

00381 29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA
ADAPTATIVA INDUCIDA *IN VIVO* POR RADIACIÓN
GAMMA Y SU RELACIÓN CON LA SENSIBILIDAD
A LA INDUCCIÓN DE DAÑO EN EL ADN Y CON LA
CAPACIDAD DE REPARACIÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

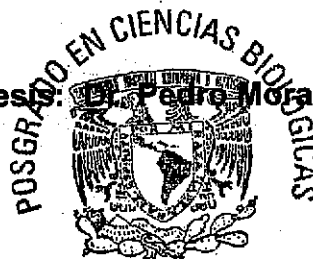
P R E S E N T A

M. en C. María Teresa Mendiola Cruz

Director de Tesis: Dr. Pedro Morales Ramírez

México, D. F.

Junio, 2002



COORDINACIÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES Y ENSEÑANZA DE LA QUÍMICA

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
SECRETARÍA DE ECONOMÍA
SECRETARÍA DE ENERGÍA
SECRETARÍA DE SALUD
SECRETARÍA DE TRABAJO Y PREVISIÓN SOCIAL
SECRETARÍA DE FOMENTO ECONÓMICO Y COMERCIO EXTERIOR
SECRETARÍA DE INDUSTRIA Y ENERGÍA
SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y ENERGÍA
SECRETARÍA DE TURISMO

01234

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES Y ENSEÑANZA DE LA QUÍMICA
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
SECRETARÍA DE ECONOMÍA
SECRETARÍA DE ENERGÍA
SECRETARÍA DE SALUD
SECRETARÍA DE TRABAJO Y PREVISIÓN SOCIAL
SECRETARÍA DE FOMENTO ECONÓMICO Y COMERCIO EXTERIOR
SECRETARÍA DE INDUSTRIA Y ENERGÍA
SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y ENERGÍA
SECRETARÍA DE TURISMO



MEXICANOS



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 29 de abril de 2002, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado del Doctorado en Ciencias del alumno(a) María Teresa Mendiola Cruz, con número de cuenta 82540092 y número de expediente 74330, con la tesis titulada: **"Determinación de la respuesta adaptativa inducida in viv por radiación gamma y su relación con la sensibilidad a la inducción de daño en el ADN y con la capacidad de reparación."**, bajo la dirección del (la) Dr. Pedro R. Morales Ramírez.

Presidente:	Dra. Judith Isabel Guzmán Rincón
Vocal:	Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano
Vocal:	Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo
Vocal:	Dra. Rosario Rodríguez Amaiz
Secretario:	Dr. Pedro Rosendo Morales Ramírez
Suplente:	Dr. José Miguel Betancourt Rule
Suplente:	Dra. Regina Dorinda Montero Montoya

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 6 de junio de 2002


Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

AGRADECIMIENTOS

Con profundo agradecimiento al Dr. Pedro Morales Ramírez, por la excelente dirección de este trabajo, por el apoyo que me ha brindado en todo momento, por el entusiasmo que siempre me ha manifestado y por su gran dedicación e interés en la ciencia.

Especialmente por compartir conmigo sus conocimientos durante todo el trayecto de mi formación profesional.

Gracias por confiar en mi.

Manifiesto mi más sincero agradecimiento a los miembros del jurado,

Dr. Pedro Rosendo Morales Ramírez

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Dra. Judith Isabel Guzmán Rincón

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz

Dra. Regina Dorinda Montero Montoya

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Por sus finas atenciones y por su interés para enriquecer esta tesis con sus correcciones y sugerencias.

Un especial agradecimiento al Dr. Mario Altamirano Lozano, quien formó parte del Comité Tutoral y me ha dedicado parte de su tiempo.

Gracias por la disposición para ayudarme siempre, por la orientación y el apoyo que me has brindado en todo momento. Aprecio mucho tu amistad que se ha forjado con el paso del tiempo.

The first part of the paper discusses the general theory of the firm, focusing on the relationship between the firm's production function and its cost function. It is shown that the firm's cost function is derived from its production function and the prices of its inputs. The second part of the paper discusses the firm's profit function, which is derived from its cost function and the price of its output. The firm's profit function is shown to be a concave function of the firm's output, and the firm's profit-maximizing output is determined by the firm's profit function.

THE FIRM'S PRODUCTION FUNCTION

The firm's production function is a function that maps the firm's inputs into its output. It is assumed that the firm's production function is concave and increasing in its inputs.

- 1. The firm's production function is concave and increasing in its inputs.
- 2. The firm's production function is homogeneous of degree one in its inputs.
- 3. The firm's production function is separable in its inputs.
- 4. The firm's production function is strictly concave in its inputs.
- 5. The firm's production function is strictly increasing in its inputs.

The firm's cost function is a function that maps the firm's output into its cost. It is assumed that the firm's cost function is convex and increasing in its output. The firm's cost function is derived from its production function and the prices of its inputs.

The firm's profit function is a function that maps the firm's output into its profit. It is assumed that the firm's profit function is concave and increasing in its output. The firm's profit function is derived from its cost function and the price of its output. The firm's profit-maximizing output is determined by the firm's profit function.

Agradezco al Dr. Emilio Rojas Del Castillo su participación en el Comité Tutorial hasta donde le fue posible, así como sus comentarios y su disposición para apoyarme.

Agradezco especialmente la colaboración y el apoyo de mis compañeros del laboratorio, Regina Rodríguez, Tere Vallarino, Vicky Cruz y Francisco González.

El apoyo técnico de mis compañeros Felipe Beltrán, Perfecto Aguilar, Angel Reyes y Miguel Angel García fue fundamental durante el desarrollo de este trabajo. Les agradezco su disposición para ayudarme.

Agradezco al personal del Departamento de Metrología del ININ las facilidades brindadas para la irradiación de los organismos. Especialmente al Dr. Víctor Tovar, al Fís. Francisco Vergara, y a los técnicos Jaime Ayala, Francisco Martínez y Luis Bribiesca. Muchas gracias por las horas de trabajo que le dedicaron a mis experimentos, por la paciencia y el apoyo que me dieron en todo momento.

Agradezco a las autoridades del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares las facilidades brindadas para la realización de mis estudios de doctorado y para el desarrollo e impresión de este trabajo de investigación.

Agradezco al CONACyT por el apoyo económico otorgado mediante una beca durante el período 1998 – 2001.

El trabajo de investigación del proyecto 3331P-N9607 apoyado por el CONACyT, culminó en esta tesis.

Igualmente agradezco la ayuda brindada por PAEP durante el desarrollo de este proyecto.

Agradezco a la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias (UNAM) por el apoyo facilitado para la impresión de esta tesis.

... ..
... ..
... ..

... ..
... ..

... ..
... ..

... ..
... ..
... ..
... ..

... ..
... ..

... ..
... ..
... ..

... ..
... ..

... ..
... ..

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo con profundo amor, agradecimiento y respeto

A mis padres

**Por darme todo su cariño y su apoyo incondicional para seguir adelante.
Por sus grandes enseñanzas, sobre todo para no rendirme en el camino y
alcanzar la meta por lejana que parezca.
Por el gran optimismo que siempre me contagian.**

Los amo y admiro verdaderamente.

Mil gracias.

A mis queridos hijos

Aldo e Iván

**Porque son una gran motivación para mí en todos sentidos.
Porque me han dado la felicidad de ser madre y han enriquecido mi vida con su
existencia.**

Porque a través de su inocencia puedo ver el mundo de otro modo.

Porque con ustedes puedo disfrutar de las cosas más valiosas.

Gracias por contagiarme su alegría de vivir.

Los amo eternamente...

1910

...

...

...

...

...

...

...

...

...

A Roberto

Con todo mi amor

Por ser un hombre tan especial que me ha brindado su mano.
Gracias por el gran apoyo y la solidaridad que me has manifestado en todo
momento.

Gracias por compartir tu vida y tus sueños conmigo.

A mis queridos hermanos

Roberto, Oscar y María Luisa, Sergio y Laura

Con profundo cariño

Por todas las experiencias que hemos compartido.
Gracias por su apoyo, su cariño y sus palabras de aliento en momentos difíciles.

A mis sobrinas

Dany y July

Con mucho cariño

Porque han alegrado mi vida.

A la memoria de mi Abuelita Carmen

A quien siempre le tuve un cariño muy especial.

1910

Received of the Treasurer of the
Board of Education the sum of
\$100.00 for the year ending
June 30, 1910.

Wm. H. ...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

A mis entrañables amigas Lorena y Miriam

Porque su amistad ha dejado huella en mi vida.
Gracias por el cariño que siempre me han tenido.

Que afortunada soy por haberlas conocido.

A todos mis amigos del ININ

Que de una manera u otra me han ayudado en la realización de este trabajo y que
comparten conmigo la alegría de ver su culminación.

Muchas gracias.

A todos mis familiares y amigos

Gracias por su cariño y amistad.

1840. 1840. 1840. 1840. 1840.

1840. 1840. 1840. 1840. 1840.

1840. 1840. 1840. 1840. 1840.

1840. 1840. 1840. 1840. 1840.

1840. 1840. 1840. 1840. 1840.

1840. 1840. 1840. 1840. 1840.

1840. 1840. 1840. 1840. 1840.

CONTENIDO

Abreviaturas	1
1. Resumen	3
1. Abstract	4
2. Introducción	5
2.1. Daño Inducido por Radiación Ionizante	5
2.2. Respuesta Adaptativa	8
2.2.1. Antecedentes	9
2.3. Indices para la Evaluación de la Respuesta Adaptativa	10
2.3.1. Aberraciones Cromosómicas	10
2.3.2. Intercambios entre Cromátidas Hermanas	11
2.3.3. Micronúcleos	12
2.3.4. Mutaciones	12
2.3.5. Supervivencia Celular y Síntesis de ADN	13
2.4. Algunos Datos Contradictorios sobre la Respuesta Adaptativa	14
2.5. Inducción de la Respuesta Adaptativa en las Diferentes Etapas del Ciclo Celular	15
2.6. Respuesta Adaptativa Cruzada	17
2.7. Posibles Causas de la Respuesta Adaptativa	18
2.7.1. Inducción de Mecanismos de Reparación	18
2.7.2. Inducción de Sistemas Desintoxicantes de Radicales Libres	24
2.7.3. Inducción de Apoptosis	25
3. Objetivos	27
3.1. Objetivo General	27
3.2. Objetivos Particulares	27
4. Materiales y Métodos	28
4.1. Protocolo Experimental para la Evaluación del Daño, la Reparación y la Inducción de Respuesta Adaptativa	

<i>in vivo</i> por Radiación Gamma	28
4.1.1 Daño y Cinética de Reparación	28
4.1.2 Respuesta Adaptativa	28
4.2. Reactivos	29
4.3. Animales	29
4.4. Irradiación	30
4.5. Determinación de Células con Daño en el ADN	30
4.5.1. Toma de Muestras	31
4.5.2. Preparación de Laminillas	31
4.5.3. Electroforesis, Tinción y Almacenamiento	32
4.5.4. Evaluación del daño en el ADN	33
5. Resultados	34
5.1 Estandarización de las Condiciones Experimentales para el Uso de la Técnica de Electroforesis Unicelular en Gel	34
5.2 Cinética de Reparación del Daño Inducido por Radiación Gamma	36
5.3 Respuesta Adaptativa Inducida por Radiación Gamma Evaluada en Función de la Cinética de Reparación	55
6. Discusión	65
6.1 Modelo Experimental	65
6.2 Cinética de Reparación del Daño Inducido por Radiación Gamma	66
6.3 Respuesta Adaptativa	71
7. Conclusiones	76
8. Apéndice	78
9. Referencias	81

ABREVIATURAS

3-AB	3-aminobenzamida
ABC	Area bajo la curva
AC	Aberraciones cromosómicas
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADPc	Adenosin difosfato ciclico
AMPc	Adenosin monofosfato ciclico
APE-1	Endonucleasa apurínica/apirimidínica
APFB	Agarosa de punto de fusión bajo
APFN	Agarosa de punto de fusión normal
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
BrEt	Bromuro de etidio
¹⁴ C	Carbono 14
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
¹³⁷ Cs	Cesio 137
DMSO	Dimetil sulfóxido
d.e	Desviación estándar
EDTA	Acido etilendiamino tetra acético
EUG	Electroforesis unicelular en gel

Gy	Gray. Unidad de dosis de radiación (Energía absorbida por unidad de masa). Equivalente a 100 rads
HBSS	Solución salina balanceada de Hank
³ H	Tritio
³ HdT	Timidina tritiada
ICH	Intercambio en las cromátidas hermanas
mA	mili Amperes
MMC	Mitomicina C
MN	Micronúcleos
MN-EPC	Micronúcleos en eritrocitos policromáticos
MT	Metalotioneina
NLS	N-lauril sarcosin
³² P	Fósforo 32
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PKC	Proteína cinasa C
RA	Respuesta adaptativa
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13 acetato
TMB-8	N-N dietilamino-octil-3,4,5-trimetoxibenzoato
SOD	Superóxido dismutasa
UV	Ultra violeta

1. RESUMEN

En este trabajo se determinó la cinética de reparación del daño provocado por diferentes dosis de radiación gamma, así como la inducción de la respuesta adaptativa temprana causada por el mismo tipo de radiación en leucocitos de ratón *in vivo*. La cinética se estableció después de la exposición a 0.5, 1.0 ó 2.0 Gy de ^{137}Cs . Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de la cola de los ratones, se analizó el porcentaje de células dañadas y la migración del ADN en cada uno de ellos mediante la técnica de electroforesis unicelular en gel (EUG) o ensayo cometa. Los resultados indicaron que las dosis de 1.0 y 2.0 Gy ocasionaron aproximadamente un 75% de cometas en el tiempo inmediato posterior a la exposición, este porcentaje se redujo a 22% y 42% respectivamente, durante los primeros 15 minutos. Esto evidencia la presencia de un proceso de reparación rápido y sugiere que los leucocitos están genéticamente bien preparados para reparar este tipo de daño. Después de los 15 minutos se detectó un segundo incremento en el porcentaje de células dañadas, que resultó proporcional a la dosis. Esta elevación puede deberse a las rupturas producidas durante la reparación de otro tipo de lesiones. Posteriormente se observó una segunda reducción llegando a valores próximos a los basales, excepto con la dosis de 2.0 Gy. La cinética con la dosis de 0.5 Gy fue similar a la establecida con 1.0 Gy, con la única diferencia de que el daño inicial fue aproximadamente 50% menor.

Además se estimó la inducción de respuesta adaptativa por la exposición de los ratones a una dosis de adaptación de 0.01 Gy y a una dosis de reto de 1.0 Gy 60 minutos después. Se encontró que el pretratamiento redujo a un tercio aproximadamente el porcentaje de células dañadas originado por la dosis de reto, así como también disminuyó este parámetro durante el proceso de reparación tardía. Esto indica que la respuesta adaptativa temprana es causada, más que por el incremento en la reparación, por la inducción de algún proceso que protege al ADN del daño provocado por la radiación, *i.e.*, la síntesis de sustancias que incrementan la captura de radicales libres.

1. ABSTRACT

The kinetics of damage induction and repair at different doses as well as the adaptive response induced by gamma ray exposure were determined in murine leukocytes *in vivo*. The damage-repair kinetics were established after the exposure to 0.5, 1.0 or 2.0 Gy in a ^{137}Cs source. Peripheral blood samples were obtained from the tails of mice, the percentage of damaged cells and the DNA migration in each one were analyzed by the single cell gel electrophoresis (SCG) technique or comet assay. Results indicated that there was an induction of approximately 75% comets with the doses of 1.0 and 2.0 Gy, which was considerably reduced to 22% and 42% respectively during the first 15 minutes. This evidences the presence of a rapid repair process and suggests that leucocytes are genetically well prepared to repair this kind of damage. After 15 minutes, a second increase in the percentage of damaged cells that was proportional to dose occurred, which seems to represent the breaks produced during the repair of other kind of lesions. After that a second reduction was observed, reaching values near to the basal ones, except with the dose of 2.0 Gy. The kinetics obtained with the dose of 0.5 Gy was similar to that established with 1.0 Gy, but in this case the initial damage was 50 % lower.

Besides, the adaptive response was observed after the exposure of the mice to an adaptive dose of 0.01 Gy and to a challenge dose of 1.0 Gy 60 minutes later. The pretreatment reduced the percentage of damaged cells caused by the challenge dose to one third approximately, and also diminished this parameter produced during the late repair process. This indicates that the early adaptive response is caused, instead of by an increment in repair, by the induction of a process that protects DNA from damage induction by radiation, *i.e* synthesis of substances that increase the scavenging of free radicals.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Daño Inducido por Radiación Ionizante.

Cuando la radiación ionizante pasa a través de la materia viva, los fotones interactúan primero con los átomos liberando electrones de los orbitales, éstos viajan ionizando y excitando a otros átomos. La ionización implica la remoción o adición completa de un electrón orbital, mientras que la excitación es el desplazamiento de un electrón a niveles más altos de energía. Ambos procesos causan efectos biológicos, aunque la ionización es más importante (Selman, 1983).

Se ha descrito que la radiación ionizante desencadena una serie de reacciones en menos de 10^{-6} segundos, las que involucran cambios químicos en todas las moléculas de la célula.

El daño inducido en el ADN por radiación se puede deber al efecto directo o al indirecto (diagrama 1) (von Sonntag, 1987). En el primer caso la energía se deposita en el ADN, ionizando directamente a sus componentes, con lo cual se producen alteraciones estructurales que dan origen a mutaciones, rupturas cromosómicas y/o distribución atípica de los cromosomas durante la mitosis. En el segundo caso el daño es causado por las especies reactivas producidas por la ionización de otras moléculas circundantes. La mayor parte del efecto indirecto proviene de los radicales libres que se originan por la ionización del agua, esto debido a que el agua constituye un porcentaje muy alto de los seres vivos. Los radicales libres son átomos o moléculas que tienen electrones no apareados en la capa de valencia más externa, por lo que pueden oxidar o reducir a otras moléculas biológicas. Los radicales libres más reactivos son: OH^* , HO_2^* , O_2^* y H^* , los tres primeros son oxidantes y el último es reductor. Debido a su alta velocidad de reacción tienen vida media corta (entre 10^{-12} y 10^{-10} segundos), pero dada la posibilidad de dispersarse (hasta 3.2 nm) pueden producir su efecto también en sitios diferentes al de su origen (Troll y Weisner, 1985).

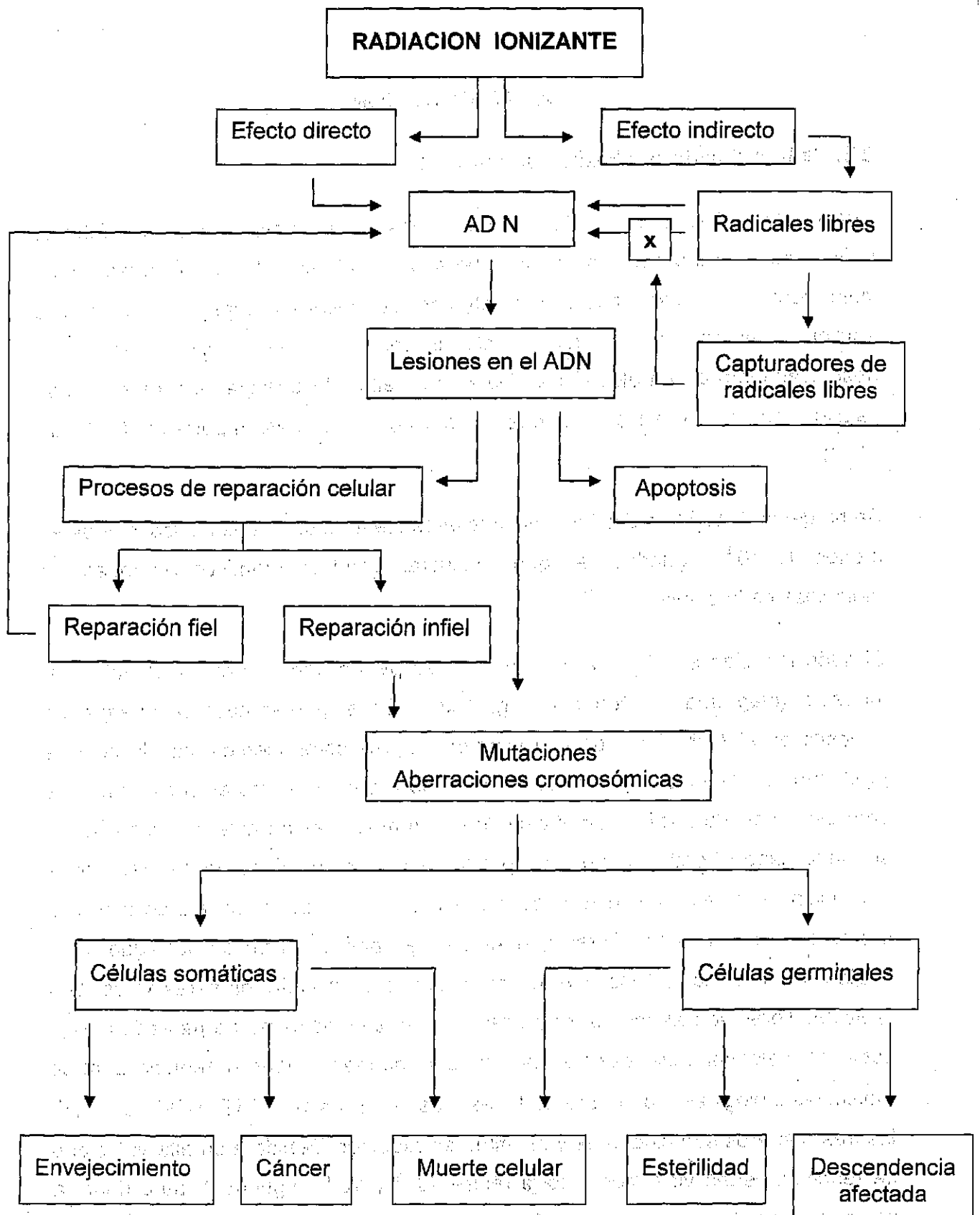


Diagrama 1. Efectos de la radiación ionizante sobre el ADN.

Los radicales libres producidos por la radiólisis del agua se combinan fácilmente con el oxígeno, con moléculas orgánicas y también reaccionan entre sí dando origen a otros radicales igualmente tóxicos para la célula (Pryor, 1986). Estas entidades altamente reactivas se combinan con los componentes del ADN, alterando su estructura mediante la ruptura de puentes químicos provocando serios trastornos.

Cuando la radiación incide sobre el ADN, tanto por la vía directa como por la indirecta, se generan varios tipos de lesiones como son: rupturas de cadena sencilla y doble, rompimientos en los puentes de hidrógeno, cambios en el esqueleto azúcar fosfato, formación de enlaces cruzados ADN-ADN o ADN-proteína, sitios lábiles al álcali y daño en las bases nitrogenadas (cuadro 1) (Sasaki y Okada, 1984; Teoule, 1987; Hagen, 1986; Ward, 1988). Todas estas alteraciones impiden que el ADN funcione adecuadamente tanto en la síntesis como en la transcripción y además traen como consecuencia la producción de aberraciones cromosómicas y/o mutaciones génicas.

Cuadro 1. Número de lesiones por célula por Gray

Lesión	Cantidad
Rupturas de cadena sencilla	1000
Rupturas de cadena doble	40
8-Hidroxiadenina	700
T * (Daño en las timinas)	250
Enlaces cruzados ADN-proteína	150

(Ward, 1988.)

Los daños inducidos en el ADN son susceptibles de ser corregidos por alguno de los mecanismos intrínsecos de reparación celular, los cuales pueden operar permitiendo la recuperación de la secuencia original y manteniendo la estructura de la molécula, o bien eliminando la lesión pero produciendo alguna alteración en la secuencia de los nucleótidos (Price, 1993). En el segundo caso, la mutación desencadena procesos relacionados con el cáncer y el envejecimiento prematuro en células somáticas principalmente, o produce esterilidad o descendencia afectada cuando se dañan las células germinales. En algunas ocasiones dichas mutaciones pueden causar la muerte celular (Brusick, 1987). Las células también poseen sistemas de protección contra los radicales libres que se producen por el efecto indirecto de la radiación, por ejemplo la remoción de especies reactivas de oxígeno mediante enzimas antioxidantes incluyendo la superóxido dismutasa, las catalasas y peroxidasas particularmente la glutatión peroxidasa (Bravard y col., 1999). Asimismo algunas vitaminas como el ascorbato o el α -tocoferol, se incorporan en estructuras vulnerables y atrapan radicales secundarios del oxígeno evitando sus efectos nocivos (Riley, 1994). Cuando las células son irradiadas en presencia de alguno de estos agentes, ya sea de origen endógeno o exógeno, éstas son más resistentes al efecto indirecto de la radiación, sufren menos cambios moleculares y tienen mayor posibilidad de sobrevivir (Wardman y col., 1994).

2.2 Respuesta Adaptativa

La respuesta adaptativa es un fenómeno que se presenta cuando la exposición a dosis bajas de algún agente físico o químico, confiere determinada resistencia a las células, frente al efecto genotóxico de la exposición posterior a dosis más altas del mismo agente o de otro que daña al ADN.

2.2.1 Antecedentes.

La primera evidencia de la respuesta adaptativa se obtuvo con agentes alquilantes en *E. coli*; se reportó que la resistencia a dosis altas de estos agentes, se debía a la inducción de un mecanismo de reparación libre de error (Jeggo y col., 1977; Samson y Cairns, 1977). Más tarde, también se detectó una respuesta similar en varios tipos celulares de mamíferos (Samson y Schwartz, 1980; Montesano y col., 1982).

La respuesta adaptativa inducida por radiación ionizante, se comenzó a estudiar en linfocitos humanos que habían incorporado timidina tritiada (^3HdT) en su ADN, después de tres días al ser expuestas a dosis de 1.5 Gy de rayos X, se observó que la cantidad de aberraciones cromosómicas que se indujeron fue 50% menor que en las células que no habían incorporado el isótopo (Olivieri y col., 1984; Wiencke y col., 1986). Posteriormente se experimentó aplicando tratamientos agudos con dosis bajas de radiación en linfocitos humanos y se detectó que cuando las células se exponían a dosis tan bajas como 0.01 Gy de rayos X, el daño citogenético causado por la exposición posterior a 1.5 Gy disminuía (Shadley y col., 1987). Otros trabajos realizados también en linfocitos humanos estimulados *in vitro*, confirmaron la inducción de respuesta adaptativa, tanto con la pre-exposición a timidina marcada con diferentes radioisótopos como ^3H , ^{14}C y ^{32}P , como con una dosis de 0.05 Gy de rayos X. En dicho estudio la frecuencia de aberraciones cromosómicas fue menor en las células que recibieron la dosis baja (de adaptación) previa a la dosis alta (de reto), comparada en términos del efecto aditivo que podrían tener ambas dosis por separado. Sin embargo, esta reducción en el número de aberraciones cromosómicas, varió entre las muestras de los distintos donadores (Sankaranarayanan y col., 1989).

Desde entonces, se han hecho una gran cantidad de experimentos al respecto, utilizando diversos tipos celulares, tales como: células V79 de criceto chino (Ikushima, 1987), médula ósea de ratón (Cai y Liu, 1990; Morales-Ramírez y Cruz-Vallejo, 1996), células de bazo (Wojcik y Tuschl, 1990), linfocitos humanos,

de bovino y de conejo (Shadley y Wolff, 1987; Bosi y Olivieri, 1989; Youngblom y col., 1989; Cai y Liu, 1992; Vijayalaxmi y col., 1995; Flores y col., 1996; Wojcik y col., 1996), fibroblastos humanos (Belyaev y col., 1996) células germinales de ratón (Cai y Liu, 1990; Cai y col., 1993; Cai y Wang, 1995; Zhang y col., 1998) y eritrocitos policromáticos de sangre periférica de ratón (Morales-Ramírez y col., 1997). También se han empleado células vegetales (Cortés y col., 1990) y algunas líneas de células cancerosas, como hepatomas (Seong y Kim, 1994), melanomas (Kim y col., 1996), adenocarcinomas (Sadekova y col., 1997), leucemia mieloide y linfomas (Mitchel y col., 1999; Park y col., 1999). Aunque en la mayor parte de estos trabajos se ha encontrado respuesta adaptativa, algunos resultados han sido negativos al respecto.

Se han diseñado diversos protocolos para estudiar la respuesta adaptativa en las células mencionadas, las dosis de adaptación con radiación ionizante van desde 0.005 Gy hasta 0.5 Gy y las dosis de reto se aplican en un rango de 1.0 a 5.0 Gy. El intervalo entre una dosis y otra varía entre los protocolos y la mayoría de los modelos experimentales se han realizado *in vitro*, aunque también algunos se han hecho *in vivo*.

2.3 Índices para la Evaluación de la Respuesta Adaptativa.

2.3.1 Aberraciones Cromosómicas (AC).

Se ha observado inducción de respuesta adaptativa cuando linfocitos humanos son expuestos a una fuente de ^{60}Co en un rango de 0.01 a 0.2 Gy, ya que al ser posteriormente irradiados con una dosis de reto de 1.0 Gy, se obtuvo un 54% menos de AC en comparación con las células que no se trataron con la dosis de adaptación. La dosis de 0.005 Gy no indujo respuesta, pero produjo un efecto similar al de la dosis de 0.01 Gy cuando se repitió la exposición en el mismo ciclo celular. Sin embargo, un doble tratamiento con 0.01 Gy, durante el mismo ciclo no causó efecto adicional (Bai y Chen, 1993). Datos similares ya habían sido

reportado por Fan y col. en 1990, quienes sugirieron la presencia de un mecanismo de reparación inducible por dosis bajas de radiación.

Se ha estudiado la inducción de respuesta adaptativa con radiación gamma, en linfocitos humanos trisómicos (47, XX o XY, +21). La frecuencia de aberraciones cromosómicas inducida por dosis altas, fue considerablemente menor en los linfocitos de donadores normales que fueron pre-expuestos a dosis bajas de radiación X en comparación con los que no recibieron el pretratamiento, mientras que en los linfocitos obtenidos de donadores con trisomía 21 no se detectaron diferencias (Kalina y col., 1994). Para analizar el control genético sobre la inducción de la respuesta adaptativa, se han comparado las frecuencias de aberraciones cromosómicas en pares de gemelos monocigóticos, dicigóticos e individuos no relacionados. La variabilidad de la respuesta fue menor entre los gemelos monocigóticos que entre los dicigóticos y los no relacionados. Se ha considerado que la heterogeneidad de la respuesta está determinada genéticamente en gran parte (Kalina y col., 1997).

2.3.2. Intercambios en las Cromátidas Hermanas (ICH).

En células V79 expuestas en forma crónica a dosis bajas de radiación β proveniente de la timidina tritiada incorporada en el ADN, se detectó menor inducción de ICH por la exposición posterior a dosis agudas de rayos gamma. Esta respuesta adaptativa fue suprimida cuando se administró 3-aminobenzamida antes de la dosis de reto, lo cual sugiere que la reparación puede estar involucrada en la respuesta (Ikushima, 1987). Posteriormente en la misma línea celular se detectó además que el pretratamiento de adaptación con timidina tritiada también redujo considerablemente la frecuencia de ICH inducida con dosis altas de UV cercano y Mitomicina C (MMC). El período necesario para la expresión de esta respuesta fue de 4 h (Ikushima, 1989). También se ha descrito que la exposición aguda o crónica de linfocitos humanos a dosis bajas de rayos X, propicia una menor inducción de ICH por la exposición posterior a MMC (Moquet,

1989). Asimismo, el pretratamiento de las células de la médula ósea de ratón *in vivo* con radiación gamma, causó una reducción en la frecuencia esperada de ICH con MMC (Morales-Ramírez y Cruz-Vallejo, 1996).

2.3.3 Micronúcleos (MN).

Otro de los indicadores de daño citogenético que se ha utilizado ampliamente en el estudio de la respuesta adaptativa es la frecuencia de micronúcleos (MN). En ratones expuestos *in vivo* a dosis baja de radiación gamma antes de la de reto, la frecuencia de MN inducida es significativamente menor que la obtenida en los organismos que no recibieron el tratamiento adaptativo. El intervalo óptimo para la inducción de la respuesta fue de 2 h, conforme el intervalo aumentó fue necesario reducir la exposición de adaptación para obtener el mismo resultado (Farooqui y Kesavan, 1993). Datos similares se han obtenido *in vitro* con linfocitos de individuos sanos de cualquier sexo, que se encuentren entre los 25 y 55 años de edad (Venkat y col., 1996).

Para establecer si la exposición ocupacional induce respuesta adaptativa, se ha analizado la frecuencia de MN producida por 1.0 y 2.0 Gy de radiación gamma, en los linfocitos obtenidos del personal relacionado con el manejo de fuentes radiactivas en medicina. A pesar de que la frecuencia basal de MN en los linfocitos de los trabajadores es mayor que en los individuos testigo, la exposición *in vitro* a las dosis de reto, produjo frecuencias de MN significativamente menores en los linfocitos del personal expuesto a radiación. Estos datos confirman que la exposición crónica a dosis bajas causa respuesta adaptativa, la cual puede deberse a una menor cantidad de daño inicial y/o a la estimulación de mecanismos de reparación del ADN (Gourabi y Mozdarani, 1998).

2.3.4 Mutaciones.

Las mutaciones son otro índice que también se utiliza para evaluar la inducción de respuesta adaptativa. En espermatogonias y espermatocitos de ratones

pretratados con 0.05 Gy de rayos X, se observó que la frecuencia de mutaciones letales dominantes fue menor que la esperada por la exposición a 2.0 Gy (Cai y col., 1993). Asimismo, se reportó que cuando las células SR-1, derivadas de carcinoma mamario de ratón y células T de leucemia humana, se expusieron a 0.01 Gy de radiación gamma previo a la exposición con 3.0 Gy, la frecuencia de mutaciones en el locus HPRT se redujo significativamente. El análisis por "Southern blot" mostró que el 47% de las mutaciones inducidas por la dosis de reto fueron deleciones y rearrreglos. Este porcentaje disminuyó a 28% en las células adaptadas, el cual resultó cercano al nivel basal de 22%. Esta respuesta se atribuyó a la estimulación de un mecanismo de reparación de doble cadena del ADN (Zhou y col., 1993, 1994).

2.3.5 Supervivencia Celular y Síntesis de ADN.

La viabilidad celular y la inhibición de la síntesis de ADN también se han utilizado para estudiar la respuesta adaptativa. En las células V79 de criceto chino, la pre-exposición a 0.05 Gy aumenta la supervivencia celular frente a la exposición a 4.0 Gy. Asimismo, la síntesis de ADN se reduce menos en las células expuestas a la dosis de adaptación. La inducción de esta respuesta se asoció a la transducción de señales mediante la proteína cinasa C, ya que un inhibidor de esta enzima bloqueó la respuesta (Ibuki y Goto, 1994). Resultados similares se han reportado en células de melanoma humano, en las que además se apreciaron cambios significativos en la biosíntesis de proteínas, tanto nucleares como de membrana (Kim y col., 1996).

Una característica común de los parámetros mencionados, es la necesidad de que transcurra por lo menos un ciclo celular para que se puedan detectar, lo cual impide el estudio de los procesos que se desencadenan inmediatamente después de la exposición a la dosis de adaptación.

2.4 Algunos Datos Contradictorios sobre la Respuesta Adaptativa.

La mayoría de los trabajos enfocados hacia el estudio de la respuesta adaptativa, han reportado resultados que apoyan la existencia de este fenómeno. Sin embargo, existen algunos datos negativos en linfocitos humanos expuestos a rayos X bajo diferentes condiciones experimentales (Bauchinger y col., 1989; Schmid y col., 1989; Wojcik y Streffer, 1995). Asimismo, en linfocitos obtenidos de niños expuestos crónicamente a emisiones de ^{137}Cs , como consecuencia del accidente de Chernobyl, no se observó disminución en la producción de aberraciones cromosómicas, cuando se expusieron a dosis de reto del mismo agente (Padovani y col., 1995). No obstante, en muestras tomadas de los mismos donadores del experimento anterior, se notó una frecuencia baja de aberraciones cromosómicas después del tratamiento *in vitro* con bleomicina, que es un agente químico radiomimético (Tedeschi y col., 1995). Esto sólo se observó en los niños que presentaban contaminación interna, por la presencia de ^{137}Cs en la sangre al momento de tomar la muestra, lo cual indica que la exposición continua induce la respuesta adaptativa (Tedeschi y col., 1996). Las diferencias obtenidas se explicaron con base en los distintos mecanismos de inducción de daño y reparación del ADN que pudieran operar para cada agente. En otro trabajo realizado en ratones BALB/c *in vivo*, también se mostró que el pretratamiento con una dosis baja de radiación ionizante, no protege contra la inducción total de micronúcleos en eritrocitos policromáticos por la dosis de reto y tampoco hubo cambio en la cinética de producción de este parámetro (Morales-Ramírez y col., 1997).

En algunas células neoplásicas de diferente origen, principalmente de linfomas humanos, no se ha observado inducción de respuesta adaptativa, evaluando la viabilidad celular y la síntesis de ADN. La respuesta adaptativa sólo se detectó en las células normales, lo cual indica que en este tipo de células cancerosas pueden estar alterados los mecanismos que participan en la inducción de la adaptación (Park y col., 1999).

Otros autores han descrito que en linfocitos humanos expuestos a la dosis de adaptación en G_1 temprana o en S y a la de reto en G_1 , S o G_2 , no se encontró respuesta adaptativa, evaluada por la cantidad de aberraciones cromosómicas. Incluso en las muestras que se expusieron a la dosis de reto en G_2 , se detectó un efecto sinérgico entre ambas exposiciones (Hain y col., 1992). Datos similares fueron obtenidos por Andersson y Chiangmai (1992) en células de criceto chino expuestas a rayos X, timidina tritiada o neutrones. Ningún pretratamiento de acondicionamiento fue capaz de disparar una respuesta celular que se expresara como reducción de aberraciones cromosómicas por la exposición subsecuente a la dosis de reto. Incluso algunas dosis de acondicionamiento que produjeron un ligero aumento en la frecuencia de aberraciones, dieron lugar a efecto sinérgico al combinarse con la dosis de reto. Se propuso que dichas células en cultivo han perdido la capacidad de inducir las enzimas responsables de la respuesta adaptativa.

2.5 Inducción de la Respuesta Adaptativa en las Diferentes Etapas del Ciclo Celular.

En algunos experimentos se ha demostrado que la inducción de la respuesta adaptativa, depende en parte de la etapa del ciclo en la que se encuentran las células al momento de la exposición tanto a la dosis de adaptación como a la de reto. También depende de la dosis total recibida y de la razón de dosis de irradiación (Shadley y col., 1987). Se ha observado que la respuesta adaptativa se puede causar al suministrar la dosis baja de rayos X durante la fase S del ciclo celular. Para determinar si es posible producir dicha respuesta en otras etapas del ciclo, se han irradiado linfocitos humanos con 0.01 o 0.05 Gy antes de la estimulación con fitohemaglutinina, es decir en G_0 , o con 0.01 Gy en diferentes tiempos después de la estimulación (en G_1) y con 1.5 Gy como dosis de reto (en G_2). Aunque los linfocitos adaptados en G_0 no mostraron respuesta adaptativa, las células irradiadas en G_1 4 h después de la estimulación respondieron positivamente. Se ha determinado que la respuesta persiste aún después de tres

ciclos de división celular (Shadley y col., 1987). Con relación a la posibilidad de inducir la respuesta en linfocitos no estimulados, Tuschl y col. (1983) observaron un incremento en la síntesis no programada de ADN y una disminución en la frecuencia de intercambios en las cromátidas hermanas en linfocitos tratados con radiación UV, obtenidos de trabajadores expuestos a dosis bajas de radiación. Posteriormente, se detectó inducción de respuesta adaptativa en linfocitos adaptados en G_0 , analizando la supervivencia celular, la frecuencia de mutaciones (Sanderson y Morley, 1986) y la de aberraciones cromosómicas (Cai y Liu, 1990). También se ha reportado que cuando los linfocitos se someten a dosis bajas de rayos X o de H_2O_2 en G_0 , presentan una frecuencia de micronúcleos menor al exponerse a la dosis de reto de rayos X. Esta respuesta se indujo solamente utilizando una razón de dosis igual a 0.01 Gy/min, ya que con 0.1 o 0.2 Gy/min no se observó buen resultado (Cortés y col., 1994). Otros autores han experimentado con diferentes esquemas de irradiación en varias etapas del ciclo celular, para determinar cuales son críticas en la inducción de la respuesta. Se expusieron linfocitos de donadores sanos a la dosis de adaptación en G_0 , G_1 o G_1/S y subsecuentemente a la de reto en G_1 , G_1/S , S o G_2 . Los datos indicaron que la acción de la dosis de adaptación se manifestó solo con el esquema de exposición a la dosis reto en S o G_2 , no obstante en G_2 se obtuvo un efecto más pronunciado, independientemente de la etapa en la que se haya suministrado la dosis de adaptación (Ryabchenko y col., 1998). Shadley y col. (1987) ya habían determinado que G_2 era la etapa más indicada para aplicar la dosis de reto, aunque a diferencia del trabajo de Ryabchenko y col. (1998), establecieron que las células adaptadas en G_1 mostraron una respuesta mayor. Como se puede apreciar, los resultados son contradictorios en cuanto a los períodos del ciclo celular en los que hay una mayor inducción de la respuesta adaptativa. Se ha argumentado que la falta de respuesta aplicando la dosis de adaptación en G_0 , en comparación con la encontrada en otras etapas del ciclo, se debe a que los linfocitos en división tienen mayor capacidad de reparación que los que están en reposo (Shadley y col., 1987).

2.6 Respuesta Adaptativa "Cruzada".

Esta característica se presenta cuando la adaptación con algún agente genotóxico físico o químico induce la respuesta adaptativa frente a otro agente diferente. Tal caso se ha observado en linfocitos humanos que han sido expuestos a radiación ionizante, lo cual les confiere resistencia al tratamiento con bleomicina o MMC (Wolff y col., 1988). En células SR-1 de ratón adaptadas con dosis bajas de radiación gamma, la inducción de mutaciones en el locus HPRT por la exposición posterior a bleomicina, fue menor que en las células no adaptadas con radiación y fue similar a la que se presentó con radiación como agente de reto. La resistencia detectada tanto a bleomicina como a radiación, se atribuyó a algún mecanismo de reparación de rupturas dobles en el ADN (Zhou y col., 1993). También *in vivo* se han obtenido algunos resultados del efecto "cruzado" entre radiación y bleomicina. En linfocitos de niños expuestos a radiación ionizante y tratados posteriormente en cultivo con bleomicina, se descubrió que la frecuencia de aberraciones cromosómicas, fue menor que en los linfocitos de los niños que no recibieron radiación (Tedeschi y col., 1995). Este mismo efecto se ha observado en individuos ocupacionalmente expuestos a radiación ionizante (Barquinero y col., 1996). Igualmente, el pre-tratamiento con bajas concentraciones de bleomicina induce la respuesta adaptativa frente a subsecuentes tratamientos con dicho agente o con rayos X (Vijayalaxmi y Burkart, 1989; Wolff y col., 1989). También se ha observado que la radiación ionizante puede inducir respuesta adaptativa, frente a agentes que causan otro tipo de lesiones, como la MMC que produce principalmente monoadductos y enlaces cruzados. En linfocitos humanos, expuestos a dosis de 0.01 Gy de rayos X de manera crónica o aguda, se redujo un 10% la frecuencia de ICH inducida posteriormente por MMC (Moquet y col., 1989). En estudios consecutivos se detectó que en células V79 de criceto chino, expuestas continuamente a dosis bajas de radiación gamma, se originaron frecuencias menores de aberraciones cromosómicas y de ICH al ser subsecuentemente tratadas con MMC (Osmak y Horvat, 1992). Resultados similares ya habían sido obtenidos en linfocitos de ratón y de humano y se sugirió que la irradiación crónica causó un incremento en la capacidad de las células para

reparar las lesiones inducidas en el ADN por MMC (Tuschl y col., 1980; Wojcik y Tuschl, 1990). Además de la respuesta con MMC, también se ha detectado resistencia cruzada contra el efecto de la radiación UV B (313 nm), pero no contra el del etil metanosulfonato ni del cisplatino (Ikushima, 1989). En otro trabajo también realizado con ratones *in vivo*, se irradiaron las células de la médula ósea del fémur de una extremidad y posteriormente se trataron los ratones con MMC para comparar la inducción de ICH entre ambas extremidades. La diferencia en la frecuencia de ICH inducida por MMC entre la extremidad irradiada y la no irradiada fue de aproximadamente 30% (Morales-Ramírez y Cruz-Vallejo, 1996). De lo cual se infirió que el pretratamiento con la radiación permitió que las células respondieran más eficientemente a la exposición a MMC. Dosis bajas de H₂O₂ pueden provocar respuesta adaptativa cruzada en linfocitos de bovino y de conejo, manifestada como una reducción en la frecuencia de micronúcleos inducidos por rayos X. Con estos resultados se propuso que las rupturas de cadena sencilla son las lesiones principales que disparan la respuesta, ya que ambos agentes las producen a través de radicales hidroxilo (Flores y col., 1996).

2.7 Posibles Causas de la Respuesta Adaptativa

La respuesta adaptativa inducida por radiación se ha explicado fundamentalmente en función de las siguientes causas:

2.7.1 Inducción de Mecanismos de Reparación.

La primera evidencia directa de la inducción de los sistemas de reparación viene de los resultados obtenidos por Wiencke y col. en 1986, quienes encontraron que la polimerasa poli(ADP-ribosa), enzima involucrada en los procesos de reparación, era necesaria para disparar la respuesta adaptativa con timidina tritiada en linfocitos humanos. La inhibición de dicha enzima mediante la 3-aminobenzamida (3-AB), bloquea completamente la respuesta adaptativa, medida en función de la

frecuencia de micronúcleos en células V79 de criceto chino y por la frecuencia de mutaciones en el locus S1 de células híbridas, lo cual apoya la hipótesis de la inducción de la reparación como mecanismo responsable de la adaptación (Ikushima, 1987; Ueno y col., 1995). Se ha comprobado que la respuesta adaptativa que se induce por radiación gamma en líneas de células humanas cancerosas como hepatomas, se puede eliminar cuando se agrega la 3-AB después de la dosis de reto, en cualquiera de los protocolos experimentados. Estos datos apoyan la propuesta de que la respuesta es el resultado de la inducción de cierto mecanismo de reparación (Seong y Kim 1994; Seong y col., 1995).

Sin embargo, la hiposensibilidad a la bleomicina detectada en linfocitos humanos, expuestos *in vivo* a radiación ionizante por el accidente de Chernobyl, persistió aun en presencia de ciertos inhibidores de la reparación del ADN como 3-AB, afidicolin o 3-didesoxitimidina. Con estos resultados se propuso que la resistencia a bleomicina en niños radioexpuestos, no está relacionada con la actividad de las enzimas involucradas en la reparación (Tedeschi y col., 1995).

Dado que la respuesta adaptativa puede ser inhibida por la actinomicina D o la cicloheximida, administradas entre el período de exposición a la dosis de adaptación y a la de reto, se ha propuesto que la síntesis *de novo* de transcritos y proteínas es requerida para la expresión de esta respuesta (Youngblom, 1989; Cai y Liu, 1992; Ikushima, 1992). Durante las primeras horas después de la dosis de adaptación, se han detectado proteínas recién sintetizadas en linfocitos humanos (Wolff, 1992), en células V79 de criceto chino (Ikushima, 1992) y en células UI-Me1 de melanoma humano (Meyers y col., 1995). En este último sistema, se incrementa el nivel de transcritos específicos después de la exposición a dosis bajas, lo cual permite la supervivencia a través de la reparación del ADN. En células de bazo de ratón, se ha detectado que los inhibidores de la síntesis de proteínas o de ARN, como la cicloheximida o el 5,6-dicloro-1-beta-d-ribofuranosilbenzimidazol, administrados entre la dosis de adaptación y la de reto, evitan el incremento en la supervivencia celular de las poblaciones adaptadas y

aumenta la presencia de células apoptóticas. Estos resultados apoyan el requerimiento de la síntesis de proteínas y ARN para inducir la respuesta (Hyun y col., 1997). Dado que Boothman y col. (1993), detectaron cambios en los niveles de transcripción de ciertos genes después de la exposición a radiación ionizante, se han hecho varios experimentos para determinar si dosis bajas de rayos X que inducen adaptación, pueden causar cambios en los niveles de transcripción de los genes involucrados en la reparación del ADN. En linfocitos humanos expuestos a dosis de adaptación de 0.02 Gy de rayos X, se determinó la presencia de diferentes especies de ARNm no detectadas en el testigo, las cuales corresponden a los transcritos de los genes candidatos a estar involucrados en la reparación durante la adaptación. Algunas especies se encontraron en células testigo pero no en irradiadas, éstas podrían ser la expresión de genes supresores involucrados en la regulación de la reparación del ADN. La respuesta adaptativa podría darse por la inducción de la síntesis de nuevas enzimas o a la pérdida del supresor en las células irradiadas (Wolff, 1992, 1998). Se ha observado en células humanas que la endonucleasa apurínica/apirimidinica (APE-1), se activa por exposición a dosis bajas de especies reactivas de oxígeno o agentes que las generan, tales como la radiación ionizante. Dicha enzima está involucrada directamente en el proceso de reparación por escisión de bases. El aumento en la expresión de la APE-1 se observó en células HeLa y fibroblastos primarios, y se relacionó directamente con el incremento en la supervivencia celular frente a dosis altas de estos agentes (Ramana y col., 1998). Asimismo, se ha reportado que dosis bajas de radiación ionizante inducen la activación de la enzima proteína cinasa C (PKC), que funciona como un mediador de señales para la activación de ciertos genes involucrados en la reparación del ADN (Woloschac y col., 1990). La participación de la PKC en la respuesta adaptativa se ha visto apoyada por diversos trabajos. Un incremento en la supervivencia celular, se produjo en células V79 de criceto, como parte de la respuesta adaptativa inducida por radiación, el cual se bloqueó cuando la dosis de adaptación se realizó en presencia de H-7 que es un inhibidor de la PKC (Ibuki y Goto, 1994). Se ha detectado que la sobreexposición de células m5S de ratón, al 12-O tetradecanoilforbol-13 acetato

(TPA), que es un inhibidor de la PKC, bloquea la adaptación causada por radiación evaluada en términos de la producción de aberraciones cromosómicas y mutaciones. Sin embargo, el TPA aplicado por intervalos cortos, actúa como un activador directo de la PKC y dicho tratamiento resulta equivalente a la dosis de adaptación con el agente genotóxico; esto indica la presencia de una vía común en la inducción de adaptación a través de señales activadas por dosis bajas de radiación, de H_2O_2 y por TPA (Sasaki, 1995).

También se ha demostrado en células cultivadas de ratón, que dosis bajas de rayos X activan a la PKC e inducen su traslocación del citosol a la membrana. Las dosis más altas no inducen adaptación y disminuyen dramáticamente el nivel total de la PKC. La activación de dicha proteína y la respuesta adaptativa observada en términos de resistencia a la producción de aberraciones cromosómicas, se bloquean mediante el Calphostin C que inhibe a la PKC. Asimismo, se determinó que la dosis de adaptación activa a otra proteína cinasa conocida como p38, la cual a su vez induce una cascada de reacciones que están asociadas con la activación de la PKC. Estos resultados indican un mecanismo de regulación coordinada de la respuesta adaptativa, mediante un circuito cerrado de señales enviadas entre las proteínas de transducción (Shimizu y col., 1999).

Se han hecho algunos trabajos utilizando la técnica de electroforesis unicelular en gel (EUG) para esclarecer de que manera participa la reparación en el estímulo de la respuesta adaptativa. Sin embargo, los resultados son variados y en algunos casos contradictorios. Por ejemplo, Ikushima y col. en 1996 reportaron que la tasa de reparación de las rupturas de doble cadena fue mayor en las células adaptadas con 0.015 Gy y expuestas a 1.5 ó 5 Gy 4 h más tarde, que en las células que no se expusieron a la dosis de adaptación. Además, el daño residual después de 120 min siempre resultó menor en la población adaptada y no se detectaron diferencias significativas en el daño inicial entre ambas poblaciones. Con estos resultados se llegó a la conclusión de que las dosis bajas de radiación ionizante, incrementan la capacidad celular para reparar las rupturas en el ADN.

También en 1996 Wojcik y col. realizaron algunos experimentos con linfocitos humanos expuestos a 0.05 Gy como dosis de adaptación y 2.0 Gy como dosis de reto, con un intervalo de 5 h entre ambas. Con la técnica de EUG detectaron un menor daño inicial, así como una tasa mayor de reparación en las células preadaptadas; aunque la adaptación no se reflejó en la frecuencia de aberraciones cromosómicas ni en la tasa de proliferación celular. Analizando la distribución de los cometas por tamaño, determinaron que la diferencia en la cinética de reparación entre ambas poblaciones celulares, se debía a la presencia de una subpoblación de linfocitos con reparación más lenta, en las células no adaptadas, la cual desaparece después de la exposición a la dosis de adaptación. Se sugirió que dicha población puede ser eliminada mediante un proceso apoptótico. Se sabe que dosis bajas de radiación ionizante inducen apoptosis en linfocitos *in vitro*, y recientemente se ha sugerido que dicho proceso está asociado con la respuesta adaptativa (Boreham y col., 1995). Sin embargo, en las preparaciones de las células adaptadas, no se observaron núcleos fragmentados o picnóticos, que normalmente se detectan en células apoptóticas. Por lo tanto, dicha hipótesis requiere de mayor investigación para confirmarse (Wojcik y col., 1996).

También existen datos que indican que la respuesta adaptativa no siempre va acompañada de una reparación más rápida del ADN, evaluada en función de la frecuencia de aberraciones cromosómicas o de micronúcleos. Tal es el caso de los resultados obtenidos por Wojewodska y col. (1997), quienes trataron de establecer una relación entre la inducción de respuesta adaptativa, la cinética de reparación del ADN, la transducción de señales y la frecuencia de micronúcleos. Ellos utilizaron H₂O₂ o rayos X para inducir la adaptación, N-N dietilamino-octil-3,4,5-trimetoxibenzoato (TMB-8) como antagonista del calcio y estaurosporina como inhibidor de la PKC, para bloquear la transducción de señales. Observaron una reducción del 30% en la frecuencia de micronúcleos inducidos, con relación a la frecuencia esperada suponiendo un efecto aditivo entre las dosis de adaptación y la de reto. El tratamiento con estaurosporina o con TMB-8 bloqueó por completo la respuesta adaptativa. Sin embargo, no apreciaron diferencias en la cinética de reparación analizada por EUG, entre los linfocitos adaptados y no adaptados. Por

lo tanto, la frecuencia baja de micronúcleos en los linfocitos preadaptados no está relacionada con la tasa de reparación medida por EUG. Incluso se detectó que el daño al tiempo cero, fue estadísticamente menor en las células no adaptadas, que en las pre-expuestas a dosis bajas de rayos X o de H₂O₂. Asimismo, no se observaron diferencias en la tasa de reparación en los linfocitos incubados con estaurosporina o TMB-8. Considerando que al promediar la cantidad de daño en las células en cada tiempo, se enmascarara la presencia de subpoblaciones celulares con distintas tasas de reparación, se compararon las distribuciones de dicho parámetro, en los linfocitos expuestos a la dosis de adaptación en presencia o ausencia de estaurosporina y sin dosis de adaptación. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas en los patrones de distribución entre los diversos tratamientos a los tiempos escogidos (0, 30 y 60 min). Por lo tanto, no hay evidencia de que la adaptación se dé como resultado de la eliminación de una subpoblación con tasa de reparación más lenta, como lo habían reportado Wojcik y col. (1996). Por lo que concluyeron que el tratamiento con agentes que interfieren con la transducción de señales, bloquea la inducción de la respuesta adaptativa por dosis bajas de rayos X o peróxido de hidrógeno (Wojewodska y col., 1997).

Es probable que toda una red de señales esté interconectada dentro de una célula estresada, en la que los canales de calcio y la PKC son componentes primordiales (Wojewodska y col., 1994). En cuanto a la participación del calcio en la regulación de señales, se ha detectado que el tratamiento con el anticuerpo anti-CD38 altera las señales involucradas en la respuesta adaptativa. Se sabe que CD38 es una proteína que influye sobre la actividad del adenosín difosfato cíclico (ADPc), que a su vez es un agente liberador de calcio (Wojewodska y col., 1996). Esta observación apoya la importancia del calcio en la adaptación. Se sabe que el TPA, el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y los iones de calcio, regulan la comunicación intercelular mediante uniones estrechas (Trosko, 1991), lo cual es indispensable para la inducción de radioadaptación en las células de embriones humanos (Ishii y Watanabe, 1996).

Se ha asumido que el daño al ADN genera una señal de alarma en el núcleo, la cual es enviada al citosol y a través de una vía de transducción de señales mediada por la PKC, regresa al núcleo activando ciertos genes involucrados en la síntesis de un grupo de enzimas, que participan en la progresión del ciclo celular, la apoptosis, la replicación, la transcripción y la reparación del ADN (Ikushima y col., 1996; Szumiel y col., 1998).

2.7.2 Inducción de Sistemas Desintoxicantes de Radicales Libres.

También existen datos que apoyan la hipótesis de que la respuesta adaptativa se debe a que las dosis bajas de radiación activan algún sistema de defensa antioxidante, que incrementa la eficiencia para remover radicales tóxicos. Se ha comprobado que la exposición a dosis bajas de radiación promueve la síntesis de proteínas relacionadas con la remoción de radicales libres (Feinendegen, 1988; Laval, 1988; Yamaoka y col., 1992).

Zhang H. y col. en 1998, investigaron los efectos de la pre-exposición *in vivo* a dosis bajas de iones de oxígeno o de rayos gamma, sobre las anomalías en la cuenta espermática y en la morfología de los espermatozoides, inducidas por dosis altas del mismo agente. Estos datos se correlacionaron a su vez con el nivel de la peroxidación lipídica de membranas y con la actividad de la superóxido dismutasa (SOD). En todos los casos se observó que la dosis de adaptación incrementa la resistencia del tejido. Se propuso que el mecanismo responsable de dicha respuesta, actúa a través del incremento en la actividad de la SOD y la disminución de la peroxidación lipídica, ya que ambos eventos se manifestaron por la exposición a la dosis de adaptación. La capacidad de la célula para capturar radicales libres, principalmente superóxido, se vio altamente favorecida por la SOD, lo cual a su vez redujo la posibilidad de que dichas especies reactivas interactuaran con el ADN y produjeran diversos tipos de daño.

La metalotioneína (MT) es otra proteína importante que se ha detectado durante la inducción de respuesta adaptativa y que se ha considerado en gran parte como responsable de la resistencia que se presenta frente a ciertos agentes como metales, tetracloruro de carbono (CCl₄), radiación ionizante y radicales libres. Dicha proteína intracelular contiene grandes cantidades de grupos tioles (30 % cisteína), su función principal es la desintoxicación de iones metálicos y como atrapador efectivo de radicales libres, principalmente superóxido, hidróxido y otros radicales orgánicos (Sato y Bremner, 1993). Se sabe que la exposición a radiación ionizante incrementa el contenido de metalotioneína en el hígado de rata, de manera similar al efecto producido con otros agentes como el oxígeno, el CCl₄ y el Zn (Shiraishi y col., 1995). La MT tiene una función inhibidora sobre la peroxidación lipídica que induce la radiación ionizante en las membranas celulares y se ha reportado que captura los radicales libres, lo cual reduce la citotoxicidad e incrementa la supervivencia celular (Matsubara y col., 1987). El tratamiento de linfocitos de conejo *in vivo* e *in vitro* con sales de Zn disminuye la frecuencia de aberraciones cromosómicas causada por radiación gamma. Este resultado se correlacionó con el incremento en la concentración de MT 24 h después del tratamiento de adaptación. Estos datos sugieren fuertemente que la síntesis de MT debe actuar como uno de los mecanismos de defensa en la inducción de respuesta adaptativa por radiación ionizante (Cai y Cherian, 1996; Cai y col., 1999).

2.7.3. Inducción de Apoptosis.

El incremento en la muerte celular programada o apoptosis, ha sido considerado como otro mecanismo que posiblemente participa en la inducción de la respuesta adaptativa, dado que ocurre con mayor frecuencia dentro del rango de dosis bajas (Singh y col., 1994; Joiner y col., 2001). Además, el pretratamiento con dosis bajas de radiación o con un aumento moderado en la temperatura, sensibiliza a las células a la inducción de apoptosis por la exposición prolongada a radiación ionizante (Boreham y col., 1995). La proteína p53, que es un supresor de tumores,

constituye un factor importante en la regulación de apoptosis inducida por radiación. En células con el gen p53 alterado o deficiente, la capacidad de iniciar procesos apoptóticos después de la exposición a radiación ionizante disminuye considerablemente, lo que propicia que las células dañadas se conserven en la población (Lee y Bernstein, 1993).

Cuando las células se enfrentan a un estrés oxidativo severo, que puede ser producido por radiación ionizante, o bien cuando sufren una reducción dramática de las enzimas de protección, éstas pueden entrar a una vía apoptótica para evitar daño posterior en los tejidos sanos circundantes e impedir el inicio de un proceso canceroso (Davies, 2000). Sin embargo, la inducción de apoptosis puede representar un mecanismo de adaptación a nivel de todo el organismo, más que a nivel de células individuales.

3. OBJETIVOS

Con base en los antecedentes mencionados, se plantearon los siguientes objetivos para este proyecto de investigación:

3.1 Objetivo General:

Determinar si la radiación gamma induce Respuesta Adaptativa (RA) en leucocitos de sangre periférica de ratón *in vivo* y si se da como resultado de una disminución en la sensibilidad a la producción de lesiones en el ADN, o al aumento en la capacidad de la célula para reparar dichas lesiones.

3.2. Objetivos Particulares:

3.2.1. Desarrollar un modelo experimental que permita analizar la inducción de daño en el ADN, la reparación del mismo y la presencia de una respuesta adaptativa *in vivo* en células de sangre periférica de ratón, mediante la técnica de electroforesis unicelular en gel (EUG).

3.2.2. Determinar el daño y la cinética de reparación del ADN inducido por diferentes dosis de radiación gamma, en tiempos específicos después de la exposición.

3.2.3. Discernir si el pretratamiento con dosis bajas de radiación gamma hace a la célula más resistente a la producción de daño inicial o incrementa la eficiencia de reparación de las lesiones producidas por la exposición posterior a dosis altas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Protocolo Experimental para la Evaluación del Daño, la Reparación y la Inducción de la Respuesta Adaptativa *in vivo* por Radiación Gamma.

4.1.1. Daño y Cinética de Reparación: Se realizaron de 3 a 5 experimentos independientes por dosis con 1 ratón en cada uno. Se probaron 3 dosis de radiación (0.5, 1.0 y 2.0 Gy) para hacer el análisis de la cinética de inducción de daño en el ADN y reparación del mismo con cada una. Se tomaron muestras de sangre por duplicado en cada tiempo, desde 5 minutos antes de la exposición (testigo), como después de la exposición desde 3 hasta 90 minutos cada 5 o 10 minutos. Estos resultados permitieron seleccionar la dosis de 1.0 Gy como la óptima para estudiar la respuesta adaptativa, ya que fue la dosis mínima que produjo el daño máximo.

4.1.2. Respuesta Adaptativa: Para determinar la inducción de respuesta adaptativa, se realizaron 5 experimentos independientes con 1 ratón en cada caso. Los ratones se expusieron a la dosis de adaptación (0.01 Gy) y después de 1 hora a la dosis de reto (1.0 Gy) en cada experimento. La dosis de adaptación se consideró como la centésima parte de la dosis de reto según referencias bibliográficas (Ikushima, 1989; Cai y Liu, 1990; Zhou y col., 1993, 1994; Ikushima, 1996). Cada ratón fue su propio testigo, ya que se obtuvieron muestras antes de la irradiación. Las demás muestras se tomaron inmediatamente después de la exposición a la dosis de adaptación (desde 3 hasta 60 minutos), y después de la exposición a la dosis de reto (durante 90 minutos) cada 5 ó 10 minutos, para hacer las comparaciones pertinentes.

Con la finalidad de discernir si la respuesta adaptativa se debe a una disminución en la sensibilidad a la producción de lesiones en el ADN o a un aumento en la

capacidad de las células para reparar dichas lesiones, la estrategia propuesta en el presente estudio fue comparar la cantidad de daño inicial inducido por la radiación y la eficiencia en la reducción de dicho daño a través del tiempo, entre las células adaptadas y no adaptadas. Al detectarse una reducción en el daño inicial observado en las células adaptadas expuestas a la dosis de reto, entonces se manifiesta el estímulo de un mecanismo radioprotector y en el caso de presentarse un incremento en la eficiencia de eliminación del daño en las mismas células, entonces se evidencia el estímulo de los mecanismos de reparación.

4.2. Reactivos.

Los reactivos usados en este proyecto fueron obtenidos de los siguientes proveedores: agarosa de punto de fusión bajo (APFB) y agarosa de punto de fusión normal (APFN) de Gibco BRL (Gaithersburg, EUA); Tris, Cloruro de Sodio (NaCl), N-lauril-sarcosin (NLS), Dimetilsulfóxido (DMSO), Cloruro de Potasio (KCl) y Bromuro de Etidio (BrEt) de Sigma Chemical (St. Louis MO, EUA); EDTA, Tritón X-100 e Hidróxido de Sodio (NaOH) de Merk (Darmstadt, Alemania).

4.3. Animales.

Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c, de 2 meses de edad y de aproximadamente 30 g de peso. En cada experimento se empleó un solo ratón debido a la dificultad de tomar varias muestras a diferentes tiempos, los experimentos se repitieron de 3 a 7 veces. Estos ratones fueron reproducidos en el bioterio del laboratorio de Radiobiología Celular del ININ. Se mantuvieron dentro de jaulas de plástico con aserrín bajo condiciones controladas de temperatura (23-25 °C) y períodos fijos de luz-oscuridad (12 horas cada uno). Se alimentaron con comprimidos Purina chow y agua *ad libitum*.

4.4. Irradiación.

Los ratones se irradiaron en una fuente de rayos gamma de ^{137}Cs (Cesagammatron, Siemens) colocados en tubos de plástico con tapa. Las dosis de exposición se seleccionaron con base en los antecedentes bibliográficos (Vijayalaxmi y col., 1992) y se modificaron de acuerdo con los resultados que se fueron obteniendo. Se trabajó dentro de un rango de dosis que se conoce como no citotóxico (Morales-Ramírez y Cruz-Vallejo, 1996) y que no afecta significativamente la supervivencia celular (Singh y col., 1990, 1991; Visvardis y col., 1997). Las dosis utilizadas fueron 0.5, 1.0 y 2.0 Gy. El mismo criterio se consideró para determinar las dosis de adaptación y reto, las cuales se fijaron en 0.01 y 1.0 Gy, respectivamente. La tasa de exposición se calculó con un equipo PTW modelo 10002 serie 20086 con una cámara de ionización PTW modelo W3001 serie 366 calibrado para la energía de ^{137}Cs . Este procedimiento se realizó en el laboratorio secundario de calibración dosimétrica del Departamento de Metrología del ININ.

4.5. Determinación de las células con daño en el ADN.

Las células con su ADN dañado fueron detectadas mediante la técnica de electroforesis unicelular en gel (EUG); esta técnica permite detectar rupturas sencillas y sitios lábiles al álcali en el ADN de células eucariontes. La migración de los fragmentos del ADN alterado forma una imagen semejante a un cometa en el espacio, por lo cual también se le conoce como ensayo cometa. Esta metodología constituye una prueba genotóxica muy sensible para determinar el daño en el ADN, inducido por diferentes tipos de agentes físicos y químicos, así como la reparación del mismo (Andrews y col., 1989; Olive y col., 1990; Fairbairn y col., 1995; Visvardis y col., 1997; Banáth y col., 1998; Tice y col., 2000). En el presente estudio se utilizó la metodología original reportada por Singh y col. (1988) con algunas modificaciones, como se describe a continuación.

4.5.1. Toma de Muestras.

Para tomar las muestras de leucocitos, cada ratón se inmovilizó dentro de un brete dejando la cola libre a través de un orificio, se cortó un segmento pequeño del extremo de la cola y se recuperaron 4 μ l de sangre. Se tomó una muestra testigo 5 minutos antes de irradiar al ratón y varias muestras a diferentes tiempos después de la irradiación: a los 3 minutos se tomó la primera y en el período de 5 a 30 minutos cada 5 minutos, de 30 a 60 minutos cada 10 minutos y la última a los 90 minutos. Se obtuvieron por lo menos 2 muestras en cada tiempo y se resuspendieron en 1 ml de solución balanceada de Hank (libre de Ca^{++} y Mg^{++}) dentro de un tubo para microcentrifuga. Las células se mantuvieron en hielo el tiempo que duró la toma de todas las muestras, para evitar la reparación de las rupturas del ADN y se procesaron para la técnica de EUG.

4.5.2. Preparación de Laminillas.

Se preparó la agarosa de punto de fusión bajo (APFB) al 0.5% y la agarosa de punto de fusión normal (APFN) al 0.75%, disolviendo respectivamente 125 mg de APFB y 187.5 mg de APFN en 25 ml de amortiguador salino de fosfatos libre de Ca^{++} y Mg^{++} (PBS). Se calentaron hasta un punto cercano a la ebullición para que las agarosas se disolvieran, se separaron en alícuotas de 5 ml y se almacenaron a 4°C. Al momento de utilizarlas se calentaron hasta fundirlas completamente y se mantuvieron a 37°C. A portaobjetos lisos y limpios se les agregaron 200 μ l de APFN y se dejaron secar a temperatura ambiente hasta deshidratarse por completo (Eriksson y Nygren, 1995). Las células resuspendidas en la solución salina balanceada de Hank se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos. El paquete celular de cada muestra se mezcló con 100 μ l de APFB (37°C) y se depositó sobre el portaobjetos con la capa deshidratada de APFN. Inmediatamente se colocó encima un cubreobjetos limpio y seco, se metió al refrigerador para que la agarosa solidificara. Después de 3 a 5 minutos se retiró cuidadosamente el cubreobjetos por deslizamiento y se puso encima otra capa de

100 μ l de APFB, se volvió a colocar otro cubreobjetos y se dejó solidificar en el refrigerador por 3 a 5 minutos. Después se removió el cubreobjetos y cada laminilla se acomodó cuidadosamente dentro de una caja de Coplin a la que se le agregaron 50 ml de solución de lisis fría recién preparada (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 1% NLS y 10 mM Tris ajustada a pH 10 con NaOH, más 1% Tritón X-100 y 10% DMSO). Las laminillas se mantuvieron dentro de esta solución protegidas de la luz a 4°C durante una hora.

4.5.3. Electroforesis, Tinción y Almacenamiento.

Las laminillas se retiraron de la solución de lisis y se acomodaron en forma horizontal dentro de la cámara de electroforesis una junto a otra. Se llenó la cámara con el amortiguador de electroforesis frío recién preparado (300 mM NaOH y 1 mM EDTA a pH 13), hasta que el nivel del líquido cubriera completamente las laminillas y se dejaron sumergidas en el amortiguador alcalino durante 40 min, para permitir el desenrollamiento del ADN y la expresión del daño sensible al álcali. La cámara se conectó a una fuente de poder y se aplicó una corriente eléctrica a 25 volts y 300 miliamperes. El tiempo de electroforesis fue de 40 min, después del cual se sacaron las laminillas y se enjuagaron con amortiguador de neutralización (0.4 M Tris a pH 7.5), dejando 5 min para que el amortiguador se absorbiera; la operación se repitió 3 veces. Posteriormente las laminillas se sumergieron en metanol con el fin de deshidratar las capas de agarosa y se guardaron en una caja para protegerlas de la luz y el polvo. Para analizarlas al microscopio se hidrataron previamente con solución de neutralización, se tiñeron con 50 μ l de Bromuro de Etidio (2 μ g/ml) y se les colocó encima un cubreobjetos limpio, con cuidado para no formar burbujas. Antes del análisis, se eliminó el exceso del colorante de los bordes de la laminilla. Las preparaciones teñidas se guardaron en el refrigerador hasta por 72 h en una cámara húmeda.

4.5.4. Evaluación del Daño en el ADN.

Para visualizar el daño en el ADN se observaron las laminillas con el objetivo de 25x, en un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro barrera de 590 nm. El daño se evaluó analizando 300 células por laminilla, calculando la proporción de células dañadas en función del número de células con cola (cometas), o determinando la migración del ADN fuera del núcleo en cada uno de ellos, mediante la medición de la longitud de la cauda. Las medidas se realizaron desde el borde caudal del núcleo hasta el final de la cola, con la ayuda de una lentilla graduada con una escala en el ocular o a través de los negativos de fotomicrografías tomadas de cada campo. También se hicieron mediciones de la longitud de la cola con un analizador de imágenes "Carl Zeiss". Además, los cometas se clasificaron en tres categorías, de acuerdo a la longitud de la cola en relación con el diámetro de su propio núcleo: cortos (hasta 1 núcleo), medianos (de unos a dos núcleos) y largos (más de dos núcleos). Se cuantificó el porcentaje de cada uno.

Los datos obtenidos se procesaron para obtener promedios, desviaciones estándar y errores estándar. Se aplicó la prueba estadística de Dunnett para analizar la significatividad de las diferencias. Los promedios se graficaron para hacer el análisis detallado de la cinética de reparación y de la respuesta adaptativa. En las tablas se presentaron los promedios con sus desviaciones estándar y en las gráficas se mostró cada punto con su error estándar.

El área bajo la curva (ABC) de porcentaje de cometas contra tiempo se obtuvo mediante integración con el programa Origin 5.0.

5. RESULTADOS

5.1. Estandarización de las Condiciones Experimentales para el Uso de la Técnica de Electroforesis Unicelular en Gel.

En esta primera etapa se hicieron los ensayos necesarios para el montaje de la técnica de EUG, estandarizando las siguientes variables: 1) concentraciones y cantidades adecuadas de la agarosa de punto de fusión bajo (APFB) y la de punto de fusión normal (APFN). 2) Tipo de portaobjetos más conveniente. 3) Cantidad adecuada de células. 4) Tiempo y temperatura para la lisis. 5) Tiempo y temperatura para el desenrollamiento de la cadena de ADN y la migración de los fragmentos. 6) Condiciones óptimas para la toma de fotomicrografías. 7) Criterios para el análisis del daño.

Como agentes inductores de daño, se utilizaron diferentes concentraciones de H₂O₂ (*in vitro*) en linfocitos aislados y radiación gamma (*in vivo*) en leucocitos de sangre periférica. Las condiciones estandarizadas para el funcionamiento y reproducibilidad de la técnica fueron las siguientes: Se usaron portaobjetos lisos con una capa seca de 200 µl de APFN a una concentración de 0.75%. Se tomaron 4 µl de sangre periférica de la cola del ratón y se resuspendieron en 1 ml de solución salina balanceada de Hank, se mantuvieron en hielo hasta procesarse, se centrifugaron y el paquete celular se resuspendió en 100 µl de APFB, a una concentración de 0.5%. Esta se aplicó sobre la primera capa seca de agarosa, se colocó un portaobjetos encima y se dejó solidificar, se retiró el cubreobjetos por deslizamiento y se agregó una última capa de APFB. La lisis se realizó durante una hora a pH 10, el desenrollamiento se llevó a cabo por 40 minutos en amortiguador a pH 13 y la electroforesis a 23 volts y 300 mA durante 40 minutos en el mismo amortiguador alcalino. Estos tres últimos pasos se realizaron en frío (4 °C). Los geles se neutralizaron con tris a pH 7.5 y se deshidrataron con metanol para guardarlos secos. La tinción se realizó con 50 µl de BrEt (2 µg/ml). Las condiciones más adecuadas para la toma de fotomicrografías con película

Technical Pan fueron: 30 Din/800 ASA con 3 minutos de exposición sin acercamiento.

Para determinar el daño basal y el inducido, se midió el diámetro del núcleo, la longitud total del cometa y la longitud de la cola en los negativos, tomando en cuenta que un eritrocito mide 0.66 mm en el negativo fotografiado con el ocular de 25x, para hacer la conversión a micrómetros. Se obtuvo el porcentaje de cometas (células con daño) y se clasificaron por tamaño.

Para el desarrollo del sistema experimental que permitiera analizar la inducción de daño en el ADN, la cinética de reparación del mismo y la presencia de una respuesta adaptativa *in vivo*, en células de sangre periférica de ratón, mediante la técnica EUG, se diseñaron varios experimentos preliminares realizando exposiciones de cuerpo entero de los ratones a una fuente de radiación gamma (^{137}Cs). Los ratones se irradiaron dentro de un tubo de plástico con tapa y posteriormente se colocaron en un brete, manteniendo la cola fuera a través de un orificio. Se cortó un segmento pequeño del extremo de la cola, desinfectándola previamente y enjuagando con agua. Esto permitió tomar muestras de sangre a diferentes tiempos manteniendo al organismo vivo, tanto antes como después de la exposición. Las células se resuspendieron en solución de Hank y se mantuvieron en hielo hasta procesarse para EUG, de acuerdo a las condiciones descritas anteriormente, para analizar el daño en cada uno de los tiempos determinados.

Los experimentos preliminares de esta etapa del proyecto sirvieron de base para el diseño de los experimentos directamente relacionados con las cinéticas del daño y reparación del ADN y con la inducción de respuesta adaptativa.

5.2. Cinética de Reparación del Daño Inducido por Radiación Gamma.

En esta etapa se determinó el daño inducido al ADN por radiación gamma en leucocitos de sangre periférica del ratón y la cinética de reparación *in vivo*, mediante la técnica de EUG siguiendo las condiciones descritas anteriormente.

Inicialmente se expusieron los ratones a 1.0 Gy y en función de los resultados obtenidos se utilizaron 0.5 y 2.0 Gy, para seleccionar la dosis mínima que produjera el daño máximo. Se seleccionaron estas dosis para trabajar dentro de un rango que no afectara la viabilidad celular, considerando que con la exposición a dosis de 2.0 Gy la reducción en la supervivencia es de un 2 a un 5% (Singh y col., 1990, 1991). Incluso con 4.0 Gy se ha reportado hasta un 95% de supervivencia celular (Visvardis y col., 1997).

La exposición de los ratones a 1.0 Gy de radiación gamma en una fuente de ^{137}Cs , indujo un daño significativo en los leucocitos de sangre periférica, que fue evaluado en función del porcentaje de células con cola (cometas), lo cual refleja la migración de fragmentos del ADN debido a la presencia de rupturas de cadena sencilla o sitios lábiles al álcali.

En la tabla 1 se muestra el porcentaje de cometas obtenidos en cada tiempo, antes y después de la irradiación en experimentos independientes, así como el promedio y la desviación estándar. Los resultados indican que en las muestras testigo tomadas 5 minutos antes de la irradiación de cada ratón, el porcentaje promedio de cometas obtenido fue 5%. El porcentaje más alto de 77.2% se encontró a los 3 minutos de la exposición, lo cual resultó estadísticamente significativo con una $p < 0.05$ comparando con el testigo mediante la prueba de Dunnett. Este porcentaje se redujo a 46% dos minutos más tarde y continuó disminuyendo hasta 22.6 % a los 15 minutos, siendo significativo respecto al testigo con una $p < 0.05$. En cada experimento se observó que entre los 25 y 40 minutos hubo un segundo aumento en el porcentaje de cometas ($p < 0.05$). La frecuencia de cometas hacia los últimos tiempos en que se tomaron las muestras

tendió a disminuir y aunque a los 90 minutos todavía persistían algunas células con daño, la diferencia con respecto al testigo ya no resultó estadísticamente significativa. Se detectaron diferencias individuales en la cinética de producción de cometas, particularmente en relación con el segundo incremento que ocurrió entre los 25 y 40 minutos después de la exposición.

Tabla 1. Porcentaje de cometas producidos a diferentes tiempos después de la exposición a 1.0 Gy de radiación gamma en leucocitos de sangre periférica de ratón *in vivo*

Tiempo (minutos después de γ)	Exp. 1 (%)	Exp. 2 (%)	Exp. 3 (%)	Exp. 4 (%)	Exp. 5 (%)	$\bar{x} \pm$ d.e.
Testigo	6	3	4	3	10	5.2 \pm 2.9
3	94	76	70	60	86	77.2 \pm 13.3 *
5	66	44	31	25	64	46.0 \pm 18.7 *
10	35	36	13	16	60	32.0 \pm 18.9 *
15	25	30	11	14	33	22.6 \pm 9.7 *
20	27	18	14	27	27	22.6 \pm 6.2 *
25	42	33	24	36	20	31.0 \pm 8.9 *
30	67	37	20	22	44	38.0 \pm 19.1 *
40	45	20	30	20	26	28.2 \pm 10.3 *
50	46	23	19	17	25	26.0 \pm 11.6 *
60	30	16	11	17	18	18.4 \pm 7.0
90	19	20	11	11	11	14.4 \pm 4.7

* Diferencia significativa con respecto al testigo, $p < 0.05$ Prueba de Dunnett.

300 células analizadas en cada tiempo por experimento.

En la figura 1 se aprecia el incremento en el porcentaje promedio de cometas que se observó en cada tiempo después de la irradiación y se puede apreciar la cinética de reparación de las lesiones inducidas:

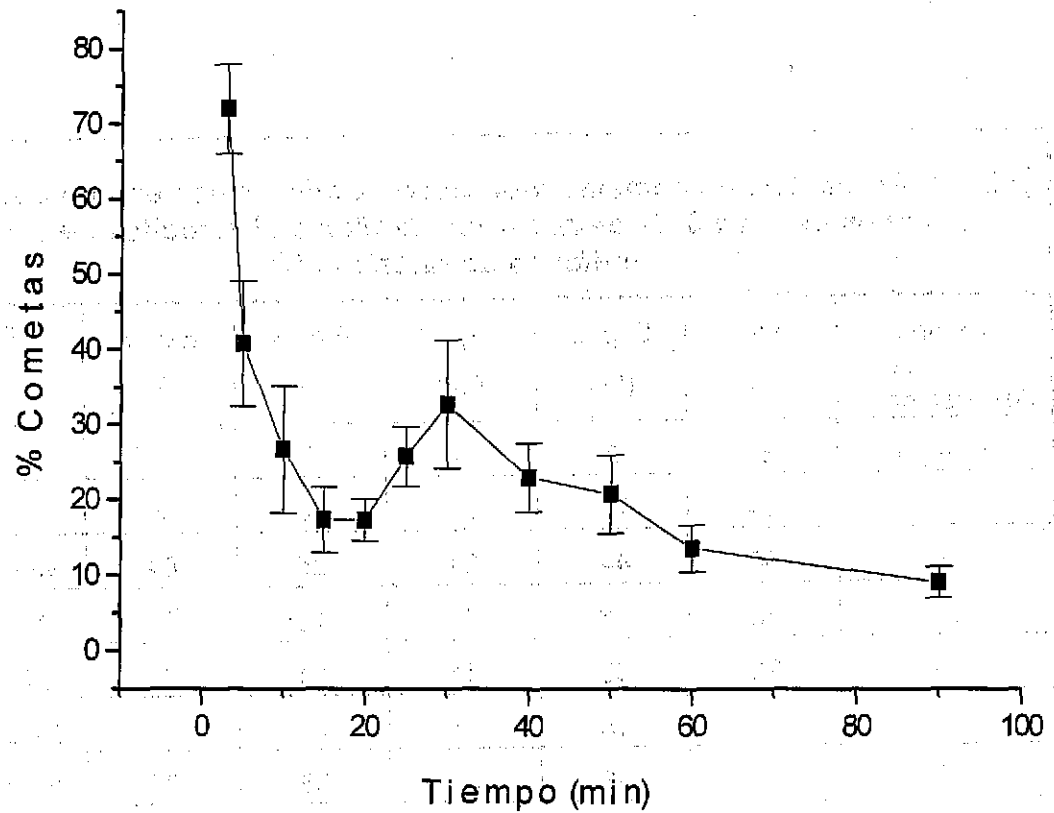


Figura 1. Incremento en el porcentaje de cometas producidos en leucocitos de ratón a diferentes tiempos después de la exposición a 1.0 Gy.

No obstante que se detectó una alta variabilidad interindividual respecto a la distribución del tamaño de los cometas, se observó que durante el segundo incremento de células dañadas a los 30 minutos, la proporción de cometas con colas cortas disminuyó y volvió a aumentar hacia los últimos tiempos (figura 2).

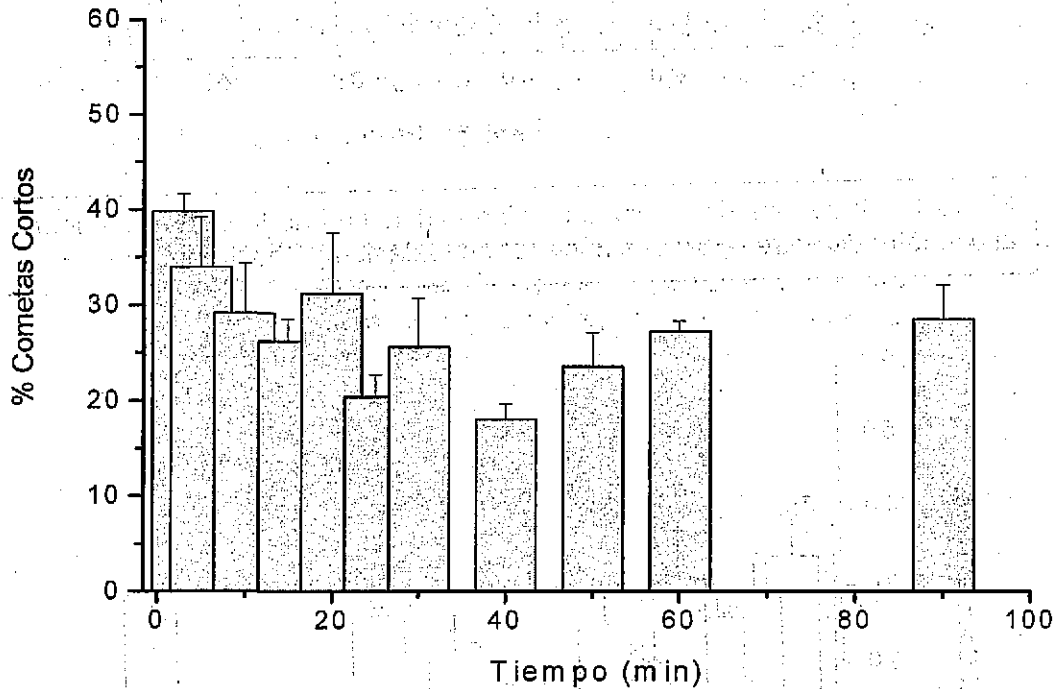


Figura 2. Porcentaje de cometas cortos (longitud de la cola equivalente al diámetro de hasta un núcleo) en cada tiempo postradiación.

La distribución de los cometas medianos mostró tendencia a subir en los primeros tiempos, pero no se detectó ningún comportamiento en particular entre los 20 y 40 minutos (figura 3).

Los cometas largos se distribuyeron de manera contraria a los cortos, es decir bajo porcentaje en los primeros tiempos, aumentaron hacia el tiempo 30 minutos y volvieron a disminuir al final (figura 4).

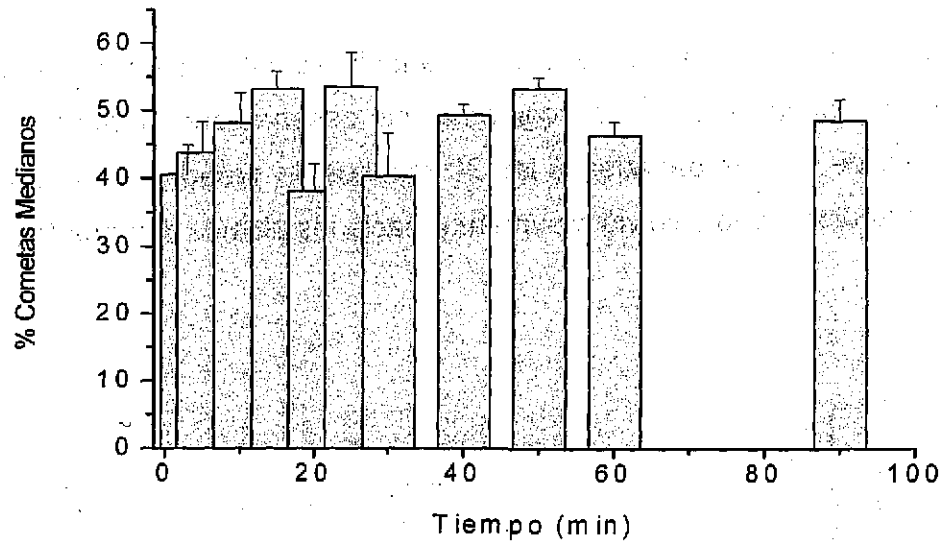


Figura 3. Porcentaje de cometas medianos (longitud de la cola equivalente al diámetro de entre uno y dos núcleos) en cada tiempo postradiación.

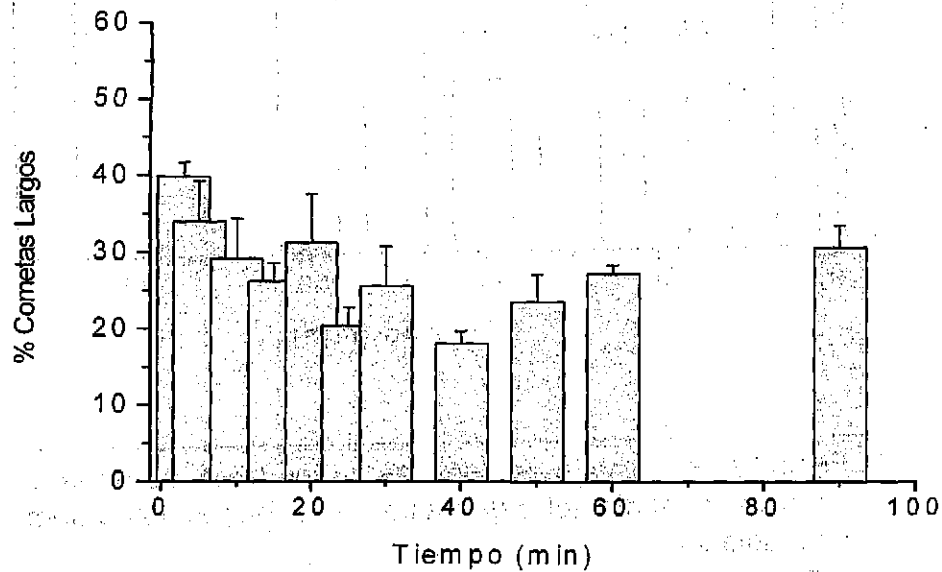


Figura 4. Porcentaje de cometas largos (longitud de la cola equivalente al diámetro de más de dos núcleos) en cada tiempo postradiación.

El porcentaje de cometas largos aumentó sólo un 5% durante los primeros 15 minutos con respecto al control, lo cual confirma que el número de células altamente dañadas, incluso que pudieran estar en proceso de muerte, no se

incrementó de manera significativa. De hecho, no se observaron células con patrones típicos de migración atribuidos a necrosis (Tice y col., 2000). Por lo tanto se puede descartar la posibilidad de que la primera reducción en el porcentaje de cometas observada de los 3 a los 15 minutos postradiación (figura 1), se deba a muerte celular.

Para establecer si el hecho de tomar las muestras continuamente, pudiera tener algún efecto sobre la frecuencia de cometas en cada tiempo, se tomaron muestras sanguíneas de ratones no tratados, a los mismos tiempos que en los irradiados, en experimentos independientes.

Tabla 2. Porcentaje de cometas producidos a diferentes tiempos en leucocitos de sangre periférica de ratones no tratados (Testigo)

Tiempo (minutos)	Exp. 1 (%)	Exp. 2 (%)	Exp. 3 (%)	Exp. 4 (%)	$\bar{x} \pm d.e.$
0	5	3	4	5	4.2 ± 1.0
3	6	10	7	8	7.7 ± 1.7
5	9	5	10	6	7.5 ± 2.3
10	10	11	10	8	9.7 ± 1.3 *
15	10	3	10	7	7.5 ± 3.3
20	9	10	7	5	7.7 ± 2.2
25	8	12	8	7	8.7 ± 2.2 *
30	7	3	8	6	6.0 ± 2.1
40	7	8	13	6	8.5 ± 3.1
50	7	6	14	5	8.0 ± 4.0
60	4	10	12	8	8.5 ± 3.4
90	9	10	12	8	9.7 ± 1.7 *

* Diferencias significativas con respecto al tiempo cero, $p < 0.05$ Prueba de Dunnett. 300 células analizadas en cada tiempo por experimento.

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos en los ratones testigo, los cuales indican que a partir de la segunda muestra se detectó un incremento leve casi constante, siendo significativa la diferencia con respecto al tiempo cero solo en 3 de los 11 tiempos considerados. Esto podría ser atribuido al estrés producido por la manipulación de los animales.

Con el fin de buscar una dosis menor a 1.0 Gy que produjera un daño considerable, se decidió trabajar con 0.5 Gy. Se realizaron tres experimentos independientes, analizando la inducción de daño y la cinética de reparación a los mismos tiempos que con la dosis de 1.0 Gy.

Tabla 3. Porcentaje de cometas y migración promedio del ADN producidos a diferentes tiempos después de la exposición a 0.5 Gy de radiación gamma			
Tiempo (minutos después de γ)	Porcentaje $\bar{x} \pm d.e.$	Migración (μm) (todas las células) $\bar{x} \pm d.e.$	Migración (μm) (sólo las células dañadas) $\bar{x} \pm d.e.$
Testigo	5.0 \pm 1.4	4.0 \pm 1.4	30.4 \pm 1.2
3	37.5 \pm 3.5	14.5 \pm 3.5	30.1 \pm 7.5
5	11.0 \pm 4.2	7.0 \pm 1.4	31.5 \pm 1.7
10	12.0 \pm 1.4	5.5 \pm 0.7	32.2 \pm 8.1
15	5.5 \pm 0.7	4.0 \pm 1.4	30.7 \pm 10.5
20	14.5 \pm 6.3	7.0 \pm 0	31.1 \pm 6.6
25	22.0 \pm 9.9	9.5 \pm 0.7	37.3 \pm 16.1
30	25.0 \pm 5.6	11.5 \pm 2.1	39.5 \pm 3.2
40	15.5 \pm 6.4	8.0 \pm 5.6	29.6 \pm 3.0
50	8.5 \pm 6.4	3.0 \pm 2.8	27.0 \pm 5.5
60	7.5 \pm 3.5	6.5 \pm 3.5	46.7 \pm 0.2
90	9.0 \pm 0	5.0 \pm 2.8	29.9 \pm 14.4

300 células analizadas en cada tiempo por experimento (resultados de 2 experimentos).

En la tabla 3 se presentan el porcentaje promedio de cometas, la migración promedio del ADN obtenida con 0.5 Gy incluyendo a las células no dañadas cuya migración equivale a cero y la migración promedio del ADN considerando únicamente a las células dañadas.

En la columna del porcentaje se aprecia que el daño detectado 3 minutos después de la exposición es aproximadamente la mitad del inducido con 1.0 Gy. Este porcentaje disminuyó rápidamente llegando casi al valor basal a los 15 minutos, alrededor de los 25 minutos se detectó un segundo incremento que volvió a disminuir lentamente hasta los 90 minutos. En la columna de la migración obtenida incluyendo a las células no dañadas, se observó que el patrón de la cinética es muy semejante al obtenido con el porcentaje de cometas. En la última columna se aprecia la migración del ADN obtenida promediando únicamente los valores de las células dañadas. Es evidente que dicho promedio no muestra ninguna tendencia en particular y por lo tanto este parámetro no resultó adecuado para hacer el análisis de la cinética de daño y reparación en nuestras condiciones experimentales.

En la tabla 4 se aprecian los porcentajes de cometas obtenidos en cada experimento con 0.5 Gy y el promedio de éstos con su desviación estándar. Antes de la irradiación se obtuvo un 6.3 % de cometas, en el primer tiempo inmediato a la exposición el porcentaje aumentó a 36.7 %, lo cual resultó estadísticamente significativo con relación al testigo con la prueba de Dunnett ($p < 0.05$). En los siguientes tiempos hasta los 15 minutos, el porcentaje fue disminuyendo llegando a un mínimo de 9 % que equivale casi al valor basal. Entre los 20 y 30 minutos se detectó nuevamente un incremento que resultó significativo con una $p < 0.05$ y entre los 40 y 90 minutos el porcentaje de células dañadas volvió a disminuir.

Tabla 4. Porcentaje de cometas producidos a diferentes tiempos después de la exposición a 0.5 Gy de radiación gamma en leucocitos de sangre periférica de ratón *in vivo*

Tiempo (minutos después de γ)	Exp. 1 (%)	Exp. 2 (%)	Exp. 3 (%)	$\bar{x} \pm d.e$
Testigo	4	6	9	6.3 \pm 2.5
3	40	35	35	36.7 \pm 2.9 *
5	14	8	29	17.0 \pm 10.8
10	13	11	26	16.7 \pm 8.1
15	6	5	16	9.0 \pm 6.1
20	19	10	16	15.0 \pm 4.6
25	29	15	38	27.3 \pm 11.6 *
30	21	29	24	24.7 \pm 4.0 *
40	11	20	21	17.3 \pm 5.5
50	4	13	23	13.3 \pm 9.5
60	5	10	22	12.3 \pm 8.7
90	9	9	19	12.3 \pm 5.8

* Diferencias significativas con respecto al testigo, $p < 0.05$ Prueba de Dunnett.

300 células analizadas en cada tiempo por experimento.

En la figura 5 se observa el incremento en el porcentaje de cometas en cada tiempo después de la exposición a 0.5 Gy. Se puede analizar la cinética de reparación de las lesiones inducidas por dicha dosis, cuyo comportamiento es similar al observado con 1.0 Gy.

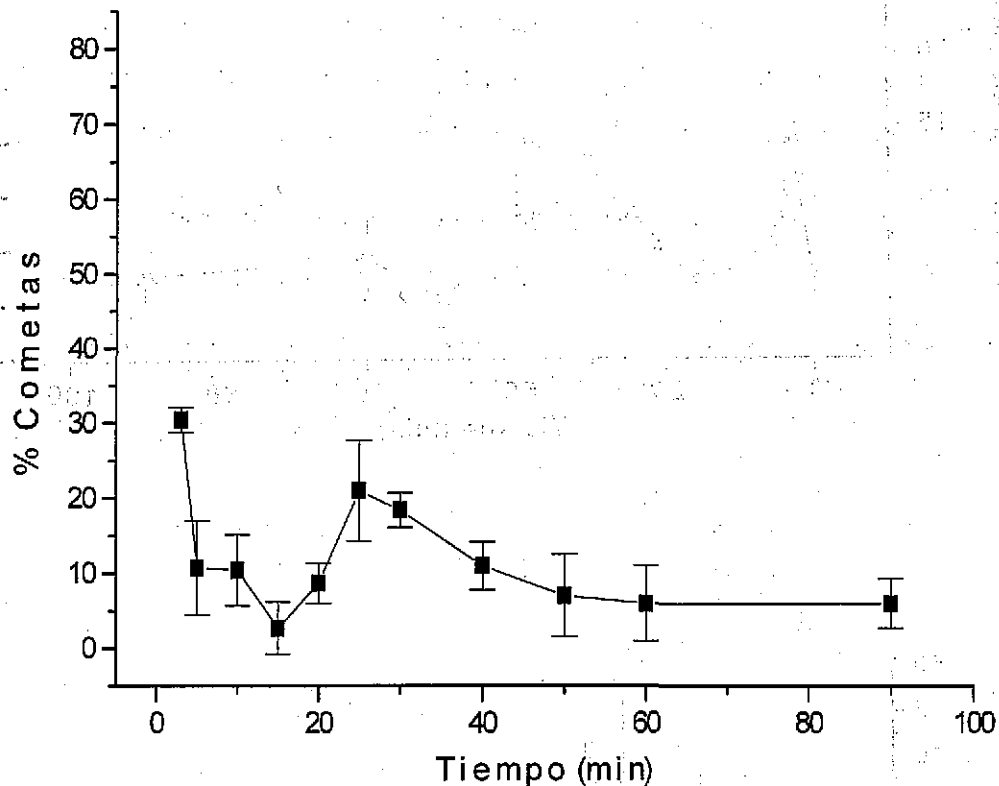


Figura 5. Incremento en el porcentaje de cometas producidos en leucocitos de ratón a diferentes tiempos después de la exposición a 0.5 Gy.

En la figura 6 (A) se observa la gráfica de la migración promedio del ADN en cada tiempo, obtenida considerando a todas las células y en la figura 6 (B) se obtuvo este parámetro pero incluyendo únicamente a las células dañadas.

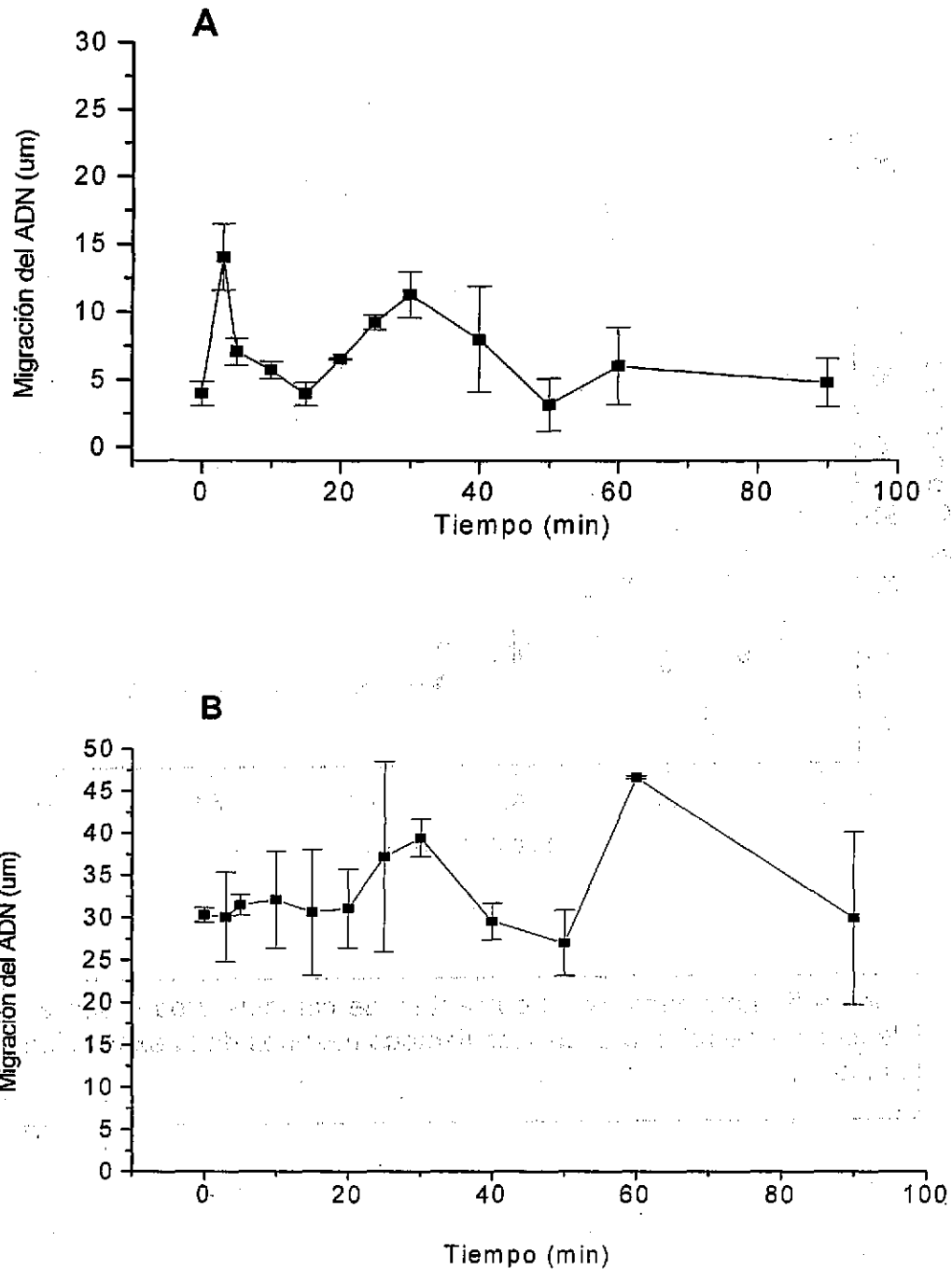


Figura 6. Migración del ADN producida en cada tiempo después de la exposición a 0.5 Gy, evaluada en células dañadas y no dañadas (A) o únicamente en las dañadas (B).

Al comparar la figura 6 (A) con la del porcentaje se aprecia la similitud entre ambos parámetros y resulta evidente que el promedio de la migración del ADN considerando las células dañadas y no dañadas, es dependiente del número de células dañadas, es decir de su porcentaje. La figura 6 (B) no muestra una tendencia en particular y podría conducir a conclusiones erróneas en el análisis ya que el pico más alto se observó a los 60 minutos mientras que en las figuras 5 y 6(A) este tiempo se ubicó dentro de la segunda fase de reparación y el porcentaje de células dañadas ya era significativamente menor que el inicial. Por lo tanto, consideramos que la migración del ADN no es un parámetro adecuado para estudiar la cinética de daño y reparación bajo nuestras condiciones.

Finalmente con el objeto de incrementar el daño se probó la dosis de 2.0 Gy, estos resultados se pueden observar en la tabla 5.

Tabla 5. Porcentaje de cometas y migración promedio del ADN producidos a diferentes tiempos después de la exposición a 2.0 Gy de radiación gamma			
Tiempo (minutos después de γ)	Porcentaje $\bar{x} \pm d.e$	Migración (μm) (todas las células) $\bar{x} \pm d.e.$	Migración (μm) (sólo las células dañadas) $\bar{x} \pm d.e.$
Testigo	8	1.6 \pm 6.5	19.7 \pm 14.8
3	80	24.2 \pm 19.6	30.2 \pm 17.2
5	46	15.3 \pm 17.8	28.3 \pm 14.9
10	40	17.3 \pm 24.4	41.1 \pm 20.6
15	26	10.8 \pm 22.6	41.5 \pm 26.7
20	48	28.7 \pm 37.5	59.9 \pm 32.5
25	70	35.3 \pm 26.8	48.9 \pm 17.8
30	70	38.6 \pm 30.4	53.7 \pm 21.5
40	64	36.7 \pm 31.3	59.4 \pm 25.3
50	88	63.7 \pm 37.9	70.8 \pm 33.0
60	76	58.3 \pm 48.9	74.7 \pm 42.8
90	60	35.0 \pm 42.3	56.4 \pm 40.9

300 células analizadas en cada tiempo (1 experimento).

En la columna del porcentaje de cometas se aprecia que el daño inicial resultó similar al inducido con la dosis de 1.0 Gy, así como la primera fase de reparación rápida. También se detectó un segundo incremento, sin embargo con esta dosis no se observó la segunda fase de reparación lenta. En la columna del promedio de la migración del ADN obtenido incluyendo el valor de las células no dañadas, se detectó un perfil similar al del porcentaje, por lo que queda claro que la migración es un reflejo del porcentaje. Considerando únicamente el valor de la migración de las células dañadas, este parámetro no brindó mayor información, ya que no se observó ninguna tendencia en particular.

Se realizaron tres experimentos con la dosis de 2.0 Gy y se determinó el porcentaje de cometas en cada tiempo (tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de cometas producidos a diferentes tiempos después de la exposición a 2.0 Gy de radiación gamma en leucocitos de sangre periférica de ratón <i>in vivo</i>				
Tiempo (minutos después de γ)	Exp. 1 (%)	Exp. 2 (%)	Exp. 3 (%)	$\bar{x} \pm d.e.$
Testigo	8	5	10	7.7 \pm 2.5
3	80	74	79	77.7 \pm 3.2 *
5	46	46	34	42.0 \pm 6.9 *
10	40	41	34	38.3 \pm 3.8 *
15	26	26	29	27.0 \pm 1.7
20	48	21	16	28.3 \pm 17.2
25	70	41	44	51.7 \pm 15.9 *
30	70	42	47	53.0 \pm 14.9 *
40	64	37	65	55.3 \pm 15.9 *
50	88	45	47	60.0 \pm 24.3 *
60	76	38	41	51.7 \pm 21.1 *
90	60	48	55	54.3 \pm 6.0 *

* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo, $p < 0.05$ Prueba de Dunnett. 300 células analizadas en cada experimento.

Se detectó que aún siendo el doble de la dosis de 1.0 Gy, no se incrementó el porcentaje de cometas en la misma proporción en el primer tiempo inmediato a la exposición, además la cinética de reparación tuvo un comportamiento distinto. Se observó que el 77.7% de cometas inducido 3 minutos después de la irradiación resultó estadísticamente significativo con respecto al testigo ($p < 0.05$) y disminuyó en los siguientes tiempos llegando hasta 27% a los 15 minutos. En los siguientes tiempos se detectó un aumento considerable llegando hasta 60% y aunque tendió a disminuir, no se apreció claramente una buena reparación ni a los 90 minutos, siendo significativa la diferencia en comparación con el testigo en todos los tiempos ($p < 0.05$) en contraste con la cinética observada con 1.0 Gy. Este comportamiento se puede analizar en la gráfica del porcentaje de cometas contra el tiempo (figura 7).

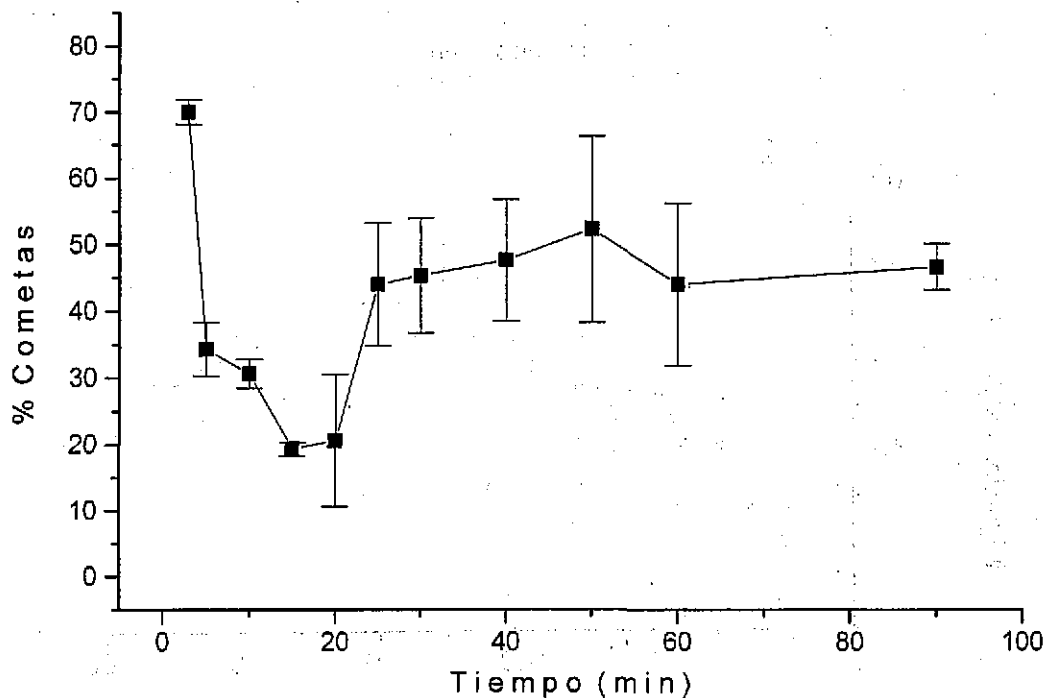


Figura 7. Incremento en el porcentaje de cometas producidos en leucocitos de ratón a diferentes tiempos después de la exposición a 2.0 Gy.

Asimismo, se hizo la gráfica de la migración promedio del ADN en cada tiempo considerando las células dañadas y no dañadas (figura 8-A) o únicamente con el valor de migración de las células dañadas (figura 8-B).

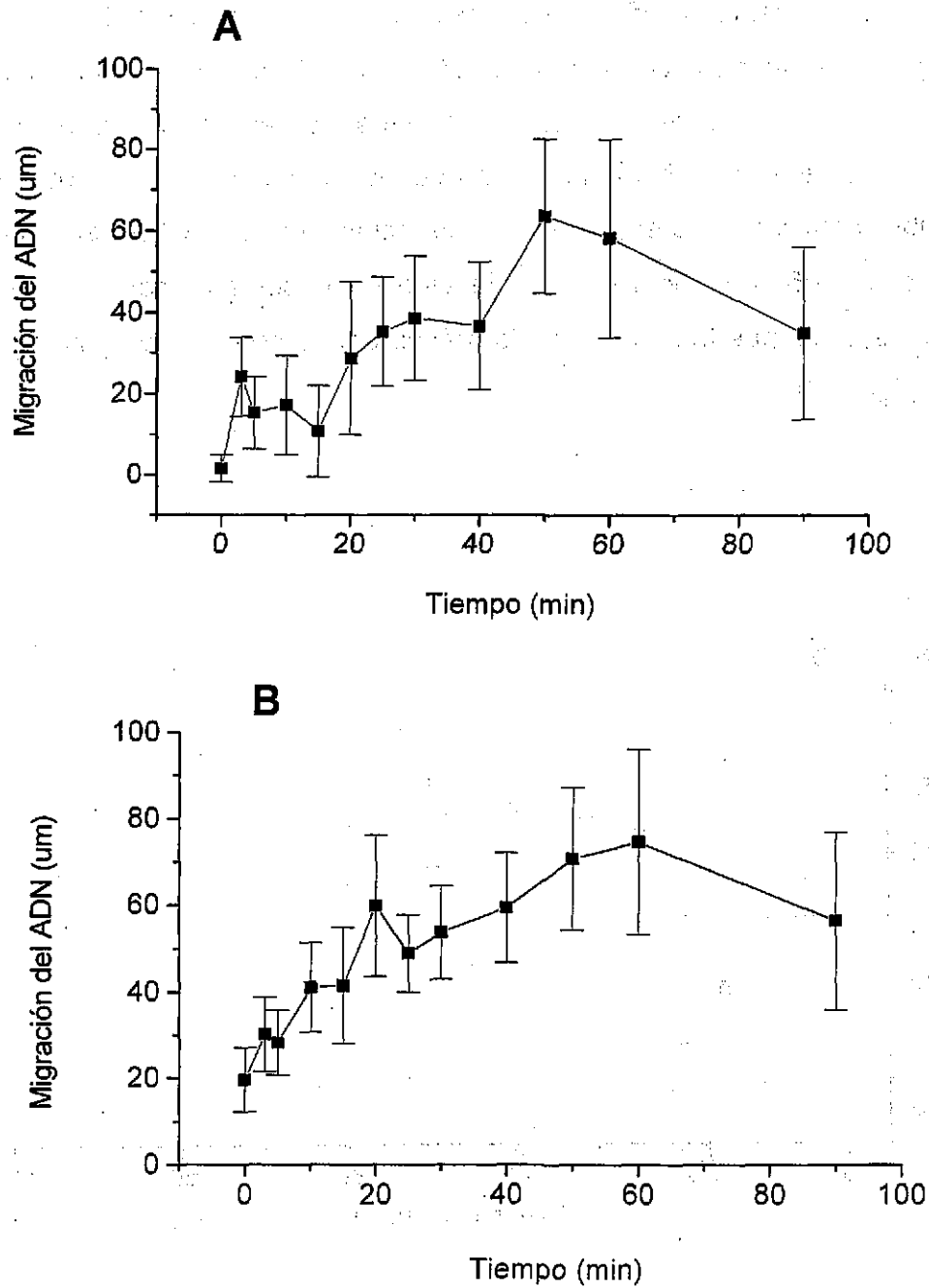


Figura 8. Migración promedio del ADN producida por la exposición a 2.0 Gy, evaluada en células dañadas y no dañadas (A) o únicamente en las dañadas (B).

En la figura 8 (A) se observa que el valor basal de la migración fue de 1.6 μm , éste aumentó hasta 24.2 μm , en el primer tiempo inmediato a la exposición y a los 15 minutos disminuyó a 10.8 μm . Posteriormente se presentó un incremento constante hasta los 50 minutos y volvió a disminuir. Sin embargo, aún a los 90 minutos se detectó una migración mayor a la que se presentó en el primer tiempo después de la irradiación. La figura 8 (B) muestra que la migración promedio de las células dañadas fue aumentando conforme transcurrió el tiempo, con lo cual no podría considerarse que esté actuando algún proceso de reparación, aunque se detectó una caída drástica ya hacia los 90 minutos. En ambos casos (A y B) los errores estándar en cada punto son elevados y esto dificulta la interpretación de los resultados.

Para determinar la relación dosis-respuesta, se obtuvo el área bajo la curva de las cinéticas promedio estudiadas con cada una de las dosis de radiación (0.5, 1.0 y 2.0 Gy) evaluadas en función del porcentaje de cometas desde 3 hasta 90 minutos postradiación. También se graficaron los porcentajes de cometas en los picos de máxima inducción, tanto en el primer tiempo postexposición (pico 1) como en el segundo incremento durante la cinética (pico 2) (tabla 7).

Tabla 7. Area bajo la curva (ABC) y porcentajes de cometas en los picos de máxima inducción al primer tiempo postradiación (pico 1) y en el segundo incremento (pico 2), de la cinética obtenida con cada dosis de radiación gamma

Dosis (Gy)	ABC \pm e.e	Pico 1 \pm e.e	Pico 2 \pm e.e
0.5	809.0 \pm 181	30.4 \pm 2.9	18.4 \pm 1.7
1.0	1745.8 \pm 277	72.0 \pm 5.2	32.8 \pm 6.0
2.0	3680 \pm 624	70.0 \pm 1	52.3 \pm 11.7

De 3 a 5 experimentos realizados por cada dosis, analizando 300 células en cada tiempo. El ABC y los picos se obtuvieron de las cinéticas de reparación.

En la tabla 7 se aprecia que el ABC aumentó en forma dosis-dependiente. Los picos 1 y 2 también se incrementaron conforme a la dosis, aunque el pico 2 aumentó en menor proporción que el 1. Con las dosis de 0.5 y 1.0 Gy el pico 1 aumentó considerablemente, pero con la dosis de 2.0 Gy se mantuvo prácticamente igual.

En la figura 9 se aprecia la curva dosis-respuesta medida en términos del ABC, cuyo comportamiento resultó lineal.

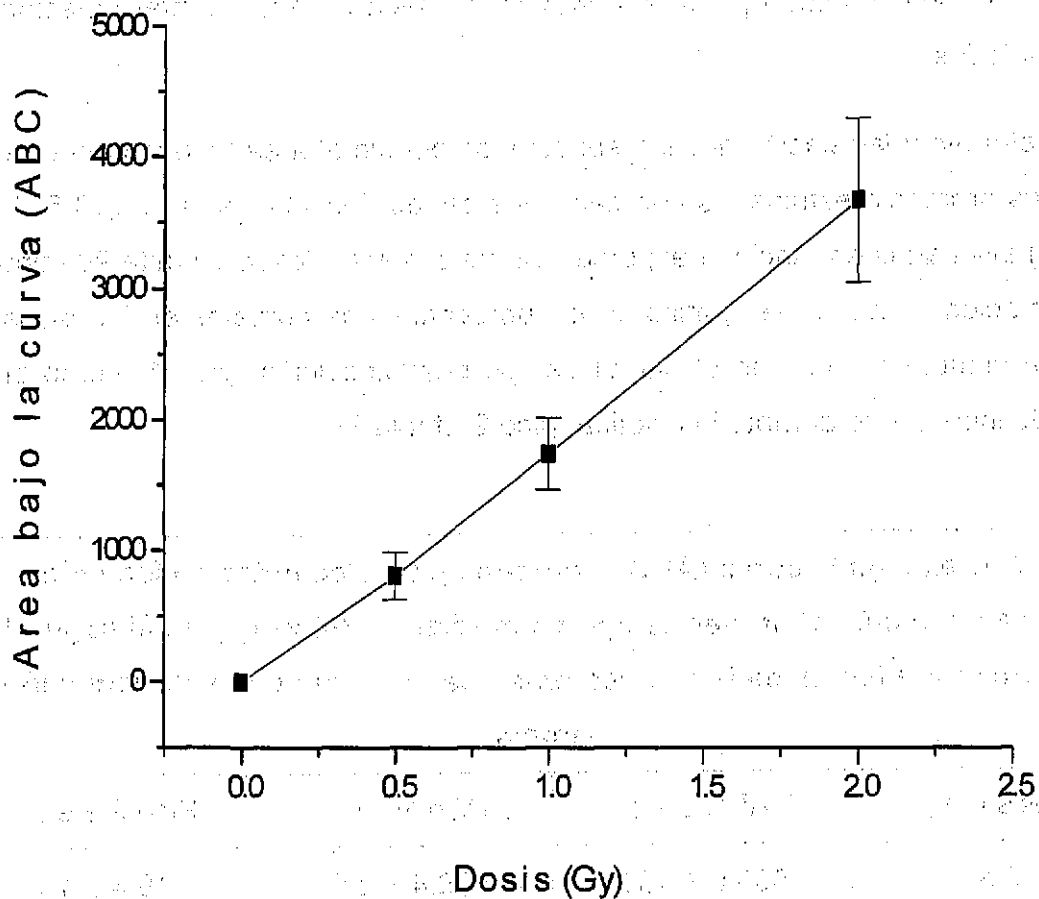


Figura 9. Relación dosis-respuesta evaluada en función del área bajo la curva (ABC) de las cinéticas de inducción de daño y reparación del ADN con cada dosis de radiación gamma.

En la figura 10 se muestra la relación dosis-respuesta graficando la altura de la frecuencia máxima de cometas y la del segundo incremento en la frecuencia con cada dosis.

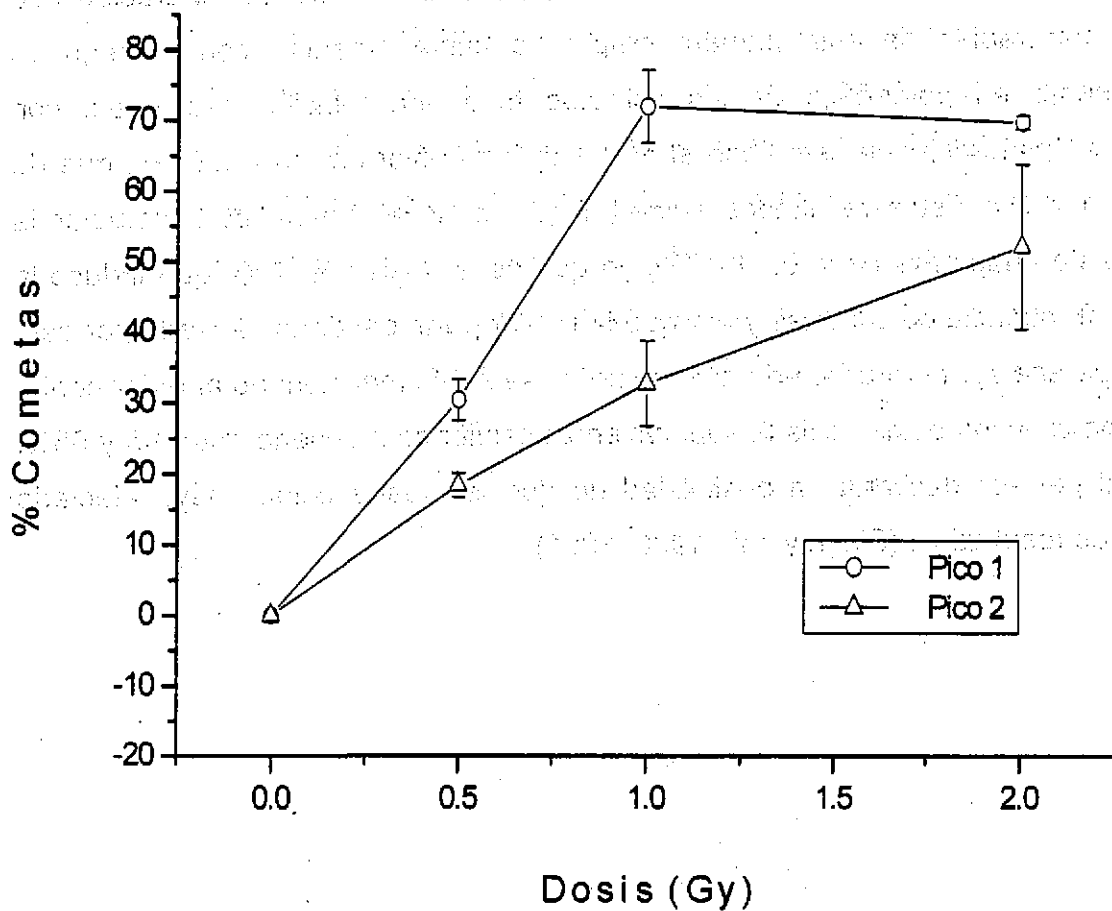


Figura 10. Relación dosis-respuesta evaluada en función de la frecuencia máxima de células dañadas (Pico 1) y de la frecuencia en el segundo incremento (Pico 2) con cada dosis de radiación gamma.

En ambas gráficas se observa que la respuesta fue dependiente de la dosis. Se puede apreciar que la curva obtenida con la frecuencia de inducción inmediata a la exposición (pico 1) aumentó de 30.4 a 72% entre las dosis de 0.5 y 1.0 Gy, sin embargo con la dosis de 2.0 Gy ya no se notó un incremento significativo llegando a un máximo porcentaje de 70 y la gráfica mostró una tendencia a aplanarse. Es decir que entre 1.0 y 2.0 Gy ya se indujo casi el máximo porcentaje de cometas posible y el incremento con dosis mayores fue reducido. Probablemente este incremento no podrá detectarse en 100% debido al proceso de reparación que actúa tan rápido en esta primera etapa. La curva obtenida con el segundo incremento en porcentaje de los cometas tuvo una relación casi lineal con respecto a la dosis, en este caso el aumento fue mayor de 1.0 a 2.0 Gy, que de 0.5 a 1.0 Gy. Estos resultados sugieren que la dosis óptima para estudiar la respuesta adaptativa es la de 1.0 Gy, ya que es la dosis más baja que induce la mayor frecuencia de cometas y por que la mayor parte del daño causado por esta dosis parece ser reparado. Además, como ya se había mencionado anteriormente, se sabe que con estas dosis la supervivencia celular se mantiene entre 95 y 98%, lo cual permite descartar la posibilidad de que la muerte celular haya afectado nuestros resultados. (Singh y col., 1990, 1991).

5.3. Respuesta Adaptativa Inducida por Radiación Gamma Evaluada en Función de la Cinética de Reparación.

En la tabla 8 se aprecia el porcentaje de cometas obtenido en las muestras testigo (antes de irradiar) y durante un período de 60 minutos a diferentes tiempos después de irradiar con la dosis de adaptación (0.01 Gy), así como durante 90 minutos después de la exposición subsecuente a la dosis de reto (1.0 Gy). El promedio de cometas que se obtuvo en las muestras testigo fue bajo (5.9 %), lo cual permitió detectar diferencias con mayor facilidad al comparar con los valores de los siguientes tiempos. La exposición a la dosis de adaptación, que fue cien veces menor que la de reto, indujo un 18.2 % de cometas a los 3 minutos de la exposición, lo cual resultó estadísticamente significativo con una $p < 0.05$ respecto al testigo. Este daño disminuyó rápidamente en los tiempos siguientes llegando hasta un mínimo de 5.3 % en la muestra que se tomó a los 15 minutos. Posteriormente, a los 30 se detectó un incremento hasta el 13 %, el cual volvió a disminuir a los 60 minutos, llegando casi al valor basal con un 8.5 %. En esta misma tabla se aprecia que la exposición a 1.0 Gy 1 hora después de la dosis de adaptación indujo un porcentaje de cometas equivalente a 30.7 % en el primer tiempo inmediato a la radiación, lo cual resultó estadísticamente significativo con una $p < 0.05$ respecto al testigo. En los tiempos siguientes se observó una reducción rápida llegando hasta un 9.9% a los 15 minutos. Un segundo incremento se detectó nuevamente hacia los 25 minutos con un 21.4%, resultando estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Después de este tiempo se observó una segunda reducción más lenta, llegando hasta un 9.7% de cometas a los 90 minutos después de la exposición.

Tabla 8. Porcentaje de cometas producidos a diferentes tiempos después de la exposición a 0.01 Gy de radiación gamma (dosis de adaptación) más 1.0 Gy (dosis de reto) en leucocitos de sangre periférica de ratón *in vivo*

0.01 Gy Adaptación	Exp. 1 (%)	Exp. 2 (%)	Exp. 3 (%)	Exp. 4 (%)	Exp. 5 (%)	$\bar{x} \pm d.e$
5' antes γ	2.3	4.6	11.3	5.3	6.0	5.9 \pm 3.3
3' después γ	7.0	14.0	22.0	25.2	22.7	18.2 \pm 7.5 *
5'	5.3	13.3	12.6	16.2	11.3	11.7 \pm 4
10'	4.7	6.6	7.6	8.5	6.0	6.7 \pm 1.5
15'	4.0	4.0	7.0	6.2	6.5	5.3 \pm 1.7
20'	4.7	5.6	6.6	8.5	5.0	6.1 \pm 1.5
25'	5.0	16.6	20.6	7.0	11.3	12.1 \pm 6.5
30'	9.7	11.6	13.3	17.7	13.0	13.0 \pm 2.9
40'	4.3	9.6	12.3	4.3	4.0	6.9 \pm 3.8
50'	4.7	5.0	13.6	10.7	4.3	7.7 \pm 4.2
60'	6.3	5.3	14.6	10.7	5.7	8.5 \pm 4
1.0 Gy Reto						
3'	34.0	28.6	25.6	36.0	29.3	30.7 \pm 4.2 *
5'	10.3	14.6	12.6	34.5	21.3	18.7 \pm 9.8 *
10'	8.7	8.6	10.0	22.0	7.7	11.4 \pm 5.9
15'	6.0	9.0	7.0	19.7	7.7	9.9 \pm 5.6
20'	4.3	11.0	18.6	20.5	18.0	14.5 \pm 6.7
25'	17.7	21.0	20.6	28.2	19.7	21.4 \pm 3.9 *
30'	10.7	9.6	16.3	26.0	23.3	17.2 \pm 7.3
40'	8.0	8.3	13.0	28.5	17.3	15 \pm 8.4
50'	5.7	11.3	14.0	18.2	18.7	13.6 \pm 5.4
60'	4.7	11.0	14.0	20.0	6.3	11.2 \pm 6.2
90'	6.0	7.3	15.0	14.0	6.0	9.7 \pm 4.5

* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control no irradiado, $p < 0.05$ Prueba de Dunnett.

300 células analizadas en cada tiempo por experimento (se consideraron sólo los experimentos en los que se pudieron hacer las determinaciones en todos los tiempos).

En la tabla 9 se pueden observar los promedios obtenidos de los porcentajes de cometas de los cinco experimentos realizados con las dosis de adaptación seguido por la dosis de reto, en comparación con los promedios de los porcentajes alcanzados en los mismos tiempos, solo con la dosis de reto.

Tabla 9. Porcentaje promedio de cometas producidos a diferentes tiempos después de la exposición a la dosis de adaptación, la de adaptación más la de reto y únicamente la de reto, en leucocitos de sangre periférica de ratón *in vivo*

Tiempo (min)	Adaptación (0.01 Gy) $\bar{x} \pm d.e$	Adaptación y Reto (0.01 + 1.0 Gy) $\bar{x} \pm d.e$	Reto (1.0 Gy) $\bar{x} \pm d.e$
5 antes y	5.9 ± 3.3	5.9 ± 3.3	5.2 ± 2.9
3 después y	18.2 ± 7.5	30.7 ± 4.2	77.2 ± 13.3 *
5	11.7 ± 4.0	18.7 ± 9.8	46.0 ± 18.7 *
10	6.7 ± 1.5	11.4 ± 5.9	32.0 ± 18.9 *
15	5.3 ± 1.7	9.9 ± 5.6	22.6 ± 9.7 *
20	6.1 ± 1.5	14.5 ± 6.7	22.6 ± 6.2 *
25	12.1 ± 6.5	21.4 ± 3.9	31.0 ± 8.9 *
30	13.0 ± 2.9	17.2 ± 7.3	38.0 ± 19.1 *
40	6.9 ± 3.8	15.0 ± 8.4	28.2 ± 10.3 *
50	7.7 ± 4.2	13.6 ± 5.4	26.0 ± 11.6 *
60	8.5 ± 4.0	11.2 ± 6.2	18.4 ± 7.0
90		9.7 ± 4.5	14.4 ± 4.7

* Diferencia significativa con respecto al porcentaje de cometas obtenido en cada tiempo con la dosis de adaptación más la de reto, $p < 0.05$ Prueba de Dunnett.

300 células analizadas en cada tiempo por experimento (se incluyeron los datos de 5 experimentos).

En el primer tiempo después de la exposición, se aprecia una clara diferencia en el porcentaje de cometas entre ambos protocolos. La exposición únicamente a la dosis de reto produjo un 77.2 % de cometas, mientras que en las células pre-expuestas a la dosis de adaptación se obtuvo un 30.7 %. La diferencia entre

ambos protocolos resultó estadísticamente significativa con una $p < 0.05$. En los siguientes tiempos también se obtuvieron porcentajes diferentes entre ambos casos, siendo siempre más bajos en los experimentos con la pre-exposición a la dosis de adaptación. Las diferencias fueron estadísticamente significativas excepto en los últimos tiempos (60 y 90 minutos).

En la figura 11 se observa claramente la tendencia de la cinética de reparación, graficando el incremento en el porcentaje promedio de cometas de los cinco experimentos en cada tiempo posterior a la exposición (adaptación hasta el minuto 60, reto del minuto 60 en adelante hasta 150 minutos). Cada punto incluye el error estándar, lo cual facilitó la apreciación de la dispersión entre los datos.

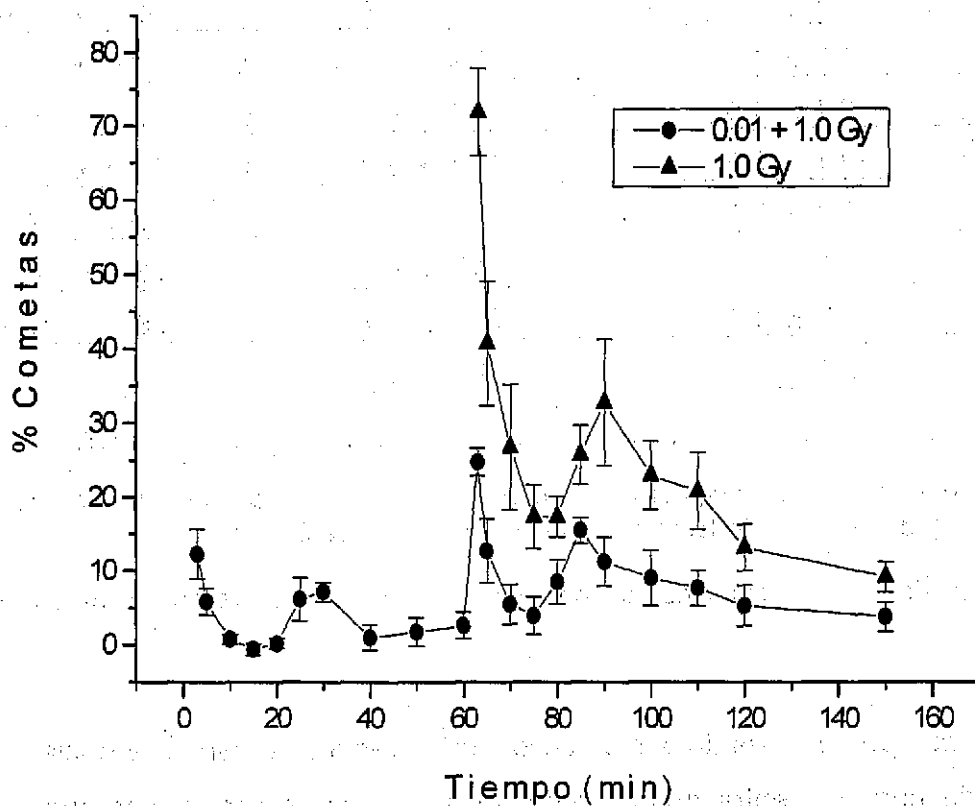


Figura 11. Incremento en el porcentaje de cometas producidos por las dosis de adaptación y reto en comparación con el incremento producido solo por la dosis de reto.

En esta figura se apreció cierta inducción de daño con la dosis de adaptación, que se reparó en los primeros minutos, con un segundo incremento que disminuyó hacia los 60 minutos. En la primera muestra que se tomó después de aplicar la dosis de reto, el porcentaje de cometas aumentó en todos los experimentos, sin embargo dicho porcentaje fue significativamente menor al obtenido en los ratones que no se expusieron a la dosis de adaptación. Esta cantidad de daño se reparó rápidamente durante los siguientes 15 minutos. Posteriormente se detectó un segundo incremento en el porcentaje de cometas a los 25 minutos, mismo que volvió a disminuir con una velocidad menor que el primero.

Es evidente que existe una variabilidad entre los experimentos en cuanto a la cantidad de células dañadas en cada tiempo, sin embargo la tendencia de la cinética es similar y reproducible en todos los casos. En esta misma figura 11 se puede hacer la comparación entre la cinética obtenida con las dosis de adaptación más reto y la obtenida con la exposición a la dosis de reto únicamente. Resulta evidente que en los leucocitos de los ratones pre-expuestos a la dosis de adaptación, hubo una menor inducción de daño desde el primer tiempo posterior a la exposición de la dosis de reto, esta reducción equivale a un 60 % aproximadamente. El perfil de la cinética de reparación en los tiempos siguientes fue similar entre las células adaptadas y no adaptadas, incluyendo el segundo incremento en el porcentaje de células dañadas a los 25 minutos seguido por un período de reparación más lenta, aunque la cantidad de células dañadas en el transcurso del tiempo fue substancialmente menor en las células adaptadas.

Para comparar la respuesta en los ratones adaptados y no adaptados expuestos a 1.0 Gy, se determinaron las áreas bajo las curvas (ABC) de las cinéticas de reparación, así como los porcentajes de cometas en los picos de máxima inducción (pico 1 y 2) (tabla 10).

Tabla 10. Area bajo la curva (ABC), porcentajes de cometas en los picos de máxima inducción (pico 1) y en el segundo incremento (pico 2) de la cinética obtenida en cada experimento después de la exposición a la dosis de adaptación y reto en comparación con la determinada únicamente con la dosis de reto

Exp.	Adaptación y Reto (0.01 + 1.0 Gy)			Reto (1.0 Gy)		
	ABC	Pico 1	Pico 2	ABC	Pico 1	Pico 2
1	454.7	31.7	15.4	2745.0	88	61
2	525.0	24.0	16.4	1881.5	73	34
3	264.9	14.3	9.3	1165.5	66	26
4	1419.7	30.7	23.2	1391.5	57	33
5	598.1	23.3	17.3	1505.0	76	34
$\bar{X} \pm e.e.$	652.5 ± 199.6	24.8 ± 3.1	16.3 ± 2.2	$1737 \pm 277.2^*$	$72 \pm 5.2^*$	$37.6 \pm 6.0^*$

Diferencia significativa con respecto a los valores obtenidos en cada parámetro con la dosis de adaptación más la de reto, $p < 0,05$ Prueba de Dunnett.

300 células analizadas en cada tiempo por experimento.

El daño fue siempre menor en los ratones adaptados y las diferencias entre ambos protocolos con relación a estos parámetros resultaron estadísticamente significativas. Es importante resaltar que aún el segundo incremento de la curva (pico 2), supuestamente causado por un tipo de daño que se reparó mediante un proceso tardío, fue significativamente menor en los ratones tratados primero con la dosis de adaptación, en comparación con los tratados únicamente con la dosis de reto.

Para cuantificar el efecto de la respuesta adaptativa en términos de dosis, tanto el porcentaje de cometas en el segundo pico de máxima inducción como el valor del ABC de los ratones adaptados, se intercalaron en las curvas de dosis respuesta determinadas para dichos parámetros (figuras 9 y 10). Los resultados indicaron

que después de la adaptación, las dosis de exposición son equivalentes a 0.38 y 0.42 Gy respectivamente. Estos datos confirman que el daño en las células adaptadas se redujo aproximadamente un 60% del inducido por 1.0 Gy en las células no adaptadas.

Por otro lado, en la tabla 11 se observan los valores de la migración del ADN en cada tiempo después de la exposición a las dosis de adaptación y reto en cada uno de los experimentos realizados, incluyendo a las células no dañadas. Para analizar este parámetro se consideraron los siete experimentos realizados con estas dosis, aunque en dos de ellos faltó el dato de algún tiempo debido a problemas metodológicos, sin embargo el promedio se obtuvo con los datos disponibles.

En la columna de promedios se aprecia que el valor de la muestra testigo fue bajo ($2.9 \mu\text{m}$), se detectó un ligero aumento en el primer tiempo después de la exposición a la dosis de adaptación ($9.1 \mu\text{m}$) que resultó estadísticamente significativo ($p < 0.05$), mismo que se fue reduciendo llegando hasta un valor de $3.2 \mu\text{m}$, el cual fue incluso menor que el del testigo. A los 20 minutos se detectó otro leve incremento el cual volvió a disminuir hacia los 60 minutos. Las muestras obtenidas 3 minutos después de la dosis de reto presentaron un promedio de migración igual a $10.1 \mu\text{m}$ ($p < 0.05$ con respecto al testigo) que se fue reduciendo en los siguientes tiempos hasta $3.3 \mu\text{m}$ a los 15 minutos. Posteriormente, se detectó un segundo incremento a $7.1 \mu\text{m}$ ($p < 0.05$) a los 25 minutos, mismo que se redujo hasta los 90 minutos.

Tabla 11. Migración del ADN (μm) producida a diferentes tiempos después de la exposición a 0.01 Gy de radiación gamma (dosis de adaptación) más 1.0 Gy (dosis de reto) en leucocitos de sangre periférica de ratón *in vivo*

0.01 Gy	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	$\bar{x} \pm d.e$
Testigo	4.3 \pm 12.8	0.8 \pm 5.5	1.8 \pm 8.4	7.5 \pm 23.7	2.1 \pm 11.3	1.8 \pm 7.4	2.4 \pm 8.3	2.9 \pm 2.3
3 min	8.4 \pm 17.5	2.5 \pm 9.7	6.6 \pm 18.4	14.6 \pm 32	10.0 \pm 19.8	12.2 \pm 25.8	ND	9.1 \pm 4.3 *
5 min	7.1 \pm 17.4	3.2 \pm 14.5	5.9 \pm 19	6.9 \pm 21.3	5.9 \pm 15.8	5.9 \pm 18.5	8.1 \pm 13.5	6.1 \pm 1.5
10 min	4.8 \pm 10.7	2.5 \pm 11.2	1.8 \pm 7.4	3.8 \pm 16.4	3.9 \pm 15.4	2.5 \pm 10.9	3.8 \pm 9.4	3.3 \pm 1.1
15 min	10.2 \pm 19.6	1.4 \pm 7.7	1.0 \pm 5	2.0 \pm 7.9	3.0 \pm 7.1	2.3 \pm 9.6	2.7 \pm 8.0	3.2 \pm 3.2
20 min	16.7 \pm 17.1	2.8 \pm 13.1	2.1 \pm 9.5	29.7 \pm 14.9	2.5 \pm 10.1	1.5 \pm 6.7	13.2 \pm 19.3	9.8 \pm 0.7
25 min	5.9 \pm 14.6	3.1 \pm 15.3	8.5 \pm 21.5	13.7 \pm 28.7	2.3 \pm 9.5	16.9 \pm 2.5	11.0 \pm 16.5	8.8 \pm 5.4
30 min	6.5 \pm 15	5.0 \pm 16	5.4 \pm 15.7	7.2 \pm 21.8	9.5 \pm 23.3	6.1 \pm 17.9	7.5 \pm 16.4	6.7 \pm 1.5
40 min	6.8 \pm 16.2	1.8 \pm 9	3.2 \pm 9.5	5.3 \pm 15.2	5.8 \pm 14.1	1.0 \pm 5.0	ND	4.0 \pm 2.3
50 min	4.3 \pm 12.2	2.9 \pm 13.7	1.5 \pm 7	7.2 \pm 20.1	2.9 \pm 9.2	1.0 \pm 5.2	ND	3.3 \pm 2.2
60 min	ND	2.7 \pm 11.8	1.3 \pm 5.4	5.9 \pm 16	21.4 \pm 14.6	2.2 \pm 9.2	5.8 \pm 12.6	6.5 \pm 7.5
1.0 Gy								
3 min	15.1 \pm 25.5	13.9 \pm 22.4	9.6 \pm 17.8	7.7 \pm 15.6	8.6 \pm 13.8	10.1 \pm 19.3	5.9 \pm 11.7	10.1 \pm 3.3 *
5min	7.3 \pm 14.6	4.6 \pm 14.1	4.6 \pm 12.6	3.7 \pm 10.9	7.7 \pm 12.5	6.7 \pm 15.7	4.6 \pm 10.5	5.6 \pm 1.6
10 min	9.7 \pm 20.5	4.2 \pm 14.4	2.0 \pm 7.2	2.0 \pm 6.82	6.7 \pm 14.6	2.0 \pm 7.8	1.8 \pm 5.6	4.1 \pm 3.1
15 min	8.7 \pm 19.3	2.7 \pm 11.4	2.6 \pm 8.6	1.7 \pm 7.2	3.5 \pm 11.2	2.3 \pm 9.0	1.6 \pm 5.2	3.3 \pm 2.5
20 min	6.7 \pm 15.7	1.9 \pm 9.2	3.1 \pm 9.5	5.0 \pm 11.5	4.0 \pm 10.6	6.6 \pm 16.0	3.6 \pm 9	4.4 \pm 1.8
25 min	ND	6.7 \pm 17.2	7.8 \pm 17.1	5.5 \pm 12	8.7 \pm 20.4	6.5 \pm 15.7	7.4 \pm 11.9	7.1 \pm 1.1 *
30 min	8.4 \pm 20.8	3.2 \pm 10.7	2.3 \pm 7.8	5.6 \pm 15.3	4.9 \pm 12.3	6.7 \pm 14.9	3.9 \pm 9.7	5.0 \pm 2.1
40 min	7.1 \pm 13.6	2.6 \pm 9.2	2.1 \pm 7.3	3.4 \pm 9.5	8.7 \pm 17.1	3.6 \pm 8.9	4.7 \pm 11.1	4.6 \pm 2.4
50 min	6.4 \pm 18.3	3.0 \pm 12.7	3.5 \pm 10.2	3.6 \pm 10	4.5 \pm 13	4.9 \pm 11.4	4.0 \pm 9.7	4.3 \pm 1.1
60 min	6.7 \pm 18.8	1.8 \pm 8.8	2.9 \pm 8.7	4.0 \pm 11.6	4.1 \pm 8.9	1.8 \pm 7.3	6.1 \pm 16.5	3.9 \pm 1.9
90 min	4.4 \pm 14.5	2.8 \pm 11.2	1.5 \pm 5.7	4.7 \pm 26	4.0 \pm 12.5	1.8 \pm 7.4	2.2 \pm 6.9	3.1 \pm 1.3

* Diferencia significativa con respecto al testigo, $p < 0.05$ Prueba de Dunnett. 300 células analizadas en cada tiempo por experimento. Se incluyeron 7 experimentos, aunque en dos de ellos no se determinó la migración en algunos tiempos debido a problemas metodológicos (ND = No Determinado). Sin embargo el promedio se obtuvo con los datos disponibles.

En la figura 12 se muestra la gráfica de la longitud promedio de migración del ADN en cada tiempo después de la irradiación, incluyendo el valor de las células dañadas y no dañadas (A), y en el panel (B) considerando únicamente la migración de las células dañadas para obtener el promedio.

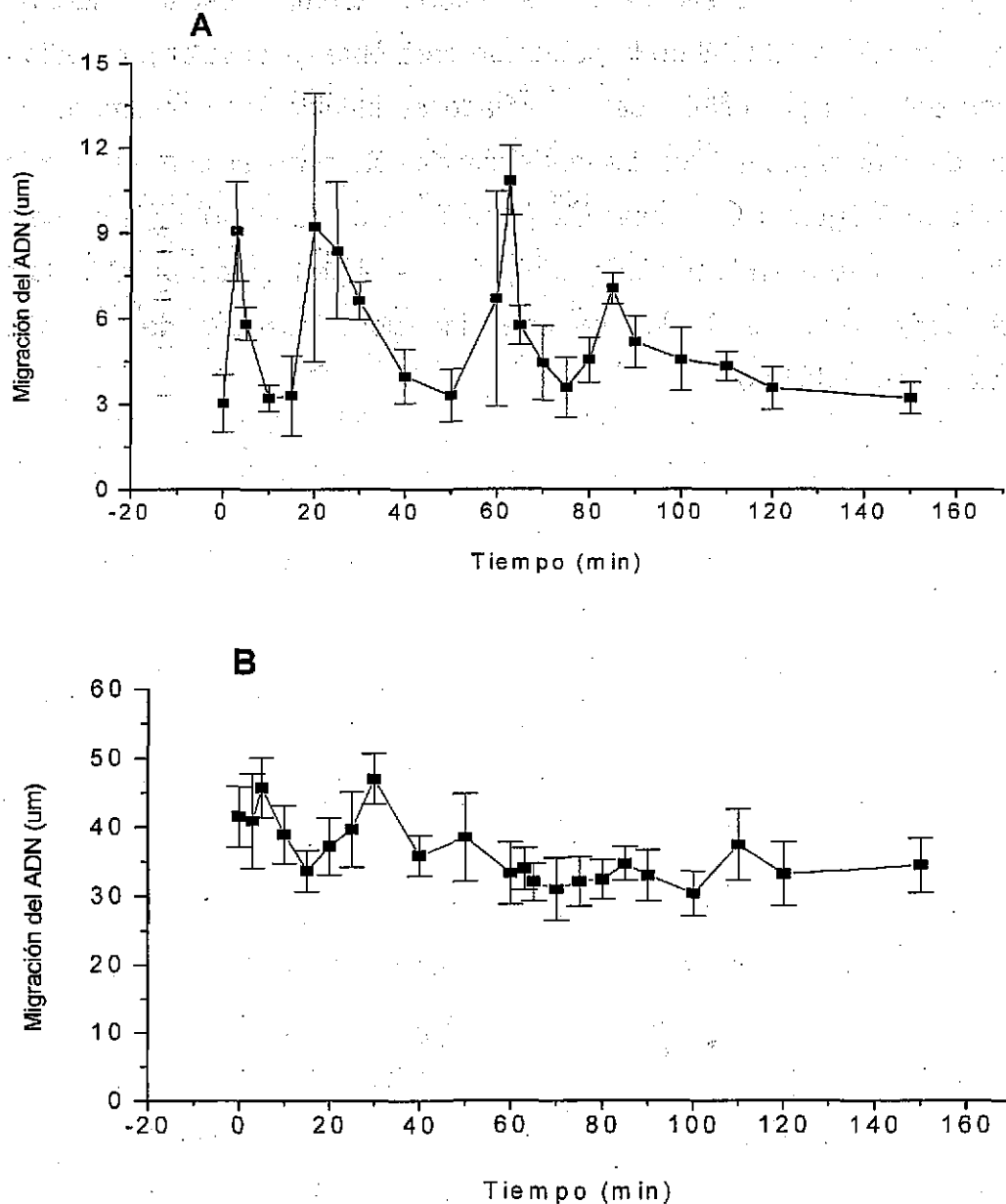


Figura 12. Migración promedio del ADN producida en cada tiempo después de la exposición a 0.01 + 1.0 Gy de radiación gamma, evaluada en las células dañadas y no dañadas (A) o únicamente en las dañadas (B).

Cada punto de la gráfica anterior incluye el error estándar, con lo cual se ve claramente la alta variabilidad entre los valores de migración de las células en cada tiempo, siendo más evidente en el panel A, esto es debido a que la desviación aumenta por la proporción de células sin daño, cuya migración es igual a cero. Esto reduce la posibilidad de detectar diferencias significativas entre los puntos y dificulta el análisis de los resultados. Además resulta evidente que cuando se considera el total de la población para obtener el valor promedio de la migración del ADN por célula, este resultado es influido sustancialmente por el número de cometas producidos. La tendencia de esta curva es semejante a la que se aprecia en la figura 11. La curva del panel B indica que se obtuvieron cometas con colas más largas en la región que representa el período después de la dosis de adaptación, que las de los cometas inducidos después de la dosis de adaptación más la de reto.

6. DISCUSIÓN

6.1 Modelo Experimental.

El modelo experimental desarrollado en este trabajo ofrece la posibilidad de evaluar el daño en el ADN inducido por la radiación, tanto inmediatamente después de la exposición como a diferentes tiempos y tan frecuentemente como se requiera, lo cual permite establecer la cinética de daño y reparación del ADN en sistemas *in vivo*. La mayoría de los estudios relacionados con el daño y la reparación del ADN usando el ensayo cometa se han hecho *in vitro*, pero resulta conveniente contar con modelos como el del presente trabajo, que permiten eliminar los efectos de las condiciones *in vitro* y la manipulación de las células durante la realización del experimento. No obstante, los resultados obtenidos *in vivo* son más difíciles de interpretar debido a los niveles de complejidad involucrados, principalmente fisiológico, celular y molecular.

Existen otros trabajos en los que también se ha analizado el efecto de agentes mutágenos *in vivo*, pero los organismos deben ser sacrificados a diferentes tiempos para obtener el órgano y analizar el daño (Sasaki y col., 1997), lo que impide estudiar la cinética en el mismo individuo, ya que no se puede determinar la respuesta temprana ni la cantidad de daño durante un período amplio en un solo sujeto.

Algunos investigadores han propuesto que el tiempo para analizar el efecto en las células después de un tratamiento, depende del modo de acción del mutágeno en estudio, sin embargo, considerando que el proceso de reparación siempre está presente, cabe cuestionar qué tan adecuado es medir el daño en cualquier sistema en un solo tiempo. Este resultado puede ser variable en el transcurso de un período y si se analiza el daño solamente en un momento específico, se pueden obtener conclusiones equivocadas. Tomando como ejemplo la cinética determinada en este estudio, si se analizara únicamente la frecuencia de cometas inmediatamente después de la exposición, se determinaría una inducción de daño estadísticamente

significativa en comparación con el testigo. En contraste, si dicho parámetro se determinara 15 minutos después de la exposición, se podría llegar a la conclusión errónea de que no hubo daño, o que en algunos casos la inducción fue mínima. Así sucesivamente, podríamos llegar a diferentes conclusiones en cada tiempo. El sistema desarrollado en este trabajo ofrece la posibilidad de hacer el análisis tan periódicamente como se necesite.

Además, con este modelo los organismos se pueden mantener vivos por un largo período para su observación, o por si se deseara analizar en qué estado se encuentran las células sanguíneas más adelante, tal vez después de algún otro tratamiento, como las combinaciones que se utilizan en las terapias para el tratamiento del cáncer.

6.2 Cinética de Reparación del Daño Inducido por Radiación Gamma.

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio se puede establecer que el daño inducido en leucocitos de ratón, 3 minutos después de la exposición a la fuente de ^{137}Cs con cualquiera de las dosis de utilizadas (0.5, 1.0 y 2.0 Gy) fue considerable, pero en ningún caso alcanzó a ser del 100%, como podría esperarse por ser la primera muestra tomada después de la irradiación. Sin embargo es probable que durante los 3 minutos que transcurren desde que termina la irradiación hasta que se puede tomar la muestra, se hayan reparado parte de las lesiones inducidas por la radiación. Esto se ve apoyado por la disminución tan drástica en el porcentaje de células dañadas que se observó en los siguientes tiempos. Por ejemplo, el 77.2% detectado en el primer tiempo después de la exposición a 1.0 Gy disminuyó a 46% 2 minutos más tarde y continuó su reducción hasta 22.6% a los 15 minutos. En el caso de la exposición a 0.5 Gy el 36.7% inducido al inicio disminuyó a 17% 2 minutos después y a los 15 minutos llegó a 9%. Asimismo, con 2.0 Gy el daño inicial de 77.7% se redujo a 42% llegando a 27% a los 15 minutos. En las gráficas del incremento en el porcentaje de cometas vs tiempo, obtenidas con cada una de las dosis, la extrapolación entre 3 y 5

minutos atraviesa el eje de las ordenadas cerca del 100% en los tres casos. La posibilidad de que en un período temprano de 3 minutos se repare rápidamente una parte del daño, es apoyada por el hecho de que la dosis de 2.0 Gy no indujo un daño sustancialmente mayor al de 1.0 Gy y sí ocurre una rápida reducción de la frecuencia de cometas en los subsiguientes 2 minutos. Estos resultados evidencian la acción de un mecanismo de reparación rápida de rupturas en el ADN, que actúa en los primeros minutos. Este puede deberse a una actividad altamente eficiente de las ADN-ligasas, que reparan la mayor parte de las rupturas de cadena sencilla inducidas por la radiación. Además de la eficiencia de estas enzimas, es posible que las células sintetizen una gran cantidad de ellas para que actúen rápidamente cuando el ADN sufra rupturas de cadena sencilla, aunque esto puede implicar un gasto energético elevado. Este proceso de reparación "ultra rápida" se ha observado con anterioridad en diferentes organismos, como bacterias y algunos mamíferos incluyendo células humanas expuestas a radiación gamma (Leontjeva y col., 1976; Van der Schans y col., 1983).

Los resultados del presente trabajo concuerdan con datos previamente reportados por otros investigadores, obtenidos al analizar la cinética de reparación en linfocitos humanos expuestos a radiación ionizante, utilizando el ensayo cometa. En dichos estudios, es claro que aproximadamente el 50% de las rupturas de cadena sencilla, inducidas en el ADN de linfocitos humanos expuestos a radiación ionizante, se reparan dentro de los siguientes 10 ó 15 minutos después de la exposición. Esta reparación llega a completarse después de 2 h de incubación *in vitro*, en células obtenidas de pacientes con diferentes tipos de cáncer y aún en células criopreservadas (Singh y col., 1988; Singh y col., 1990; Malcolmson y col., 1995; Plappert y col., 1995; Tice y Strauss 1995; Lankinen y col., 1996; Visvardis y col., 1997). Asimismo, comparando la cinética de reparación entre linfocitos y granulocitos de sangre periférica humana, es evidente que la reparación de las rupturas de cadena sencilla ocurre después de los 15 minutos en ambas poblaciones. Sin embargo, hubo una tendencia de los linfocitos para reparar su ADN más rápido y en mayor proporción que los granulocitos (Lankinen y col., 1996).

En todos los experimentos del presente estudio, alrededor del intervalo entre los 20 y 50 minutos se detectó un incremento en el porcentaje de cometas seguido por una reducción. Este comportamiento refleja la acción de un segundo mecanismo de reparación. El incremento en el porcentaje de cometas puede deberse a que las lesiones, probablemente daño causado en cualquiera de las bases del ADN, sean transformadas en rupturas mediante la acción de las endonucleasas, durante el mismo proceso de reparación. La reducción en el porcentaje de reparación refleja la reunión posterior de las rupturas. Resultados similares se obtuvieron en células de linfoma de ratón expuestas a 2.0 Gy de radiación gamma e incubadas a 37°C. Después de 20 minutos se detectó la formación de nuevas rupturas de cadena sencilla, lo cual se explicó en función de las incisiones que producen las enzimas endonucleolíticas, en los sitios de las bases dañadas. Estas rupturas se unen más tarde por acción de las ligasas (Ostling y Johanson, 1984). Se sabe que la acción de las enzimas de reparación por escisión en el ADN sustrato produce rupturas de cadena sencilla (Rubin, 1988; Frankenberg-Schwager, 1990).

La clasificación de los cometas de acuerdo con su tamaño se ha utilizado para determinar el daño inducido por radiación UV-C en células humanas, más aún se ha señalado que esta técnica es lo suficientemente sensible para detectar hasta 0.1 rupturas de ADN por cada 10^9 Daltones. También el tamaño y la intensidad de la fluorescencia de los cometas se relacionaron cuantitativamente con la frecuencia de rupturas del ADN (Gedik y col., 1992). Algunos autores han opinado que no es adecuado clasificar a los cometas por tamaño, dada la variabilidad tan alta en una población celular heterogénea como son los leucocitos (Plappert y col., 1995; Malcolmson y col., 1995). En el presente estudio se consideró conveniente analizar la distribución del tamaño de los cometas en cada tiempo. Llama la atención que es durante el segundo incremento en el porcentaje de cometas a los 30 minutos, cuando se detectó el mayor porcentaje de cometas largos. Lankinen y col. en 1996, reportaron que la longitud máxima de cometas en linfocitos humanos se observó a los 30 minutos de incubación después de la exposición a UV, esto representa las rupturas de ADN producidas por la escisión de los dímeros de

pirimidina. Estos datos indican que el tiempo de inducción de rupturas del ADN durante la reparación de las lesiones inducidas por UV, es el mismo que se observa durante la segunda etapa de reparación de lesiones diferentes que se producen por la radiación gamma. La presencia de algunos cometas largos apoya la posibilidad de que durante este tiempo ocurra la reparación de otro tipo de lesiones. Debido al período tan breve entre la exposición a la radiación y la presencia de cometas largos, la posibilidad de que éstos representen células apoptóticas, como las descritas por Olive y col. en 1993, es remota. Además, los cometas de las células en apoptosis encontradas *in vitro* por estos autores tienen apariencia diferente a la que se observó en los cometas del presente estudio *in vivo*. Los cometas que reportaron estos autores presentaban colas cortas, como nubes brillantes con el vértice hacia el residuo del núcleo, y los cometas descritos en este trabajo mostraron colas largas y angostas de poca intensidad.

La reducción en la frecuencia de cometas, obtenida entre los 40 y 90 minutos (con las dosis de 0.5 y 1.0 Gy), probablemente represente una tercera etapa de reparación tardía cuya pendiente es menor que la de las etapas anteriores, lo cual indica que la reparación es más lenta, aunque también se podría explicar por la muerte celular. Este componente de la cinética puede atribuirse a la reparación de las rupturas de doble cadena del ADN, ya que el tiempo en el que se presenta coincide con el período reportado por otros investigadores durante el que se reparan dichas rupturas, el cual va desde 40 minutos hasta 4 horas (Bryant y Blöcher, 1980). Esta etapa ya había sido observada *in vitro* por Ostling y Johanson en 1984 y por Malcolmson y col. en 1995, quienes analizaron la proporción de células que presentaban cola, para describir el daño en cada muestra en linfocitos humanos, expuestos a una fuente de ^{137}Cs . Ellos mencionaron que el período de reparación lenta se completaba casi al 100% a los 120 minutos.

La persistencia de células dañadas aún a los 90 minutos, se puede explicar considerando la existencia de una subpoblación celular más radiosensible y/o más dañada en sus funciones para la reparación. Este tipo de subpoblaciones ha sido descrito por otros autores en células sanguíneas humanas (Wuttke y col., 1993).

Diferentes investigadores han reportado que la reparación de las lesiones inducidas se completa después de un período de incubación de 2 horas en diversas células, como fibroblastos, linfocitos y granulocitos humanos (Tice y col., 1990; Singh y col., 1991; Malcolmson y col., 1995; Lankinen y col., 1996). Sin embargo, aún después de este período, en algunos casos todavía existen pequeñas poblaciones de células con colas más largas que las del testigo.

Comparando los resultados por animal, es evidente que el porcentaje de células dañadas en cada tiempo es diferente de un ratón a otro, pero el comportamiento de la cinética de reparación tiene un patrón similar aún con las diferentes dosis utilizadas. Solo la dosis de 2.0 Gy indujo un comportamiento distinto en la etapa de 40 a 90 minutos, ya que no se observó una disminución en la frecuencia de cometas en este período y mostró tendencia a mantenerse alta. Plappert y col. en 1995, observaron que la inducción de daño al ADN por radioterapia y la capacidad de reparación varía de un paciente a otro. Algunos autores han reportado cierta diferencia en la capacidad de reparación entre linfocitos y granulocitos de diversos donadores (Lankinen y col., 1996). Es factible que esta variación represente cambios reales de célula a célula en la producción y reparación de lesiones en el ADN. No obstante, en las poblaciones humanas existen otros factores que pueden afectar la capacidad de reparación, tales como la edad (Singh y col., 1990), el estado de salud, los hábitos nocivos de fumar y tomar alcohol y las condiciones fisiológicas en general (Fairbairn y col., 1995).

Los resultados aquí descritos representan la primera evidencia de la cinética de inducción de daño y reparación del ADN en leucocitos de sangre periférica de ratón *in vivo* expuestos a radiación gamma.

La importancia de hacer el análisis de la relación dosis-respuesta determinando el área bajo la curva (ABC) de la cinética de inducción de daño y reparación del ADN, radica en que al evaluar este proceso en función del tiempo se obtiene información más representativa y completa de lo que sucede en el sistema vivo. De tal manera, al analizar las modificaciones en la producción de cometas conforme transcurre el tiempo, se aprecian aumentos y disminuciones en ciertos

momentos después de la exposición a la radiación, que podrían pasar desapercibidos si el análisis se hiciera a un tiempo fijo. La estrategia de hacer el análisis ABC permite obtener un solo valor representativo del comportamiento de toda la cinética, el cual se puede graficar en relación con la dosis. En las gráficas obtenidas de los porcentajes de máxima inducción de cometas (inicial: pico 1 y segundo incremento: pico 2), también se aprecia que la relación es dosis dependiente, siendo más claro el análisis con la altura del segundo incremento.

6.3. Respuesta Adaptativa.

La inducción de la respuesta adaptativa se ha relacionado con la acción de tres procesos, los cuales determinan que una célula o todo el organismo responda más eficientemente frente a la exposición a dosis altas de agentes que causan daño. Uno es el incremento de moléculas que son atrapadoras eficientes de radicales libres (Shiraishi y col., 1995; Matsubara y col., 1987; Sato y Bremner 1993; Cai y Cherian 1996; Zhang y col., 1998; Cai y col., 1999, Bravard y col., 1999), el segundo es la síntesis de enzimas involucradas en la reparación del ADN dañado (Ikushima 1987; Woloschack y col., 1990; Ibuki y Goto 1994; Seong y Kim 1994; Sasaki 1995; Ueno y col., 1995; Ramana y col., 1998) y el tercero es la inducción de apoptosis (Boreham y col., 1995). Estos procesos pueden ser complementarios pero independientes en cuanto al tiempo. El primero de ellos es la síntesis de moléculas que protegen a la célula de la subsecuente inducción de daño, el segundo es la biosíntesis de enzimas que reparan el daño inducido en alguna molécula que es fundamental para la célula y el último proceso detecta y elimina irreversiblemente las células dañadas con el fin de iniciar la restitución celular.

Los experimentos de este proyecto fueron diseñados para determinar la presencia de una respuesta adaptativa temprana en leucocitos de ratón y discernir si la respuesta se debe a un incremento en la reparación del ADN o a una menor sensibilidad a la inducción de daño. La estrategia para discernir entre estas dos

alternativas fue mediante la comparación de la cantidad de daño inicial inducido por radiación y la eficiencia en la reducción de dicho daño entre las células de los organismos adaptados y los no adaptados. Los resultados indican que la cantidad inicial de células con su ADN dañado fue sustancialmente reducida alrededor de un 60 % en los organismos adaptados. No obstante, considerando que en las células no adaptadas, normalmente la cinética de reparación del daño inicial es rápida, existe la posibilidad de que la tasa de este proceso se haya incrementado por la dosis de adaptación y no se pudo detectar el daño inicial real. Sin embargo, el segundo aumento en el porcentaje de células dañadas, que parece deberse a un mecanismo de reparación tardía involucrado en la eliminación de lesiones diferentes a las rupturas, por ejemplo daño en las bases del ADN, también se redujo, lo cual indica que el daño causado durante este segundo proceso de reparación disminuyó ya que había menos lesiones que restituir. Si el daño fuera el mismo en las células adaptadas y no adaptadas, el segundo aumento sería similar entre ambas poblaciones. Adicionalmente, si la tasa de este segundo proceso de reparación también se hubiera elevado, la intensificación en el daño inducido por la reparación sería similar al de las células no adaptadas, aunque podría presentarse de manera más temprana debido a que no se requeriría la estimulación de la síntesis *de novo* de las enzimas involucradas en la reparación.

En estudios realizados previamente en nuestro laboratorio, analizando la inducción de micronúcleos en eritrocitos policromáticos (MN-EPC) de sangre periférica de ratón *in vivo*, no se detectó respuesta adaptativa provocada por radiación ionizante (Morales-Ramírez y col., 1997). Esto se analizó utilizando la estrategia del ABC como índice de la inducción total de la frecuencia de MN-EPC durante 60 h. Sin embargo, en otros ensayos en los que también se usó la estrategia del ABC se reportaron resultados positivos (Farooqui y Kesavan, 1993). En algunos trabajos realizados en linfocitos empleando la frecuencia de aberraciones cromosómicas como índice para analizar la inducción de respuesta adaptativa, se encontraron resultados más consistentes apoyando la presencia de tal evento (Olivieri y col., 1984, Wienke y col., 1986, Shadley y col., 1987, Kalina y Nemetova 1997), sin embargo también existen resultados negativos (Bauchinger y col., 1989, Wojcik y

Streffer 1995). Las posibilidades para explicar estas inconsistencias pueden ser tan numerosas como las diferencias que existen entre los sistemas y protocolos utilizados.

Las disparidades principales entre las condiciones del presente trabajo y las del mencionado anteriormente que se realizó en nuestro laboratorio, son: el tipo de célula que se utilizó, la condición proliferativa de las mismas y el índice analizado para medir la respuesta adaptativa. El tipo celular tal vez no podría explicar las discrepancias, ya que como se explicó previamente, en los eritroblastos de ratón se ha presentado respuesta adaptativa (Farooqui y Kesavan, 1993). Con respecto al estado proliferativo de las células, hay resultados contradictorios, Shadley y col. en 1987 no encontraron respuesta adaptativa en linfocitos en G_0 , pero varios autores si la han detectado en esta etapa del ciclo celular (Tuschl y Kovac 1983; Sanderson y Morley 1986; Cortés y col., 1994; Ryabchenko y col., 1998). Las características de los parámetros determinados pueden no ser tan relevantes *per se*, pero cabe resaltar que difieren notablemente en relación con el tiempo que debe transcurrir para la expresión del daño detectado por cada uno de ellos. El ensayo cometa permite medir el daño inmediatamente después de la exposición a la radiación, mientras que para analizar las aberraciones cromosómicas se necesita un período más largo y en el caso de los micronúcleos se requiere que la célula pase por un ciclo de división. Otro punto importante es que después del tratamiento con la misma dosis (1.0 Gy), el daño inicial determinado por medio de los cometas involucra cerca del 80% de las células, y debido a la velocidad de reparación en este primer proceso, se puede inferir que el 100% de las células tenía lesiones, mientras que la frecuencia más alta de MN-EPC fue aproximadamente del 3%, lo cual es equivalente al porcentaje de células afectadas. Esta cantidad es similar a la que presenta un daño residual evaluado con el ensayo cometa. Es importante tomar en cuenta que el número de células que muestran un daño residual a los 90 minutos después de la exposición a radiación, también disminuye con el pretratamiento con la dosis de adaptación. Posiblemente estas células son aquellas que podrían tener aberraciones cromosómicas o micronúcleos después de la división celular.

Utilizando la técnica de electroforesis unicelular en gel, algunos autores han reportado que la tasa de reparación en células V79 adaptadas con 0.05 Gy y retadas con 1.5 ó 5.0 Gy, fue mayor que en las no adaptadas y no encontraron disparidades significativas en la cantidad de daño inicial producido por la dosis de reto entre ambas poblaciones (Ikushima y col., 1996). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la respuesta adaptativa inducida por dosis bajas de radiación gamma, es debida a un incremento en la capacidad de las células para reparar las lesiones. A diferencia del trabajo de Ikushima y col. 1996, los datos obtenidos en el presente estudio, indican que las células adaptadas sufren menos daño desde los primeros tiempos postradiación, que las células tratadas únicamente con la dosis de reto. La aparición del segundo pico entre los 25 y 40 minutos en las células expuestas a la dosis de reto solamente, se explicó con base en que la presencia de otro tipo de lesiones da lugar a la producción de rupturas de cadena sencilla durante su reparación. Este segundo incremento también fue menor en las células adaptadas, sugiriendo que hay menos lesiones, lo cual también apoya la posibilidad de que la respuesta adaptativa sea el resultado de algún mecanismo radioprotector. Zhang y col. en 1998, reportaron que la exposición a dosis bajas de radiación gamma incrementa la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en testículo de ratón, ellos sugirieron que dicho evento es el responsable de la radioresistencia detectada en función de la cantidad y calidad de los espermatozoides de ratones tratados con 0.05 Gy como dosis de adaptación y con 2.0 Gy como dosis de reto. El bloqueo de la respuesta adaptativa mediante la inhibición de la síntesis de proteínas, apoya a dicho mecanismo de radioprotección (Youngblom y col., 1989). Asimismo, Bravard y col. en 1999 detectaron mayor actividad de algunas enzimas antioxidantes como SOD, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa, en linfoblastos humanos normales irradiados (0.02 Gy como dosis de adaptación y 3.0 Gy como dosis de reto), en comparación con las células no adaptadas. Estos datos se correlacionaron a su vez con un incremento en el nivel de proteínas, particularmente de SOD y catalasa, lo cual sugiere fuertemente que dichas enzimas participan directamente en la respuesta adaptativa.

Los resultados de este trabajo evidencian la inducción de una respuesta adaptativa en leucocitos de ratón *in vivo* por radiación gamma. Bajo las condiciones experimentales de este proyecto, los datos sugieren que la respuesta se expresa como una inducción menor de daño, tal vez debido al estímulo de la síntesis de moléculas que capturan radicales libres y reducen la sensibilidad.

La motivación para continuar con el estudio de la respuesta adaptativa está basada en el deseo de comprender a fondo los mecanismos moleculares que participan en su inducción y regulación así como para conocer si este fenómeno afecta la estimación del riesgo inducido por dosis bajas de radiación en la incidencia de mutación y cáncer en las poblaciones humanas. La identificación de los transcritos y la definición del papel de las proteínas, cuya síntesis se incrementa por dosis bajas de radiación y que se requieren para la inducción de la respuesta adaptativa, facilitará la comprensión de los mecanismos involucrados en dicho proceso.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante la realización de estos experimentos en leucocitos de sangre periférica de ratón *in vivo*, permiten obtener las siguientes conclusiones:

- 1) Un alto porcentaje de lesiones inducidas por radiación se elimina mediante un mecanismo de reparación rápido que actúa durante los primeros minutos después de la exposición.
- 2) Más tarde se producen nuevas rupturas de cadena sencilla en el ADN debido a la reparación de otro tipo de lesiones.
- 3) Se evidenció una segunda fase de reparación lenta.
- 4) El porcentaje de células dañadas por arriba del valor basal que persistió al final del período estudiado, puede representar una subpoblación más dañada o con menor capacidad de reparación.
- 5) La dosis mínima que produjo el mayor porcentaje de células dañadas fue la de 1.0 Gy.
- 6) El área bajo la curva de la cinética de inducción de daño en el ADN es un parámetro adecuado para hacer el análisis de la relación dosis-respuesta.
- 7) La dosis de 0.01 Gy de radiación gamma induce respuesta adaptativa, siendo suficiente un intervalo de 1 h entre esta dosis y la de reto.
- 8) La respuesta adaptativa puede explicarse como resultado de una menor sensibilidad a la producción de daño, probablemente debido a la inducción de síntesis de moléculas que actúan como radioprotectores por su capacidad de atrapar radicales libres.

9) El modelo experimental desarrollado es adecuado para estudiar la capacidad de reparación de las lesiones inducidas por radiación ionizante o por otros mutágenos, así como la respuesta adaptativa *in vivo*.

10) El parámetro de la migración no resulta adecuado para hacer el análisis de la cinética de inducción de daño y reparación del ADN.

8. APENDICE

Preparación de Soluciones.

Solución salina balanceada de Hank (HBSS) 20 mM	
Reactivo	Gramos por cada litro de agua destilada
NaCl	8.0
KCl	0.4
Na ₂ HPO ₄	0.048
KH ₂ PO ₄	0.06
NaHCO ₃	0.35
Glucosa	1.0
Rojo fenol	0.02
EDTA	7.44

A 800 ml de esta solución (1x) se le agregan 7.44 g de EDTA, se ajusta el pH a 7-7.5, se afora a 1 litro con la solución HBSS que sobra, se filtra y se guarda a 4°C

Amortiguador salino de fosfatos libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ (PBS)	
Reactivo	Gramos por cada litro de agua destilada
NaCl	8.0
KCl	0.2
KH ₂ PO ₄	0.2
Na ₂ HPO ₄	1.11

Ajustar pH a 7.4, filtrar y guardar a 4 °C

Solución concentrada de lisis	
Reactivos	Gramos por cada litro de agua bidestilada
NaCl	146.1
EDTA	37.2
Tris	1.2
NaOH	12.0
Sodio-N-lauril sarcosin	10.0
Ajustar pH a 10 con el NaOH y después agregar el sodio-N-lauril sarcosin. Se afora a 1 litro, se filtra y se guarda a temperatura ambiente	

Solución final de lisis	
Reactivos	ml por cada litro de solución concentrada de lisis
Tritón X-100	10
DMSO	100
Refrigerar durante 60 minutos antes de utilizarla.	

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Amortiguador de electroforesis	
Soluciones concentradas	Gramos por cada 200 ml de agua destilada
NaOH (10 N)	80
EDTA (200 mM, pH 10.0)	14.89

Para cada litro de amortiguador se toman 30 ml de la solución de NaOH, 5 ml de la solución de EDTA y se afora a 1 litro, el pH debe quedar en 13.0.

Solución concentrada de Bromuro de Etidio (10 X)	
Reactivo	mg por cada 50 ml de agua bidestilada
Bromuro de etidio	10

Guardar a temperatura ambiente. Precaución: el bromuro de etidio es un agente genotóxico, manejar adecuadamente con guantes.

Solución final de Bromuro de Etidio (1X)	
Solución	ml por cada 10 ml de agua bidestilada
Bromuro de etidio (10X)	1

Proteger de la luz y guardar a 4°C.

9. REFERENCIAS

- Andersson H, Chiangmai S. (1992): No adaptive response of Chinese hamster ovary cells to low doses of ionizing radiation. *Hereditas*. 117, 215-222.
- Andrews P, Tice R, Nauman C. (1989): The single cell gel (SCG) assay: a new tool for detecting organ-specific levels of DNA damage induced by genotoxic agents. *Environ Mol Mut.* 14 (s15), 10.
- Bai Y, Chen D. (1993): Accumulative effect of two low doses of irradiation in inducing an adaptive response in human lymphocytes. *Mutat Res.* 302, 191-196.
- Ban ath J, Fushiki M, Olive P. (1998): Rejoining of DNA single and double strand breaks in human white blood cells exposed to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 73, 649-660.
- Barquinero J, Barrios L, Caballin M, Miro R, Ribas M, Subias A, Egozcue J. (1996): Decreased sensitivity to the cytogenetic effects of bleomycin in individuals occupationally exposed to ionizing radiation. *Mutat Res.* 354, 81-86.
- Bauchinger M, Schmid E, Braselmann H, Nahrstedt V. (1989): Absence of adaptive response to low level irradiation from tritiated thymidine and x-ray in lymphocytes of two individual examined in serial experiments. *Mutat Res.* 227, 103-107.
- Belyaev I, Spivak I, Kolman A, Harms-Ringdahl M. (1996): Relationship between radiation induced adaptive response in human fibroblasts and changes in chromatin conformation. *Mutat Res.* 358, 223-230.
- Bosi A, Olivieri G. (1989): Variability of the adaptive response to ionizing radiations in humans. *Mutat Res.* 211, 13-17.
- Boothman D, Meyers M, Fukunaka M, Lee S. (1993): Isolation of X-ray-inducible transcripts in radioresistant melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci.* 90, 7200-7204.
- Boreham D, Cregan S, Walker J, Morrison D, Mitchel R. (1995): Radiation and hyperthermia induced adaptive response in human lymphocytes: the relationship

- between apoptosis and chromosome aberrations. Proc 10th Int Cong Radiat Res., Germany, Hagen U, Jung H, Streffer C (Eds), 307.
- Bravard A, Luccioni C, Moustacchi E, Rigaud O. (1999): Contribution of antioxidant enzymes to the adaptive response to ionizing radiation of human lymphoblasts. *Int J Radiat Biol.* 75, 639-645.
- Brusick D. (1987): Principles of Genetic Toxicology. Plenum Press. NY. 284 pp.
- Bryant P, Blöcher D. (1980): Measurement of the kinetics of DNA double-strand break repair in Erlich ascites tumor cells using the unwinding method. *Int J Radiat Biol.* 38, 335-347.
- Cai L, Liu S. (1990): Induction of cytogenetic adaptive response of somatic and germ cells in vivo and in vitro by low-dose X-radiation. *Int J Radiat Biol.* 58, 187-194.
- Cai L, Liu S. (1992): Study on the mechanism of cytogenetic adaptive response induced by low dose radiation. *Chinese Med J.* 105, 277-283.
- Cai L, Wang P. (1995): Induction of cytogenetic adaptive response in germ cells of irradiated mice with very low-dose rate of chronic gamma-irradiation and its biological influence on radiation-induced DNA or chromosomal damage and cell killing in their male offspring. *Mutagenesis.* 10, 95-100.
- Cai L, Cherian M. (1996): Adaptive response to ionizing radiation-induced chromosome aberrations in rabbit lymphocytes: effect of pre-exposure to zinc and copper salts. *Mutat Res.* 369, 233-241.
- Cai L, Jiang J, Wang B, Yao H, Wang X. (1993): Induction of an adaptive response to dominant lethality and chromosome damage of mouse germ cells by low dose radiation. *Mutat Res.* 303, 157-161.
- Cai L, Satoh M, Tohyama C, Cherian M. (1999): Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Int J Radiat Biol.* 75, 351-364.
- Cortés F, Domínguez I, Mateos S, Pinero J, Mateos J. (1990): Evidence for an adaptive response to radiation damage in plant cells conditioned with X-rays or incorporated tritium. *Int J Radiat Biol.* 57, 539-541.

- Cortés F, Domínguez I, Flores M, Pinero J, Mateos J. (1994): Differences in the adaptive response to radiation damage in G₀ human lymphocytes conditioned with hydrogen peroxide or low-dose X-rays. *Mutat Res.* 311, 157-163.
- Davies K. (2000): Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *Life.* 50, 279-289.
- Eriksson S, Nygren J. (1995): Preparing dried slides. Comet Workshop. Prague, Aug. 19-20.
- Fairbairn D, Olive P, O'Neill K. (1995): The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res.* 339, 37-59.
- Fan S, Vijayalaxmi, Mindek G, Burkart W. (1990): Adaptive response to 2 low doses of X-rays in human blood lymphocytes. *Mutat Res.* 243, 53-56.
- Farooqui Z, Kesavan P. (1993): Low-dose radiation-induced adaptive response in bone marrow cells of mice. *Mutat Res.* 302, 83-89.
- Feinendegen L, Bond V, Vooz J. (1988): Biochemical and cellular mechanism of low dose radiation effects. *Int J Radiat Biol.* 53, 23-27.
- Flores M, Pinero J, Ortiz T, Pastor N, Mateos J, Cortés F. (1996): Both bovine and rabbit lymphocytes conditioned with hydrogen peroxide show an adaptive response to radiation damage. *Mutat Res.* 372, 9-15.
- Frankenberg-Schwager M. (1990): Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eukariotic cells. *Radiat Environ Biophys.* 29, 273-292.
- Gedik C, Ewen S, Collins A. (1992): Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int J Radiat Biol.* 62, 313-320.
- Gourabi H, Mozdarani H. (1998): A cytokinesis-blocked micronucleus study of the radioadaptive response of lymphocytes of individuals occupationally exposed to chronic doses of radiation. *Mutagenesis.* 3, 475-480.

- Hagen U. (1986): Current aspects on the radiation induced base damage in DNA. *Radiat Environ Biophys.* 25, 261-271.
- Hain J, Jaussi R, Burkart W. (1992): Lack of adaptive response to low doses of ionizing radiation in human lymphocytes from five different donors. *Mutat Res.* 283, 137-144.
- Hyun S, Yoon M, Kim T, Kim J. (1997): Enhancement of mitogen-stimulated proliferation of low dose radiation-adapted mouse splenocytes. *Anticancer Res.* 17, 225-229.
- Ibuki Y, Goto R. (1994): Adaptive response to low doses of gamma-ray in Chinese hamster cells determined by cell survival and DNA synthesis. *Biol Pharm Bull.* 17, 1111-1113.
- Ikushima T. (1987): Chromosomal responses to ionizing radiation reminiscent of an adaptive response in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res.* 180, 215-221.
- Ikushima T. (1989): Radio-adaptive response: characterization of cytogenetic repair induced by low-level ionizing radiation in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res.* 227, 241-246.
- Ikushima T. (1992): Radio-adaptive response: Involvement of specific genes induction by low doses of ionizing radiation. In : T. Suguhara, L. Sagan & T. Aoyama (Eds.). *Low dose irradiation and biological defense mechanisms.* Elsevier, Amsterdam. 255-258.
- Ikushima T, Aritomi H, Morisita J. (1996): Radioadaptive response: Efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells. *Mutat Res.* 358, 193-198.
- Ishii K, Watanabe M. (1996): Participation of gap-junctional cell communication on the adaptive response in human cells induced by low dose of X-rays. *Int J Radiat Biol.* 69, 291-299.
- Jeggo P, Defais M, Samson L, Schendel P. (1977): An adaptive response of *E. Coli* to low levels of alkylating agent: Comparison with previously characterized DNA repair pathways. *Molec Gen Genet.* 157, 1-9.

- Joiner M, Marples B, Lambin P, Short S, Turesson I. (2001): Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 49, 379-389.
- Kalina I, Konecna H, Nemethova G, Racekova N. (1994): Adaptive response to ionizing radiation in normal and aneuploid human lymphocytes. *Folia Biol.* 40, 119-123.
- Kalina I, Nemethova G. (1997): Variability of the adaptive response to low dose radiation in peripheral blood lymphocytes of twins and unrelated donors. *Folia Biol.* 43, 91-95.
- Kim J, Hahm K, Cho C, Yoo S. (1996): Protein biosynthesis in low dose ionizing radiation-adapted human melanoma cells. *Int J Radiat Res.* 37, 161-169.
- Lankinen M, Vilpo L, Vilpo J. (1996): UV and gamma-irradiation induced DNA single strand breaks and their repair in human blood granulocytes and lymphocytes. *Mutat Res.* 352, 31-38.
- Laval F. (1988): Pretreatment with oxygen species increases the resistance of mammalian cells to hydrogen peroxide and gamma-rays. *Mutat Res.* 201, 73-79.
- Lee J, Bernstein A. (1993): p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc Nat Acad Sci.* 90, 5742-5746.
- Leontjeva G, Mantzighin Y, Gaziev A. (1976): The ultra-fast repair of single-strand breaks in DNA of gamma-irradiated Chinese hamster cells. *Int J Radiat Biol.* 30, 577-580.
- Malcolmson A, Davies G, Hanson J, Deeley J, Gaffney C, McGregor A, Kerby I. (1995): Determination of radiation induced damage in lymphocytes using the micronuclei and microgel electrophoresis "comet assay". *European J Cancer.* 31A(13/14), 2320-2323.
- Matsubara J, Tajima Y, Karasawa M. (1987): Metallothionein induction as a potent means of radiation protection in mice. *Radiat Res.* 111, 267-275.

- Mendiola-Cruz MT, Morales-Ramírez P. (1999): Repair kinetics of gamma-ray induced DNA damage determined by the single cell gel electrophoresis assay in murine leukocytes in vivo. *Mutat Res.* 433, 45-52.
- Meyers M, McCaffrey J, Odegard E, Boothman D. (1995): X-ray inducible transcripts and altered cell cycle regulation are involved in adaptive survival responses in human cells. *Radiat Res.* 141, 110-120.
- Mitchel R, Jackson J, McCann R, Boreham D. (1999): The adaptive response modifies latency for radiation-induced myeloid leukemia in CBA/H mice. *Radiat Res.* 152, 273-279.
- Montesano R, Bresil H, Drevon C, Piccoli C. (1982): DNA repair in mammalian cells exposed to multiple doses of alkylating agents. *Biochimie.* 64, 591-594.
- Moquet J, Prosser J, Edwards A, Lloyd D. (1989): Sister-chromatid exchanges induced by mitomycin C after acute or chronic exposure of human lymphocytes to a low dose of X-rays. *Mutat Res.* 227, 207-213.
- Morales-Ramírez P, Cruz-Vallejo V. (1996): In vivo effect of gamma ray pretreatment on sister-chromatid exchange induction by mitomycin C in murine bone marrow cells. *Mutat Res.* 367, 225-232.
- Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Rodríguez-Reyes R. (1997): No radioadaptive response to micronucleated polychromatic erythrocyte (MN-PCE) induction in murine peripheral blood in vivo. *Environ Mol Mut.* 29, 289-295.
- Olive P, Banáth J, Durand R. (1990): Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res.* 122, 86-94.
- Olive P, Frazer G, Banáth J. (1993): Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphocytes cells using the comet assay. *Radiat Res.* 136, 130-136.
- Olivieri G, Bodycote J, Wolff S. (1984): Adaptive response of human lymphocytes to low concentration of radioactive thymidine. *Science.* 223, 594-597.

- Osmak M, Horvat D. (1992): Chromosomal analysis of Chinese hamster V79 cells exposed to multiple gamma-ray fractions: induction of adaptive response to mitomycin C. *Mutat Res.* 282, 259-263.
- Ostling O, Johanson K. (1984): Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Comm.* 23, 291-298.
- Padovani L, Appolloni M, Anzidei P, Tedeschi B, Caporossi D, Vernole P, Mauro F. (1995): Do human lymphocytes exposed to the fallout of the Chernobyl accident exhibit an adaptive response? 1. Challenge with ionizing radiation. *Mutat Res.* 332, 33-38.
- Park S, Lee Y, Jeong K, Yoo S, Cho C, Lee Y. (1999): Different induction of adaptive response to ionizing radiation in normal and neoplastic cells. *Cell Biol Toxicol.* 15, 111-119.
- Plappert U, Raddatz K, Roth S, Fliedner T. (1995): DNA damage detection in man after radiation exposure. The comet assay: its possible application for human biomonitoring. *Stem Cell.* 13, 215-222.
- Price A. (1993): The repair ionizing radiation-induced damage to DNA. *Cancer Biol.* 4, 61-71.
- Pryor W. (1986): Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Ann Rev Physiol.* 48, 657-667.
- Ramana C, Boldogh I, Izumi T, Mitra S. (1998): Activation of apurinic/aprimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 5061-5066.
- Riley P. (1994): Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 65, 27-33.
- Rubin J. (1988): The molecular genetics of the incision step on the DNA excision repair process. *Int J Radiat Biol.* 54, 309-365.

- Ryabchenko N, Antoshchina M, Fesenko E, Ivanova T, Kondrashova T, Nasonova V. (1998): Cytogenetic adaptive response in cultured human lymphocytes dependence on the time of exposure to adapting and challenging doses of gamma-rays. *Mutat Res.* 418, 17-19.
- Sadekova S, Lehnert S, Chow T. (1997): Induction of PBP74/mortalin/Grp75, a member of the hsp70 family, by low doses of ionizing radiation: a possible role in induced radioresistance. *Int J Radiat Biol.* 72, 653-660.
- Samson L, Cairns J. (1977): A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*. *Nature.* 267, 281-282.
- Samson L, Schwartz J. (1980): Evidence for an adaptive DNA repair pathway in CHO and human fibroblast cell lines. *Nature.* 287, 861-863.
- Sanderson B, Morley A. (1986): Exposure of human lymphocytes to ionizing radiation reduces mutagenesis by subsequent ionizing radiation. *Mutat Res.* 164, 347-351.
- Sankaranarayanan K, von Duyn A, Loos M, Natarajan A. (1989): Adaptive response of human lymphocytes to low-level radiation from radioisotopes or X-rays. *Mutat Res.* 211, 7-12.
- Sasaki M. (1995): On the reaction kinetics of the radioadaptive responses in cultured mouse cells. *Int J Radiat Biol.* 68, 281-291.
- Sasaki K, Okada S. (1984) Radiation-induced DNA damage and cellular lethality in cultured mammalian cells. *Radiat Res.* 98, 479-490.
- Sasaki Y, Tsuda S, Izumiyama F, Nishidate E. (1997): Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Mutat Res.* 388, 33-44.
- Sato M, Bremner I. (1993): Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Rad Biol Med.* 14, 325-337.
- Schmid E, Bauchinger M, Nahrstedt U. (1989): Adaptive response after X-irradiation of human lymphocytes. *Mutagenesis* 4, 87-89.

- Selman J. (1983) Elements of Radiobiology. Charles C. Thomas Publisher. Springfield, EUA. 311 pp.
- Seong J, Kim G. (1994): Adaptive response to ionizing radiation induced by low dose of gamma ray in human hepatoma cell lines. *Yonsei Med J.* 35, 77-83.
- Seong J, Suh C, Kim G. (1995): Adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of gamma rays in human cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 33, 869-874.
- Shadley J, Afzal V, Wolff S. (1987): Characterization of the adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of x-rays to human lymphocytes. *Radiat Res.* 111, 511-517.
- Shadley J, Wolff S. (1987): Very low doses of x-rays can cause human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation. *Mutagenesis.* 2, 95-96.
- Shimizu T, Kato T, Tachibana A, Sasaki M. (1999): Coordinated regulation of adaptive response by protein kinase C and p38 mitogen-activated protein kinase. *Exp Cell Res.* 251, 424-432.
- Shiraishi N, Hochadel J, Coogan T, Koropatnik J, Waalkes M. (1995): Sensitivity to cadmium-induced genotoxicity in rat testicular cells is associated with minimal expression of the metallothionein gene. *Toxicol Appl Pharmacol.* 130, 229-236.
- Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175, 184-191.
- Singh N, Danner D, Tice R, Brant L, Schneider E. (1990): DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat Res.* 237, 123-130.
- Singh N, Tice R, Stephens R, Schneider E. (1991): A microgel technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutat. Res.* 252, 289-296.
- Singh N, Stephens R, Schneider E. (1994): Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int J Radiat Biol.* 66, 23-28.

- Szumiel I. (1998): Monitoring and signaling of radiation-induced damage in mammalian cells. *Radiat Res.* 150, 92-101.
- Tedeschi B, Caporossi D, Vernole P, Padovani L, Appolloni M, Anzidei P, Mauro F. (1995): Do human lymphocytes exposed to the fallout of the Chernobyl accident exhibit an adaptive response? 2. Challenge with bleomycin. *Mutat Res.* 1995; 332:39-44. Published erratum appears in *Mutat Res.* (1996) 356, 299-300.
- Tedeschi B, Caporossi D, Vernole P, Padovani L, Mauro F. (1996): Do human lymphocytes exposed to the fallout of the Chernobyl accident exhibit an adaptive response? 3. Challenge with bleomycin in lymphocytes from children hit by the initial acute dose of ionizing radiation. *Mutat Res.* 354, 77-80.
- Teoule R. (1987): Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int J Radiat Biol.* 51, 573-589.
- Tice R, Strauss G. (1995): The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells.* 13 (s1), 207-214.
- Tice R, Andrews P, Singh N. (1990): The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Sci.* 53, 291-301.
- Tice R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J-C, Sasaki Y. (2000): Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mut.* 35, 206-221.
- Troll W, Weisner R. (1985): The role of oxygen radicals as a possible mechanism of tumor promotion. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 25, 509-528.
- Trosko J. (1991): Possible role of intercellular communication in the modulation of biological response to radiation. *Yokohama Med Bull.* 42, 151-165.
- Tuschl H, Altmann H, Kovac R, Topaloglou A, Egg D, Gunther R. (1980): Effects of low dose radiation on repair processes in human lymphocytes. *Radiat Res.* 81, 1-9.

- Tuschi H, Kovac R, Altman H. (1983): UDS and SCE in lymphocytes of persons occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Health Phys.* 45, 1-7.
- Ueno A, Vannais D, Waldren C. (1995): A small dose of gamma-ray decreased the yield of mutants from a later larger dose in AL Chinese hamster-human hybrid cells: evidence for an adaptive response, in: *Proc 10th Int Cong Radiat Res. Germany.* 310.
- Van der Schans G, Paterson M, Cross W. (1983): DNA strand breaks and rejoining in cultured human fibroblast exposed to fast neutrons or gamma rays. *Int J Radiat Biol.* 45, 75-85.
- Venkat S, Chaubey R, Chauhan P. (1996): Radio-adaptive response in human lymphocytes *in vitro*. *Indian J Exp Biol.* 34, 909-912.
- Vijayalaxmi, Burkart W. (1989): Resistance and cross-resistance to chromosome damage in human blood lymphocytes adapted to bleomycin. *Mutat Res.* 211: 1-5.
- Vijayalaxmi, Tice R, Strauss G. (1992): Assessment of radiation induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis technique. *Mutat Res.* 271, 243-252.
- Vijayalaxmi, Leal B, Deahl T, Meltz M. (1995): Variability in adaptive response to low dose radiation in human blood lymphocytes: consistent results from chromosome aberrations and micronuclei. *Mutat Res.* 348, 45-50.
- Visvardis E, Tassiou A, Piperakis S. (1997): Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H₂O₂ and γ -irradiation with the alkaline comet assay. *Mutat Res.* 383, 71-80.
- von Sonntag C. (1987): *The Chemical Basis of Radiation Biology.* Taylor & Francis Printers. London, Great Britain. 515 pp.
- Ward J. (1988): DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation and reparability. *Progress in Nucl Acid Res Mol Biol.* 35, 91-125.

- Wardman P, Candeias L, Everett S, Tracy M. (1994): Radiation chemistry applied to drug design. *Int J Radiat Biol.* 65:35-41.
- Wienke J, Afzal V, Olivieri G, Wolff S. (1986): Evidence that 3-H-thymidine-induced adaptive response of human lymphocytes to subsequent dose of x rays involves the induction of a DNA repair mechanism. *Mutagenesis.* 1, 375-380.
- Wojcik A, Tuschl H. (1990): Induction of an adaptive response in C57BL mice pre-exposed in vivo to low doses of ionizing radiation. *Mutat Res.* 243, 67-73.
- Wojcik A, Streffer C. (1995): Application of a multiple fixation regimen to study the adaptive response to ionizing radiation in lymphocytes of two human donors. *Mutat Res.* 326, 109-116.
- Wojcik A, Sauer C, Zolzer F, Bauch T, Muller W. (1996): Analysis of DNA damage recovery processes in the adaptive response to ionizing radiation in human lymphocytes. *Mutagenesis.* 11, 291-297.
- Wojewodska M, Wojcik A, Szumiel I. (1994): Faster DNA damage repair in adapted human lymphocytes. In: U. Hagen, H. Jung & Streffer (Eds.), *Proc 10th Intl Cong Radiat Res.* Wurburg, Germany. 307, 10.
- Wojewodzka M, Kruszewski M, Szumiel I. (1996): Anti-CD38 prevents the development of the adaptive response induced by x-rays in human lymphocytes. *Mutagenesis.* 11, 533-536.
- Wojewodzka M, Kruszewski M, Szumiel I. (1997): Effect of signal transduction inhibition in adapted lymphocytes: micronuclei frequency and DNA repair. *Int J Radiat Biol.* 71, 245-252.
- Wolff S. (1992): Is radiation all bad?. The search for adaptation. *Radiat Res.* 131: 117-132.
- Wolff S. (1998): The adaptive response in radiobiology: evolving insights and implications. *Environ Health Perspect.* 106 (s1), 277-283.
- Wolff S, Afzal V, Wiencke J, Olivieri G, Michaeli A. (1988): Human lymphocytes exposed to low doses of ionizing radiations become refractory to high doses of

- radiation as well as to chemical mutagens that induce double strand breaks in DNA. *Int J Radiat Biol.* 53, 40-48.
- Wolff S, Wiencke J, Afzal V, Youngblom J, Cortés F. (1989): The adaptive response of human lymphocytes to chromosomal repair with the induction of specific proteins. *Low Dose Radiation: Biological Bases of Risk Assessment*. London: K.F. Baverstock and J.W. Stather (Eds.) Taylor & Francis, 446-454.
- Wolosschack G, Chang-Liu P, Jones C. (1990): Modulation of gene expression in Syrian hamster embryo cells. *Cancer Res.* 50, 339-344.
- Wuttke K, Streffer C, Muller W. (1993): Radiation induced micronuclei in subpopulations of human lymphocytes. *Mutat Res.* 281, 181-188.
- Yamaoka K, Edamatsu R, Akitane M. (1992): Effects of low-dose X-ray irradiation on old rats: SOD activity, lipid peroxidation level and membrane fluidity. *Low dose irradiation and biological defense mechanism*, Amsterdam: Suguhara (Eds.) Elsevier, 419-422.
- Youngblom J, Wiencke J, Wolff S. (1989): Inhibition of the adaptive response of human lymphocytes to very low doses of ionizing radiation by the protein synthesis inhibitor cycloheximide. *Mutat Res.* 227, 257-262.
- Zhang H, Zheng Z, Wei W, Cai C. (1998): Effects of pre-exposure of mouse testis with low-dose O ions or ⁶⁰Co gamma rays on sperm shape abnormalities, lipid peroxidation and superoxide dismutase (SOD) activity induced by subsequent high dose radiation. *Int J Radiat Biol.* 73, 163-167.
- Zhou P, Liu X, Sun W, Zhang Y, Wei K. (1993): Cultured mouse SR-1 cells exposed to low dose of gamma-rays become less susceptible to the induction of mutagenesis by radiation as well as bleomycin. *Mutagenesis.* 8, 109-111.
- Zhou P, Xiang X, Sun W, Liu X, Zhang Y, Wei Khou P. (1994): Adaptive response to mutagenesis and its molecular basis in a human T-cell leukemia line primed with a low dose of gamma-rays. *Radiat Environ Biophys.* 33, 211-217.

Reprinted from

MUTATION RESEARCH

DNA Repair

Mutation Research 433 (1999) 45–52

**Repair kinetics of gamma-ray induced DNA damage determined
by the single cell gel electrophoresis assay in murine leukocytes
in vivo**

M.T. Mendiola-Cruz, P. Morales-Ramírez *

Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Apartado Postal 18-1027, México, DF, Mexico

Received 29 May 1998; revised 28 September 1998; accepted 22 October 1998



Aims and scope

MUTATION RESEARCH, DNA Repair provides a forum for the comprehensive coverage of cellular responses to DNA damage in pro- and eukaryotes. It publishes papers on original observations on cellular, biochemical and molecular aspects of DNA damage and repair, and their relationship to human hereditary diseases, cancer and aging and to cell cycle progression. The journal also welcomes contributions which incorporate other aspects of the pathogenesis of cancer especially on the role of activated oncogenes and tumor suppressor genes and of genomic instability. Original papers and short communications are published at regular intervals. In addition, invited minireviews on selected topics that provide a 'state of the art' synopsis are regularly featured.

Editors

Prof. E.C. Friedberg University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA
Fax: (1) 214 648 4067; e-mail: friedber@utsw.swmed.edu

Prof. A.A. van Zeeland State University of Leiden, 2300 RA Leiden, The Netherlands
Fax: (31) 71 522 1615; e-mail: zeeland@fuff2.leidenuniv.nl

Prof. K. Tanaka Osaka University, Osaka 565-0871, Japan
Fax: (81) 6 877 9136; e-mail: ktanaka@imcb.osaka-u.ac.jp

Editorial Board

D. Bootsma, <i>Rotterdam, The Netherlands</i>	T. Lindahl, <i>London, UK</i>
A. Collins, <i>Aberdeen, UK</i>	V.M. Maher, <i>East Lansing, MI, USA</i>
R.P. Cunningham, <i>Albany, NY, USA</i>	L. McDaniel, <i>Dallas, TX, USA</i>
F. Eckardt-Schupp, <i>Neuherberg, Germany</i>	L.B. Meira, <i>Dallas, TX, USA</i>
J.M. Essigmann, <i>Brookline, MA, USA</i>	E. Moustacchi, <i>Paris, France</i>
K. Frenkel, <i>New York, NY, USA</i>	A. San'car, <i>Chapel Hill, NC, USA</i>
R.P.P. Fuchs, <i>Illkirch, France</i>	A. Sarasin, <i>Villejuif, France</i>
A. Ganesan, <i>Stanford, CA, USA</i>	R.A. Schultz, <i>Dallas, TX, USA</i>
L. Grossman, <i>Baltimore, MD, USA</i>	E. Seeberg, <i>Oslo, Norway</i>
P.C. Hanawalt, <i>Stanford, CA, USA</i>	M. Sekiguchi, <i>Fukuoka, Japan</i>
J.H.J. Hoeijmakers, <i>Rotterdam, The Netherlands</i>	Y. Shiloh, <i>Tel Aviv, Israel</i>
G. Holmquist, <i>Duarte, CA, USA</i>	W. Siede, <i>Atlanta, GA, USA</i>
M. Ikenaga, <i>Kyoto, Japan</i>	C.A. Smith, <i>Stanford, CA, USA</i>
H. Klein, <i>New York, NY, USA</i>	K. Tanaka, <i>Osaka, Japan</i>
K.H. Kraemer, <i>Bethesda, MD, USA</i>	L.H. Thompson, <i>Livermore, CA, USA</i>
B.A. Kunz, <i>Geelong, Vic., Australia</i>	B. van Houten, <i>Galveston, TX, USA</i>
J. Laval, <i>Villejuif, France</i>	G.C. Walker, <i>Cambridge, MA, USA</i>
R. Legerski, <i>Houston, TX, USA</i>	S.S. Wallace, <i>Burlington, VT, USA</i>
A. Lehman, <i>Brighton, UK</i>	M.Z. Zdzienicka, <i>Leiden, The Netherlands</i>

Instructions to Authors and addresses for submission of articles are provided at the back of each issue and at the website <http://www.elsevier.com/locate/mutres>



ELSEVIER

Mutation Research 433 (1999) 45–52



DNA Repair

Repair kinetics of gamma-ray induced DNA damage determined by the single cell gel electrophoresis assay in murine leukocytes in vivo

M.T. Mendiola-Cruz, P. Morales-Ramírez *

Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Apartado Postal 18-1027, México, DF, Mexico

Received 29 May 1998; revised 28 September 1998; accepted 22 October 1998

Abstract

The repair kinetics of the gamma rays induced DNA damage was determined in murine peripheral blood leukocytes in vivo by the comet assay. Mice were exposed to 1.0 Gy of gamma rays in a ^{137}Cs source and samples of peripheral blood were taken from their tails at different times. The repair was evaluated per mice in separate experiments by measuring the proportion of cells with tail (comets) in each sample. An average of nearly 80% of comets was obtained at the initial time after the exposure; 2 min later the frequency decreased to 45% and continued diminishing to 22% at 15 min. This evidences the presence of a rapid repair mechanism. For a period of 25 to 40 min after exposure there was a slight but consistent increase of comets from 22 to 38% followed by a second reduction, which could be due to a late repair process that causes strand breaks and then joined them. In summary our results indicated that this system seems to be appropriate for the study of the repair capacity of cells following exposure to ionizing radiation. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: DNA repair; Gamma ray; In vivo; Leukocyte; Comet assay

1. Introduction

Ionizing radiation interacts with living cells and produces different cytotoxic, mutagenic and carcinogenic effects. DNA is probably one of the principal targets for lethal effects of this physical agent. The main lesions produced by the physico-chemical interaction between ionizing radiation and cellular DNA are the single strand breaks (SSB), double strand breaks (DSB), DNA–DNA and DNA–protein crosslinks, alkali-labile sites and damage to purine and pyrimidine bases [1–3].

Cells are, in general, capable of repairing most of the lesions induced by physical or chemical agents. Single strand breaks and damaged bases are repaired by the action of the excision repair pathway, which is maintained in some species from bacteria to higher organisms [4]. Nevertheless, above a certain level of exposure, cells die due to an increase of non-repaired or misrepaired damage.

The single cell gel test (SCG test or comet assay), originally developed by Rydberg and Johanson in 1976 [5], is an adequate method to determine single strand breaks. This test was modified [6] to detect alkali-labile site production, caused by different agents in eukaryotic cells [7,8], which in turn has

* Corresponding author. Fax: +52-3-29-72-96

permitted the study of radiation-induced DNA-damage and repair [4,6,9–12].

It has been reported that the SCG technique is capable of detecting the increase in DNA damage induced by doses of gamma radiation as low as 0.05 Gy in peripheral human blood leukocytes [9] and in isolated granulocytes [10] *in vitro*. The comet assay has been used to study the capacity of different cells to repair the damage induced by ionizing radiation [6,12–16]. Most of the research on repair has been done *in vitro*; however, *in vivo* conditions allow one to observe the response as it occurs in nature. It could be easier to make the *in vivo* than the *in vitro* assay, although more difficult to interpret due to the physiological effects of treatments in the animal.

The aim of this study was to determine the repair kinetics of the gamma-ray-induced DNA damage in murine leukocytes *in vivo*, using the comet assay.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The chemicals used in these experiments were purchased from the following suppliers: agarose and low melting point agarose (LMP) from Gibco BRL (Gaithersburg, USA); Tris, sodium chloride, *N*-lauroyl-sarcosine, dimethyl sulfoxide, potassium chloride and ethidium bromide from Sigma Chemicals (St. Louis MO, USA); EDTA, triton X-100 and sodium hydroxide from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Animals

Two to three-months-old BALB/c male mice weighing approximately 30 g were used. They were kept in plastic cages with a sawdust bed, under controlled temperature (23–25°C), and light-dark cycles (12 h periods). The animals were fed with Purina Chow and tap water *ad libitum*.

2.3. Irradiation conditions

For the gamma ray treatment, the animals were put into a plastic tube and exposed to a ^{137}Cs source (Cesagammatron, Siemens), at a distance of 25 cm.

The dose rate was 0.0064 Gy/s and the exposure time was 2 min 36 sec giving a total dose of 1.0 Gy. The exposure rate was calculated with a chamber from the Laboratorio Nacional de Metrología (National Patron Laboratory).

2.4. Sample preparation

One mouse was used in each experiment and a total of five separate experiments were carried out in the same conditions. To take the peripheral blood samples, each mouse was confined in a plastic device with the tail on the outside, a small fragment was cut from the end of the tail and a blood drop of approximately 4 μl was obtained. Samples were taken at different times: one before the exposition which was considered as zero time (control), the second immediately after the irradiation (3 min), and the others every 5 or 10 min, within a period of 5 to 90 min. At least two samples of blood were taken at each time, resuspended in a microcentrifuge tube with 1 ml of Hank's solution, and kept cold to prevent the repair of any DNA lesion.

2.5. Slide preparation

The basic alkaline technique described by Singh et al. [6] was used, with some modifications as outlined below. Non-frosted slides with a dry layer of normal melting point agarose solution (200 μl , 0.75%) dissolved in Ca^{2+} and Mg^{2+} free PBS were utilized [17]. Blood samples were centrifuged at 2500 rpm during 10 min. The pellets were mixed with 100 μl of low melting point agarose (LMP) solution kept at 37°C (0.5%) and added to the dry slide, after which they were immediately covered with a No. 1 coverslip and then allowed to solidify at 4°C. The coverslip was carefully removed and a top layer of 100 μl 0.5% LMP agarose was added. A clean coverslip was put over the surface and the slides were placed on a tray kept on an ice plaque to allow LMP agarose to solidify. Next, the coverslip was removed and the slide immersed in a jar containing a freshly prepared cold lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 1% SLS and 10 mM Tris, pH 10.0) to which 1% Triton X-100 and 10% DMSO were added just before use. Finally, the slides were left at 4°C for 1 h in the dark.

Table 1
Percentage of comets at different times after exposure with 1.0 Gy of gamma rays in murine blood leukocytes

Time (min)	Exp.					$\bar{x} \pm \text{s.d.}$
	1	2	3	4	5	
5 before γ	6	3	4	3	10	5.2 ± 2.9
3 after γ	94	76	70	60	86	$77.2 \pm 13.3^{***}$
5	66	44	31	25	64	$46.0 \pm 18.7^{***}$
10	35	4	13	16	60	$32.0 \pm 18.9^*$
15	25	36	11	14	33	$22.6 \pm 9.7^*$
20	27	30	14	27	27	$22.6 \pm 6.2^*$
25	42	18	24	36	20	$31.0 \pm 8.9^*$
30	67	33	20	22	44	$38.0 \pm 19.1^*$
40	45	37	30	20	26	$28.2 \pm 10.3^*$
50	46	20	19	17	25	$26.0 \pm 11.6^*$
60	30	23	11	17	18	$18.4 \pm 7.0^*$
90	19	16	11	11	11	$14.4 \pm 4.7^*$

* $p \leq 0.01$, ** $p \leq 0.001$, *** $p \leq 0.0001$, Student's *t*-test. 300 cells were analyzed per animal at each time.

2.6. Electrophoresis

The slides were removed from the lysis solution, drained and placed in a horizontal position inside an electrophoresis chamber. The unit was filled with a fresh alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 13.0) preventing bubbles from forming at approximately 0.25 cm above the slides. To allow the unwinding of DNA chains and the transformation of alkali-labile sites into DNA breaks, the slides were exposed to the alkaline buffer for 40 min. Next, an electric current of 25 V and 300 mA was applied for 40 min, using a power supply (PS250-1, Techware Sigma, St. Louis MO, USA). All of these steps were conducted under low light conditions to prevent the occurrence of additional DNA damage. After electrophoresis, the power supply was turned off and the slides were removed from the buffer and placed horizontally on a tray. Tris buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) was added gently, drop by drop, to neutralize the excess alkali. The slides were allowed to lay for 5 min in each rinse, and this process was repeated 3 times.

2.7. Staining and storage

Ethidium bromide (EtBr) (20 $\mu\text{l}/\text{ml}$) (50 μl) was added to each slide and covered with a clean cover-

slip. The slides were kept in a humidifier for as long as 72 h to prevent the gel from drying. However, the best images were obtained within a period of 24 h after the assay. It was not convenient to store the slides for long because of DNA diffusion. A duplicate of each sample was dehydrated, immersing the slide in a jar containing cold pure methanol and placing it on a flat surface to dry; then it was stored in a closed box protected from light, humidity and dust. To analyze the samples, they were hydrated with Tris buffer and then stained with EtBr [17].

2.8. Analysis

The slides were examined using a fluorescent microscope (Zeiss, Axiomat) equipped with an excitation filter of 515–560 nm at a 250X magnification. Three hundred randomly selected leukocytes were analyzed from each sample to calculate the proportion of damaged cells being determined by the number of cells with a tail. Additionally, comets were classified according to their tail length with respect to the nuclei diameter from the non-damaged cells observed in the same field. The three categories considered were: short (tail size equivalent to one nucleus or less, $\leq 7 \mu\text{m}$), medium (until 2 nuclei, 7–14 μm) and large (more than 2 nuclei, $> 14 \mu\text{m}$). The percentage of each category was calculated.

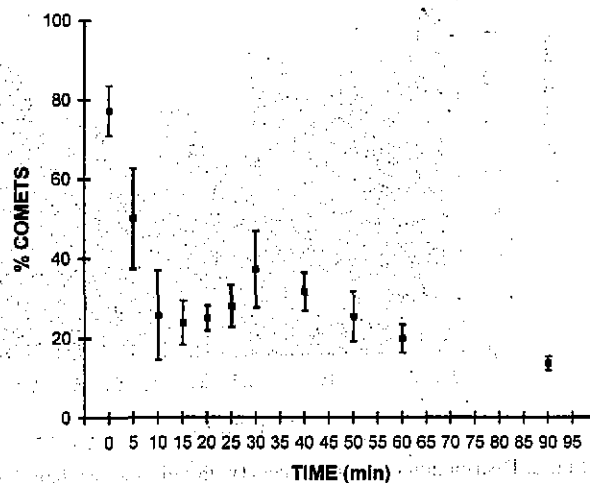


Fig. 1. Percentage of comets produced in murine leukocytes by gamma radiation at different times after exposure.

Table 2
Frequency of comets (%) in blood leukocytes from untreated mice in subsequent samples

Time (min)	Mouse				$\bar{x} \pm s.d.$
	1	2	3	4	
0	5	3	4	5	4.2 ± 1.0
3	6	10	7	8	7.7 ± 1.7
5	9	5	10	6	7.5 ± 2.3
10	10	11	10	8	9.7 ± 1.3
15	10	3	10	7	7.5 ± 3.3
20	9	10	7	5	7.7 ± 2.2
25	8	12	8	7	8.7 ± 2.2
30	7	3	8	6	6.0 ± 2.1
40	7	8	13	6	8.5 ± 3.1
50	7	6	14	5	8.0 ± 4.0
60	4	10	12	8	8.5 ± 3.4
90	9	10	12	8	9.7 ± 1.7

$p \leq 0.01$, Student's *t*-test.

300 cells were analyzed per animal at each time.

To determine the statistical differences of comet percentage obtained before and at each time after irradiation, Student's *t*-test was used with three levels of probability.

3. Results

Table 1 shows the percentage of comets obtained at each time before and after irradiation from sepa-

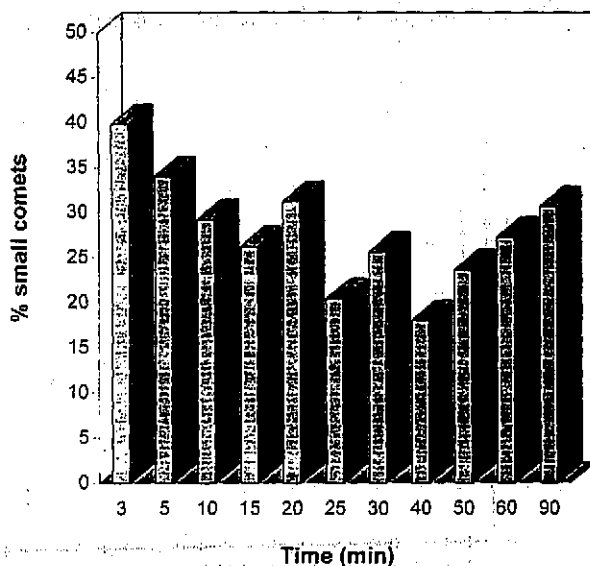


Fig. 2. Distribution of small comets (with tails shorter than 7 μm) produced in murine peripheral blood leukocytes by 1.0 Gy of gamma radiation in each time after exposure.

rate experiments, as well as the average and standard deviation calculated from them. The results indicate that in the control samples taken 5 min before the irradiation of each mouse, the average percentage of comets obtained was approximately 5%. The highest percentage, 80%, was obtained 3 min after radiation, which was statistically significant with a $p \leq 0.0001$ using the student's *t* test as compared with the control value. From 10 to 15 min after irradiation the percentage dropped considerably to 22% but this remains significantly different from the control with a $p \leq 0.01$. Between 20 and 30 min after exposure, there was an increase in the percentage of comets ($p \leq 0.001$). The frequency of comets at final sample times tended to diminish, although it remained significantly different from the control ($p \leq 0.01$). There are individual differences in the kinetics of comet production, particularly in the second increase that occurs between 25 to 40 min after exposure. The repair kinetics in Fig. 1 show the average percentage of comets produced by radiation at each time after exposure.

In order to establish if continuous sampling has an effect on the frequency of comets, untreated mice were sampled at the same times of the irradiated

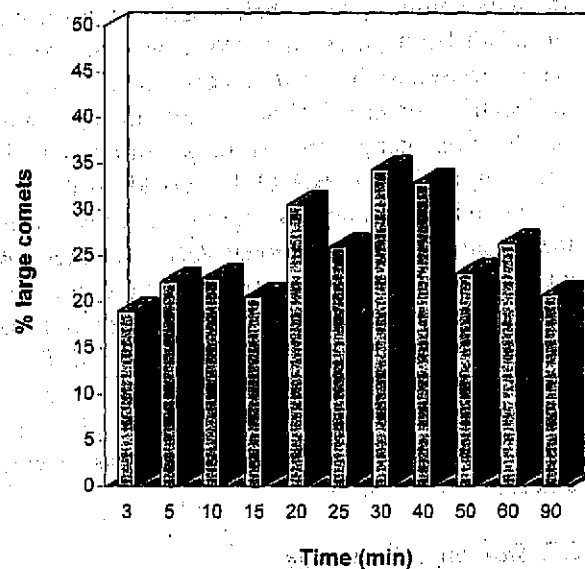


Fig. 3. Distribution of large comets (with tails longer than 14 μm) produced in murine blood leukocytes by 1.0 Gy of gamma radiation in each time after exposure.

animals, in independent experiments. Table 2 shows the results, which indicate that although there was an increase of comet percentage with respect to the first sample time; only the samples obtained 10 and 90 min after the first sample resulted statistically significant ($p < 0.01$, Student's *t*-test).

Even though there was a high variability among individuals with respect to the distribution of comet sizes, it was observed that during the second increase of damaged cells at 30 min, the proportion of comets with short tails diminished and then increased towards the end of the experiment (Fig. 2). Medium size comets showed no special trend (data not shown). Finally, the comets with large and short tails were distributed inversely in time, which means there is a low percentage of large tail comets at the early sample times, an increase nearing 30 min, and then a decrease at the latest sample times (Fig. 3).

4. Discussion

In the present study the damage detected in peripheral blood murine leukocytes 3 min after irradiation was never 100%, as could be expected immediately after exposure; however, this is the minimum time required to cut the end of the tail and take the first blood sample. Perhaps during this period a certain proportion of the lesions induced by radiation are being repaired; this is supported by the drastic decrease in the percentage of damaged cells observed in the subsequent times, i.e., the proportion of comets, nearly 80% detected at 3 min decreased 2 min later to 45%, and continued diminishing to 22% at 15 min. Extrapolating the slope from 3 to 5 min, the resultant line crosses the y axis near the 100% frequency. This evidences the presence of a rapid repair mechanism, which agrees with data previously obtained by analyzing the repair kinetics in human lymphocytes exposed to ionizing radiation using the comet assay. In the latter study it is clear that the bulk of DNA repair occurred within the first 15 min, and the rest was essentially completed 120 min after exposure [6]. Similar results have been obtained in lymphocytes from patients with different types of cancer [15]. Also, from the comparison of the repair kinetics between human peripheral blood lympho-

cytes and granulocytes, it is evident that the repair of single strand breaks was demonstrable after 15 min. incubation period in both populations. However, there was a trend for lymphocytes to repair their DNA faster and to a greater extent than granulocytes [12]. Similar findings were observed using cryopreserved lymphocytes, and no significant differences in repair capacities were detected between cryopreserved and freshly isolated lymphocytes [16].

In our experiments, a peak in the percentage of comets was detected between 25 and 40 min in all the experiments; this could be due to the presence of a certain type of lesions that become single strand breaks during the repair process. Similar results were obtained in a murine lymphoma cell line exposed to 2.0 Gy of gamma rays and incubated at 37°C; after 20 min, a slight indication of newly formed breaks was detected, which was explained by the action of endonucleolytic incisions at base-damage sites. These breaks were subsequently joined [18]. It is well known that the action of some excision repair enzymes on DNA produces single strand breaks [19].

The slope obtained between 40 and 90 min was lower than the one detected between 3 and 15 min, showing that there exists another period of late repair or the death of highly damaged cells. This phase was also described *in vitro* by Ostling and Johanson in 1984 [18], and similar data were found by Malcolmson et al. in 1995 [15] in human lymphocytes exposed to 2.0 Gy of gamma rays. The authors also analyzed the proportion of comets, to measure the damage in each sample and they reported that the period of slower repair was almost completed at 120 min.

The classification of comets according to their size has been used to determine the damage induced by UV-C radiation in human cells; moreover, it has been stated that this technique is sensitive enough to detect as few as 0.1 DNA breaks per 10^9 Da. The size and the fluorescence of comets were correlated quantitatively with the frequency of DNA breaks [20]. In the present work it was considered pertinent to analyze the distribution of comets by size in each sample. It is apparent that during the second increase of comet frequency, the lowest percentage of short tail comets and the highest percentage of long tail comets were detected. Lankinen et al. in 1996 [12] reported that the maximum comet lengths in human

lymphocytes were observed after a 30 min incubation period subsequent to UV exposure, these seems to represent the DNA breaks induced by the excision of pyrimidine dimers. This indicates that the time of DNA-break induction during repair of UV induced lesions is the same observed during the repair of non-strand breaks induced by the exposure to gamma rays.

The presence of long tail comets supports the possibility that during this period the repair of other type of lesions occurred. Due to the short time period between exposure and the presence of long tail comets, the probability that these comets represent apoptotic cells as described by Olive et al. in 1993 [21] is remote. The comets of apoptotic cells obtained by these authors *in vitro* are different from the ones that we obtained *in vivo*. They obtained comets with short, bright and cloudy pear-shape tails, with the vertex toward the residue of the nucleus and in our study the long tail comets presented nearly-normal shaped nuclei and long thin tails with low intensity.

The persistence of damaged cells still at 90 min could be explained on the basis that there exists a cell subpopulation which is more radiosensitive, more damaged or damaged in sites functionally critical for repair. This kind of subpopulations has been described by other authors in human blood cells [22]. Different authors have reported that the repair of ionizing radiation-induced lesions is essentially completed after an incubation period of 2 h in cells such as human fibroblasts [14], human fresh lymphocytes, [13,15,23] or cryopreserved [16], granulocytes [12]. However, even after this period, in some cases there were still small populations of cells with significant longer tails than the controls [6].

Comparing the results per animal in this study, it is evident that the percentage of damaged cells at each time is different from one mouse to another, but the repair kinetics are similar. Plappert et al. in 1995 [11], observed that DNA damage induction by radiotherapy and repair capacity vary between patients. Some authors have reported a certain variation in repair capacity among the lymphocytes and granulocytes of different donors [12]. It is highly conceivable that this represents a real cell-to-cell variation in the production and repair of DNA lesions. Although, in human beings there are other factors that can

affect the repair capacity, such as age [23], health, habits like smoking or drinking and physiological conditions [8].

Considering that most of the studies related to DNA damage and repair using the comet assay have been done *in vitro*; it is convenient to have a system that allows one to make experiments *in vivo* in order to eliminate the effect of *in vitro* conditions and the manipulation of cells prior to the experiment. *In vivo* systems permit the study of the cell response as it occurs inside the organism. In general, the *in vivo* experiments are more difficult to interpret due to the three levels of complexity involved, namely, physiological, cellular and molecular. In our system, this does not seem to be the case due to the possibility of discerning the effect of such levels because the physiological and cellular levels have been well studied. Furthermore, this system is easier to use than *in vitro*. The results of the present study are the first evidence of the repair kinetics in murine peripheral blood leukocytes *in vivo*.

There are other studies which have also been performed *in vivo* with different mutagens [24,25], but in such experiments the animals had to be sacrificed at each time so as to obtain the organs to analyze the damage.

Another important aspect is the validity to measure the damage in any system at specific time after exposure to mutagens. Some authors have established that the time to collect the cells depends on the mode of action of the mutagen; however, we consider that the damage should be determined at different times, because the repair process is always present and can alter the results. The system described in this article offers the possibility of making the analysis as often as desirable.

5. Conclusion

Our experiments *in vivo* indicate that murine peripheral blood leukocytes eliminate a high percentage of gamma ray induced lesions by a rapid repair mechanism that acts during the first 15 min after exposure. Later, other single strand breaks are produced in DNA due to the repair of different lesions. Another process of lower repair was detected, but

even at the end of the experiment there remained a percentage of damaged cells over the untreated controls, which could represent a more damaged subpopulation or one with a lower repair capacity.

Considering the sensitivity of this method, the advantage of measuring the damage in individual cells, the small number of cells required and the possibility of maintaining the organism alive during a long period, all make this system adequate for the study of repair capacity of lesions induced by ionizing radiation and may be for other mutagens, in blood cells in vivo. Future experiments will be focused on the study of the adaptive response in murine leukocytes in vivo using different adaptive and challenging ionizing radiation doses.

Acknowledgements

This study was supported by the 'Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología' (Science and Technology National Council) Project PN-3331. We wish to thank Angel Reyes, Perfecto Aguilar, Miguel Angel García and Felipe Beltrán for their excellent technical assistance, Víctor Tovar and the technicians Francisco Vergara and Francisco Martínez for animals radiation facilities, and Rosa María Noriega for English editing.

References

- [1] K. Sakai, S. Okada, Radiation-induced DNA damage and cellular lethality in cultured mammalian cells, *Radiat. Res.* 98 (1984) 479–490.
- [2] R. Teoule, Radiation-induced DNA damage and its repair, *Int. J. Radiat. Biol.* 51 (1987) 573–589.
- [3] U. Hagen, Current aspects on the radiation induced base damage in DNA, *Radiat. Environ. Biophys.* 25 (1986) 261–271.
- [4] A. Price, The repair of ionizing radiation-induced damage to DNA, *Cancer Biol.* 4 (1993) 61–71.
- [5] B. Rydberg, K. Johanson, in: P. Hanawalt, E. Friedberg (Eds.), *DNA Repair Mechanism*, Academic Press, New York, USA, 1978, pp. 465–468.
- [6] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.
- [7] Andrews, R. Tice, C. Nauman, The single cell gel (SCG) assay: a new tool for detecting organ-specific levels of DNA damage induced by genotoxic agents, *Environ. Mol. Mutagen.* 14 (1989) 10.
- [8] D.L. Fairbairn, P.L. Olive, K.L. O'Neill, The comet assay: a comprehensive review, *Mutation Res.* 339 (1995) 37–59.
- [9] Vijayalaxmi, R.R. Tice, G.H.S. Strauss, Assessment of radiation induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique, *Mutation Res.* 271 (1992) 243–252.
- [10] Vijayalaxmi, G. Strauss, R. Tice, Radiation-induced micronuclei in subpopulations of human lymphocytes, *Mutation Res.* 286 (1993) 181–188.
- [11] U. Plappert, K. Raddatz, S. Roth, T. Flieger, DNA-damage detection in man after radiation exposure- The comet assay — its possible application for human biomonitoring, *Stem Cells* 13 (1995) 215–222.
- [12] M.H. Lankinen, L.M. Vilpo, J.A. Vilpo, UV- and γ -irradiation-induced DNA single-strand breaks and their repair in human blood granulocytes and lymphocytes, *Mutation Res.* 352 (1996) 31–38.
- [13] R.R. Tice, P.W. Andrews, N.P. Singh, The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair, in: B.M. Sutherland, A.D. Woodhead (Eds.), *DNA Damage and Repair in Human Tissues*. Plenum, New York, USA, 1990, pp. 291–301.
- [14] N.P. Singh, R.R. Tice, R.E. Stephen, E.L. Schneider, A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides, *Mutation Res.* 252 (1991) 289–296.
- [15] A.M. Malcolmson, G. Davies, J.A. Hanson, J.O.T. Deeley, C.C. Gaffney, A.D. McGregor, I.J. Kerby, Determination of radiation-induced damage in lymphocytes using the micronucleus and microgel electrophoresis comet assay, *Eur. J. Cancer* 31A (1995) 2320–2323.
- [16] E.E. Visvardis, A.M. Tassiou, S.M. Piperakis, Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H_2O_2 and γ -irradiation with the alkaline comet assay, *Mutation Res.* 383 (1997) 71–80.
- [17] S. Eriksson, J. Nyrgen, Preparing Dried Slides, *Comet Workshop*, Prague, August, 1995, 19–20.
- [18] O. Ostling, K.J. Johanson, Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123 (1984) 291–298.
- [19] J. Rubin, The molecular genetics of the incision step on the DNA excision repair process, *Int. J. Radiat. Biol.* 54 (1988) 309–365.
- [20] C.M. Gedik, S.W.E. Ewen, A.R. Collins, Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells, *Int. J. Radiat. Biol.* 62 (1992) 313–320.
- [21] P.L. Olive, G. Frazer, J.P. Banáth, Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay, *Radiat. Res.* 136 (1993) 130–136.
- [22] K. Wuttke, C. Streffer, W.U. Müller, Radiation induced micronuclei in subpopulations of human lymphocytes, *Mutation Res.* 286 (1993) 181–188.
- [23] N.P. Singh, D.B. Danner, R.R. Tice, L. Brandt, E.L. Schnei-

- der, DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes, *Mutation Res.* 237 (1990) 123–130.
- [24] Y.F. Sasaki, E. Nishidate, F. Izumiyama, N. Matsukada, S. Tsuda, Simple detection of chemical mutagens by the alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow), *Mutation Res.* 391 (1997) 215–231.
- [25] Y.F. Sasaki, F. Izumiyama, E. Nishidate, N. Matsusaka, S. Tsuda, Detection of rodent liver carcinogen genotoxicity by the alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow), *Mutation Res.* 391 (1997) 201–214.

TRANSFER OF COPYRIGHT

To be signed by the author or, in the case of multiple authorship, by at least one of the authors who agrees to inform the others, or, in the case of a work made for hire, by the employer. The signed statement must be received by the Editor before the manuscript can be accepted for publication.

Copyright to the article by: M. T. Mendiola-Cruz and P. Morales-Ramirez

submitted under the title: Damage-Repair Kinetics and Early Adaptive Response Induced by Gamma Rays in Murine Leukocytes *in vivo*.

is hereby transferred to Plenum Publishing Corporation effective if and when the article is accepted for publication in:

SOMATIC CELL AND MOLECULAR GENETICS

For authors who are employees of the United States Government, the transfer of copyright is understood to be effective only to the extent that such copyright is transferable.


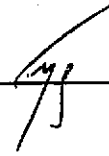
The authors explicitly reserve the following rights:

All proprietary rights other than copyright, such as patent rights.

The right to use all or part of this article in future works of their own, such as lectures, reviews, textbooks, or reprint books.

The right to make copies for the authors' own teaching use.

The right to use figures and tables in future publications, provided explicit acknowledgment is made of their initial appearance in this journal.

Signature		Signature	
M. T. Mendiola-Cruz		P. Morales-Ramirez	
Name (print)		Name (print)	
Title, if not Author		Title, if not Author	
1 / III / 02		1 / III / 02	
Date		Date	

1. The first part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

2. The second part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

3. The third part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

4. The fourth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

5. The fifth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

6. The sixth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

7. The seventh part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

8. The eighth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

9. The ninth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

10. The tenth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

11. The eleventh part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

12. The twelfth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

13. The thirteenth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

14. The fourteenth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

15. The fifteenth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

16. The sixteenth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

SOMATIC CELL AND MOLECULAR GENETICS

Editor-in-Chief
Elliot Kaufman, PhD

Editorial Office

Department of Molecular Genetics (M/C 669)
University of Illinois College of Medicine
900 South Ashland Avenue
Chicago, Illinois 60607-7170
Telephone: (312) 996-6975
FAX: (312) 355-1475
INTERNET: erk@uic.edu

February 26, 2002

Dr. P. Morales-Ramirez
Departamento de Genetica
Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares
Apartado Postal 18-1027
Mexico, D.F. MEXICO

Manuscript #: 24,062
Manuscript title: Damage-Repair Kinetics and Early Adaptive Response Induced by Gamma Rays in Murine Leukocytes *in vivo*.
Date received: October 29, 2001

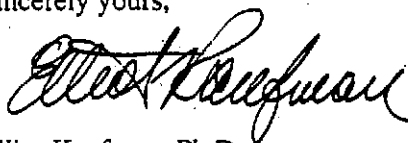
Dear Dr. Morales-Ramirez:

Your manuscript has been reviewed and accepted for publication in *Somatic Cell and Molecular Genetics*. You could expect to receive the proofs in 2-3 months.

At your earliest convenience, please return the enclosed copyright transfer form. The journal is also accepting the final version of manuscripts on computer disk. Therefore, if you wish, you may also include a disk containing the final version and labelled with title, authors, journal, computer used, software and version number used, disk format, and file name.

Thank you for submitting your article to *Somatic Cell and Molecular Genetics*.

Sincerely yours,



Elliot Kaufman, Ph.D.
Editor-in-Chief

EK/fp
enclosure

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

PHYSICS DEPARTMENT

PHYSICS 551

PROFESSOR [Name]

STUDENT [Name]

PHYSICS 551

PHYSICS DEPARTMENT

PHYSICS 551

PHYSICS DEPARTMENT

PHYSICS 551