

Intervalo para la expresión de la respuesta adaptativa inducida por radiación gamma en leucocitos de ratón *in vivo*

Mendiola Cruz MT. y Morales Ramírez P.
Departamento de Biología, ININ



MX0300187

Resumen

Se determinó el intervalo entre la dosis de radiación gamma de adaptación (0.01 Gy) y reto (1.0 Gy) capaz de inducir la máxima expresión de la respuesta adaptativa en linfocitos de ratón *in vivo*. Los animales se expusieron a las dosis mencionadas con diferentes intervalos entre ambas (1, 1.5, 5 ó 18 hr). Se analizaron 4 parámetros de daño mediante la técnica de electroforesis unicelular en gel. Los resultados indicaron que desde el intervalo de 1 hr se produjo una respuesta adaptativa, ya que en los organismos pretratados con 0.01 Gy las células presentan menor daño que en los no adaptados. La máxima respuesta se indujo con los intervalos de 2.5 y 5 hr y aunque persistió hasta 18 hr el efecto fue disminuyendo.

Introducción

Bajo ciertas condiciones experimentales, la exposición a dosis bajas de radiación puede conferir determinada resistencia a las células frente al efecto genotóxico de exposiciones posteriores con dosis más altas del mismo agente o de otro que dañe al ADN; a este fenómeno se le conoce como respuesta adaptativa (1). Dicho efecto se ha explicado con base en la inducción de mecanismos de reparación o mediante la estimulación de la síntesis de enzimas involucradas en la captura de radicales libres (2).

Anteriormente desarrollamos un modelo experimental en leucocitos de ratón, que nos permitió evaluar el daño que sufrieron las células a diferentes tiempos después de la exposición a radiación, manteniendo al organismo vivo. El daño se midió mediante el ensayo cometa, con el cual se detectaron las rupturas en el ADN o los sitios lábiles al álcali inducidos por la radiación gamma en muestras de sangre periférica. Se determinó que dichas lesiones se repararon rápidamente durante los primeros 15 minutos y más adelante se detectó un segundo período de reparación, tal vez relacionado con otro tipo de lesiones (3). Utilizando este modelo hemos establecido la cinética de inducción de daño y reparación con diferentes dosis, así como la respuesta adaptativa inducida *in vivo* por la exposición a radiación gamma (4). Dicha respuesta se determinó después de haber expuesto a los ratones a la dosis

de adaptación (0.01 Gy) y la de reto (1.0 Gy) con un intervalo de 1 hr entre ambas. El pretratamiento redujo el porcentaje inicial de células dañadas a un tercio de lo que causaría la dosis de reto *per se* y también disminuyó el daño producido durante el segundo período de reparación. Estos datos indican que la respuesta adaptativa temprana es causada por la activación de un proceso que protege al ADN de la inducción de daño.

Se han diseñado diversos protocolos para estudiar la respuesta adaptativa en diferentes tipos de células, las dosis de adaptación 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 ambas dosis varía de un estudio a otro en un rango que va desde 1 hasta 72 horas, lo cual se determina en parte por el tipo celular que se estudia y el parámetro seleccionado para analizar la respuesta (5).

Dado que la respuesta que observamos en los experimentos anteriores se produjo a tiempos tempranos con un intervalo corto entre ambas dosis, el objetivo de este trabajo fue determinar cual es el intervalo óptimo entre la dosis baja y la alta que induce la máxima expresión de la respuesta adaptativa.

Materiales y métodos

1) Protocolo General para la determinación de Respuesta Adaptativa: Se realizó un experimento para cada

intervalo seleccionado, con 10 ratones cada grupo. Cinco ratones se expusieron a la dosis de reto (1.0 Gy), los otros cinco a la dosis de adaptación (0.01 Gy) y después del intervalo correspondiente (1, 2.5, 5 o 18 hr) a la dosis de reto. Se tomaron muestras de sangre periférica 5 min. antes de la irradiación (muestra testigo) y 3 minutos después de la exposición a la dosis de reto. El daño se determinó mediante la técnica de EUG (Electroforesis Unicelular en Gel) considerando varios parámetros, se hicieron las comparaciones pertinentes entre los grupos para determinar la respuesta.

2) Animales: Se usaron ratones machos de la cepa BALB/c de 3 meses de edad y de 28-30 g de peso corporal, mantenidos en cajas de plástico con aserrín bajo condiciones controladas de temperatura (23-25 °C) y ciclos de luz-oscuridad (12 h c/u). Estos animales fueron reproducidos en el bioterio del Dpto. de Biología del ININ y fueron alimentados con comprimidos Purina Chow y agua *ad libitum*.

3) Irradiación: Los organismos se colocaron dentro de tubos de plástico con tapa y se expusieron a una fuente de ^{137}Cs (Cesagammatron, Siemens). La dosis para el tratamiento de adaptación fue de 0.01 Gy y la dosis de reto fue de 1.0 Gy. El tiempo y la distancia requeridos para suministrar dichas dosis, se calcularon en función de la actividad de la fuente en la fecha de realización de cada experimento. La tasa de exposición se determinó con una cámara de ionización del Laboratorio Secundario de Calibración Dosimétrica (Dpto. Metrología-ININ).

4) Preparación de muestras: Para tomar las muestras de sangre cada ratón se inmovilizó dentro de un brete de lucita, dejando la cola fuera a través de un orificio. Se cortó un pequeño fragmento del extremo de la cola y se recuperó un volumen de 4 μl de sangre. Se tomaron 2 muestras en cada tiempo, se resuspendieron en 1 ml de solución Hank dentro de un tubo para microcentrífuga y se mantuvieron en hielo para evitar la reparación de las lesiones en el ADN, hasta tomar el total de las muestras para procesarlas.

5) Electroforesis Unicelular en Gel (EUG): Básicamente se utilizó la técnica descrita por Singh y col. (1988) (6) con algunas modificaciones, brevemente: Las muestras se centrifugaron y cada paquete celular se resuspendió en una solución de APFB (agarosa de punto de fusión bajo) y se colocó sobre un portaobjetos liso cubierto con una capa deshidratada de agarosa de punto de fusión normal. Encima se colocó otra capa de APFB y una vez solidificada, las laminillas se colocaron dentro de una caja de Coplin a la que se le agregó una solución de lisis fría y se mantuvieron a 4 °C en la oscuridad durante 1 hr. Transcurrido ese tiempo, las laminillas se retiraron de la solución de lisis y se colocaron en forma horizontal dentro de una cámara de electroforesis con amortiguador alcalino y

se mantuvieron en frío durante 40 min. para permitir el desenrollamiento del ADN. Posteriormente la cámara se conectó a una fuente de poder y se aplicó una corriente eléctrica de 25 V y 300 mA durante 40 min. para inducir la migración de los fragmentos del ADN que se produjeron por la radiación. Los geles se neutralizaron y se deshidrataron con metanol para guardar las preparaciones en cajas, protegiéndolas del polvo y la luz. Para el análisis se procedió a la rehidratación de cada laminilla y la tinción con el fluorocromo bromuro de etidio. Se utilizó un analizador de imágenes (Comet) adaptado a un microscopio de fluorescencia. Se analizaron 100 células por laminilla y se determinaron cuatro parámetros de daño: 1) Porcentaje de células dañadas (cometas), 2) Migración del ADN (longitud de la cauda), 3) Intensidad de fluorescencia en la cauda y 4) "Momento de la cauda" (longitud de cauda x intensidad). Se obtuvieron los promedios, desviaciones y errores estándar. Se aplicó la prueba de Dunnett para analizar la significatividad de las diferencias.

Resultados y discusión

En la tabla 1 se observa el promedio \pm d. e del porcentaje de cometas obtenido en los organismos tratados únicamente con la dosis de reto y en los adaptados previamente, utilizando diferentes intervalos entre la dosis de adaptación y reto. También se observan los datos de las longitudes de caudas (μm) que se obtuvieron bajo las mismas condiciones.

Tabla 1. Incremento en el porcentaje de cometas y longitud de la cauda por la exposición a la dosis de reto (1.0 Gy) y a la de adaptación más reto (0.01+1.0 Gy) con diferentes intervalos entre ambas. * $p < 0.05$ con la prueba de Dunnett.

Porcentaje de cometas		
Intervalo	Reto 1.0 Gy	Adapt. + Reto 0.01 + 1.0 Gy
1 hr	59 \pm 6.9	24 \pm 6.3 *
2.5 hr	72 \pm 5.4	31 \pm 6.1 *
5 hr	62 \pm 5.0	21 \pm 6.2 *
18 hr	76 \pm 3.8	54 \pm 3.5 *
Longitud de la cauda (μm)		
1 hr	9.8 \pm 2.3	4.8 \pm 1.6 *
2.5 hr	22.3 \pm 2.8	6.2 \pm 1.7 *
5 hr	14.5 \pm 0.7	1.6 \pm 2.8 *
18 hr	12.0 \pm 2.5	6.5 \pm 2.2 *

Claramente se aprecia que en los animales expuestos a la dosis de 0.01 Gy previamente a la de 1.0 Gy, se indujo una respuesta adaptativa ya que presentaron un porcentaje de células dañadas significativamente menor al que se produjo con la dosis de reto únicamente. Esta reducción se observó en todos los intervalos utilizados entre las dosis. Así mismo, con la longitud promedio de la cauda, se aprecia que en todos los casos éste índice fue menor en los organismos adaptados.

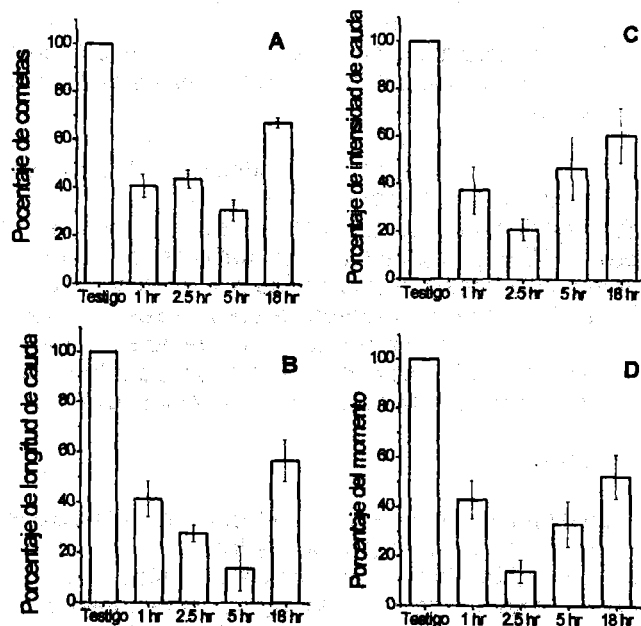
En la tabla 2 se encuentran los resultados de la intensidad y momento de la cauda, de los organismos expuestos a la dosis de adaptación y de los tratados solamente con la de reto, con cuatro intervalos utilizados entre las dosis.

Tabla 2. Incremento en la intensidad y momento de la cauda producidos por la exposición a la dosis de reto (1.0 Gy) y a la de adaptación más reto (0.01+1.0 Gy) con diferentes intervalos entre ambas. *p < 0.05 con la prueba de Dunnett.		
Intensidad de fluorescencia en la cauda (unidades arbitrarias)		
Intervalo	Reto 1.0 Gy	Adapt. + Reto 0.01 + 1.0 Gy
1 hr	1.7 ± 0.3	0.6 ± 0.5 *
2.5 hr	3.3 ± 1.6	0.7 ± 0.3 *
5 hr	5.4 ± 0.5	2.7 ± 1.6 *
18 hr	4.0 ± 0.3	2.2 ± 1.0 *
Momento de la cauda (unidades arbitrarias)		
1 hr	0.25 ± 0.02	0.11 ± 0.04 *
2.5 hr	0.52 ± 0.21	0.07 ± 0.05 *
5 hr	1.09 ± 0.27	0.40 ± 0.22 *
18 hr	0.68 ± 0.11	0.31 ± 0.14 *

En ambos casos, resultó evidente que se indujo respuesta adaptativa, debido a que con todos los intervalos probados, los índices son significativamente menores en los organismos expuestos en forma preliminar a la dosis de adaptación.

Debido a que se presentó una variabilidad importante entre los datos obtenidos únicamente con la exposición a la dosis de reto en todos los parámetros, se dificultó la comparación entre intervalos, por lo cual se procedió a hacer los cálculos del porcentaje de cada parámetro, considerando como el 100% al valor promedio del grupo expuesto únicamente a la dosis de reto, gráfica 1 (A-D).

El porcentaje de cometas (1-A) y la longitud de la cauda (1-B) se redujeron con todos los intervalos, la máxima



Intervalos entre las dosis de adaptación y reto

Gráfica 1. Porcentaje de cometas (A), longitud de cauda (B), intensidad (C) y momento (D) producidos por 0.01 + 1.0 Gy con cada intervalo entre las dosis, en comparación

expresión de la respuesta se detectó con el intervalo de 5 hr. En ambos parámetros el efecto fue menor con el intervalo de 18 hr.

La intensidad y el momento de la cauda (1- C y 1-D) presentaron un comportamiento semejante entre ellos. A diferencia del porcentaje de cometas y longitud de la cauda, la mayor respuesta se detectó con el intervalo de 2.5 hr, mientras que con 5 y 18 hr el efecto disminuyó.

Con este protocolo es posible detectar la respuesta adaptativa en grupos formados numerosos organismos, pero sólo se analiza el efecto inmediato a la radiación y no el comportamiento de la cinética.

Se puede decir que el intervalo para inducir la máxima expresión de la respuesta es entre 2.5 y 5.0 hrs. De los cuatro parámetros analizados convertidos a porcentaje, el de cometas fue el que presentó los valores menores del error estándar. Los demás parámetros pueden ser un reflejo del mismo porcentaje de cometas y presentan mayor variabilidad.

Se han hecho varios estudios sobre el intervalo necesario para inducir la respuesta adaptativa. Shadley y col. (1987) reportaron que en linfocitos humanos se requiere un intervalo de 4-6 hr entre la dosis de adaptación y reto (7). De manera similar, Ikushima (1989) sugirió que un período de 4 hr era suficiente para la síntesis de proteínas involucradas en la expresión de la respuesta (8). Los re-

sultados de este trabajo concuerdan con los reportados por Seong y col. (1995), quienes observaron en una línea celular de linfoblastos humanos, que un intervalo tan corto como 1 hr es adecuado para inducir la respuesta adaptativa (9).

De acuerdo a nuestros resultados recientes (4) hemos propuesto que el mecanismo que causa esta respuesta está relacionado con la inducción de un proceso que protege al ADN de la inducción del daño por radiación, por ejemplo la síntesis de moléculas que capturan radicales libres. Con base en los datos del presente estudio, es factible decir que dicho proceso se puede detectar desde 1 hr después de la exposición a la dosis de adaptación y persiste hasta por 18 hrs, aunque va disminuyendo.

Conclusiones

La respuesta adaptativa en linfocitos de ratón se puede inducir *in vivo* en un intervalo de hasta 1 hr entre la dosis de adaptación y la de reto. Se podría considerar que el intervalo óptimo para estimular la máxima expresión de la respuesta es entre 2.5 y 5 hr. Sin embargo, debido a la variabilidad que se observó en la respuesta a la exposición con la dosis de reto, no es posible obtener una conclusión definitiva. La respuesta adaptativa persiste aún después de 18 hr, pero el efecto se reduce.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó con el apoyo de CONACyT (proyecto 33167-N).

Agradecemos a los técnicos Angel Reyes y Perfecto Aguilar por su excelente asistencia. Al Dr. Víctor Tovar, al Fis. Francisco Vergara y a los Tec. Esp. Jaime Ayala y Francisco Martínez por el apoyo brindado para la irradiación de los animales.

Referencias

1. Olivieri G., Bodycote J. y Wolff Sh. 1984, Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science*. 223, 594-597.
2. Mendiola-Cruz, MT. 2000, La respuesta adaptativa inducida por radiación y sus posibles causas. *Vertientes*. 3, 14-24.
3. Mendiola-Cruz MT. y 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.
4. Mendiola-Cruz MT. y Morales-Ramírez P. 2002, Damage-repair kinetics and early adaptive response induced by gamma rays in murine leukocytes in vivo. *Somat. Cell Mol. Gen.* 25, 287-299.
5. Mendiola Cruz MT. 2002, 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 Doctoral. UNAM. pp 93.
6. Singh N., McCoy M., Tice R. y Schneider. 1988, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
7. Shadley J., Afzal V. y Wolff Sh. 1987, Characterization of the adaptive response to ionizing radiation by low doses of X-rays to human lymphocytes. *Radiat. Res.* 111, 511-517.
8. Ikushima T. 1989, Radio-adaptive response: Characterization of a cytogenetic repair induced by low-level ionizing radiation in cultures Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 227, 241-246.
9. Seong J., Chang O., Eon 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.