



## ESTUDIO DE LA RESPUESTA ADAPTATIVA EN CELULAS DE HAMSTER CHINO

S.C. MICHELIN, M. DEL R. PÉREZ, D. DUBNER, P.A. GISONE  
Autoridad Regulatoria Nuclear, Gerencia de Apoyo Científico,  
Buenos Aires, Argentina

### Resumen

Durante muchos años se consideró la posibilidad de que las bajas dosis de radiación indujeran cambios en células y organismos permitiendo una adaptación a los efectos mutagénicos de la radiación. Actualmente, numerosos datos experimentales avalan la existencia de una respuesta adaptativa, que se caracteriza por una disminución del daño genético radioinducido.

La comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en este fenómeno permitiría estimar los efectos y riesgos de exposiciones a bajas dosis.

En este trabajo se presentan los resultados preliminares tendientes a estudiar la inducción de la respuesta adaptativa en células de mamíferos con distintas dosis condicionantes de radiaciones ionizantes.

### Introducción

Existen numerosas evidencias por las cuales las células expuestas a bajas dosis de agentes mutagénicos o clastogénicos, resultan menos sensibles a los efectos de mayores dosis administradas posteriormente.

En los últimos años un gran número de trabajos indican que la administración de bajas dosis de radiación, del orden de mGy, producen cambios en organismos eucariotes y procariotes que le permiten disminuir los efectos de posteriores irradiaciones.

Desde los primeros trabajos de Olivieri et al (1984), (1), numerosas experiencias con radiaciones ionizantes han contribuido a confirmar la existencia de una respuesta adaptativa (RA). Esta respuesta es inducida en células eucariotes por dosis que varían entre 5 y 200 mGy (dosis condicionante) y se caracteriza por una reducción de los niveles esperados de: aberraciones cromosómicas, intercambios de cromátidas, formación de micronúcleos y mutaciones, luego de una segunda dosis variable entre 2 y 4 Gy (dosis provocadora).

Se postula que la dosis condicionante induce la activación de genes que participan en la transducción de señales, control del ciclo celular, reparación del ADN, eliminación de radicales libres y apoptosis. La presencia de estas proteínas en concentraciones adecuadas en el momento de la segunda irradiación haría que el daño sea menor.

Entre las proteínas propuestas figuran las kinasas y ciclinas que actúan en los puntos de control del ciclo celular, los productos de varios antioncogenes (Rb, p53) que participan en la regulación del ciclo celular, proteínas nucleares, receptores de membrana, etc.

Esta hipótesis es avalada por la observación de que un inhibidor de la síntesis de proteínas como la cicloheximida y la 3 amino-benzamida, un inhibidor de la poly ADPribosil-sintetasa, bloquean la respuesta adaptativa.

Se ha demostrado que la RA ocurre en células de animales irradiados y algunos trabajos muestran que la sobrevivencia puede ser incrementada y la incidencia de cáncer puede disminuir por la preexposición de animales a bajas dosis. (2)

Por otra parte, las distintas fases del ciclo celular, la dosis y la tasa de dosis así como el intervalo de tiempo entre la dosis condicionante y la dosis provocadora, regulan la efectividad de la RA.

Si bien la RA se ha demostrado en animales, e in vitro, en sistemas eucariotes y procariotes, los resultados no pueden ser fácilmente extrapolables a humanos dada la complejidad de un organismo superior que incluye el sistema inmunológico, factores endócrinos, etc que también pueden modificar la respuesta. Por otra parte, las distintas condiciones de exposición a las radiaciones ionizantes y a agentes mutagénicos ambientales podría activar mecanismos diferentes de RA.

La inducción de un mecanismo radioprotector por bajas dosis tendría importantes aplicaciones para la salud humana. Esto sugeriría la posibilidad de una sobreestimación de los riesgos de efectos estocásticos a bajas dosis de radiaciones ionizantes. Sin embargo, aun no existen claras evidencias epidemiológicas de dicho efecto.

Un gran esfuerzo se está realizando para comprender los mecanismos básicos de este fenómeno que permitiría una mejor estimación de los efectos y riesgos de exposiciones a bajas dosis (3)

## Objetivos

Los objetivos de este trabajo son:

- a) determinar la existencia de la respuesta adaptativa con distintas dosis condicionantes,
- b) determinar el tiempo necesario para la inducción del fenómeno y la duración del mismo
- c) analizar la influencia de las distintas dosis condicionantes en la expresión de la RA en células de la línea V79 de hamster chino.

Como parámetro de evaluación se utiliza la frecuencia de mutaciones en el gen de la hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT) y la eficiencia de clonado.

Para las experiencias se utilizan células de la línea V79 de hamster chino, mantenidas en medio F-12 suplementado con 10 % de suero fetal bovino.

## Resultados

Se determinó la eficiencia de clonado y la frecuencia de mutaciones espontáneas de esta línea.

La eficiencia de clonado se realizó sembrando en cada experiencia 1000 células por cada 10 cápsulas de petri de 10 cm de diámetro. La eficiencia fue del 62 %.

Para determinar la frecuencia de mutaciones espontáneas en el gen mencionado se ensayaron distintas concentraciones de 6 tioguanina (6-TG), utilizada para seleccionar las mutantes. Se determinó que 2 ug/ml es la más adecuada.

La frecuencia de mutaciones espontáneas se determinó sembrando en cada experiencia  $10^6$  células por cada 10 cápsulas de petri de 10 cm de diámetro. A los 11 días de cultivo se determinó la frecuencia de mutaciones espontáneas, siendo de 3,7 mutantes cada  $10^5$  células viables.

Con el objeto de determinar la inducibilidad de la respuesta adaptativa y la duración de este mecanismo, las células fueron irradiadas con una dosis condicionante de 0,03 Gy con una tasa de dosis de 0,015 Gy/min. A las 18 horas se aplicó la dosis provocadora de 3 Gy con una tasa de dosis de 0.20 Gy/min.

Paralelamente otros cultivos fueron irradiados con 3 Gy solamente. Luego de esta irradiación las células permanecieron en cultivo durante 48 horas.

Para determinar la eficiencia de clonado, se procedió como se describió previamente. Se obtuvo una eficiencia del 41 % para las células irradiadas con 3 Gy y del 46 % para las irradiadas con 0,03 Gy y 3 Gy.

Para determinar la frecuencia de mutaciones, las células permanecieron en cultivo durante 14 días. Las frecuencias de mutaciones fueron de 4,96 mutantes cada  $10^5$  células para las irradiadas con 3 Gy y 4,42 mutantes cada  $10^5$  células para las irradiadas con 0,03 Gy y 3 Gy respectivamente.

Estos resultados preliminares no evidencian diferencias estadísticamente significativas que permitan inferir la existencia de una respuesta adaptativa en las condiciones establecidas. Se están realizando nuevas experiencias para confirmar estas observaciones.

### **Bibliografía**

- (1) Olivieri, G., Bodycote, J., Wolff, S.. Adaptive response of human lymphocytes to low concentration of radioactive thymidine. *Science*, 223 (1984), 594-597
- (2) The adaptive response to very low doses of ionizing radiation. Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis. *Mutation Research* vol 358, N° 2, 1996
- (3) Sources and effects of ionizing radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. USCEAR Report to the General Assembly with scientific annexes, New York, 1994