



MX0500365

Cinética de la respuesta adaptativa temprana y dosis umbral de adaptación

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

Departamento de Biología, ININ

Resumen

Se determinó la cinética de expresión de la respuesta adaptativa (RA) en leucocitos de ratón *in vivo* y la dosis mínima de radiación gamma que la induce. Los ratones se expusieron a 0.005 ó 0.02 Gy de ^{137}Cs como adaptación y 1h después a la dosis de reto (1.0 Gy), otro grupo se expuso únicamente a 1.0 Gy y se evaluó el daño en el ADN con el ensayo cometa. El tratamiento con 0.005 Gy no indujo RA y 0.02 Gy causó un efecto similar al obtenido con 0.01Gy. La RA se manifestó desde un intervalo de 0.5 h obteniéndose la máxima expresión con 5.0 h. La dosis umbral para inducir la RA es 0.01 Gy y en 5.0 h presumiblemente se presenta la mayor cantidad de moléculas que están relacionadas con la protección del and.

Introducción

La exposición a dosis bajas de radiación induce ciertos mecanismos mediante los cuales las células adquieren resistencia frente al efecto genotóxico de una exposición posterior a dosis más altas del mismo agente o de otro que dañe al ADN. Esta respuesta adaptativa se induce bajo ciertas condiciones experimentales y ha sido estudiada *in vitro* e *in vivo* con diferentes tipos celulares, entre los cuales los linfocitos de ratón y de humano han sido muy útiles para entender algunos aspectos importantes de este fenómeno (1, 2, 3).

La principal desventaja de algunos índices de daño al ADN que se han utilizado para evaluar la respuesta adaptativa, tales como aberraciones, micronúcleos y mutaciones, es que representan consecuencias residuales del daño en el ADN o de los eventos de reparación, que sólo se hacen evidentes después de un ciclo de división celular, por lo que son parámetros tardíos. Esta situación limita su uso para el estudio de los procesos que se desencadenan inmediatamente después de la dosis de adaptación. En contraste, el ensayo cometa ofrece la posibilidad de analizar los eventos tempranos inducidos por la radiación ionizante (4). Tanto las dosis de adaptación y de reto aplicadas como el tiempo que transcurre entre una y otra exposición, son algunas de las condiciones experimentales más importantes que determinan la inducción de la respuesta adaptativa. Se han diseñado

diferentes protocolos para estudiar este evento, las dosis de adaptación varían entre 0.005 y 0.5 Gy, mientras que las de reto se aplican en un rango de 1.0 a 5.0 Gy. Los intervalos entre ambas van de 1 hasta 72 h, dependiendo del tipo celular y del parámetro para medir el daño.

La dosis de adaptación debe ser tan baja como sea posible, pero suficiente para estimular los mecanismos involucrados en la respuesta. Si dicha dosis produce algún daño, éste debe ser no significativo. La dosis de reto debe producir un alto nivel de daño factible de reparar. El intervalo entre ambas dosis que permita la máxima expresión de la respuesta adaptativa, dependerá del tiempo requerido por el proceso involucrado para el inicio de la respuesta y en la regulación de la misma. Los mecanismos moleculares inducidos por este fenómeno no han sido esclarecidos completamente, pero se ha postulado que la radioadaptación es el resultado de la activación de mecanismos de reparación de daño o de la inducción del sistema de defensa antioxidante (5).

Con un sistema que desarrollamos anteriormente en leucocitos de ratón, estudiamos la respuesta adaptativa inducida *in vivo* por radiación gamma. Observamos que el pretratamiento con 0.01 Gy reduce a un tercio el porcentaje inicial de células dañadas, originado por la dosis de reto *per se* (1.0 Gy), con 1 h de intervalo entre ambas. Estos resultados sugieren que la respuesta adaptativa temprana es causada por la inducción de un mecanismo que protege al ADN del daño causado por la radiación,

producen constantemente en pequeñas cantidades durante los procesos normales del metabolismo celular. La historia previa de exposición a ERO en cada tipo celular determinado, debido a sus funciones metabólicas específicas, puede influir en la inducción de la respuesta adaptativa. Tanto la dosis de adaptación como el intervalo entre ésta y la dosis de reto, influyen considerablemente en la inducción de la respuesta adaptativa y deben ser cruciales para que la señalización que dispara y regula dicha respuesta opere óptimamente. Considerando que la dosis umbral es la mínima que produce respuesta significativa, los resultados de este trabajo indican que dicha dosis es de 0.01 Gy. Por otro lado, en relación con la cinética de expresión de la respuesta adaptativa, los datos mostraron que con un intervalo de 0.5 a 1 h entre la dosis de adaptación y reto, se detectó una reducción drástica en los parámetros de daño analizados. Esto significa que durante dicho período ocurre la mayor actividad de transcripción y síntesis de las enzimas involucradas en el sistema de defensa antioxidante. De 1 a 5 h probablemente todavía se producen más moléculas que siguen contrarrestando el efecto de las especies reactivas de oxígeno generadas por la radiación y podría considerarse que éste es el intervalo óptimo que permitió obtener la máxima expresión de la respuesta. Estos datos coinciden con lo reportado por otros investigadores, en relación con el tiempo requerido para obtener los niveles más altos de enzimas antioxidantes, involucradas en la protección contra el estrés oxidativo inducido por radiación. Transcurriendo un período de 18 h entre ambas dosis, la respuesta disminuyó notablemente en comparación con la obtenida con los otros intervalos, sin embargo todavía persistió algún efecto protector. Seguramente después de este tiempo tanto la síntesis como la actividad de las enzimas antioxidantes ya haya disminuido notablemente.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que: 1) La dosis umbral para inducir la respuesta adaptativa en leucocitos de ratón *in vivo* es 0.01 Gy. 2) El intervalo de 5 h es en el que presumiblemente se presenta la mayor cantidad de moléculas sintetizadas *de novo*, relacionadas con los mecanismos de protección del ADN que propusimos anteriormente como responsables de la respuesta. 3) La respuesta persiste aún 18 h después de la dosis de adaptación, pero considerablemente disminuida.

Agradecimientos

Agradecemos la excelente asistencia técnica de Perfecto Aguilar, Ángel Reyes y Felipe Beltrán. Asimismo, al

personal de Metrología del ININ, especialmente al Dr. Víctor Tovar, Fis. Francisco Vergara y a los Técnicos Especializados Jaime Ayala y Francisco Martínez, por el apoyo brindado para la irradiación de los animales. Este trabajo se realizó con el apoyo de CONACyT (proyecto 33167-N).

Referencias

1. 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.
2. 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.
3. Ryabchenko N., Antoschina M., Fesenko E., Ivanova T., Kondrashova T. y 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.* 311, 157-163.
4. 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.
5. Mendiola-Cruz M:T (2000): La respuesta adaptativa inducida por radiación y sus posibles causas. *Vertientes.* 3, 14-24.
6. 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.
7. 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.
8. Ward J.F. (1988): DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanism of formation and reparability. *Prog Nucl Acid Res and Mol Biol.* 35, 95-115.
9. Sun J., Chen Y., Li M. Y Ge Z. (1998): Role of the antioxidant enzymes on ionizing radiation resistance. *Free Rad Biol Med.* 24, 586-593.
10. Feinendegen L. (2002): Reactive oxygen species in cell responses to toxic agents. *Hum. Exp. Toxicol.* 21, 85-90.
11. 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.

por ejemplo mediante la síntesis de sustancias que capturan radicales libres. (6).

Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) Establecer la dosis mínima de radiación gamma que induce la respuesta adaptativa temprana. 2) Estudiar la cinética de la respuesta para determinar el intervalo entre ambas dosis con el que se obtiene la máxima expresión. 3) Determinar durante cuánto tiempo persiste la respuesta.

Material y métodos

1) Protocolos. Para determinar el intervalo adecuado entre las dosis de adaptación y reto, con el que se induce la máxima expresión de la respuesta adaptativa, se realizó un experimento por cada intervalo con un grupo de 10 ratones. Se probaron cuatro intervalos: 0.5, 1.0, 5.0 y 18.0 h. En cada experimento se expusieron 5 ratones a la fuente de radiación gamma y recibieron la dosis de reto (1.0 Gy), los otros 5 ratones se irradiaron con la de adaptación (0.01 Gy) y después del intervalo correspondiente con 1.0 Gy. Como testigo se tomaron muestras de sangre periférica 5 min antes de la exposición y el daño en el ADN fue determinado 3 min después de la dosis de reto mediante el ensayo cometa. Para determinar la dosis umbral de adaptación se utilizó el mismo protocolo, irradiando a los ratones con 0.005 Gy ó 0.02 Gy de rayos gamma y 1 h después con la dosis de reto (1.0Gy). Se evaluó el daño inmediatamente después de la exposición a 1.0 Gy, para seleccionar la dosis mínima capaz de proteger a las células. Los resultados se compararon con los obtenidos anteriormente utilizando una dosis de adaptación de 0.01 Gy.

2) Animales. Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c de 2 a 3 meses de edad con un peso aproximado de 30 g. Se mantuvieron en jaulas de plástico con cama de aserrín, bajo condiciones controladas de temperatura (23-25 °C) y períodos de 12 h de luz-oscuridad. Los animales fueron reproducidos en el bioterio de Dpto. de Biología del ININ y se alimentaron con comprimidos Purina Chow y agua *ad libitum*.

3) Irradiación. Los ratones se colocaron en tubos de plástico y se expusieron a una fuente de rayos gamma (^{137}Cs , Cesagammatron Siemens), a una distancia de 29.5 cm para la dosis de 1.0 Gy y 100 cm para 0.005 y 0.02 Gy. La razón de dosis para 1.0 Gy fue 5.6×10^{-4} Gy/seg, y para las dosis de adaptación de 0.005, 0.01 y 0.02 las razones de dosis fueron 4.966×10^{-4} , 4.827×10^{-4} y 4.774×10^{-4} Gy/seg, respectivamente. La tasa de exposición se determinó con una cámara de ionización del Laboratorio Secundario de Calibración Dosimétrica del ININ.

4) Preparación de las muestras. Las muestras de sangre se tomaron de cada ratón inmovilizándolo dentro de un brete de lucita y 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 microcentrifuga 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. en 1988 (7) con algunas modificaciones. Brevemente: se centrifugaron las muestras 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, una vez solidificada se colocaron las laminillas 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 h. 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. 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 frío para guardar las preparaciones en cajas a temperatura ambiente, protegiéndolas del polvo y la luz.

6) Tinción. Para el análisis se procedió a la rehidratación de cada laminilla con amortiguador tris y la tinción con 50 μl del fluorocromo bromuro de etidio (2.0 $\mu\text{g/ml}$). Las laminillas se mantuvieron en una cámara húmeda y se analizaron en un período no mayor a 24 h.

7) Análisis. Se utilizó un analizador de imágenes (Comet Assay II Analyzer), adaptado a un microscopio de fluorescencia (Hund H500) equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro barrera de 590 nm, usando un objetivo de 40X. Se analizaron 300 células para determinar el porcentaje de cometas (células dañadas) y 100 células para la Migración del ADN (longitud de la cauda en μm). Se obtuvieron los promedios, desviaciones y errores estándar. Se aplicó la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples con $p \leq 0.05$ para determinar la significatividad estadística de las diferencias.

Resultados

La tabla 1 muestra el efecto de cada dosis de adaptación sobre el porcentaje de células dañadas y el promedio de longitud de cauda. Es claro que con la dosis de 0.005 Gy se detectó una reducción del 6.6% y 11.3% en el porcentaje de cometas y la longitud de la cauda respectivamente, en relación con el daño producido sólo con la dosis de reto, pero las diferencias no fueron significativas. La otra dosis de 0.02 Gy

produjo una reducción importante en ambos parámetros, en comparación con el valor obtenido con la dosis de reto *per se*. Los porcentajes de reducción obtenidos fueron 46.6% para la frecuencia de células dañadas y 61.5% para la longitud de cola, la diferencia resultó estadísticamente significativa.

Adaptación (A) Gy	Reto (R) Gy	Cometas		Longitud de la cauda	
		%	A-R	µm	A-R
	1.0	76 ± 3		23.9 ± 7.2	
0.005	1.0	71 ± 5	5	21.2 ± 2.8	2.7
	1.0	73 ± 2		18.2 ± 2.8	
0.02	1.0	39 ± 3	34	7.0 ± 2.4	11.2

Números en negritas son estadísticamente significativos con respecto al tratamiento con la dosis de reto únicamente. Dunnett $p < 0.05$.

Estos valores son similares a los obtenidos previamente en otros experimentos usando una dosis de adaptación de 0.01 Gy (6), con la que los porcentajes de reducción fueron 59.3% y 53.9% respectivamente.

En la figura 1 se observa la cinética de expresión de la respuesta adaptativa temprana en leucocitos de ratón, adaptados con 0.01 Gy y retados con 1.0 Gy, con diferentes intervalos entre ambas. El valor del tiempo cero es el promedio del incremento en el porcentaje de cometas producido con la dosis de reto *per se*, los otros puntos representan el incremento en los cometas obtenidos después del tratamiento con la dosis de adaptación más la de reto con cada intervalo, desde 0.5 hasta 18 h.

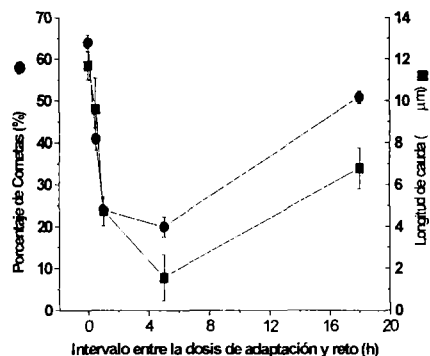


Figura 1. Se muestran las curvas del porcentaje de cometas (●) o de longitud de cauda (■) obtenidas a diferentes intervalos entre las dosis de adaptación.

Con respecto al porcentaje de cometas, es evidente que desde el intervalo más corto utilizado (0.5 h), la reducción en dicho parámetro fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en comparación con el valor al tiempo cero. Este porcentaje de células dañadas continuó disminuyendo notablemente hasta el intervalo de 1 h, con el cual se obtuvo una respuesta casi del doble. La recta obtenida entre 0 y 0.5 h presentó una pendiente negativa pronunciada con valor de -46 y de 0.5 a 1 h el valor de la pendiente fue de -34 . Con el intervalo de 5.0 h se obtuvo el valor más bajo en el porcentaje de cometas, aunque la pendiente de la recta cambió a -1 , lo cual indica que la reducción fue menos drástica que con los intervalos anteriores. Con el intervalo de 18 h el valor del parámetro de daño fue más alto que el obtenido con los otros intervalos, pero aún sigue siendo menor que el inducido sin la dosis de adaptación. En este caso se obtuvo una recta creciente con una pendiente positiva de 2.38.

En relación con el análisis de la longitud de cauda obtenida con cada intervalo, en la misma figura 1 se aprecia que el comportamiento de la curva es similar al del porcentaje de cometas. Así mismo, se detectó que de 0.5 a 1 h se obtuvo una pendiente pronunciada con valor negativo (-9.72), lo cual indica un comportamiento drástico decreciente. El valor menor de longitud de cauda, fue obtenido con el intervalo de 5 h entre ambas dosis, aunque de 1 a 5 h la pendiente de la recta cambió a -4.86 . Es decir que el efecto sobre la reducción en la longitud de cauda disminuyó. Con 18 h la respuesta se redujo ya que se obtuvo una recta creciente con pendiente positiva de 0.4, aunque se obtuvo mayor reducción que con el intervalo de 0.5 h. Con todos los intervalos probados las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Los errores estándar fueron mayores analizando la longitud de la cauda que el porcentaje de cometas.

Discusión

La interacción de la radiación ionizante con las células genera especies reactivas de oxígeno (ERO), que causan estrés oxidativo. La sobreproducción de estas ERO constituye uno de los principales factores que causan daño al ADN y pueden producir la muerte celular (8). Dependiendo de la cantidad y ubicación de las ERO, éstas pueden iniciar la activación de cascadas metabólicas y la retroalimentación de algunas rutas bioquímicas, incluyendo las del sistema de defensa antioxidante (9). Dichas reacciones que temporalmente cambiarán la sensibilidad y protegerán a las células de una subsiguiente elevación en el nivel de ERO, caracterizan a la respuesta adaptativa (10). Para controlar los efectos potencialmente dañinos de las ERO, en las células irradiadas se induce la producción de enzimas antioxidantes tales como la Mn-SOD, CuZn-SOD, catalasa y glutatión, entre otras (11). Estas enzimas normalmente mantienen las concentraciones de ERO a niveles fisiológicos adecuados, ya que también se