

35
reje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

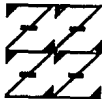
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

EFECTO CITOGENETICO E INDUCCION DE
RESPUESTA ADAPTATIVA EN LINFOCITOS
HUMANOS POR MITOMICINA C.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
SILVIA MARTINEZ TORRES

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



LO SUMADO A/DE
DE NUESTRA SELECCION

MEXICO, D. F.

ABRIL 1994.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Efecto citogenético e
inducción de respuesta
adaptativa en linfocitos
humanos por mitomicina C**

A mis padres:

Con mucho cariño y respeto
por haberme enseñado que cada
tropiezo no significa un fracaso
sino una meta más por superar.
Gracias por haber compartido mis
desvelos y anhelos a lo largo de
esta carrera.

Teresita y Raúl.

A mis hermanas:

Por los estímulos recibidos
y su ayuda incondicional.

Paty, Lólu y Alis.

A mis hermanos:

Ray, Manuel y Sergio.

El trabajo experimental en que se basa esta tesis, se realizó en el laboratorio de Genética del Departamento de Morfología, de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Q.B.P. Martha Cassani Galindo y la coasesoría del Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar a quienes agradezco su valiosa colaboración y enseñanzas.

Asimismo hago extensivo mi agradecimiento a la M. en C. Sandra Díaz Barriga por el apoyo otorgado.

Agradezco al G.B.P. Gustavo Miranda Contreras (F.E.S. "ZARAGOZA") por su colaboración y asesoramiento que me brindo en la realización de esta tesis.

R E S U M E N

La mitomicina C (MMC) es un antibiótico que se considera un derivado del uretano y la etilenamina, posee propiedades antibacterianas y antitumorales, se le considera un potente inductor de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y como prototipo de agente alquilante bioreductivo para uso clínico.

Debido a que las investigaciones anteriores acerca de la respuesta adaptativa (RA) se han realizado con radiaciones ionizantes, estimándose el daño celular por medio de aberraciones cromosómicas. El presente trabajo, se realizó en un sistema "in vitro" utilizando cultivos de linfocitos humanos estimulados con las siguientes dosis adaptativas de MMC: 5, 10 y 20 ng/ml y desafiadas con 200 y 400 ng/ml a dos diferentes tiempos de contacto que fueron cuatro y una hora respectivamente del mismo agente, se evaluó el daño celular por medio del número de ICH, ya que el ICH es un eficiente indicador de daño genotóxico y son mucho más frecuentes que las aberraciones cromosómicas en un intervalo que varía de 0.7 a 200 veces.

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

De lo anterior concluimos que la MMC es un agente capaz de inducir R.A y las dosis más eficaces fueron 5 y 10 ng/ml sin tener

ninguna influencia la concentración y tiempo de contacto del
antibiótico.

C O N T E N I D O

I. INTRODUCCION	
1.1 ANTECEDENTES Y MECANISMOS DE ACCION DE LA MITOMICINA C.....	1
1.2 ABERRACIONES CROMOSOMICAS	5
1.3 INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS.....	7
1.4 RESPUESTA ADAPTATIVA.....	10
II. OBJETIVOS.....	15
III. HIPOTESIS.....	16
IV. MATERIALES Y METODOS	
4.1 CURVA Dosis RESPUESTA.....	17
4.2 RESPUESTA ADAPTATIVA INDUCIDA CON MITOMICINA C.....	19
V. RESULTADOS.....	24
VI. DISCUSION.....	34
VII. CONCLUSIONES.....	40
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	41

Introducción

I N T R O D U C C I O N

El antibiótico mitomicina C (MMC) fue inicialmente aislado de Streptomyces caespitosus en 1956 y se considera como un derivado del uretano y la etilenamina, presenta una estructura policíclica con grupos altamente reactivos, la cual se encuentra esquematizada en la figura 1. Posee propiedades antitumorales y antibacterianas debido a su interacción con el DNA, a la vez que actúa como agente alquilante bifuncional. La MMC inhibe selectivamente la síntesis de DNA, pero no afecta la síntesis de RNA y proteínas. Reich y col. propusieron que la MMC actúa a través de la escisión de fibras de DNA y de ese modo previene la replicación. La despolimerización de DNA y la acumulación de fragmentos ácido solubles implica el sistema de reparación de DNA polimerasa como posible blanco de la actividad de la actividad de la mitomicina C (61).

Posteriormente se confirmó que este antibiótico es un inhibidor específico de la síntesis de DNA y se propuso que su acción química se debe a sus propiedades alquilantes. Iyer y Szibalsky sugirieron que la acción primaria de la mitomicina C es por entrecruzamiento entre el antibiótico y la molécula de DNA, produciendo posteriormente como acción secundaria la degradación del DNA (8,18). Sin embargo, el entrecruzamiento solamente se realiza después de la reducción de la molécula de mitomicina C a derivados de hidroquinona - reductasa dependiente de NADPH (fig. 2) (54).

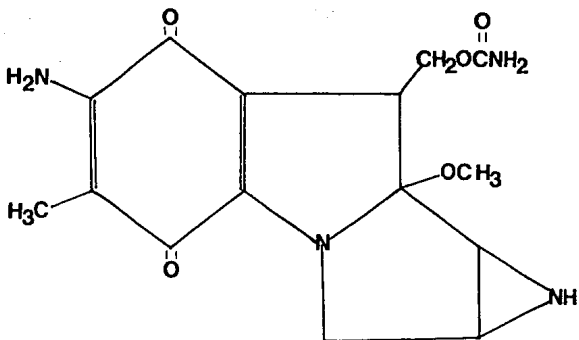


Fig. 1. Estructura química de la Mitomicina C.

La activación reductiva del antibiótico MMC produce intermediarios reactivos con la capacidad para producir entrecruzamiento entre hebras complementarias de DNA; tales entrecruzamientos se consideran las lesiones responsables de la citotoxicidad producida por dicho agente. En tejidos humanos solo una tercera parte del DNA muestra entrecruzamiento con el antibiótico (37). La formación de dicha alteración se correlaciona con la muerte celular debido a la dificultad para la separación de las fibras hermanas del DNA durante la replicación. En resumen, la toxicidad puede explicarse por la formación de un agente alquilante bifuncional totalmente reducido que se entrecruza con el DNA, como se muestra en la fig. 2. En presencia de oxígeno, el radical semiquinona formado después de la reducción de un electrón, puede transferir este electrón al oxígeno para generar el anión superóxido y regenerar la quinona oxidada. La detección de superóxido y radicales hidróxilo después de la reducción de MMC en presencia de oxígeno coincide con el mecanismo de reacción indicada. Una variedad de estudios han demostrado que NADPH-citocromo C reductasa y xantina oxidasa son capaces de activar la MMC en presencia o ausencia de oxígeno (29,54).

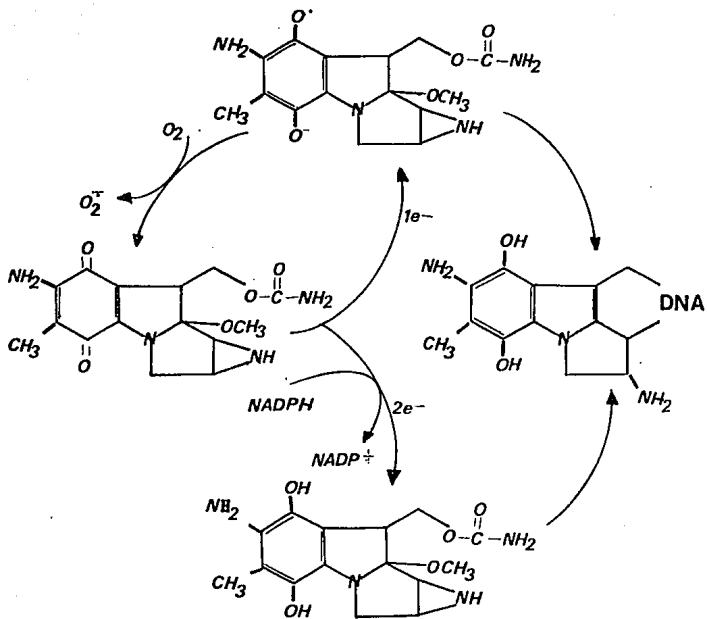


Fig.2. Vías de biosíntesis de la Mitomicina C.

EFFECTOS CITOGENETICOS PRODUCIDOS POR LA MMC

1.-Aberraciones cromosómicas

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

Existen numerosas evidencias que confirman la genotoxicidad de la MMC, como son estudios en Vicia faba, dónde se han observado diversos tipos de aberraciones cromosómicas. En este sistema la frecuencia de aberraciones no se afecta por anoxia, cambios de pH o temperatura (30,31,75). El tratamiento de leucocitos humanos en la fase G0, G1 o S también ha producido aberraciones cromosómicas similares a las detectadas en Vicia faba. El rompimiento de cromosomas causado por la MMC se ha atribuido a la unión de fibras complementarias de DNA por enlaces covalentes (31). En Vicia faba las aberraciones cromosómicas inducidas por MMC se localizan comunmente en las regiones heterocromáticas, con una frecuencia máxima de

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

Las configuraciones cuadrirradiales constituyen un buen modelo para el estudio de aberraciones cromosómicas inducidas por la MMC. En este modelo la distribución de los sitios donde se presentan las aberraciones se ha correlacionado con los patrones de bandeo; así Morad y colaboradores encontraron que los intercambios coinciden con las bandas C en preparaciones con quinacrina, y determinaron que las constricciones secundarias de los cromosomas 1, 9 y 16 son los más involucrados (36,63).

2.- Intercambio de Cromátidas Hermanas

El intercambio de cromátidas hermanas (ICH) refleja un intercambio de segmentos simétricos y equivalentes entre las cromátidas de un mismo cromosoma. La diferenciación de cromátidas hermanas se realizó inicialmente por Taylor y colaboradores en 1957, quienes usaron la incorporación de timidina tritiada (Hdt^3) seguida por autorradiografía para demostrar la distribución semiconservativa del DNA entre las cromátidas hermanas (67).

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

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

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

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

Tabla 1. Ejemplos de mutágenos que inducen ICH

Tipo de Agentes	Ejemplos
Alquilantes	Etilmetanosulfato mitomicina C
Colorantes	Daunorobicina
Bases Análogas	Bromodesoxiuridina
Irradiación	BrdU-luz ultravioleta o timidina tritiada
Virus	SV-40
Misceláneos	Acetaldehído

3.- Respuesta Adaptativa

Se conoce como respuesta adaptativa (R.A) a la resistencia celular creada contra diversos agentes mutagénicos. La inducción de la respuesta ocurre cuando las células se exponen a concentraciones bajas de los agentes que lesionan al DNA, lo que provoca mayor actividad en un sistema de reparación y da como consecuencia una disminución en el daño al DNA, cuando las células se someten posteriormente a concentraciones elevadas de los mismos o distintos agentes (tabla No. 2) (43, 52).

El primer sistema en el que se observó este tipo de respuesta fue en mutantes de E. coli por Samson y Cairns en 1977, al observar que dichos mutantes se acumulaban durante el crecimiento continuo de bacterias en presencia de bajas concentraciones de N-metil-N-Nitro-N-Nitrosoguanidina (MNNG). La reversión hacia histidina sólo se induce durante la primera hora del cultivo en un medio que contenía 1 g de MNNG y su frecuencia no se incrementó durante el resto del experimento el cual se prolonga de 4 a 7 días. También observaron que esta resistencia no se presentaba cuando la síntesis de proteínas era inhibida por el cloranfenicol por lo que al principio se propuso que una proteína era la responsable de la reparación del DNA cuando se producían lesiones mutagénicas (2).

Otro estudio en microorganismos mostró que una cepa de Vibrio cholerae expuesto a dosis bajas de furozolidona por un periodo entre 5 a 60 minutos, las bacterias fueron 100% más resistentes al efecto letal de una dosis de reto, o sea una dosis subsecuente casi 100 veces mayor, en relación a cultivos control no expuestos a las dosis adaptativas. Estas investigaciones también pusieron de manifiesto que

la Respuesta Adaptativa es dependiente al tiempo de exposición pues la máxima respuesta se observó entre los 15 y 30 minutos (56). Dentro de este mismo contexto se ha logrado determinar que además de las bacterias algunas otras especies presentan respuesta adaptativa como es el caso también del virus SV-40 en el cual se ha encontrado protección contra la toxicidad y mutagenicidad de agentes metilantes. Estudios posteriores han mostrado la presencia de un sistema similar en células de mamíferos. A continuación se resumen algunas investigaciones que indican la adaptación de células de mamíferos incluyendo al humano frente a agentes alquilantes y radiaciones. En 1984 Olivieri y col. fueron los primeros en demostrar que un pretratamiento crónico de linfocitos humanos con timidina tritiada hace a las células menos susceptibles a la inducción de aberraciones cromosómicas por subsecuente dosis de desafío de rayos X. Resultados similares fueron encontrados utilizando los mismos agentes solo variando las condiciones de adaptación y desafío por Sankaranarayanan y col.(1989) y Vijayalaxmi y Burkart (1990). Samson y Schwartz también demostraron que un pretratamiento con MNNG producía una disminución en la frecuencia de ICH así como también reducía la mortalidad celular como resultado de la acción posterior de los agentes metilantes N-metil-N-Nitro-N-nitrosoguanidina o N-metil-N-nitrosourea (MNU) sobre células ováricas en hamster chino.

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

otras etapas del ciclo celular. No obstante cuando los linfocitos fueron irradiados con una dosis de 0.01 a 0.05 Gy de rayos X antes de ser estimulados por fitohemaglutinina en G0 seguida de una dosis de reto de 1.5 Gy (150 rad) no presentaron la respuesta, en tanto que las células en G1 sometidas a las mismas dosis si la presentaron manifestándose como una disminución de los rompimientos cromatídicos. También se ha determinado que la respuesta adaptativa persiste por lo menos tres ciclos celulares después de su estimulación en cultivos de 66 a 72 hrs. con un incremento en metafases de 3a. división (13,27,58).

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

Otro aspecto del tema es que la respuesta adaptativa no se presenta únicamente al emplear la misma substancia como dosis adaptativa y de reto, sino que puede producirse empleando distintos agentes como por ejemplo linfocitos humanos adaptados a dosis bajas de rayos X muestran menos rompimientos cuando son desafiados con Bleomicina (70). También en ratones de la cepa C57BL inicialmente irradiados con 5 cGy/día de rayos X (dosis adaptativa), posteriormente extrajeron los linfocitos del baso en forma periódica (1,3,7,19 y 26 días) y se trataron con MMC a una concentración de 10^{-7} M, los resultados mostrarán una disminución en la producción del ICH comparado con los testigos (70). Vinculado con lo anterior esta un experimento "in vitro" efectuado por Woole y col. en el que

informan de una resistencia cruzada entre MMC y la luz ultravioleta; presentandose una disminuci3n en las lesiones cromatidicas e isocromatidicas.

TABLA 2

ANTECEDENTES ACERCA DE LA RESPUESTA ADAPTATIVA

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

Objetivos

OBJETIVOS

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

Hipótesis

H I P O T E S I S

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

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

Material y Métodos

MATERIAL Y METODOS

Curva Dosis- Respuesta

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

I. Siembra:

1.- Se obtuvieron 10 ml de sangre venosa usando una jeringa heparinizada de un donador clínicamente sano del sexo femenino.

2.- Se preparó la cantidad necesaria de frascos de cultivo estériles cada uno con las siguientes sustancias:

a) 0.3 ml de solución estéril de bicarbonato de sodio al 4% por cada 10 ml de medio de cultivo.

b) 0.5 ml de fitohemaglutinina.

c) 0.5 ml de sangre total.

d) 8.5 ml de medio Mc. Coy 5A.

3.- A las 24 hrs. de cultivo a 37°C se agregó 45 l de bromodesoxiuridina y se volvió a incubar.

4. A las 48 hrs se agregó MMC en concentraciones de 50,75,100,150 y 300 ng/ml y se volvió a incubar por 24 hrs. a 37°C.

5.- A las 23 hrs de incubación se agregó 0.25 ml de colchicina y se volvió a incubar 1 hr.

II. Cosecha:

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

2.- Se centrifugó 10' a 1200 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en KCl 0.075 M a 37°C.

3.-Se incubó 20' a 37 °C.

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

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

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

III. Preparación de laminillas

1.- Se desengrasaron los portaobjetos que permanecieron en alcohol etílico 96° por lo menos 2 hrs.

2.- En el tubo con la suspensión celular se dejó aproximadamente 1 ml de fijador, se resuspendió con pipeta Pasteur y se dejó caer de 2 - 3 gotas sobre el portaobjetos a una distancia aproximada de 20 cm.

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

IV. Tinción:

1.- Las laminillas se sumergieron en un vaso de Coplin con colorante de Hoechst 33258 por 40'.

2.- Se lavó con agua de la llave y se secó a 60 °C por 15'.

3.- Se agregó a las laminillas unas gotas de citrato-fosfato pH 7.0 cubriendolas con cubreobjetos y se expuso a la luz negra por 40'.

4.- Se lavó con agua de la llave y se secó en la estufa a 60 °C por 15'.

5.- Las laminillas se sumergieron en un vaso de Coplin conteniendo solución salina-citrato por 20' a 60 °C.

6.- Se lavó con agua de la llave y se secó a 60 °C por 15'.

7.- Se tiñó con colorante de Siemsa al 2% en amortiguador de Sorensen a pH 6.8.

V. Observación de laminillas:

1.- Se analizaron 30 mitosis de segunda división por cada dosis para establecer la frecuencia de ICH.

2.- Se analizaron 1000 células para determinar el índice mitótico

3.- Se analizaron 100 células (1a, 2a y 3a. división) para determinar la proliferación celular.

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

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

1. Siembras:

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

2.- Se preparó la cantidad necesaria de frascos de cultivo estériles, para tener cuatro series de frascos de cultivo. Cada uno contenía las siguientes sustancias:

a) 0.3 ml de solución estéril de bicarbonato de sodio al 4% por cada 10 ml de medio de cultivo.

b) 0.5 ml de fitohemaglutinina.

c) 0.5 ml de sangre total.

d) 8.5 ml de medio Mc. Coy 5A.

3.- Para cada serie se efectuó un cultivo por duplicado, correspondiendo el primero para observar el comportamiento de la respuesta adaptativa, el segundo para el testigo de la dosis de reto, el tercero para los testigos de las dosis estimulante y la cuarta para el testigo negativo.

El cultivo en que se observó la respuesta adaptativa tuvo una preincubación de 45 hrs a 37°C, una vez que concluyó esta se

adicionó las dosis adaptativas o estimulantes (5, 10 y 20 ng/ml) y se continuó la incubación a 37 °C por 24 hrs.

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

a) Se vertió el contenido de los frascos de cultivo en tubos con tapón de rosca y se centrifugó 10' a 1500 rpm.

b) Se quitó el sobrenadante y se agregó 5 ml de medio Mc. Coy con Bicarbonato, y se agitó para romper el botón celular.

c) Se centrifugó 10' a 1500 rpm y se eliminó el sobrenadante.

5.- Se resembraron las células en 9 ml. de medio Mc. Coy conteniendo bicarbonato y fitohemaglutinina. Se agregó 45 l. de 5-Bromodesoxiuridina (10 ng/ml) y se dejó actuar 48 horas a 37°C.

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

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

II. Cosecha:

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

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

3.- Se incubó 20' a 37°C.

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

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

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

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

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

III. Preparación de laminillas:

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

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

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

IV. Tinción:

1.- Se sumergieron las laminillas en un vaso de Copling con colorante de Hoescht 33258 por 40'.

2.- Se lavó con agua de la llave y se secó a 60 °C por 15'.

3.- Se agregó a las laminillas unas gotas de buffer citrato-fosfato pH 7.0, se colocó un cubreobjetos y se expuso a la luz negra por 40'.

4.- Se lavó con agua de la llave y se secó en la estufa a 60 °C por 15'.

5.- Las laminillas se sumergieron en un vaso de Coplin conteniendo una solución salina-citrato por 20' a 60 °C.

6.- Se lavó con agua de la llave y se secó a 60 °C por 15'

7.- Se tiñó con colorante de Giemsa al 2% en amortiguador de Sorensen pH 6.8.

V. Observación de laminillas:

1.- Se observaron 30 mitosis de segunda división por dosis para establecer la frecuencia de ICH.

2.- Se observaron 1000 células para determinar el índice mitótico.

3.- Se observaron 100 células (1a, 2a, y 3a división) para determinar la proliferación celular.

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

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

En el resto de los pasos se procedió de igual manera que en el experimento 1.

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

Fig.3. Protocolo seguido en el presente estudio de respuesta adaptativa.

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

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

P= Fitoheماغلوتينina S= Dosis estimulante C=Dosis de desafío B=Bromodesoxiuridina H=cosecha.

Resultados

RESULTADOS

1.- EFECTO DE LA MITOMICINA C.

A continuación se describen los resultados obtenidos en este trabajo. El primer aspecto a analizar fue el comportamiento de la mitomicina C (MMC) sobre los linfocitos humanos, estos resultados se presentan en la tabla número 3 en la que podemos observar los parámetros utilizados que fueron los intercambios de cromátidas hermanas (ICH), índice mitótico (IM) y el índice de replicación (IR), el cual nos permite estimar la velocidad de la proliferación celular. También podemos observar que las dosis utilizadas fueron de 0, 50, 75, 100, 150 y 300 ng/ml. En la misma tabla observamos que el valor promedio fue de 7.3 ± 0.42 para el testigo negativo y que dicho valor aumenta proporcionalmente con el incremento de las dosis. Para 75 ng/ml se presentó un incremento de 2.5 veces en relación al testigo negativo y ya para la última dosis la MMC aumento la frecuencia de ICH más de cuatro veces estableciéndose una relación dosis dependiente con la concentración de la MMC. El análisis de Chi cuadrada fue usada para analizar la variación interindividual para cada dosis de MMC. La correlación probada muestra que las frecuencias de ICH aumentan como una función lineal de las dosis de MMC ($r = 0.921$, $y = 0.0742x + 11.39$), mostrando una diferencia significativa con relación al testigo negativo a partir de la dosis de 75 ng/ml ($p = 0.01$). En la gráfica número 1 se presentan los resultados con un análisis de regresión lineal. En cuanto al IM se observó una disminución de 1 a 0.5 indicando que con la dosis de 300 ng/ml la división celular se abate considerablemente provocando alta toxicidad para las células.

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

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

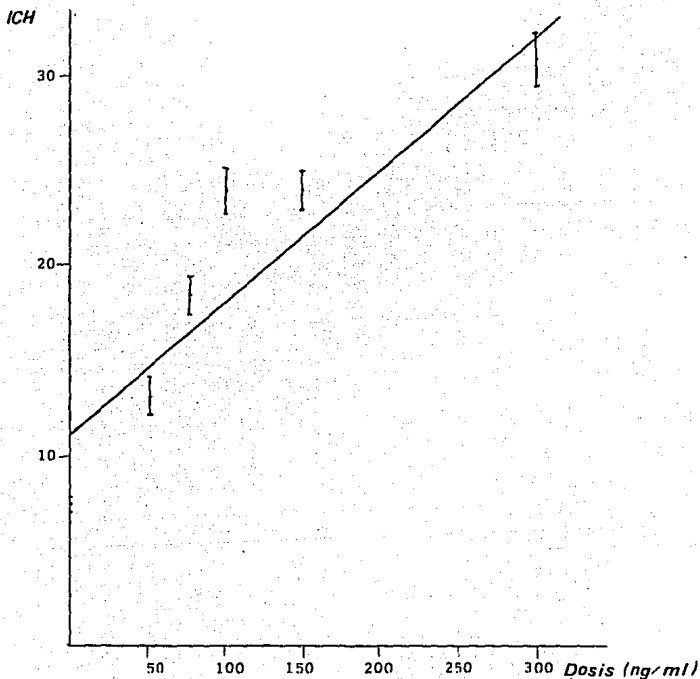
En la primera columna se presenta la media de ICH para el testigo negativo y testigos de las dosis adaptativas, en la siguiente se encuentran los resultados para el testigo de la dosis de reto y los problemas del donador 1, continuando las columnas en el mismo orden para el donador 2. Al aplicar ANOVA (análisis de varianza) con clasificación doble y T de student encontramos que solo hubo diferencias significativas al comparar al testigo negativo con el de reto y al testigo de 20 ng/ml con el tratamiento de 20 ng/ml más la dosis de 200 ng/ml para ambos donadores y para la dosis de reto de 400 ng/ml sólo hubo diferencia significativa con el testigo negativo y el de reto (Tabla número 5), debido a que las frecuencias de ICH de los controles positivos (sólo dosis de reto) tienden a ser altos mientras que las dosis adaptativas no. En testigos negativos (sólo dosis de adaptación) la frecuencia de ICH fue ligeramente variable

para ambos tratamientos y ambos donadores; como en el caso del donador 1 con la dosis de reto de 200 ng/ml que muestra para T_0 una $X = 8.26$ y $T_5 X = 8.6$ de ICH; aunque las diferencias son muy pequeñas en ambos sujetos se sigue conservando en todas las concentraciones utilizadas que la frecuencia de ICH son dependientes de la concentración de MMC. Una disminución de 30 a 50 % de ICH inducida por MMC fue observada en cultivos de ambos sujetos (Tabla número 6) en comparación al valor esperado el cual se obtuvo con la siguiente formula:

Valor esperado = Valor de DA + Valor de DR - Valor del testigo neg.

En la tabla número 6 se encuentran resumidos los resultados de ambos tratamientos y donadores, la primera columna indica el tipo de tratamiento, la siguiente la media de ICH observado para cada tratamiento con su error estandar, después el valor que se hubiera esperado y la ultima columna presenta los porcentajes de inhibición que se obtuvieron. En la misma tabla se pone de manifiesto que al comparar los valores de ICH observados con los esperados, la diferencia para ambos donadores es notoria ya que el valor observado es muy inferior al esperado. En el ensayo con la dosis de 200 ng/ml la minima inhibición fue de 36.98% para el donador 1 y para el 2 fue de 34.70% y la máxima fue de 49.26% y 42.09% respectivamente, mientras que el ensayo con la dosis de reto de 400 ng/ml el porcentaje de inhibición minima para el donador 1 fue de 30.22% y para el donador 2 de 30.30% mientras que la máxima fue de 53.8% y 45.90% respectivamente. Esto se observa de forma más objetiva en la gráfica 2 y 3 en las que se comparan por medio de barras los valores obtenidos para cada grupo de tratamientos.

Gráfica No.1



Frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas producidas por la mitomicina C en cultivo de linfocitos humanos.

Análisis de regresión lineal: $Y=0.0742 \cdot x + 11.39$

$r=0.921$

TABLA 3

**FRECUENCIAS DE INTERCAMBIO DE CROMATIDES HERMANAS (ICH)
PRODUCIDAS POR MITOMICINA C EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS**

DOSIS ng/ml	X	ICH \pm e.e.	I.M. %	PROLIFERACION		CELULAR	
				1a	2a	3a	I.R.
0	7.3	0.42	1.0	19	60	21	2.02
50	13.0*	0.75	1.4	27	60	13	1.87
75	18.5*	0.59	1.1	37	62	7	1.82**
100	23.8*	1.07	1.2	39	57	4	1.65**
150	23.8*	0.97	1.0	43	53	4	1.61**
300	31.3*	1.37	0.5	43	56	1	1.56**

e.e. Error estandar

I.M. Indice Mitotico

LR Indice de replicación

* Diferencia significativa con t de student $p=0.01$

** Diferencia significativa con Xi cuadrada $p=0.01$

El análisis de regresión lineal para el I.M: $y=0.0742x + 11.39$
 $r=0.921$

TABLA 4

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

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

e.e. = error estandar

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

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

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

TABLA 5

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

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

e.e.= Error estandar

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

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

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

TABLA 6

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

TRATAMIENTO ng/ml	DONADOR 1			DONADOR 2				
	ICH OBSERVADO	e.e.	ICH ESPERADO	INHIBICION %	ICH OBSERVADO	e.e.	ICH ESPERADO	INHIBICION %
TESTIGO (0)	8.26	0.52			6.73	0.92		
MMC (200)	20.16	0.55			15.06	0.99		
MMC.DA(5)	8.16 ^a	0.60			7.83 ^a	0.55		
MMC.DA(10)	10.73 ^{a,b}	0.43			8.76 ^{a,b}	0.65		
MMC.DA(20)	11.11 ^{a,b}	0.40			10.53 ^{a,b}	0.61		
MMC.DA + DR (5 + 200)	10.39 ^{a,b}	0.64	20.50	49.26	8.2 ^a	0.51	14.16	42.09
MMC.DA + DR(10 + 200)	10.99 ^{a,b}	0.63	22.63	51.43	9.26 ^{a,b}	0.66	15.09	38.63
MMC.DA + DR(20 + 200)	14.5 ^{a,b}	0.83	23.01	36.98	11.0 ^{a,b}	0.61	16.86	34.70
TESTIGO(0)	7.8	0.39			7.43	0.39		
MMC (400)	17.86	1.04			17.83	0.91		
MMC.DA(5)	8.0 ^a	0.51			7.73 ^{a,b}	0.40		
MMC.DA(10)	11.0 ^{a,b}	0.48			10.46 ^{a,b}	0.81		
MMC.DA(20)	12.34 ^{a,b}	0.45			13.1 ^{a,b}	0.56		
MMC.DA + DR(5 + 400)	8.33 ^a	0.49	18.06	53.8	9.6 ^{a,b}	0.50	17.1	43.27
MMC.DA + DR(10 + 400)	12.53 ^{a,b}	0.66	21.06	40.5	10.76 ^{a,b}	0.56	19.83	45.90
MMC.DA + DR (20 + 400)	15.63 ^{a,b}	0.78	22.40	30.22	13.96 ^{a,b}	0.72	20.03	30.30

DA= DOSIS DE ADAPTACION

DR= DOSIS DE RETO

e.e.= ERROR ESTANDAR

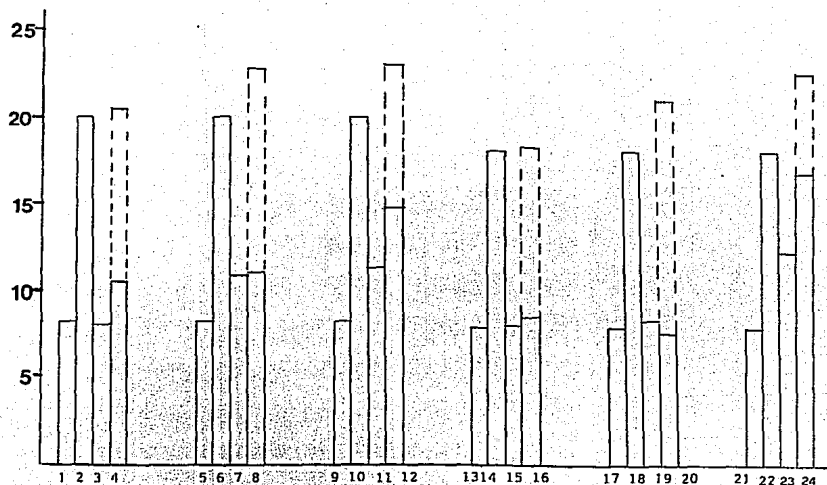
VALOR DE ICH ESPERADO= VALOR OBTENIDO CON LA DA + VALOR OBTENIDO CON LA DR- VALOR DEL TESTIGO

^a- SIGNIFICATIVO RESPECTO A MITOMICINA C

^b- SIGNIFICATIVO RESPECTO A SU TESTIGO

ICH

Gráfica No. 2



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

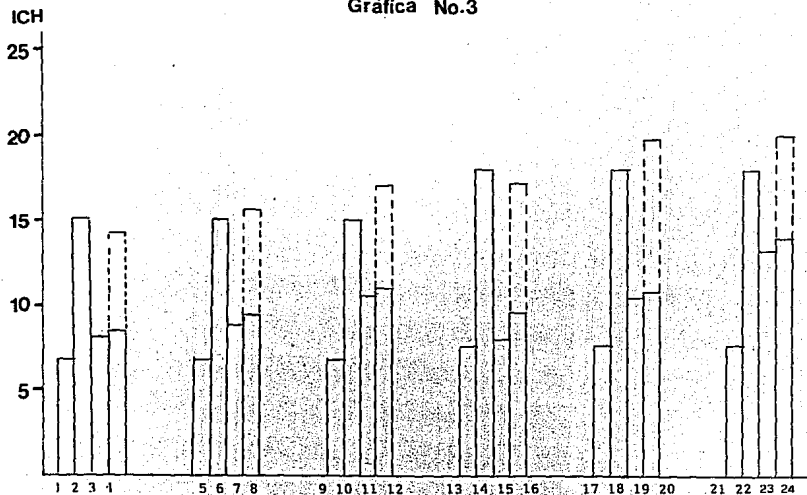
—— ICH OBSERVADO

----- ICH ESPERADO

1, 2, 3, 4=0,200, 5, 5+200, 5, 6, 7, 8=0,200; 10, 10+200, 9, 10, 11, 12=0,200, 20, 20+200

13, 14, 15, 16= 0,400, 5, 5+400, 17, 18, 19, 20=0,400, 10, 10+400, 21, 22, 23, 24=0,400, 20, 20+400.

Gráfica No.3



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

———— ICH OBSERVADO

----- ICH ESPERADO

1, 2, 3, 4=0, 200, 5, 5+200. 5, 6, 7, 8 =0, 200, 10, 10+200. 9, 10, 11, 12=0, 200, 20, 20+200

13, 14, 15, 16=0, 400, 5, 5+400. 17, 18, 19, 20=0, 400, 10, 10+400. 21, 22, 23, 24=0, 400, 20, 20+400.

Discusión

D I S C U S I O N

Recientemente han surgido una serie de investigaciones para demostrar si es posible inducir un mecanismo de reparación de DNA y determinar el tipo de lesiones clastogénicas que pudiera afectar. La mayoría de estas se han realizado usando como agente estimulante la radiación y estiman el daño celular por medio de aberraciones cromosómicas ya sea en bacterias, plantas, linfocitos y fibroblastos humanos, razón por la cual se realiza este trabajo con el mutageno químico mitomicina C, y para evaluar el potencial de este antibiótico como inductor de respuesta adaptativa se estimó el daño celular por medio de intercambio de cromátidas hermanas que se consideran indicadores extremadamente sensitivos de cromosomas dañados (67). La MMC se considera un derivado del uretano y la etilenamina a la vez que posee propiedades antibacterianas y antitumorales debido a su interacción con el DNA actuando como agente alquilante bifuncional por lo cual se le considera fuerte inductor de ICH y como prototipo de agente alquilante biorreductivo para uso clínico (54,61).

Los resultados mostrados en la tabla 4 y 5 demuestran la capacidad de los linfocitos humanos para inducir un mecanismo de reparación previa exposición de MMC y posterior desafío a dosis mayores con lo que demostramos que se llevó a cabo el proceso denominado "Respuesta Adaptativa" manifestandose en que no hay gran diferencia en el número de ICH antes y después del tratamiento. Efectos similares fueron observados por Cairns en 1970 en cultivos de E. coli que son expuestos a dosis bajas de MNNG y desafiados con una dosis mayor de agentes alquilantes encontrandose una marcada

diferencia al efecto letal y mutagénico en células adaptadas comparadas con controles no adaptados (52).

El mismo efecto se ha observado en linfocitos humanos y algunas bacterias estimuladas con radiaciones de bajo nivel y posteriormente desafiados con dosis mayores del mismo o diferente agente estimulante en los que se ha obtenido menor frecuencia de aberraciones que las esperadas (4,20,53). En este trabajo los resultados de R.A son similares en ambos donadores y ambos tratamientos aunque los valores fuerón significativamente diferentes, es decir, que aunque se manejan las mismas condiciones de cultivo y tratamientos los números de ICH son variables debido a que se ha demostrado que existe una heterogeneidad entre individuos, ya que tienen diferente sensibilidad al antibiótico y también a que dos tratamientos no pueden tener la misma cantidad de células (4,37,53). En cuanto a los tratamientos se encontró la mejor R.A con la dosis de desafío de 400 ng/ml y una hora de contacto con la MMC ya que para ambos donadores no hubo diferencia significativa con ninguna de las tres dosis estimulantes más la dosis de desafío, efecto que si se observó con la dosis de 200 ng/ml en la cual si hubo diferencia significativa con la dosis estimulante de 20 ng/ml para ambos donadores, por lo cual podemos generalizar diciendo que en ambos tratamientos y ambos donadores si fue posible inducir una R.A independientemente del tiempo y concentración de la MMC con los linfocitos, obteniéndose la mejor R.A con las dosis estimulantes de 5 y 10 ng/ml. La esencia de este fenómeno es una preexposición preliminar con una dosis baja prácticamente no mutagénica de agentes químicos o radiaciones lo que provoca una resistencia significativa de las células a la acción

desafiante del mismo u otro agente (19,62). Se ha observado que con dosis muy altas del agente estimulante utilizadas como dosis de adaptación no hay R.A, como es el caso de fibroblastos humanos estimulados con 1 microlitro de solución 0.1 M de MNNG a intervalos de 12 hrs. por nueve tratamientos y después de dos a tres hrs. desafiados con MNU (20).

La R.A se debe a la inducción de un sistema enzimático reparador en el cual las células retienen una memoria de exposición manifestada por la expresión de algunas proteínas que pueden ser candidatas potenciales para reparar DNA (52,62,69), indicando que involucra la inducción de uno o más genes en respuesta a la exposición de bajos niveles de agentes alquilantes.

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

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

La O-6-meG-DNA- metiltransferasa también repara la O-4-metilguanina aunque más lentamente. También se han involucrado tres genes más que actúan en la R.A y son el gen Alk que induce la 3-

metiladenina-DNA-glicosilasa, la cual repara la lesión citotóxica 3-metiladenina o bien O-2-metilguanina y O-2-metilcitosina y en baja proporción la N-7-metilguanina (20,21,39,44,46). Los genes alk B y Aid hacen a las células más resistentes a la muerte celular pero su mecanismo de acción permanece desconocido. E. coli también contiene otros genes de reparación que no pertenecen a la R.A como son el gen OGT que repara las lesiones O-6-metilguanina y O-4-metilguanina y el gen Tag I que sólo repara lesiones 3-metiladenina (20).

Hay una gran evidencia para la existencia de una posible R.A en linfocitos humanos similar a la encontrada en E. coli (Samson y Cairns 1977) y células de roedores (Samson y Schwartz 1980) ya que la enzima DNA-metiltransferasa y glicosilasa se ha encontrado en linfocitos humanos, placenta, tejido fetal humano y células tumorales humanas sin estimular y cuando son estimuladas se inducen de 20 a 3000 moléculas más por célula y se han visto incrementos de 100 veces o más los niveles de O-6-meG-DNA-metiltransferasa (13,20). También la O-6-alquilguanina se ha considerado una lesión de importancia en células y tejidos de mamíferos. En cultivos de células de mamíferos la O-6-metilguanina es implicada en mutagenesis por agentes alquilantes (12,40), y es una evidencia considerable que la O-6-alquilguanina puede ser involucrada en la producción de tumores en experimentos con animales por carcinógenos alquilantes. En general, los agentes alquilantes que producen poca O-6-alquilguanina en DNA son carcinógenos débiles. En resumen, diferente proporción en la reparación de esta lesión en tejidos blanco tienen un efecto profundo sobre la producción de tumores.

Por ejemplo, la producción de tumores en cerebro de ratas jóvenes tratadas con N-metil-N-nitrosourea (MNU) es correlacionada con la persistencia de O-6-alkilguanina en el órgano blanco.

Similarmente, tratamientos crónicos con N-metil-N-nitrosourea da como resultado tumores neurales en experimentos con animales y es acompañada por una acumulación progresiva de O-6-metilguanina en el cerebro sin ninguna acumulación en otro tejido (30). Es bien conocido que ciertos tejidos y células pueden remover la O-6-metilguanina y O-6-etilguanina de DNA (5,6,7,15,24,30,41,47,48,51,55,64,65). Una actividad enzimática que transfiere el grupo O-6-alkil a cisteína, formando S-alkilcisteína en una molécula aceptora, esta presente en una variedad de mamíferos, incluyendo tejidos humanos (3,11,16,33,34,42,49,50,68,72). Se ha encontrado gran actividad de transferasa en: hígado de hamster que contiene aproximadamente 22,000 moléculas por célula, en hígado de rata aproximadamente 60,000 por célula e hígado humano de 600,000 a 900,000 por célula. En cultivos celulares humanos aproximadamente 100,000 moléculas por célula. La actividad de transferasa y aceptor son aparentemente producidas por la misma proteína (11), y las propiedades bioquímicas de bacterias y humanos son similares. En varios estudios se ha encontrado que la R.A es similar a la de E. coli (72). En células de hamster chino, virus SV-40 expuestos a dosis bajas de MNNG hace a las células más resistentes a la inducción de ICH (34).

Conclusiones

CONCLUSIONES

1.- Se determinó que la mitomicina C tiene un efecto dosis dependiente sobre la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas.

2.- Se observó una Respuesta Adaptativa empleando a la Mitomicina C como agente estimulante.

3.- Las dosis estimulantes con las que se observó una mejor respuesta adaptativa fueron 5 y 10 ng/ml de Mitomicina C.

4.- La concentración en el tiempo es una determinante crítica para obtener la Respuesta Adaptativa. En este caso con 20 ng/ml la respuesta declina.

5.- No se observaron diferencias significativas en la Respuesta de ambos donadores.

6.- El fenómeno de Respuesta Adaptativa se debe probablemente a la inducción de un sistema de reparación.

Bibliografía

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Bauchinger, E. Schmid and H. Braselman. (1989). Absence of adaptive response to low level irradiation from tritiated thymidine and X-rays in lymphocytes of two individuals examined in serial experiments. *Mutation. Res.* 227, 103-107.
- 2.- Bhattacharya, R. (1989). An adaptive response of Vibrio cholerae strain ogawa 154 to furazolidone. *Mutation. Res.* 225, 43-47.
- 3.- Bogden, J. M., Eastman, A., and Bresnick, E. (1981). A system in mouse liver for the repair of O-6-methylguanine lesions in methylated DNA. *Nucleic Acids Res.* 9, 3089.
- 4.- Bosi, A., and B. Olivieri (1989). Variability of the adaptive response to ionizing radiation in humans. *Mutation. Res.* 211, 13-17.
- 5.- Buecheler, J., and Kleihues, P. (1977). Excision of O-6-methylguanine from DNA of various mouse tissues following a single injection of N-methyl-N-nitrosourea. *Chem. Biol. Interact.* 16, 327.
- 6.- Bukley, J. D., O'Conner, P. J and Craif, A. W. (1979). Pretreatment with acetylamonofluorene enhances the repair of O-6-methylguanine in DNA. *Nature.* 281, 403.
- 7.- Chu, Y-H., Craig, A. W., and O' Conner, P. J. (1981). Repair of O-6-methylguanine in rat liver DNA is enhanced by pretreatment with single or multiple doses of aflatoxin B1. *Br. J. Cancer.* 43, 850.
- 8.- Cohen, M. M. y M. Shaw. (1964). Effect of mitomycin C on human chromosome, *J. Cell. Biol.* 23, 386-395.
- 9.- Evans, H. J. (1977). Molecular Mechanism in the induction of chromosome aberrations. *Genet. Toxicol.* 2, 35-52.

10.- Evensen, G., y E. Seeberg (1982) Adaptation to alkylation resistance involves the induction of a DNA glyccosilase. Nature 296, 773-775.

11. Foote, R. S., and Mitra, S. (1983). Quantitations of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase in Hella cells. Mutation Res. 119,221.

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

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

14.- Ghislain D. y O. Kramma. (1983). Influence of varios mitogens on the yields of sister chromatid exchanges, induced by chemicals, in human lymphocytes. Mutation. Res. 111, 161-170.

15.- Goth, R. and Rajewsky, M. (1974). Persistence of O-6-ethylguanine in rat brain DNA: correlation with nervous system-specific carcinogenesis by ethylnitrosourea. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 71, 639.

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

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

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

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

20.- Karran, P., C. F. Arlett y B.C. Broughton (1982). An adaptive response to the cytotoxic effects N-methyl-Nitrosourea is apparently absent in normal human fibroblasts. *Biochimie.* 64, 717-721.

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

22.- Kato, H., and H. Shimada. (1975). Sister chromatid exchanges induced by mitomycin C; a new method of detecting DNA damage at cromosomal level. *Mutation Res.* 28, 459-464.

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

24.- Kleihues, P., and Margison G.P. (1976). Exhaustion and recovery of repair excision of O-6-methylguanine from rat liver DNA. *Nature.* 259, 133.

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

26.- Latt, S. A. (1974). Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 8, 3162-3166.

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

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

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

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

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

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

33.- Metha, J. R. L. Ludlum, D. B. and Verly, W. G. (1981). Repair of O-6-ethylguanine in DNA by a chromating fraction from rat liver: transfer of the ethyl group to and acceptor protein. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 78, 6766.

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

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

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

- 37.- Morimoto, K. and M. Mizuno (1986). Adaptation-like response to the chemical induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes. *Human. Genet.* 73, 81-85.
- 38.- Nagasawa H., and A. J. Fornae (1988). Recovery of mitomycin C-treated mouse 10T1/2 cells during confluent holding. *Mutation Res.* 198, 153-160.
- 39.- Nakabappu, Y., H. Kondo and M. Sekiguchi (1984). Cloning and characterization of the alk A gene of *Escherichia coli* the encodes 3-methyladenine DNA glycosylase II. *J. Biol. Chem.* 259, 13723-13729.
- 40.- Newbold, R. F., Warren, W., and Amos, J. (1980). Mutagenicity of carcinogenic methylating agents is associated with a specific DNA modification. *Nature* 283, 596.
- 41.- Nicoll, J., Swan, P., and Pegg, A. (1975). Effect of dimethylnitrosamine on persistence of methylated guanines in rat liver and kidney DNA. *Nature*, 254-261.
- 42.- O'Conner, P. J., and Margison, G.P. (1981). The enhanced repair of O-6-alkylguanine in mammalian systems. In *Chromosome damage and repair*. E. Seeberg and K. Kleppe, eds., p. 233. New York Plenum.
- 43.- Olivieri, G., J. Bodycote and S. Wolff (1984). Adaptive response of human lymphocytes to low concentration of radioactive thymidine. *Science.* 233, 594-597.
- 44.- Olsson, M., and T. Lindhal (1980). Repair of Alkylated DNA in *Escherichia coli*: methyl group transfer from O-6-methylguanine to a protein cysteine residue. *J. Biol. Chem.* 255, 10569-10571.
- 45.- Painter, R. B. (1980). A replication Model for sister chromatid exchange. *Mutation Res.* 70. 337-341.

- 46.- Parry., and H. Evans (1975). Cytological detection of mutagen carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*. 258, 121-125.
- 47.- Pegg. A. E. (1978). Enzymatic removal of O-6-methylguanine from DNA by mammalian cells extracts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 84, 166.
- 48.- Pegg A. E. and Balog B. (1979). Formation and subsequent excision of O-6-ethylguanine from DNA of rat liver following administration of diethylnitrosamine. *Cancer Res.* 39, 503.
- 49.- Pegg A. E., and Perry W. (1981). Stimulation of transfer of methyl group from O-6-methylguanine in DNA to protein by rat liver extracts in response to hepatotoxins. *Carcinogenesis*. 2, 1195.
- 50.- Pegg A. E., Roberfroid, M., Vond, Bahr, C. and Montesano, R. (1982). Removal O-6-methylguanine from DNA by human liver fractions. *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)*. 79, 51-62.
- 51.- Renard, A., and Verly, W. G. (1980). Kinetic analysis of O-6-ethylguanine disappearance from DNA catalyzed by the chromatin of rat liver. *FEBS Lett* 122, 271.
- 52.- Samson, L., and J. Cairns (1977). A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*. *Nature (London)*. 267, 281-283.
- 53.- Sankaranarayanan, K. A., V., Duyn., and A. T. Natarajan (1989). Adaptive response of human lymphocytes to low concentration or radio-isotopes. *Mutation. Res.* 211, 7-12.
- 54.- Sartorelli, A. C. (1986). The role of mitomycin antibiotics in the chemotherapy of solid tumors, *Biochem. Pharmacol.* 35, 67-69.
- 55.- Scherer, E., Steward, A. P. and Emmelot, P. (1977). Kinetics of formation of O-6-ethylguanine in, and its removal from,

liver DNA of rats receiving dimethylnitrosamine. Chem. Biol. Interact. 19, 1.

56.- Schwartz, J. L., Samson L. (1983). Mutation induction in chinese hamster ovary cells after chronic pretreatment with MNNG. Mutation. Res. 119, 393-397.

57.- Sedwick, B. and P. Vaughan. (1991): Widespread adaptive response against environmental methylating agents in microorganism. Mutation. Res. 250, 211-221.

58.- Shadley, J. D., and S. Wolff. (1987). Characterization of the adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of X-rays to human lymphocytes. Radiat. Res. 111, 511-517.

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

60.- Shevel, E., B. Friedman y G. Walker (1990). Resistance to alkylation damage in Escherichia coli: role of the Ada protein in induction of the adaptive response. Mutation. Res. 233, 53-72.

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

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

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

- 64.- Smith, G. J., Kaufmann, D. G., and Grisham, J. W. (1980). Decreased excision of O-6-methylguanine and N-7-methylguanine during the S phase in 10 T1/2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 92, 787.
- 65.- Swan, P. F., and Mace, R. (1980). Changes in O-6-methylguanine disappearance from rat liver DNA during chronic dimethylnitrosamine administration. A possible similarity between the system removing O-6-methylguanine from DNA in rat liver and in *Escherichia coli* adapted to N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. *Chem. Biol. Interact.* 31, 239.
- 66.- Swan, P. F., and Magee, P. N. (1979). Induction of rat kidney tumours by ethyl methylsulfonate and nervous tissue tumours by methylmethane sulfonate. *Proc. Natl. Sci. (USA)* 71, 639.
- 67.- Taylor J. H. (1958). Sister Chromatid differentiation. *Genetics.* 43, 515-521.
- 68.- Teo, I. A., and Karran, P. (1982). Excision of O-6-methylguanine from the DNA by human fibroblasts determined by sensitive competition method. *Carcinogenesis.* 3, 923.
- 69.- Vijayalaxmi, S. F., G. Mindek and W. Burkart (1990). Adaptive response to low doses of X-rays in human blood lymphocytes. *Mutation Res.* 243, 53-56.
- 70.- Vijayalaxmi, and W. Burkart. (1989). Resistance and cross resistance to chromosome damage in human blood lymphocytes adapted to bleomycin. *Mutation Res.* 211, 1-5.
- 71.- Waldsteain, E. A., Cao, E. H., Bender, M. A., and Setlow, R. B. (1982). Abilities of extracts of human in lymphocytes to remove O-6-methylguanine from DNA. *Mutation. Res.* 45, 405.

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

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

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

75.- Wolff, S. (1982). Chromosome aberration, SCE, and the lesions that produce them. Mutation. Res. 58, 345-356.