

## Uso del Ensayo Cometa para Evaluar el Efecto de la Temperatura sobre la Reparación del Daño Genético inducido por Peróxido de Hidrógeno y la Radiación Ultravioleta A en Células Sanguíneas Humanas

Mayte Cossio AYALA\*, Yanela González HERNÁNDEZ,  
José Carlos García PIÑEIRO y Elio Prieto GONZÁLEZ

Centro de Investigaciones Biomédicas, Avenida 146 N° 3102, Playa. CP 11600. La Habana, Cuba,  
e Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón".  
Reina 462 entre Gervasio y Chávez, Ciudad Habana, Cuba.

**RESUMEN.** Las roturas de simple cadena y sitios sensibles al álcali detectados por el ensayo cometa pueden afectarse por la temperatura. Este estudio evaluó el efecto de tres temperaturas (4, 15 y 37 °C) sobre la reparación del daño al ADN inducido por la radiación ultravioleta A (rUVA) y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en leucocitos humanos sanos y de un paciente con Xeroderma pigmentoso (XP). Además se evaluó la reparación en linfocitos aislados. A 4 °C no se observó reparación del daño. La incubación a 15 °C disminuyó la reparación de ambas células frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no siendo así a 37 °C. Los leucocitos XP irradiados no mostraron reparación ni a 15 ni a 37 °C. Los linfocitos aislados mostraron menor capacidad de reparación que los leucocitos. Concluimos que la temperatura afecta la reparación del daño al ADN inducido por (rUVA) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**SUMMARY.** "Use of the Comet Assay to Evaluate the effect of Temperature on DNA Repair of Damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Ultraviolet Radiation A in Human Blood Cells." Single strand breaking and alkali labile sites detected by comet assay could be affected by the cell temperature incubation. We exposed peripheral blood leukocytes (PBL) from healthy and Xeroderma pigmentosum (XP) patients and isolated lymphocytes to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ultraviolet radiation A (UVA) at 4, 15 and 37 °C. At a 4 °C we did not observe DNA repair of damage. Incubation at 15 °C reduced in both cases DNA repair of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but not at 37 °C. The irradiated XP leukocytes did not show DNA repair neither at 15 nor at 37 °C. Isolated lymphocytes showed lesser DNA repair ability than leukocytes. We conclude that temperature affects DNA repair of damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or UVA.

### INTRODUCCIÓN

El ensayo cometa es una técnica altamente sensible para evaluar el daño y la reparación del ADN en cualquier tipo celular eucariota. Este, en su versión alcalina, permite detectar roturas de simple cadena y sitios sensibles al álcali que se originan durante la reparación por escisión de bases y de nucleótidos dando lugar a la formación de la cola del cometa <sup>1,2</sup>.

Sin embargo algunos autores han detectado que la reparación del daño puede verse afectada por la temperatura de incubación de las células. En 1998 Hjertvik *et al.* <sup>3</sup> estudiaron las actividades enzimáticas de proteínas de la reparación de acuerdo a su energía de activación frente a agentes alquilantes y demostraron que la capacidad reparadora de los linfocitos disminuía cuan-

do se incubaban a temperaturas inferiores a los 37 °C. Este hallazgo se corresponde con planteado por Tice <sup>2</sup> en 1995 acerca de que la reparación del daño al ADN inducido por la radiación ultravioleta en leucocitos humanos no se observaba hasta tanto las células no fueran incubadas a una temperatura de 37 °C.

Por estas razones nuestro trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de tres temperaturas: 4, 15 y 37 °C, sobre la reparación del daño inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la radiación ultravioleta A en células sanguíneas humanas y compararlas con los de un paciente afectado por Xeroderma pigmentoso (XP), defecto genético donde las células presentan deficiencias en la reparación por escisión de nucleótidos (REN) <sup>4</sup>.

**PALABRAS CLAVE:** Ensayo cometa, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Radiación ultravioleta A, Reparación por escisión de bases, Reparación por escisión de nucleótidos.

**KEY WORDS:** Base excision repair, Comet assay, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Nucleotide excision repair, UV A radiation.

\* Autor a quien debe ser enviada la correspondencia. E-mail: mayte.cossio@infomed.sld.cu

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Leucocitos de sangre periférica**

Se realizó la extracción de sangre por venipuntura a un individuo sano del sexo femenino, no fumador y de 25 años. El segundo donante fue un individuo de 28 años del sexo femenino afectado por Xeroderma pigmentoso, no fumador.

### **Linfocitos aislados**

La sangre se obtuvo por venipuntura. Los donantes fueron cinco individuos sanos del sexo masculino, no fumadores, con edades comprendidas entre 28 y 30 años. Los linfocitos se purificaron según el protocolo descrito por Collins *et al.* <sup>5</sup>.

### **Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

La sangre se trató con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300 µM durante 30 min. Después del tratamiento las células se centrifugaron durante 6 min a 4000g y se lavaron en PBS fresco. Se evaluó la viabilidad celular con azul de Tripán <sup>6</sup>. En este momento se tomó la muestra correspondiente al tiempo cero en la curva de reparación. A este tiempo se lo denominó tiempo cero de reparación (t<sub>0</sub> rep), ya que las células habían sido tratadas con el agente inductor de daño pero no incubadas a las temperaturas permisivas para que se efectuara la reparación. Posteriormente se incubaron a 4°, 15° y 37 °C. A los 30 y 60 min de incubación se realizó el ensayo cometa (tiempo 30 y 60 de reparación).

### **Radiación ultravioleta A (rUVA: 365nm)**

La sangre se irradió durante 10 min a temperatura ambiente. La dosis de radiación empleada fue de 1,42 kJ/cm. Luego se centrifugó por 6 min a 4000g y se lavó en PBS fresco. A partir de este paso se realizó el mismo procedimiento indicado para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **Ensayo Cometa**

Este ensayo se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Tice <sup>2</sup>. La muestra de sangre se mezcló con agarosa regular (0,5%) y posteriormente las células fueron sometidas a lisis (1 h), desenrollamiento (20 min) y electroforesis (20 min) a 25 V y 300 mA a 4 °C. Para el análisis las láminas fueron teñidas con nitrato de plata <sup>7</sup>. Fueron cuantificadas 100 células por tratamiento tomando como criterio de la longitud total de migración, donde se mide desde el inicio hasta el final de la imagen. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (UA). Se reali-

zó la prueba de Student-Newman-Keulls para niveles de significación del 99 y 95%.

## RESULTADOS

Las Tablas 1 y 2 muestran los resultados obtenidos para la viabilidad celular con ambos agentes. Los valores encontrados estuvieron por encima del 85%, valor establecido para la aplicación del ensayo cometa, que previene el registro de falsos positivos <sup>8</sup>.

Tratamientos	Viabilidad Celular (%)
XP sin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	91,5
XP H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	87
Sanas sin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	97
Sanas H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	87,5
XP sin UV	91
XP UV	87
Sanas sin UV	96
Sanas UV	89

**Tabla 1.** Valores de viabilidad celular de los leucocitos de sangre periférica en cada tratamiento.

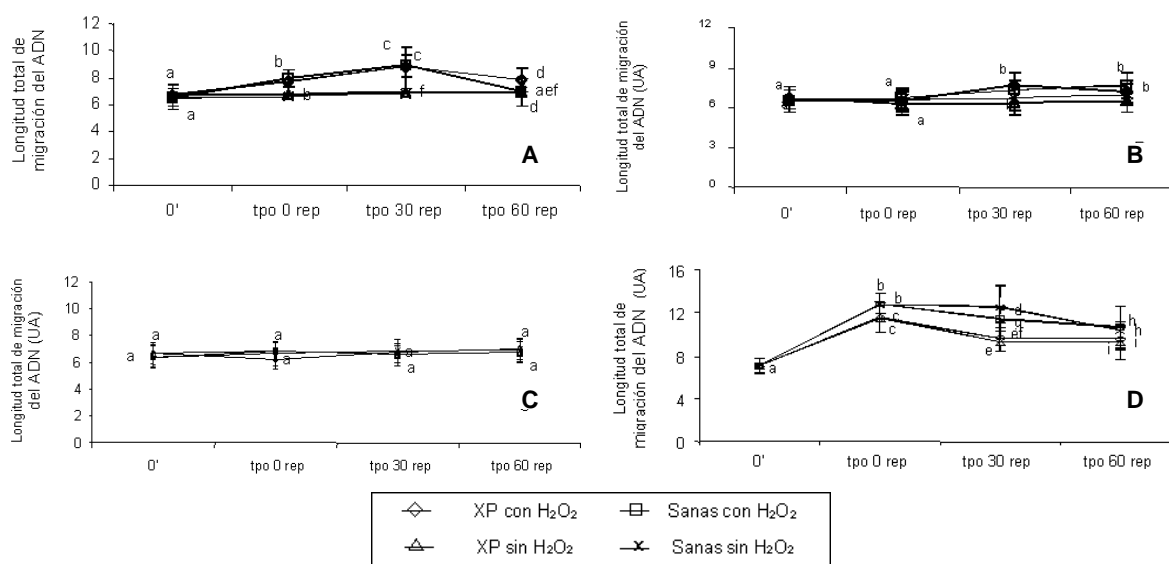
### **Tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

La Figura 1A muestra los resultados obtenidos en leucocitos de sangre periférica tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e incubados a 37 °C y su control. Ambos tipos de células mostraron un aumento significativo después del tratamiento (t<sub>0</sub> rep: 6,68 ± 0,80 vs 7,71 ± 0,92 en XP y 6,45 ± 0,8 vs 7,93 ± 0,61 en sanas). Dicho incremento se acentuó a los 30 min de incubación (t<sub>30</sub> rep) (8,76±1,55 en XP y 8,88 ± 0,78 en sanas). Luego, a los 60 min de reparación (t<sub>60</sub> rep), hubo una disminución significativa del daño en las células sanas (6,92 ± 1,06), mientras las XP mostraban un retardo en su recuperación (7,8 ± 0,85).

Los resultados obtenidos para la incubación a 15 °C con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostraron valores similares de migración tanto en leucocitos sanos como en XP (t<sub>0</sub> rep) con respecto al inicio (0') (6,68 ± 0,84 vs 6,45 ± 0,76 XP y 6,45 ± 0,8 vs 6,65 ± 0,8 sanas (Figura 1B). A pesar de la disminución de la temperatura se observó un incremento significativo de la longitud total del cometa a los 30 min de reparación (t<sub>30</sub> rep) tanto en sanas como en XP (7,7 ± 0,94 XP y 7,35 ± 0,67 sanas). Sin embargo fue significativamente menor que la encontrada para la incubación a 37 °C (8,76 ± 1,55 XP y 8,88 ± 0,78 sanas). No existieron dife-

Tratamientos				
Individuo	Control de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)	Control de UV (%)	UV (%)
1	96.5	88.3	98.8	85.6
2	94.3	92.5	92.2	89.3
3	97.9	96.8	97.4	86.7
4	95.2	91.4	95.6	91.2
5	96.4	91.3	96.7	87.2
Total	96.1	92.1	96.1	88.0

**Tabla 2.** Porcentaje de viabilidad celular de los linfocitos aislados de cinco individuos sanos de sexo masculino según el tratamiento.



**Figura 1.** Cinética de reparación en leucocitos de sangre periférica sanos y mutantes expuestos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e incubados a 37 °C (A), 15 °C (B) y 4 °C (C) y en linfocitos aislados expuestos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e incubados a 15 y 37 °C (D). Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05). *Tpo*: tiempo; *rep*: reparación.

rencias significativas entre ellas en los puntos de 30 y 60 min de la cinética realizada a 15 °C.

La incubación a 4 °C afectó la migración del ADN (Figura 1C). Se observó una respuesta silente tanto de leucocitos sanos como XP. Los registros encontrados fueron: 6,22 ± 0,73 en XP y 6,84 ± 0,65 en sanas después del tratamiento, 6,78 ± 0,84 en XP y 6,58 ± 0,61 en sanas a los 30 y 7,04 ± 0,82 en XP y 6,78 ± 0,82 en sanas a los 60 min de reparación.

Las células control (no tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mostraron aumento significativo de la longitud total del cometa con la incubación a 37 °C tanto en sanas como en XP. Sin embargo a 15 y 4 °C no hubo diferencias significativas respecto a las células tratadas.

La respuesta de los linfocitos aislados frente

al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se muestra en la Figura 1D. Se encontró un aumento significativo de las longitudes totales de los cometas respecto al inicio (7,06 ± 0,74 vs 12,85 ± 0,96) tanto en las células tratadas como en las no tratadas. Sin embargo los linfocitos tratados e incubados a 15 °C mostraron una menor migración (11,41 ± 0,9) que los incubados a 37 °C (12,55 ± 1) lo cual se manifestó a los 30 min de reparación. La reparación del daño tuvo lugar a los 60 min de incubación (10,62 ± 0,97 a 15 °C y 10,38 ± 0,78).

Es importante destacar que los linfocitos aislados control, a diferencia de los leucocitos de sangre periférica control, mostraron un aumento significativo de la longitud total del cometa a ambas temperaturas (15 y 37 °C) durante la cinética de reparación.

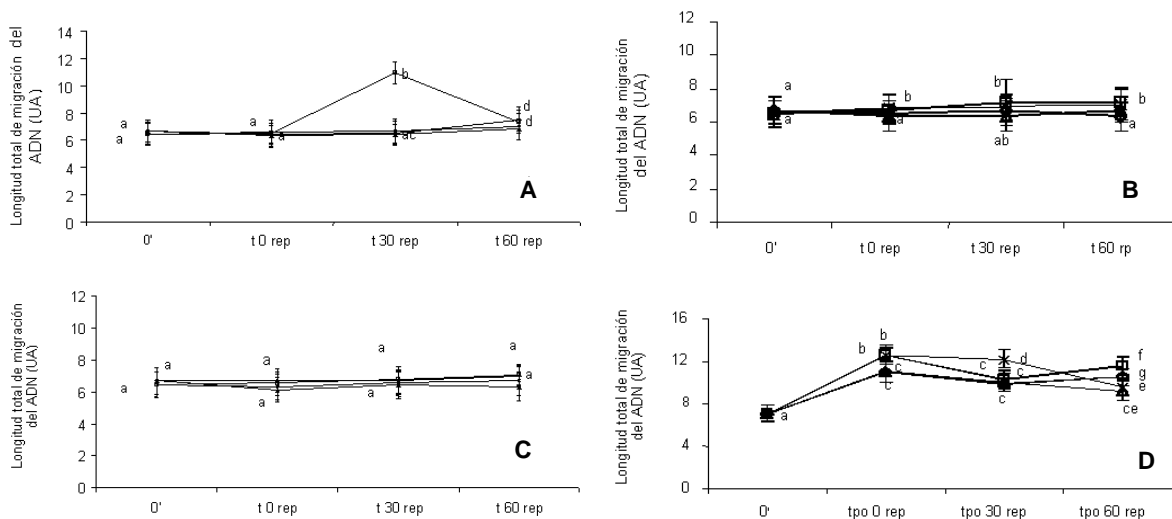
**Tratamiento con rUVA (365 nm)**

La Figura 2A muestra la respuesta de los leucocitos de sangre periférica frente a la rUVA con la incubación a 37 °C. No hubo diferencias entre los valores reportados antes de la irradiación (0') con respecto a los hallados inmediatamente después (XP  $6,68 \pm 0,84$  vs  $6,47 \pm 0,80$  y sanas  $6,45 \pm 0,80$  vs  $6,5 \pm 0,97$ ). Sin embargo a los 30 min se produjo un aumento significativo de la longitud total de migración de las sanas hasta  $10,96 \pm 0,88$  no así para los leucocitos XP  $6,54 \pm 0,81$ . Las longitudes totales de las células sanas disminuyeron ( $7,34 \pm 0,97$ ) a los 60 min de reparación mientras que en las XP se observó un ligero aumento.

Las Figuras 2B y 2C muestran los resultados obtenidos a 15°C y 4 °C en leucocitos sanos y

XP. La incubación a ambas temperaturas no hizo posible que se incrementara la longitud total de migración frente al daño generado por la rUVA. Durante la cinética de reparación no se observó modificación de la respuesta por parte de ambas células.

La rUVA generó un aumento significativo de la longitud total de migración en los linfocitos aislados ( $12,59 \pm 0,92$  respecto al inicio  $7,06 \pm 0,74$ ) (Figura 2D). La temperatura de 15 °C afectó la respuesta celular frente a este agente ya que la migración a 37 °C ( $12,17 \pm 0,76$ ) fue mayor en respuesta al daño que a 15°C ( $10,3 \pm 0,80$ ). Sin embargo a los 60 min se incrementó la migración de las células incubadas a 15 °C ( $11,54 \pm 0,89$ ) con respecto a 37 °C ( $9,55 \pm 0,87$ ).



**Figura 2.** Cinética de reparación en leucocitos de sangre periférica sanos y mutantes irradiados con rUVA e incubados a 37 °C (A), 15 °C (B), 4 °C (C) y en linfocitos aislados expuestos a radiación ultravioleta A e incubados a 15 y 37 °C (D). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Tpo: tiempo; rep: reparación

**DISCUSION**

El  $H_2O_2$  produce alteraciones en el material genético que se expresan como roturas de cadenas a través de la formación del radical OH, el cual ha sido considerado la principal especie radicalaria derivada del oxígeno que contribuye a la oxidación endógena del ADN celular<sup>9</sup>. Además este radical puede generar modificaciones de bases sensibles al álcali, siendo estos detectados con elevada sensibilidad por la versión alcalina del ensayo cometa empleada en nuestro estudio. Frente a este daño la respuesta celular que con mayor participación se reporta es la de

las enzimas ADN glicosilasas y las endonucleasas apirimidínicas o apurínicas (EAP) que se activan en dependencia de la magnitud y el tipo de lesión<sup>10</sup>. Se ha visto que estas enzimas pueden ser activadas por EROs. Se sugiere que los mecanismos de activación cursan a través del factor de transcripción NFkB ya que se han encontrado secuencias consenso en las EAP para la unión a este factor, cuyo papel en la defensa ante el daño por EROs esta descrito<sup>11</sup>. La disminución de la longitud total del cometa se ha relacionado con las acción de las polimerasas y las ADN ligasas que actúan sintetizando y se-

llo la molécula <sup>12</sup> y cuya actividad depende en gran medida de la disponibilidad de precursores de la síntesis de ADN (guanina, timina, adenina y citosina) presentes en la célula. Varios autores han descrito que los linfocitos de sangre periférica poseen pocas cantidades de estos nucleótidos lo que pudiese influir en la síntesis de las nuevas cadenas de ADN <sup>13</sup>. A pesar de la disminución de la temperatura, tanto los leucocitos XP como los sanos mostraron una marcada reparación del daño oxidativo. Este resultado se corresponde con lo encontrado por otros autores <sup>2</sup> que han descrito que la actividad de las ADN glicosilasas y las EAP no se afecta con la disminución de la temperatura. No obstante encontramos una diferencia con respecto a la incubación a 37 °C, en la cual se evidencia una capacidad de reparación óptima. Sin embargo es importante destacar la respuesta diferencial de los linfocitos aislados control respecto a los leucocitos. Los resultados obtenidos, en este sentido, demuestran el posible efecto protector del plasma frente al daño oxidativo generado por la exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el caso de los leucocitos ya que mostraron menores valores de longitud total.

La exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también puede dar lugar a reacciones en cadena donde se forman diferentes intermediarios reactivos como los aldehídos de cadena larga (heptanal, nonenal y hexanal) y corta (MDA) <sup>14</sup> que atraviesan las membranas celulares con relativa facilidad aunque no tan rápido como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ya que su lipofiliidad se lo impide <sup>15</sup>. Este es el caso de los hidroperóxidos y lipoperóxidos que aunque su capacidad de difusión no está bien caracterizada, si se conoce de su elevada reactividad y de su papel en el proceso de peroxidación lipídica por lo que su difusión se hace mucho más lenta que el resto de los aldehídos y por tanto es probable que reaccionen de forma más tardía con el ADN. Otro de los aldehídos reactivos es el MDA que es capaz de inducir enlaces cruzados ADN-proteínas así como aductos voluminosos en el ADN <sup>15</sup>. Se ha demostrado que todas estas moléculas pueden generar afectaciones al material genético, las cuales en su mayoría son reparadas por (REN) <sup>16</sup>. Como hemos mencionado estas células presentan una mutación en los genes que codifican para las proteínas implicadas en el complejo de la REN. Esta podría ser la causa por la que los leucocitos XP muestren una respuesta recuperativa tardía respecto a los sanos. No obstante podemos sugerir que, a pesar de ser una respuesta demorada en el tiempo, am-

bos tipos de células poseen susceptibilidades similares al daño directo provocado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta respuesta también ha sido encontrada por otros autores en diferentes sistemas <sup>17</sup>. Esta permanente recuperación de las células de organismos aerobios, que ha sido estudiada con anterioridad, ha garantizado la adaptación y la supervivencia de las especies al ambiente oxidante durante todo el proceso evolutivo <sup>18</sup>.

La incubación de 4 °C afectó la migración del ADN de manera considerable ya que no se observó incremento en la longitud de los cometas durante la cinética de reparación. La energía de activación de los sistemas puede influir en las incisiones de los mecanismos de reparación del daño al material genético ya sea de tipo oxidativo u otros y se ha visto que se modifica con la temperatura <sup>19</sup>. Sin embargo las vías por las que esto ocurre necesitan ser esclarecidas <sup>20</sup>.

A diferencia de lo encontrado en el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el daño por rUVA no se detectó inmediatamente después que los leucocitos se incubaron a 37 °C. La radiación UV genera daño directo al ADN como son los dímeros de pirimidina y 6-4 fotoproductos, sin embargo no produce per se roturas de simple y doble cadena, sino sólo como resultado de la acción de los mecanismos de reparación <sup>20</sup>.

En múltiples estudios realizados con células de individuos afectados por el XP y el empleo del ensayo cometa alcalino se ha encontrado que, cuando estas células se exponen a la radiación UV las longitudes totales de los cometas no se ven incrementadas <sup>21</sup>. Este hecho ha sido atribuido a las deficiencias en el mecanismo de REN como uno de los sistemas responsables de reparar este tipo de daño y es la causa por las que los leucocitos XP muestran una elevada sensibilidad a las radiaciones ultravioletas del sol y los afectados por este desorden genético, una susceptibilidad característica para desarrollar cáncer de piel y de otras localizaciones <sup>22</sup>. Se ha estudiado que esencialmente las enzimas afectadas en estos individuos son las que forman parte del complejo de la REN las cuales son responsables del corte del fragmento dañado así como de la síntesis de la nueva hebra <sup>10</sup>.

Cuando la radiación UVA penetra a la célula ocasiona reacciones de fotosensibilización sobre moléculas del entorno. Estas absorben energía y pasan del estado excitado al estado basal liberando electrones que son tomados por el O<sub>2</sub> dando lugar a la formación de EROs <sup>23</sup>. Muchas de ellas, a pesar de su corto tiempo de vida media, podrían actuar directamente sobre el mate-

rial genético o producir reacciones en cadena rindiendo otras moléculas reactivas que dañan al ADN <sup>23</sup>. Como resultado de esto pueden activarse, en un tiempo dado, otros mecanismos de reparación no afectados en este tipo de células. Esta activación es probablemente la responsable del incremento observado a los 60 min en células XP. No obstante no descartamos la posibilidad de que los dímeros formados que no hayan sido reparados hasta ese momento originen sitios sensibles al álcali que contribuyan a la migración. Un dímero de pirimidina constituye un aducto voluminoso que se forma entre dos pirimidinas contiguas y cuyos enlaces son susceptibles de ruptura bajo condiciones alcalinas, que fueron las empleadas en nuestro estudio <sup>24</sup>.

Resulta importante señalar que la migración del ADN de los leucocitos XP no mostró diferencias en cuanto a la temperatura, ya que muestran un comportamiento similar frente al daño por rUVA tanto a 15 °C como a 37 °C. Si el mecanismo afectado por la mutación es REN y la temperatura de 15 °C se ha demostrado que afecta el funcionamiento de este mecanismo, entonces podremos afirmar que este ensayo es sensible para estudiar el comportamiento de las enzimas reparadoras frente a diferentes tipos de daños inducidos al ADN.

El comportamiento de los linfocitos fue diferente al de los leucocitos. Su supervivencia no se afectó notablemente ni por la exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ni a la rUVA en los cinco individuos muestreados, aunque los valores registrados para las células irradiadas con rUVA fueron menores que para las tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicando un efecto citotóxico ligeramente mayor. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es una especie que constantemente se genera en el entorno celular ya sea como resultado del proceso respiratorio mitocondrial como por la acción de otras enzimas como la SOD <sup>25</sup>. La respuesta observada en linfocitos aislados no coincide ni con los resultados obtenidos en leucocitos de sangre total ni con lo planteado por Tice <sup>2</sup> acerca de que sólo a temperaturas cercanas a 37 °C hay una expresión del daño ocasionado por la rUVA. No obstante este autor no reporta hasta qué valores de temperaturas no se puede observar la expresión del daño. Nosotros en ambos diseños experimentales irradiamos a temperatura ambiente, sólo que en este caso observamos el daño a nivel de linfocitos aislados y resultó ser significativamente mayor. Suponemos que la ausencia del plasma pueda estar jugando su papel atendiendo a su probada capacidad protectora contra el daño oxidativo <sup>26</sup>.

Además existen estudios comparativos entre linfocitos, granulocitos y monocitos frente al reto con radiaciones  $\gamma$  y rayos x donde se reportan valores mayores de daño en los linfocitos que en el resto de las células <sup>27</sup>. Estos estudios han arrojado que el tiempo de vida medio ( $t_{1/2}$ ) de cada tipo celular también influye en la respuesta <sup>26</sup>. Los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) poseen una vida media en el torrente sanguíneo de 7 a 24 horas mientras que los linfocitos pueden vivir desde una semana hasta décadas <sup>28</sup>. Esto dificulta cualquier comparación entre ambas células ya que mientras la corta vida media de los granulocitos en sangre indica una breve exposición al daño la de los linfocitos puede estar expresada como un daño acumulado en el tiempo. Sobre este aspecto se plantea que los linfocitos de sangre periférica no muestran una elevada capacidad de reparación del ADN hasta tanto no son estimulados a la proliferación celular <sup>29</sup>.

Por todo lo anteriormente planteado podríamos pensar que el hecho de estar observando solamente linfocitos posiblemente hace que se incremente la probabilidad de registrar mayor cantidad de células dañadas que cuando se realiza el conteo entre varios tipos de células como polimorfonucleares, monocitos, entre otras.

El daño al ADN constituye un factor de riesgo en el desarrollo del proceso de carcinogénesis, el cual es más acentuado en individuos cuya capacidad de respuesta está afectada por la ausencia de genes relacionados con la reparación, como es el caso del XP <sup>30</sup>. Sin embargo resulta costosa la caracterización del grupo de complementación a que corresponde cada paciente de manera que aquellos métodos que permitan estimar el daño al material genético en estos enfermos serán de gran importancia.

El empleo del ensayo de electroforesis alcalina de células aisladas en gel de agarosa o ensayo cometa ha permitido establecer una detección rápida, sensible y poco costosa del daño al ADN generado por numerosos agentes genotóxicos como radiaciones ionizantes <sup>31</sup>, metales pesados <sup>32</sup>, pesticidas <sup>33</sup>, así como estimar la reparación del ADN bajo una gran variedad de condiciones experimentales. La ventaja de esta técnica con respecto a otras radica en el hecho de que emplea pequeñas poblaciones celulares sin que sea necesario que se encuentren en proliferación <sup>2</sup>.

Los experimentos realizados en este trabajo utilizando el ensayo cometa han sido útiles para comprender la capacidad de reparación de los

leucocitos de sangre periférica procedentes de un individuo afectado por el XP frente al daño inducido por la rUVA y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Así mismo nos ha permitido destacar el hecho de que las actividades de incisión de las proteínas implicadas en la reparación de los daños pueden afectarse por la disminución de la temperatura.

Es evidente que la detección de los daños generados por la exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y a la rUVA así como su reparación muestran afectaciones dependientes de la temperatura de incubación. A pesar de que ambos agentes actúan mediante la generación de EROs implicadas en la señalización celular que induce mecanismos de reparación por escisión del ADN, se hace necesario ampliar este estudio a otros mutágenos directos y promutágenos con diferentes mecanismos de acción.

Otro aspecto que debemos plantear es el hecho de que las células afectadas por el XP mostraron una respuesta superior frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que frente a la rUVA. A pesar de estar deficientes de un mecanismo reparador del ADN se observó claramente como son capaces de responder de manera más efectiva al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que a la rUVA. Como hemos planteado la exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activa mecanismos de defensa antioxidantes como (APE) los cuales no se encuentran activados frente a la exposición a la rUVA a pesar de que también se generan EROs. La presencia de esta enzima (APE) activada así como su efectividad

para reparar daño oxidativo pudiese ser la causa por la que las células XP mostraran este comportamiento. Además podría constituir una respuesta defensiva esencial para la supervivencia de las mismas.

De los cánceres humanos, el de la piel, parece conocerse mejor por el avanzado conocimiento de los mecanismos moleculares que le dan origen. Hasta el momento la radiación ultravioleta parece ser el agente más carcinogénico de los rayos solares. La insuficiencia en los mecanismos reparadores y los errores postreplicativos que fijan mutaciones representan eventos iniciadores de los procesos carcinogénicos. La exposición crónica a estas radiaciones resulta en la subsiguiente disrupción de las estructuras epiteliales y la extensión de clones premalignos cuyos cambios genéticos pueden dar lugar a su transformación maligna total. Las personas con defectos genéticos en sus mecanismos de reparación del ADN como los afectados por el Xeroderma pigmentoso, muestran una elevada sensibilidad a la luz solar, la que además de producirles cáncer origina trastornos neurodegenerativos y conducen al envejecimiento prematuro de nuestra primera barrera de defensa, la piel.

Debido a ello sugerimos la necesidad de estudiar los efectos de las radiaciones así como de los agentes oxidantes en células epiteliales tanto en individuos afectados por XP como en otros trastornos genéticos.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ostling, O. & K.J. Johanson (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**: 292-8.
- Tice, R. (1995) "The single cell gel/comet assay: A microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells", en "*Environmental Mutagenesis*" (D.H. Phillips, S. Venitt, Eds.), Oxford, UK, págs. 315-39 Environmental Mutagenesis. pp. 315-39.
- Hjertvik, M., K. Erixon & G. Ahnström (1998) *Mutat. Res.* **407**: 87-96.
- Cleaver, J.E. & E. Crowley (2002) *Front Biosci.* **1**: 1024-43.
- Collins, A.R., M. Aiguo & S.J. Duthie (1995) *Mutat. Res.* **336**: 69-77.
- Chilakamarti, V., T. Ramana, B. Istvan, T. Izumi & M. Sankar (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 5061-6.
- Nadin, S.B., L.M. Vargas-Roig & D.R. Cioccia (2001) *Histochem & Cytochem.* **49**: 1183-6.
- Henderson, L., A. Wolfreys, J. Fedyk, C. Bourner & S. Windenbank (1998) *Mutagenesis* **13**: 89-94
- Marnett, L (1987) *Carcinogenesis* **8**: 1365-73.
- Voet, D. & J.G. Voet (1995) *Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> Edition, John Wiley & Sons Inc. New York, pp. 1046-53.
- Schreck, R., P. Rieber & P.A. Baeuerle (1991) *Embo. J.* **10**: 2247-58.
- Erixon, K., N. Erixon, C. Stensman & K. Valeri (1989) *J. Cell. Biochem.* 409 (Suppl. 13D), 52, abstract.
- Angelis, K.L., M. McGuffie, M. Menke & I. Schubert (2000) *Environ. Molec. Mutag.* **36**: 146-50.
- Marnett, L. (1999) *Mutat. Res.* **424**: 83-95.
- Green, M. H., A.P. Waugh, J.E. Lowe, S.A. Harcourt, P.H. Cligen & J. Cole (1996) *Mutat. Res.* **350**: 239-46.

16. Pryor, W.A., R. Cueto & G.L. Squadrito (1994) *The Tenth Effects Institute Annual Conference*, May 1-4, Biodynamics Institute, Louisiana. Conference Program Abstracts for Posters Session, pp. 23, 559.
17. Speit, G. & A. Hartman (1995) *Mutagenesis* **10**: 555-9.
18. Joenje, H. (1989) *Mutat. Res.* **219**: 193-208.
19. Bock, C., H. Dittmar, H. Gemeinhardt, E. Bauer & K.O. Greulich (1998) *Mutat. Res.* **408**: 111-20.
20. Ahnstrom, G. (1986) "Repair pathways in mammalian cells: Incision-ligation kinetics after UV, X-rays and mutagenic chemicals. Effects of 3-aminobenzamide and hydroxy urea+cytosine arabinoside", en "*Genetic toxicology of Environmental Chemicals: I. Basics Principles and Mechanism of Action*". (C. Ramel, B. Lambert, J. Magnusson, Eds.), New York: Academic Press, Vol. 1, págs. 275-82.
21. Speit, G. & A. Hartman (1995) *Mutagenesis* **10**: 555-9.
22. Cleaver, J.E & K.H. Kraemer (1994) *The Metabolic Bases of Inherited Disease*, 6<sup>th</sup> ed. (C.R. Scriver, A. Beaudet, L. Sly, D. Valle, Eds.), New York, Mc Graw-Hill Press, Vol. 2, págs. 2000-949.
23. Krutmann, J. (2000) *J. Dermatol. Sci.* **1**: 522-6.
24. Runger, T.M., B. Epe & K. Moller (1995) *Recent Results Cancer Res.* **139**: 31-42.
25. Burcham, P.C. (1999) *Mutat. Res.* **443**: 11-36.
26. Ramana, C.V., I. Boldogh, T. Izumi. & S. Mitra (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 5061-6.
27. Nakakuki, Y., C. Nishigori, K. Okamoto, S. Imamura & H. Hiai (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**:1132-9.
28. Fedaku, K., P. Wolfram & S. Knasmuller (2000) *Mutat. Res.* **463**: 13-31.
29. O'Donovan. M.R., S. Johns & P. Wilcox (1995) *Mutagenesis* **10**: 371-4.
30. Collins, R., M. Dusinska, E. Hotvátova, E. Munro, M. Savio & R. Stetina (2001) *Env. Mol. Mutat.* **36**: 149-56.
31. Vijayalaxmi, Y., R.R. Tice & G.H.S. Strauss (1992) *Mutat. Res.* **271**: 243-52.
32. Hartmann, A. & G. Speit (1995) *Env. Mol. Mutat.* **23**: 299-305.
33. Ribas, G., G. Frezilli, R. Barale & R. Marcos (1995) *Mutat. Res.* **344**: 41-54.