



**Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Departamento de Postgrado**

Tesis Doctoral

Estudio comparativo de los efectos cito- y genotóxicos en células de mamífero con diferente capacidad de reparación del daño genético, en dos modelos de exposición a dosis bajas de radiación ionizante

Tesista

Lic. María Virginia Ponzinibbio

Director

Dra. Analía Seoane

Co-director

Dra. Gisel Padula

2015

A Dios y a mis padres, Mario y Diana, que me dieron la vida;
A mi esposo Fernando y nuestros hijos Valentina, Vicente y Vito,
que convierten en magia cada uno de sus días.

Agradecimientos

Quisiera agradecer profundamente,

En primera medida al Ing. Fernando N. Dulout quien fuera el director del Centro de Investigación en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA) y mi primer mentor en los inicios de este largo camino emprendido en mi carrera.

A la Dra. Pilar Peral García y al Dr. Guillermo Giovambattista, por haber confiado en mí y haberme permitido continuar con mi crecimiento profesional una vez creado el Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET).

A la Dra. Analía Seoane y a la Dra. Gisel Padula, no sólo por dirigirme en este arduo trabajo sino, principalmente, por su incondicional compañía basada en la profunda amistad construida a lo largo de todos estos años compartidos.

A la Dra. Alicia Antonini por su desinteresada y constante colaboración con el análisis estadístico de los datos.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a César, con quienes he compartido innumerables momentos y me ayudaron día a día a resolver los problemas cotidianos para poder continuar avanzando.

A mis amigas de toda la vida, Ana, Vicky y Samanta, quienes me sostuvieron en momentos de flaqueza personal y laboral alentándome y sosteniéndome en todos y cada uno de ellos.

A mi amiga Caro, por el acompañamiento brindado con su gran cantidad de aportes e ideas sugeridas.

A mis padres, Mario y Diana, por haberme enseñado siempre que “lo que el árbol tiene de florido, vive de lo que tiene sepultado”...

A mis hermanos María, Guillermo, Luján y Arturo por su compañía y aliento para no bajar los brazos cuando el cansancio apremia.

A mi ahijada quien con su alegría transforma en proyectos e ilusiones todas mis preocupaciones.

A mi esposo, Fernando, por su inagotable paciencia y acompañamiento; y a nuestros hijos, Valen, Vico y Vito quienes con su inocencia y alegría llenan mi vida de sonrisas.

ÍNDICE GENERAL

Resumen en español.....	7
Resumen en inglés.....	11
Índice de abreviaturas y acrónimos.....	14
Capítulo I Introducción	
I.1. Acerca de la genética, la toxicología y la genética toxicológica.....	17
I.2. Acerca de las radiaciones.....	21
I.3. La radiación como agente genotóxico.....	28
I.4. La respuesta celular a la exposición a radiación ionizante.....	38
Capítulo II. Antecedentes	
II.1. Estudios de los efectos asociados con la exposición a dosis bajas de radiación ionizante.....	57
Exposición crónica a dosis bajas de radiación ionizante.....	60
Inestabilidad genómica inducida por exposición a dosis bajas de radiación ionizante	62
Estudios con individuos o líneas celulares deficientes en los mecanismos de reparación del ADN.....	64
II. 2. Antecedentes de los ensayos a utilizar.....	66
Ensayo de electroforesis de células individuales (Ensayo Cometa).....	67
Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis	68
Ensayo de Anexina V.....	70
Capítulo III. Hipótesis y Objetivos de Trabajo	72

Capítulo IV. Materiales y Métodos

IV.1. Líneas celulares utilizadas.....	77
IV.2. Irradiación celular.....	79
IV.3. Ensayos realizados	
IV.3.a. Ensayo de electroforesis en gel de células individuales.....	81
IV.3.b. Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis.....	85
IV.3.c. Ensayo de Anexina V.....	88
IV.4. Análisis estadístico.....	90
IV.5. Diseño experimental.....	90

Capítulo V. Resultados

V.1. Resultados para la línea celular CHO-K1

V.1.a. Ensayo cometa análisis cualitativo.....	94
V.1.b. Ensayo cometa análisis cuantitativo.....	99
V.1.c. Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis.....	103
V.1.d. Análisis de células apoptóticas	104

V.2. Resultados para la línea celular XRS-5

V.2.a. Ensayo cometa análisis cualitativo	106
V.2.b. Ensayo cometa análisis cuantitativo.....	111
V.2.c. Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis	115
V.2.d. Análisis de células apoptóticas	116

V.3. Comparación entre líneas celulares para MIC

V.2. Comparación entre líneas celulares para MIG

Capítulo VI. Discusión

VI.1. Consideraciones generales.....	125
--------------------------------------	-----

VI.2. Modelo de irradiación crónica	130
VI.3. Modelo de inestabilidad genómica	137
VI.4. Comparación entre ambas líneas para el MIC.....	141
VI.5 Comparación entre ambas líneas para el MIG.....	142
Capítulo VII Conclusiones 	149
Bibliografía 	151
ANEXO I 	173

Resumen en español

La presente tesis se enmarca dentro de una disciplina relativamente nueva y creciente, la genética toxicológica, la cual tiene sus fundamentos en dos grandes áreas del conocimiento como son la genética y la toxicología.

En este contexto, la radiación constituye en la actualidad un agente genotóxico físico ampliamente estudiado, debido a su creciente utilización en diversos campos de aplicación y el interés por evitar sus consecuencias perjudiciales para la salud humana. La radiación es una forma de energía en movimiento a través del espacio. Según su capacidad para generar pares electrónicos, se clasifica en ionizante y no ionizante. Así, la radiación ionizante se define como cualquier tipo de radiación que sea capaz de remover un electrón de la órbita de un átomo, provocando que el mismo resulte en una forma cargada o ionizada, entre las cuales se encuentran los rayos X.

Otra forma de clasificar las radiaciones es en función de su dosis. De esta manera, se plantea que entre el *background* natural (aproximadamente 0,01 mSv/día) de radiación ionizante y las dosis altas de radiación (aproximadamente 150 mSv), en las que se advierten efectos inmediatos en la salud humana, se encuentra el rango de exposición conocido como dosis bajas de radiación. Este tipo de dosis carece de efectos detectables inmediatamente después de la exposición, sin embargo existe un gran interés en sus consecuencias biológicas a largo plazo.

Poco tiempo después de que fueran descubiertas las radiaciones ionizantes, surgió una nueva disciplina que se encarga de estudiar, describir y explicar los efectos que la radiación ionizante tiene sobre los tejidos vivos: la radiobiología. Ésta en sus comienzos, planteó un modelo lineal sin umbral, en el cual se considera que existe una relación lineal entre la dosis de radiación y su efecto sobre el material biológico. Así, los efectos celulares esperados en el rango de las dosis bajas de radiación eran extrapolados linealmente desde las dosis altas. Con el avance de los conocimientos, este paradigma ha ido cambiando debido a que se ha acumulado mucha evidencia que sugiere que los riesgos asociados a dosis bajas de radiación no son los esperados conforme a este modelo.

Actualmente, se considera que uno de los principales efectos responsables de que este modelo no se cumpla es la inestabilidad genómica inducida por la radiación. Ésta es definida como el fenómeno por el cual las señales generadas por la exposición a radiación son transmitidas hacia la progenie de las células irradiadas conduciendo a la aparición de efectos genéticos, tales como mutaciones y aberraciones cromosómicas, varias generaciones celulares después de la irradiación original.

Entre las lesiones producidas en el ADN por exposición a radiación ionizante, las rupturas de cadena doble son las más riesgosas para la salud humana, por poseer una alta correlación con los procesos de mutagénesis y carcinogénesis. En eucariotas superiores, se reconocen dos mecanismos para la reparación de dichas rupturas, la recombinación homóloga y la reunión de extremos no homólogos. Éste último mecanismo, es el que representa la principal vía por la cual las células reparan las lesiones originadas por radiación ionizante.

Por otra parte, los sistemas vivos cuentan con diversos mecanismos de muerte celular, algunos de los cuales se disparan en forma controlada y son verdaderos procesos de muerte tal como la apoptosis, mientras que otros se desarrollan en forma descontrolada o más abruptamente tal como la necrosis.

En base a todo lo anteriormente expuesto, se plantean los siguientes objetivos:

- Evaluar la inducción de daño en el ADN y en los cromosomas y de apoptosis, en células de mamífero eficientes (línea celular CHO-K1) y deficientes (línea celular XRS-5) para el mecanismo de reparación por unión de extremos no homólogos, tratadas en forma crónica con dosis bajas de radiación ionizante.
- Evaluar la inducción de daño en el ADN y en los cromosomas y de apoptosis, en la progenie de células CHO-K1 y XRS-5, expuestas a una única dosis baja de radiación ionizante.
- Comparar los resultados obtenidos en ambas líneas celulares, a fin de determinar si la capacidad de reparar el daño genético mediante el mecanismo de reparación por unión de extremos no homólogos tiene influencia sobre la radiosensibilidad de las células en alguno de los modelos planteados.

Para poder cumplir con los objetivos planteados, se utilizaron dos líneas celulares distintas. Una línea parental, CHO-K1, y su derivada deficiente para la reparación por unión de extremos no homólogos, XRS-5. Se trabajó con dos modelos experimentales diferentes,

- Modelo de irradiación crónica: los cultivos de ambas líneas celulares fueron irradiados diariamente durante un período de 10 días con 100 mSv de rayos X cada día.
- Modelo de inestabilidad genómica: los cultivos de ambas líneas celulares fueron irradiados con 100 mSv de rayos X el primer día del protocolo y mantenidos en cultivo durante 10 días.

Los ensayos utilizados para medir los efectos de la exposición crónica y de la inestabilidad genómica fueron el Ensayo Cometa en su versión alcalina, el Ensayo de Micronúcleos con bloqueo de la citocinesis y el ensayo de Anexina V. Los cuales se realizaron tanto inmediatamente después de la primera irradiación (Día 1), como así también luego de transcurridos los 10 días del diseño experimental (Día 10).

Los resultados obtenidos con los tres ensayos luego de la primera exposición a la radiación ionizante fueron semejantes en ambas líneas celulares y en ambos modelos experimentales. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el control negativo y las células irradiadas en el número de células con su ADN dañado, pero no se hallaron diferencias significativas al analizar los resultados a través de la técnica de Anexina V. De modo contrario, al realizar el análisis al término del protocolo, día diez (D10), los resultados son diferentes en cada una de las líneas celulares en cada uno de los modelos experimentales. De estos resultados se desprenden las siguientes conclusiones:

- En células de mamífero capaces de reparar mediante la unión de extremos no homólogos el daño inducido con la irradiación crónica de dosis bajas de radiación ionizante (100 mSv); los niveles de daño en el ADN y en los cromosomas permanecen constantes, mientras que la apoptosis aumenta.

- En células incapaces de reparar su ADN mediante la unión de extremos no homólogos el daño inducido con la irradiación crónica de DBRI (100 mSv); tanto los niveles de daño en el ADN y en los cromosomas como la apoptosis aumentan.
- La inestabilidad genómica en células eficientes para NHEJ se evidencia, exclusivamente, a través de la persistencia de los niveles de daño en el ADN y en los cromosomas generados al inicio del modelo experimental.
- La inestabilidad genómica en células deficientes para NHEJ se evidencia tanto a través de la persistencia de los niveles de daño en el ADN y en los cromosomas generados al inicio del modelo experimental, como por un aumento en la frecuencia de células apoptóticas.

Considerando el escaso conocimiento acerca de los riesgos concretos asociados a la exposición a dosis bajas de radiación ionizante, no es posible con el conocimiento actual construir un modelo en el cual se identifique un nivel umbral de radiación por debajo del cual no se encuentre riesgo para la salud, por ello constantemente las asociaciones de todo el mundo están abocadas a la tarea de dilucidar los límites para dicha exposición. En este contexto, cobran relevancia los hallazgos experimentales tendientes a demostrar el impacto que tiene la exposición crónica a dosis bajas de radiación ionizante sobre la estabilidad genómica.

Resumen en inglés

This thesis project is part of a relatively new and rapidly growing discipline, genetic toxicology, which is based on two major areas of knowledge, namely, genetics and toxicology.

Radiation is a physical genotoxic agent widely studied due to its increasing use in different fields and its impact on human health. Radiation is a form of energy in motion that travels through space. According to the ability to generate electron pairs, radiation is classified as ionizing or non-ionizing radiation. Thus, ionizing radiation is defined as any type of radiation able to remove an electron from the orbit of an atom, charging or ionizing it, reason why these radiations are dangerous for human health. Among ionizing radiations we can mention X-rays. Radiations can also be classified according to the dose. The exposure range known as low-dose radiation is found between the natural background (approximately 0.01 mSv/day) of ionizing radiations and high radiation doses at which immediate effects on human health are observed (approximately 150 mSv). Although low-dose radiation effects are undetectable immediately after exposure, there is a great interest for their long-term biological consequences.

At the beginning, the radiobiology postulated the linear no-threshold model, i.e., there was a linear relation between radiation dose and effect on biological material. As a result of the use of this model, the expected cell effects in the low-dose radiation range were linearly extrapolated from high to extremely low doses. This paradigm has changed over time because much evidence suggests that the risk associated to low-dose radiation was not the expected one.

At present, it is assumed that there are some responses inherent to the effects of low-dose radiations, such as radiation-induced genomic instability, defined as the phenomenon whereby the signals generated by radiation exposure are transmitted to the progeny of irradiated cells, leading to the appearance of genetic effects, such as mutations and chromosomal aberrations, several cell generations after the original irradiation.

Among DNA lesions produced by IR exposure, double-strand breaks are the most dangerous for human health due to their high correlation with mutagenesis and carcinogenesis processes. Despite the existence of two well-known mechanisms for double-strand breaks repair in higher eukaryotes, non-homologous end joining is the main pathway by which these cells repair ionizing radiation-induced lesions.

Living systems have different cell death mechanisms; some are triggered in a controlled manner – the same as apoptosis – whereas other mechanisms develop in an uncontrolled and abrupt way, as is the case of necrosis.

On the basis of the above mentioned, the aims of this thesis project are:

- To evaluate DNA and chromosome damage and apoptosis induction in efficient (CHO-K1 cell line) and deficient to non-homologous end-joining (XRS-5 cell line) mammalian cells under chronic treatment with low doses of ionizing radiation.
- To evaluate DNA and chromosome damage induction and apoptosis in the progeny of CHO-K1 and XRS-5 cells exposed to a single low ionizing radiation dose.
- To compare the results obtained in both cell lines and determine whether the genetic damage repair capacity by non-homologous end-joining affects cellular radiosensitivity in any of the proposed models.

To accomplish these objectives, the alkaline comet assay, the micronucleus test and the annexin V test were applied to two different models:

- Chronic irradiation model: both cell lines were irradiated with 100 mSv X-rays during 10 days.
- Genomic instability model: both cell lines were irradiated with 100 mSv X-rays on the first day and then cultured for 10 days.

Both experimental models were carried out with parental CHO-K1 and its deficient cell line XRS-5 repaired by non-homologous end joining. All assays were performed immediately after irradiation (Day 1) or after the experimental design (Day 10).

The results obtained with the three assays after the first IR exposure were similar in both cell lines and both experimental models. Analysis of the negative control and of

irradiated cells with alkaline comet assay and micronucleus test showed statistically significant differences in the number of cells with damaged DNA. However, results were not significant when analysed with the Annexin V. On the other hand, results obtained on Day 10 were different depending on the cell line studied in each experimental model.

The results obtained after the analysis of the effect of low ionizing radiation doses on genetic material showed that they can damage DNA in both cell lines. Such effect was statistically significant even after the first irradiation, as shown by the increased ID and the frequency of micronuclei.

The results obtained by analyzing the effect of low doses of ionizing radiation on the genetic material showed that these are capable of generating DNA damage in both cell lines. With regard to chronic exposure, allow us to affirm that low doses of ionizing radiation affecting more to cells deficient in the repair mechanism of non-homologous end joining, the magnitude of induced genetic damage depends on the efficiency of the DNA repair through this mechanism.

Moreover, in relation to the process of programmed cell death, it can be suggested that chronic exposure to low doses of ionizing radiation could induce apoptosis in both cell lines.

With respect to the induction of genomic instability, it was confirmed that the DNA damage after a single exposure to low doses of ionizing radiation can last at least for a period of ten days in an in vitro cell system, regardless of the cell ability to repair its DNA.; and conversely, the induction of programmed cell death after ten days depends on the ability of the cell to repair its DNA.

Considering the lack of knowledge about the specific risks associated with exposure to low dose ionizing radiation is not possible with current knowledge to build a model in which a threshold level of radiation is identified below which no health risk is found. Therefore constantly associations around the world are doomed to the task of clarifying the limits for such exposure.

Índice de abreviaturas y acrónimos utilizados en el manuscrito

ACE: aberraciones cromosómicas estructurales

ATM: ataxia telangiectasia mutada

ATR: ataxia telangiectasia relacionada con rad-53

AV: anexina V

CSPT: condiciones estándares de presión y temperatura

CBMN: ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis

d: dosis utilizada

D: día de irradiación

DBRI: dosis bajas de radiación ionizante

DDR: respuesta al daño en el ADN

DNA PKsc: subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN

DSB: ruptura de cadena doble

EB: efecto de la vecindad

EC: ensayo cometa

FP: fosfolípidos

FS: fosfatidilserina

Gy: gray

HR: recombinación homóloga

IP: yoduro de propidio

ICRP: Comisión Internacional de Protección Radiológica

ICRU: Comisión Internacional de Unidades Radiológicas

LET: transferencia lineal de energía

MN: micronúcleo

NCCD: Comité de Nomenclatura de Muerte Celular

NHEJ: unión de extremos no homólogos

OIEA: Organización Internacional de Energía Atómica

OMS: Organización Mundial de la Salud

PI3K: kinasa fosfatidilinositol3-fosfato

R: Röentgen

rad: unidad de dosis de radiación absorbida

rem: Röentgen equivalent man

RI: radiación ionizante

RIGI: inestabilidad genómica inducida por radiación

RL: radicales libres

ROS: especies reactivas de oxígeno

RNS: especies reactivas de nitrógeno

RX: rayos X

SCGE: electroforesis en gel de células aisladas

SI: sistema internacional de unidades

SSB: ruptura de cadena simple

UNSCEAR: Comité Científico de las Naciones Unidas sobre los efectos de la radiación atómica

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

1.1. Acerca de la genética, la toxicología y la genética toxicológica

La presente tesis se enmarca dentro de una disciplina relativamente nueva y creciente como es la genética toxicológica, la cual tiene sus fundamentos en dos grandes áreas del conocimiento como son la genética y la toxicología.

La genética es una disciplina en crecimiento continuo, ya que el avance de la tecnología permite ahondar constantemente en nuevos descubrimientos. A pesar de presentar varias definiciones, podría decirse que se trata del estudio de la herencia en todas sus manifestaciones. Abarca desde la distribución de los caracteres en un árbol genealógico, hasta la bioquímica del material genético. Tamarín, en el año 1996, la define como la ciencia que trata sobre la transmisión, expresión y evolución de los genes, las moléculas que controlan el funcionamiento, el desarrollo y la apariencia final de los individuos.

La toxicología, si bien tiene sus orígenes previos a los de otras ciencias biológicas, incluso al de la medicina, recién emerge como disciplina con un saber científico y académico propio, hace poco tiempo atrás. Desde el punto de vista etimológico la palabra toxicología deriva de dos palabras griegas: toxicon (veneno) y logos (discurso), de modo que podría interpretarse como la “*ciencia de los venenos*”. Aunque esta fue su primera acepción, rápidamente esta ciencia fue creciendo y ampliando su campo de estudio. Así, si bien originalmente estudiaba la acción que las sustancias químicas tenían en el ser humano, actualmente se ocupa del estudio de los efectos nocivos no sólo de los agentes químicos sino también físicos y biológicos. También ha ampliado su centro de atención estudiando tanto los efectos que ejercen dichos agentes en el ser humano como en el medio ambiente que lo rodea (Bello Gutierrez y López de Cerain, 2001). Su metodología cambió drásticamente con la incorporación de conceptos provenientes de las investigaciones en mutagénesis y teratogénesis, los sistemas de ensayo de corto plazo (Ames et al., 1973) y el uso de modelos matemáticos para la estimación del riesgo.

Una vez reconocido el ADN como la principal molécula de información de todas las células (con la excepción de los virus de ARN), se asume que ésta ha de ser

extraordinariamente estable a fin de mantener el mayor grado de fidelidad a lo largo de su progenie. Sin embargo, es sorprendente ver que es dinámica y que está sujeta a constantes cambios. Muchos de éstos aparecen como consecuencia de procesos celulares normales tales como la replicación, la transcripción, la transposición y los propios mecanismos de reparación del ADN.

Una mutación es un cambio heredable en la secuencia del genoma de un organismo. Asumiendo el término genoma como la totalidad del material genético de un organismo. Cuando un individuo acarrea una mutación en su genoma se lo denomina mutante.

Ahora bien, un mutágeno es un agente que lleva a un incremento en la frecuencia de ocurrencia de las mutaciones. La mayoría de los mutágenos conocidos en la actualidad comprenden agentes físicos o químicos, sin embargo, existen también algunos agentes biológicos que pueden ser considerados mutágenos como por ejemplo ciertos virus bacteriófagos o elementos genéticamente transponibles. Si bien no existen criterios uniformes para dividir a los agentes en mutagénicos y no mutagénicos, un criterio ampliamente utilizado es considerar como mutágeno a todo agente capaz de interactuar química o físicamente con la secuencia de bases del ADN o alterar su estructura física (Mudry y Carballo, 2006).

La mayoría de los mutágenos actúan introduciendo lesiones en el ADN, sin embargo, los procesos que ocurren entre la acción inicial del mutágeno y la introducción final de la mutación, son muy complejos. El proceso por el cual son producidas las mutaciones se denomina mutagénesis.

El estudio de las mutaciones resulta sumamente importante debido a que, si bien algunas de ellas pueden ser ventajosas (como fuente de variabilidad para el proceso de selección natural) o neutras, también pueden tener manifestaciones patológicas, provocando padecimientos congénitos y cáncer. De esta manera, los esfuerzos en el análisis actual de los procesos de transformación celular se focalizan en el estudio de las mutaciones en su relación con los procesos de teratogénesis y carcinogénesis.

El reconocimiento de la mutagénesis como paso previo para la carcinogenicidad y los peligros potenciales de los agentes mutagénicos para la población humana y la biosfera, despertó el interés por desarrollar una nueva área de conocimiento, la cual terminaría por convertirse en una nueva ciencia en sí misma.

En este contexto, la genética toxicológica es una ciencia que ha surgido como resultado del descubrimiento de que la interacción entre los tóxicos y el ADN puede traducirse en varios procesos biológicos como: la mutagénesis, la carcinogénesis y la teratogénesis, entre otros. Esta disciplina científica se centra en identificar y analizar la acción de un grupo de agentes tóxicos que, dada su capacidad de interactuar con el material genético de los organismos y producir en ellos efectos hereditarios deletéreos o letales, fueron llamados agentes genotóxicos. De esta manera, el término genotóxico pasó a ser más abarcativo que el vocablo mutagénico, ya que incluye aquellos agentes que no sólo inducen mutaciones, sino todo evento relacionado con el daño en el ADN.

Los primeros estudios en el área de la genética toxicológica datan de 1927, cuando Müller utilizó radiación para demostrar “mutaciones genéticas” y, posteriormente, fueron retomados por Auerbach en 1947, quien trabajó con agentes químicos (Brusick, 2011). A pesar de ello, el término genotoxicidad no fue introducido hasta 1973, cuando Ehrenberg y colaboradores lo utilizaron para referirse a aquellos efectos tóxicos, letales y heredables, sobre el material hereditario nuclear o extranuclear en células germinales o somáticas.

Actualmente se asume que existe una íntima correlación entre la capacidad genotóxica y la capacidad tumorigénica de un determinado agente. Este hecho, sumado a la identificación de genes nucleares específicos capaces de controlar la iniciación del proceso de carcinogénesis (oncogenes), fue el hito que permitió el rápido desarrollo de la genética toxicológica como disciplina.

La genética toxicológica es una disciplina esencialmente multidisciplinaria e intenta establecer la correlación que existe entre la exposición a agentes xenobióticos y la inducción de alteraciones genéticas, tanto en las células germinales como en las células somáticas de los organismos y definir, a partir de ello, los efectos que las toxinas ambientales producen sobre la integridad genética de los seres vivos. Desde

los años 80 los organismos de salud pública en varios países industrializados se preocuparon de implementar tecnologías para evaluar las propiedades genotóxicas de agentes químicos, físicos y biológicos, en aditivos alimenticios y medicamentos, entre otros.

El diseño de sistemas de ensayos con los cuales se pueda asesorar acerca de los potenciales daños de los diferentes agentes ambientales en los seres vivos, suele ser una tarea quizá un tanto ambiciosa por su multiplicidad de factores. Debemos considerar las características farmacocinéticas, metabólicas, bioquímicas y genéticas de cada tipo celular diferente, como así también el conocimiento de cómo se integran cada una de esas unidades en la totalidad de un individuo.

Los ensayos destinados a evaluar la genotoxicidad se pueden clasificar en cuatro tipos considerando distintos niveles de observación y modelos experimentales (Dulout, 1993). A saber:

- Ensayos de nivel primario: son aquellos que se desarrollan con organismos procariotas, por ejemplo aquellos llevados a cabo en *Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli* o con material subcelular, como los estudios a nivel molecular que evalúan el daño sobre la molécula de ADN propiamente dicha (análisis de ductos, rupturas en el ADN, etc).
- Ensayos de tipo secundario: son los que se llevan a cabo en células mantenidas fuera del organismo, por ejemplo los ensayos con cultivos primarios, líneas celulares o linfocitos de sangre periférica, tanto de humanos como de otras especies; se denominan ensayos *in vitro*. Los parámetros que se estudian en ellos pueden ser alteraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, cambios cromosómicos numéricos, entre otros.
- Ensayos de tipo terciario: en estos estudios el objeto es el organismo completo, se llaman también ensayos *in vivo*. Se suelen realizar sobre animales de laboratorio como ratón, rata y hámster, o sobre vegetales. Son ejemplos de ellos el análisis de aberraciones cromosómicas en células de médula ósea o en células germinales, conteo de micronúcleos en células de médula ósea o células

sanguíneas, inducción de mutaciones en distintos loci empleando cepas de ratón especialmente diseñadas, etc.

- Ensayos de tipo cuaternario: se desarrollan sobre grupos de seres vivos, por ejemplo en poblaciones expuestas a un determinado contaminante ambiental o estudios epidemiológicos en seres humanos expuestos accidental o laboralmente a determinados agentes. Entre los diferentes modelos experimentales que se pueden emplear se encuentran los de tipo citogenético, basados en el análisis de alteraciones inducidas a nivel cromosómico o aquellos en los que se realiza la detección de mutaciones en ciertos loci como el de hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HPGRT).

Los ensayos primarios y secundarios proveen información rápida acerca de un determinado compuesto, pero resulta difícil extrapolar los resultados a lo que sucede *in vivo*. Los terciarios tienen la desventaja de ser más lentos y costosos, ya que usualmente se necesita contar con un número importante de animales y ejercer numerosos controles sobre los factores ambientales que puedan influir sobre ellos, pero la ventaja es que los resultados son más fáciles de extrapolar. Finalmente, los ensayos cuaternarios brindan una muy valiosa información debido a que son los que mejor nos muestran lo que ocurre en poblaciones reales expuestas a un agente contaminante. Tienen la desventaja de que se necesita una considerable cantidad de tiempo y esfuerzo para llevar a cabo la toma de la muestra, así como los análisis pertinentes.

1.2. Acerca de las radiaciones

Desde hace mucho tiempo, la existencia ha sido explicada a través de dos entidades: materia y energía. Las mismas existen bajo infinidad de formas a fin de construir todas las cosas visibles e invisibles del universo. Estas dos entidades son intercambiables y una es creada a expensas de otra. Esto fue lo que Einstein planteó en su relación masa-energía: $E = mc^2$.

La materia tiene un cuerpo, una forma y un tamaño conocido, es caracterizada por su cuantificación: la masa, y está constituida por su unidad más pequeña: el átomo.

La energía es definida como la capacidad de realizar trabajo y puede existir en diversas formas, pero a diferencia de la materia carece de cuerpo y tamaño. La energía puede cambiar de una forma hacia la otra. Entre las diversas formas en las que se encuentra la energía podemos nombrar la energía cinética, dada por el movimiento de la materia; la energía potencial, dada por la posición y configuración de la materia; la energía térmica, dada por el movimiento de los átomos y moléculas en la materia; la energía eléctrica, dada por el flujo de los electrones alrededor de un potencial eléctrico; la energía química, dada por reacciones químicas; y, finalmente, la radiación, que es la energía en movimiento.

La radiación es una forma de energía en movimiento a través del espacio y siempre es emitida por un objeto y absorbida o dispersada por otro.

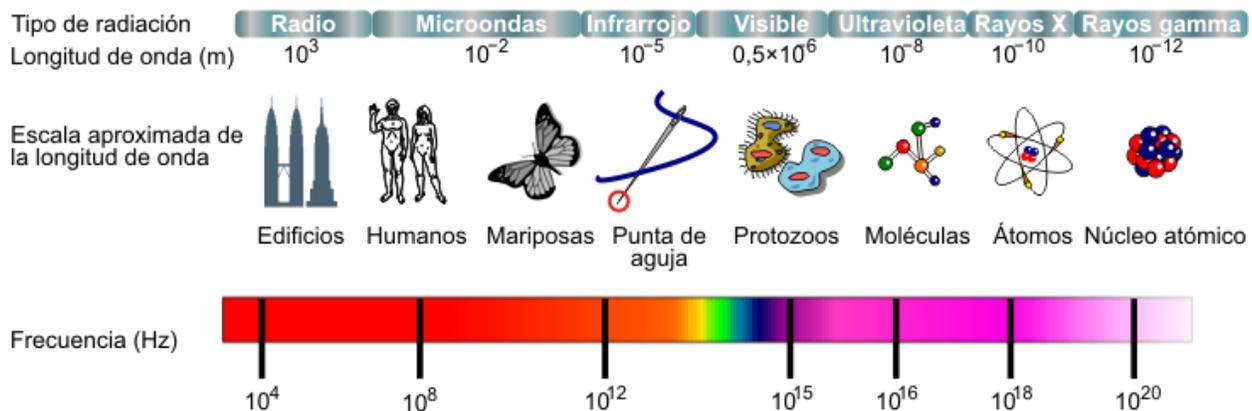
Existen dos tipos de radiaciones, la radiación particulada y la radiación electromagnética. Mientras la primera está constituida por partículas que poseen una masa y una carga determinada (con excepción de los neutrones que carecen de carga neta), la segunda es una energía carente tanto de masa como de carga.

La velocidad de movimiento de la energía particulada depende de su energía cinética y puede originarse desde diversas fuentes, tales como la descomposición radioactiva, los rayos cósmicos, las reacciones nucleares, etc. Como ejemplos de este tipo de energía podemos nombrar los protones, neutrones, partículas alfa, etc.

Por su parte, la radiación electromagnética es un tipo de energía en movimiento que carece de masa y carga neta, y es capaz de propagarse tanto en forma de ondas como de paquetes de energía llamados fotones o cuantos. Este tipo de radiación viaja a la velocidad de la luz y como ejemplos podemos mencionar las ondas de radio, la luz visible, las microondas, los rayos X (RX), etc.

Radiaciones Electromagnéticas

Las radiaciones electromagnéticas cubren un amplio espectro de longitudes de onda; éstas van siendo progresivamente más cortas desde las ondas de radio hasta los rayos X y rayos γ en el extremo opuesto (Figura 1).



Fuente: Slater, M. 2011

Figura 1. Diagrama de las longitudes de onda de las radiaciones electromagnéticas.

Una propiedad importante de la radiación es que cuanto más corta es la longitud de onda mayor es su frecuencia, con lo cual adquiere la energía suficiente para remover los electrones del último orbital produciendo así la ionización de los electrones de la materia con la cual colisiona.

En este sentido, existe otra clasificación de las radiaciones, establecida según su capacidad para generar pares electrónicos. Así, se definen las radiaciones no ionizantes como aquellas que no cuentan con la energía suficiente como para producir tal fenómeno. Son ejemplos la luz visible, las microondas, las ondas de radiofrecuencia, televisión, teléfonos móviles, etc. Mientras que la radiación ionizante (RI) queda definida como cualquier tipo de radiación que sea capaz de remover un electrón de la órbita de un átomo, provocando que el mismo resulte en una forma cargada o ionizada. Esta cualidad es la causa de que este tipo de radiaciones sean muy peligrosas para la salud humana. Dentro de esta categoría de radiaciones se incluyen no sólo los rayos X

y rayos γ , sino también algunas radiaciones particuladas tales como las partículas alfa y beta, los neutrones, los protones y los electrones (OMS, 2012).

Por otra parte, las radiaciones también pueden clasificarse según la cantidad de energía que depositan al atravesar la materia. Con este propósito se utiliza el concepto Transferencia Lineal de Energía (LET). Este término hace referencia a la cantidad de energía transferida por unidad de longitud, se mide en KeV por micrómetro y depende tanto de la naturaleza de la radiación como del material que atraviesa la misma.

Así, un haz de radiación de alta LET (ej. partículas α) perderá su energía rápidamente y será incapaz de atravesar grandes grosores de materia, por lo que son conocidas también como radiaciones no penetrantes. Mientras que un haz de radiación de baja LET (como los rayos X y rayos γ) será capaz de atravesar un gran espesor de materia antes de perder la totalidad de su energía, por lo que reciben también el nombre de radiaciones penetrantes.

Los rayos X fueron descritos por primera vez por Röntgen en el año 1895, constituyen un tipo particular de radiación electromagnética que tiene exactamente la misma naturaleza que la luz visible, pero de longitud de onda de varios órdenes de magnitud más pequeña ($\lambda=10^{-10}$ m). Al igual que otras radiaciones electromagnéticas, manifiestan aspectos característicos de las partículas y otros que son típicamente ondulatorios (Eisberg y Resnick, 1974). Los mismos, se originan cuando un haz de rayos catódicos (electrones) choca contra cualquier obstáculo interpuesto en su camino. Los rayos X, se producen siempre que se detiene bruscamente una corriente de electrones que se desplaza a velocidad elevada. Actualmente se considera a los rayos X como un tipo de RI de bajo LET.

Unidades de Radiación

Durante los primeros años del siglo XX, la metodología implementada para la dosimetría de las radiaciones se basaba en un proceso químico, ya que la dosis se estimaba por el cambio de color de una pastilla. También existía un mecanismo biológico basado en la formación de eritemas en la piel. Frente a la necesidad de

unificar los términos utilizados en la dosimetría comenzaron a establecerse diversas unidades de radiación.

Dosis de exposición

A principios del siglo XX, se estableció el Röentgen (R) como medida de ionización en el aire y fue definida como la cantidad de radiación X o γ capaz de generar un número de pares de iones equivalente a 2.58×10^{-4} Coulombs por kg de aire en condiciones estándar de presión y temperatura (CSPT). Esta fue la primera unidad de radiación admitida internacionalmente y define la cantidad de radiación dirigida al material, pero no indica de modo alguno la cantidad de radiación absorbida por éste. Por tal motivo, luego fue reconocida por la Comisión Internacional de Unidades Radiológicas (ICRU) la necesidad de una unidad de dosis absorbida.

Dosis absorbida

Una vez observada la necesidad de mensurar la dosis absorbida por un cuerpo más que la dosis emitida por una fuente de radiación, en 1956 se propuso una nueva unidad de medida denominada rad (radiation absorbed dose). Esta nueva unidad de radiación fue definida como la absorción de 0,01 Joule (J) de energía por kilogramo de materia ($0,01 \text{ J kg}^{-1}$). Afortunadamente, la energía absorbida en los tejidos expuestos a una dosis de exposición de 1 R es de 0,0095 J por kg, redondeando este valor para la mayoría de los propósitos como 0,01 J por kg. Así, si 1 rad equivale a $0,01 \text{ J kg}^{-1}$ y por cada 1 R emitido por una fuente de radiación, los tejidos absorben 0,01 J por kg, entonces 1 R puede ser igualado a 1 rad. Este hecho es sumamente conveniente, ya que permite comparar aquellos trabajos más antiguos donde se utilizaba el R como unidad, con trabajos actuales donde la unidad utilizada es el rad.

Actualmente, el Sistema Internacional de Unidades (SI) utilizado en ciencias, establece como unidad de medida para la dosis absorbida al *Gray (Gy)* definido como 1

J por kg, o sea, que es una unidad de medida 100 veces mayor, por lo tanto, 1 Gy es igual a 100 rad.

Dosis Equivalente

Aunque todos los tipos de radiación ionizante son capaces de producir efectos biológicos similares, una cierta dosis absorbida puede producir efectos de magnitudes distintas, según el tipo de radiación de que se trate. Por este motivo en el año 1977 la Comisión Internacional en Protección Radiológica (ICRP) introdujo el concepto de dosis equivalente en donde para cada tipo de radiación, se atribuyó un factor de ponderación llamado factor de calidad (Q). Se seleccionó arbitrariamente $Q= 1$ para rayos X y γ , y para las otras radiaciones los valores dados en la Tabla 1. De esta manera, el factor de calidad es una forma de ponderar los efectos biológicos producidos por las distintas radiaciones, comparados con los producidos por los rayos X y γ , para una dosis absorbida dada. Así, por ejemplo, 1 Gy de protones produce efectos biológicos 10 veces más severos que 1 Gy de rayos X. El factor de calidad Q, también llamado factor de eficacia biológica relativa (EBR) está determinado por el número de fracciones, la tasa de dosis, la dosis de radiación y la calidad de la radiación (LET).

Tabla 1. Algunos de los Factores de calidad (Q), asignados para el cálculo de las dosis equivalentes para cada tipo de radiación. Según la recomendación de la Comisión Internacional en Protección Radiológica (ICRP).

Tipo de radiación	Q asignado
Rayos X y γ	1
Neutrones térmicos	2,3
Neutrones rápidos	10
Protones	10
Partículas α	20

La dosis equivalente se calcula por lo tanto, como la dosis absorbida multiplicada por el factor de calidad correspondiente a la radiación utilizada. La unidad de dosis equivalente adoptada por el SI) es el *Sievert (Sv)*, definido como,

$$1 \text{ Sv} = 1 \text{ Gy} \times Q$$

con sus correspondiente submúltiplos: deci (0,1 Sv); centi (0,01 Sv) y mili (0,001 Sv).

Antiguamente, para comparar los efectos de diversas radiaciones se utilizaba una unidad denominada Röntgen equivalent-man (rem) la cual se definía como:

$$1 \text{ rem} = 1 \text{ rad} \times Q$$

dado que,

$$1 \text{ rad} = 0,01 \text{ Gy}$$

entonces,

$$1 \text{ rem} = 0,01 \text{ Gy} \times Q = 1 \text{ cSv}$$

Dosis Altas y Dosis Bajas

Dada la existencia natural de las radiaciones ionizantes en el planeta tierra y la gran variedad de utilidades que han ido surgiendo para este tipo de radiación fue necesario, con el correr del tiempo, poder establecer límites de exposición a la misma.

Si bien la radiación natural existente sobre la superficie terrestre no es homogénea, se calcula que en promedio el *background* general es de aproximadamente 0,01 mSv/día (Wei, 1996). En el otro extremo de la escala se encuentran las exposiciones agudas mayores a 150 mSv, las cuales se encuentran en el rango de las dosis altas de radiación (DAR) en donde comienzan a aparecer efectos inmediatos y mensurables en la salud humana (*National Council on Radiation Protection*, 1991). Entre el *background* natural y las dosis altas de radiación se encuentra el rango de exposición conocido como dosis bajas de radiación (DBR). Este tipo de dosis carece de efectos detectables inmediatamente después de la exposición,

sin embargo existe un gran interés en sus consecuencias biológicas a largo plazo (Bonner, 2003; Trosko et al., 2005).

Por su parte, el Comité Científico de las Naciones Unidas para los Efectos de las Radiaciones Atómicas (González, 1994) concluye que una dosis baja de radiación corresponde a una dosis total inferior a 200 mSv y a tasas de dosis por debajo de 0,1 mSv por minuto.

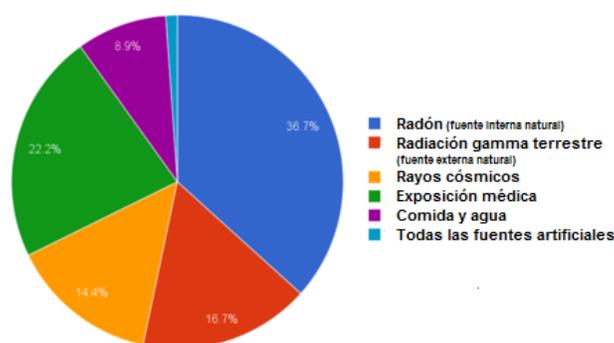
1.3. La radiación como agente genotóxico

En el apartado anterior, las radiaciones fueron definidas como un tipo especial de energía, la energía en movimiento a través del espacio. Debido a que las radiaciones siempre son emitidas por un objeto y absorbidas por otro, cabe preguntarse acerca de las consecuencias que podría traer aparejado este fenómeno.

Al analizar desde el punto de vista de su interacción con la materia, se esperan respuestas diferentes según se trate de radiación particulada o electromagnética. Una diferencia sustancial entre ellas es que las primeras, al poseer una masa definida, no tienen la capacidad de recorrer grandes distancias a través de la materia, por lo que se las califica como radiaciones no penetrantes. De modo contrario, las radiaciones electromagnéticas son capaces de viajar a través de la materia distancias mayores antes de perder toda su energía, motivo por el cual se las denomina radiaciones penetrantes.

Por otra parte, es importante considerar que tanto los mecanismos de interacción con la materia como sus consecuencias serán diferentes según se trate de radiación ionizante (RI) o no ionizante.

La RI, ha sido un agente físico natural de daño al ADN en los seres vivos desde el inicio de la evolución biológica. La mayor fuente de RI proviene del *background* natural al cual el hombre se encuentra inevitablemente expuesto, como es el caso de la radioactividad natural en el aire a partir del radón, la radiación γ que surge de la radioactividad de la corteza terrestre y la radiación cósmica proveniente del espacio, entre otras (Figura 2).



Fuente: Hughes y Riordan, 1993

Figura 2. Fuentes naturales y antropogénicas de radiación ionizante.

Poco tiempo después de que fueran descubiertas las RI, se comenzaron a describir sus efectos biológicos. Rápidamente se supo que eran capaces de producir alteraciones permanentes en los tejidos, luego se observó que muchas alteraciones celulares eran transmitidas a la progenie y, con el correr del tiempo, las evidencias de efectos colaterales fueron aumentando.

Así, ha surgido una nueva disciplina, como una rama de la biología, que se encarga de estudiar, describir y explicar los efectos que la RI tiene sobre los tejidos vivos: la radiobiología. Consecuentemente, es tarea de los radiobiólogos buscar continuamente el modo de mensurar los efectos biológicos de estas formas de radiación a fin de asesorar a las autoridades al momento de constituir los parámetros en el campo de la radioprotección.

La mayoría de los agentes químicos carcinogénicos y algunas radiaciones no ionizantes, como por ejemplo la luz ultravioleta, producen un daño específico en las bases del ADN debido a la formación de aductos o de productos de alquilación de las bases. Este tipo de daño es rápidamente reparado por procesos metabólicos como escisión de bases o de nucleótidos en los cuales la estructura dañada es sintetizada utilizando la hebra complementaria de ADN como molde. Por su parte, en la actualidad, se considera que el riesgo biológico asociado a la exposición a RI es la generación de rupturas de doble cadena, ya que su reparación generalmente ocurre sin la utilización de una hebra molde, lo cual conlleva a una alta tasa de error (Little, 2007).

Se ha observado que el impacto de las radiaciones en una célula es simplemente al azar. Así, en principio, se asume que no existe afinidad entre este agente y alguna de las organelas o moléculas constituyentes de la célula. Consecuentemente, el impacto de la radiación en una célula podría originar un daño en cualquiera de sus componentes celulares (Friedberg et al., 1995).

Junto con el desarrollo de las radiaciones como herramienta para el hombre, ha evolucionado a gran escala la ciencia. Así, una vez dilucidada la estructura del ADN y su importancia como responsable de la información genética, la radiobiología ha ido acercando sus estudios hacia esta macromolécula reconocida en la actualidad como de vital importancia.

En este sentido, las RI son capaces de causar tanto un daño directo como un daño indirecto sobre el ADN. El daño directo es el generado por la interacción directa de la energía de la radiación con cualquiera de los componentes de la doble hélice de ADN. Mientras que el daño indirecto resulta de la interacción de la radiación ionizante con moléculas simples del interior celular generando especies químicas reactivas, como los radicales libres (RL) capaces de dañar en última instancia al ADN. Las moléculas inestables más abundantes en el interior celular son las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS). La presencia de tales moléculas en el interior celular genera el fenómeno conocido como estrés celular.

La radiobiología propone clasificar las consecuencias de la RI según diferentes criterios, tales como relación causa-efecto (estocásticos o deterministas) o características de la lesión, como el tamaño (micro o macroscópicas), la velocidad de aparición (inmediatas o tardías), la extensión (locales o corporales), la posibilidad de pasar a la descendencia (somáticas o hereditarias), entre otros.

Actualmente varias organizaciones como la ICPR, el Comité Científico de las Naciones Unidas sobre los Efectos de la Radiación Atómica (UNSCEAR) y el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) proponen clasificarlas según su relación causa-efecto. Así se describe,

Efectos Estocásticos:

Aquellos que aparecen aleatoriamente o debidos al azar, por lo cual se asume que su probabilidad de ocurrencia es función de la dosis; carecen de un umbral conocido a partir del cual suceden, pero su intensidad es independiente de la dosis. Este tipo de efectos estocásticos se pueden presentar tanto en el individuo expuesto (efectos estocásticos somáticos) como también en la descendencia (efectos estocásticos hereditarios).

Efectos Deterministas:

Aquellos para cuya ocurrencia existe un valor umbral y la severidad del efecto aumenta junto con la dosis. Podemos mencionar como ejemplo efectos inflamatorios, necróticos, etc.

De acuerdo con este criterio, la prevención de los efectos deterministas quedaría garantizada al establecer límites de dosis por debajo del umbral. De modo contrario, para la prevención de los efectos estocásticos se debe reducir al máximo la exposición a la RI a los fines de minimizar la probabilidad de inducción de los mismos.

Actualmente, el modelo dosis-respuesta con umbral es un paradigma extendido en la mayoría de las disciplinas en las que se estudia este tipo de relación (Hayes, 2001; Klaassen y Lawrence, 2009). En los comienzos de la radiobiología se planteó el modelo lineal sin umbral, en el cual se considera que existe una relación lineal entre la dosis de radiación y su efecto sobre el material biológico; según éste, no hay una dosis umbral por debajo de la cual no se produce efecto alguno (ICRP, 2005). Como consecuencia de la utilización de este modelo, los efectos celulares esperados en el rango de las dosis bajas de radiación, eran extrapolados linealmente desde las dosis altas hacia las dosis extremadamente bajas. Los límites originalmente establecidos para exposiciones humanas, como por ejemplo los descritos en el reporte de 1990 de la ICRP, estaban basadas en este modelo (Upton, 2002).

Con el correr del tiempo, este paradigma ha ido cambiando debido a que se ha acumulado mucha evidencia que sugiere que los riesgos asociados a dosis bajas de radiación no son los esperados conforme al modelo lineal sin umbral (Tubiana et al.,

2006; Harbron, 2012). Algunas organizaciones, como la *U.S. National Council On Radiation, Protection and Measurements*, basadas en la evidencia de las consecuencias a largo plazo acarreadas por la exposición a dosis bajas, rechazaron la posibilidad de considerar este modelo para este rango de dosis (Upton, 2002).

Existe una serie de respuestas celulares inherentes a los efectos de las dosis bajas de radiación que hacen que el modelo lineal no se cumpla. Entre ellas cabe mencionar las variaciones en los mecanismos de reparación del ADN (Rothkamm y Löbrich, 2003) y los denominados efectos no dirigidos: *non-targeted effects* (Azzam et al., 1998; Sawant et al., 2001; Venkat et al., 2001; Ballarini et al., 2002; Little et al., 2002, Prise et al., 2003). Estos efectos describen un conjunto de fenotipos celulares asociados con la exposición a la radiación en células que no han sido irradiadas, desafiando por lo tanto la noción de que los efectos de la radiación están exclusivamente asociados al depósito de energía en el núcleo de la célula (Baverstock, 2000; Morgan, 2003; Coates et al., 2004). En el año 2005 Trosko propuso que la liberación de señales de traducción relacionadas con el estrés oxidativo sería la causa de estos fenómenos inducidos por exposición a dosis bajas de radiación. Estas señales pueden llevar a una expresión génica alterada por eventos epigenéticos. Entendiendo por estos últimos, aquellos que modifican la expresión génica en cualquiera de sus niveles (transcripcional, traduccional, o postraduccional) y diferenciándolos, por lo tanto, de los cambios mutagénicos en los que se ve afectada la información cualitativa del genoma. Así Merrifield y Kovalchuk (2013) afirman que si bien los mecanismos celulares responsables de los efectos no dirigidos no están esclarecidos en su totalidad, en la actualidad se considera que las principales vías están relacionadas con la epigenética; en el mismo sentido, Wang y colaboradores (2014) afirman que los mecanismos epigenéticos juegan un rol clave en los efectos no dirigidos a través de la hipermetilación de los promotores de genes específicos.

Dentro de los efectos no dirigidos se incluyen la inestabilidad genómica inducida por la radiación (RIGI), el llamado efecto de la vecindad (en inglés "*bystander effect*", BE) y la respuesta radioadaptativa (RA). En el año 2007, Morgan y Sowa sugieren incluir también la "muerte reproductiva retrasada", entendiendo por ésta una falla en la

progenie de las células sobrevivientes a la radiación para multiplicarse, lo que se manifiesta en una eficacia de plaqueo reducida en aquellas células que sobrevivieron a la exposición.

Inestabilidad genómica inducida por la radiación

Se define como el fenómeno por el cual las señales generadas por la exposición a radiación son transmitidas hacia la progenie de las células irradiadas conduciendo a la aparición de efectos genéticos, tales como mutaciones y aberraciones cromosómicas, etc. varias generaciones celulares después de la irradiación original (Morgan, et al. 1996, Limoli et al., 1997, Morgan, 2003a y b, Morgan, 2011, Kadhim et al., 2013). La inestabilidad genómica producida por radiación constituye una importante consecuencia de la exposición a la radiación, ya que se relaciona con el desarrollo de efectos tardíos tales como los procesos de carcinogénesis y teratogénesis (Streffer, 2005). Este término abarca también la inducción tardía de cambios cromosómicos a gran escala: principalmente inestabilidad cromosómica y recombinación homóloga (Morgan, 2003). Por su parte, la inestabilidad cromosómica se define como la ganancia o pérdida de un cromosoma o un segmento del mismo en una población celular determinada con una tasa mayor comparada con la de una población celular normal (Gollin, 2005). La recombinación homóloga es un proceso fundamental en la célula, que permite la reorganización de genes dentro y entre cromosomas, participa en la reparación del ADN, asegura la segregación de los cromosomas en la división y es una potente fuerza evolutiva que promueve la diversidad genética. Las células que manifiestan el primero de los fenómenos generalmente presentan una muerte reproductiva tardía (Marder, 1993), mientras que este efecto no se ha observado en células que desarrollan recombinación homóloga (Morgan, 2007).

Efecto de la vecindad

Se define como el conjunto de respuestas biológicas encontradas en células que no han sido directamente atravesadas por la radiación pero que estuvieron en contacto con células irradiadas o recibieron señales de ellas. Estas células vecinas pueden exhibir daños típicamente asociados a la exposición directa a la radiación (Morgan, 2003). Se han desarrollado numerosos estudios para evaluar este tipo de efecto, la mayoría de ellos se encuadran dentro de dos metodologías, se irradia una sola célula dentro de toda una monocapa (*microbeam irradiation*) o bien una monocapa entera, generando el denominado *medio condicionado irradiado* que luego se transfiere a nuevas monocapas celulares. Con ambos modelos experimentales se ha podido demostrar un aumento en las frecuencias de intercambio de cromátidas hermanas (ICH), micronúcleos, células apoptóticas, mutaciones y transformaciones malignas, en las células no irradiadas. Por medio de esos modelos también se han demostrado cambios en los perfiles de expresión de algunos genes como p53, p21^{Waf1}, CDC2, cyclin-B1 y rad51. La explicación sugerida para este fenómeno es la secreción de citoquinas y otros factores por parte de las células irradiadas llevando a una sobreexpresión del metabolismo oxidativo en las células vecinas (Little, 2007). Este fenómeno involucra las vías de comunicación célula-célula a través de uniones celulares tipo gap. Algunos autores sugieren que la exposición a la radiación podría aumentar la comunicación celular, ya que se ha encontrado una sobreexpresión de la proteína conexina 43 en células irradiadas (Azzam et al., 2003).

Respuesta radioadaptativa

Varios autores coinciden en señalar el desarrollo de una resistencia a los efectos inducidos por la radiación (Olivieri et al., 1984; Sasaki, 2002; Streffer, 2005; Mitchel, 2006). La misma surgiría como consecuencia de la exposición previa a radiaciones de dosis muy bajas. De este modo, las células irradiadas con una dosis sub-letal podrían

convertirse en células menos susceptibles a una posterior exposición a dosis mayores de radiación (Huang et al., 2004).

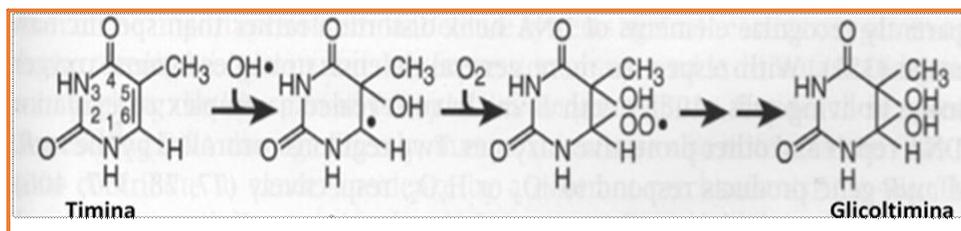
Interacción de la radiación ionizante con el ADN

Cuando la RI impacta directa o indirectamente sobre el ADN puede dañar cualquiera de sus partes constituyentes trayendo aparejadas consecuencias diversas según sea el sitio de impacto.

- *Daño a nivel de las bases nitrogenadas*: hasta la actualidad han sido caracterizados tanto intermediarios de vida corta como varios productos finales originados a partir de bases púricas y pirimidínicas por efecto de la radiación.

Con respecto a las bases púricas, el bajo potencial de óxido-reducción de la guanina, hace a esta base particularmente vulnerable a las ROS. Uno de los productos de oxidación de la guanina más estudiados es la 7,8-dihidro-8-oxo-2'-deoxyguanosina (OG). La presencia de OG es generalmente utilizada como biomarcador celular de estrés oxidativo (Su et al., 2013). Otro producto de oxidación de la guanina ampliamente estudiado es la 8-hidroxiguanina, la cual resulta de la adición de un grupo oxhidrilo a la guanina.

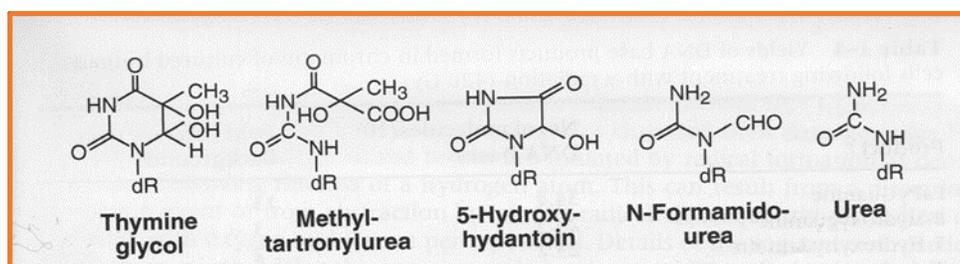
En el caso de las bases pirimidínicas, la mayoría de los trabajos aportan resultados relacionados con el efecto de la radiación ionizante sobre estas bases nitrogenadas, más específicamente sobre la timina. En este sentido, los radicales oxhidrilo suelen atacar el doble enlace de la posición insaturada del C5-C6, llevando a la formación de un radical intermediario, la 6-hidroxitimina. Bajo condiciones aeróbicas pueden ocurrir reacciones posteriores con moléculas de O₂ las cuales pueden resultar en la formación de varios anillos saturados, principalmente la 5,6 di-hidroxitimina (Figura 3).



Fuente: Friedberg et al., 1995

Figura 3. Formación de glicoltimina a partir de timina.

Este anillo saturado, conocido como glicoltimina, puede fragmentarse dando lugar a la formación de productos tales como la *methyltartronylurea*, la *5-hydroxyhydantion*, la *N-formamido-urea* y urea (Figura 4).



Fuente: Friedberg et al., 1995

Figura 4. Formación de urea a partir de la glicoltimina.

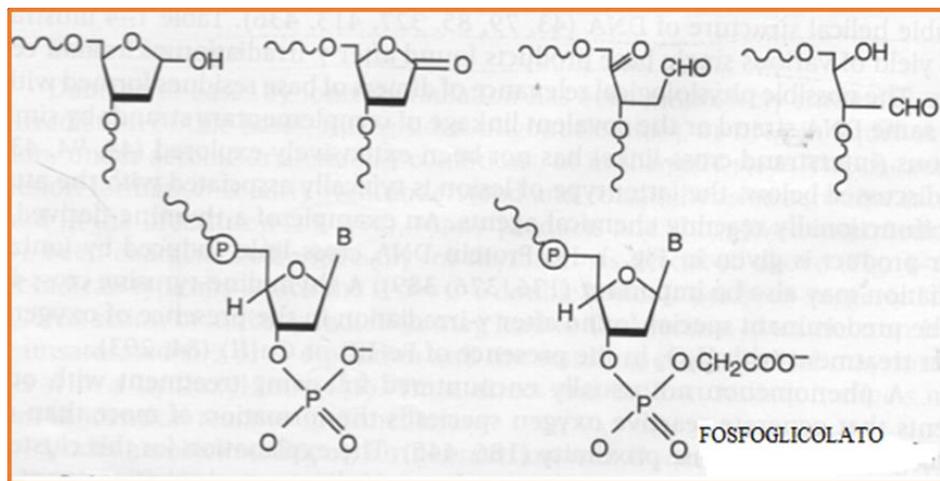
Es mucho menos frecuente la formación de productos a partir de la citosina, aunque al igual que para la timina, el sitio de ataque para los radicales OH• más ampliamente reportado es el doble enlace establecido entre el C5 y C6.

Los efectos biológicos finales acarreados por este tipo de lesiones en el ADN pueden ser diversos, desde el enrollamiento incorrecto de la doble hélice y apareamientos incorrectos de las bases durante el proceso de replicación hasta el bloqueo de la misma, tal como ocurre generalmente en presencia de glicoltimina.

Por su parte, la saturación de los anillos, puede resultar en la desestabilización del enlace N-glicosídico y, finalmente, en la formación de sitios abásicos en el ADN.

- *Daño a nivel del azúcar:* a pesar de que se ha estimado que el daño a nivel de los residuos de azúcar es bastante menos frecuente que el daño a nivel de las bases nitrogenadas, este tipo de lesiones son biológicamente más relevantes, ya que pueden ocasionar efectos tales como la fractura de una o de ambas cadenas de ADN.

El ataque directo de iones OH^* a los azúcares constituyentes del ADN puede generar distintos tipos de lesiones, entre las que se encuentran los sitios lábiles al álcali, que a su vez pueden resultar en rupturas de cadena luego del tratamiento con soluciones alcalinas (Figura 5).



Fuente: Friedberg et al., 1995

Figura 5. Sitios lábiles al álcali.

Se denomina ruptura de cadena simple (SSB) a la interrupción de sólo una de las dos hebras de ADN, mientras que recibe el nombre de ruptura de cadena doble (DSB) cuando quedan interrumpidas ambas hebras. La presencia de una ruptura simple de cadena inducida por la radiación puede resultar en la desnaturalización del ADN en la zona periférica de la ruptura. Esto podría traer como resultado la pérdida del efecto protector dado por las interacciones generadas en el apilamiento de las bases en el ordenamiento natural de la hebra; exponiendo a su vez aún más a la cadena opuesta y haciéndola, por lo tanto, más susceptible al ataque de radicales libres. Con respecto a las DSBs, no se ha establecido totalmente si son causadas por la

transferencia de un radical hacia la cadena opuesta o si se deben a ataques múltiples de radicales, llevando a la ruptura independiente de cada una de ellas.

Al considerar la posibilidad de reparación de estas lesiones, es importante notar que la mayoría de las mismas están caracterizadas por terminaciones inusuales en la molécula dañada, las cuales impiden la normal reparación. A pesar de que la mayor parte de los extremos 5' retienen el grupo fosfato, en el extremo 3' usualmente no están disponibles los oxhidrilos y en su lugar se encuentran grupos fosfatos o fosfoglicolato. En algunas oportunidades el fosfato también se pierde totalmente e incluso a veces también los fragmentos del azúcar, convirtiendo así a muchas de las rupturas de la cadena en gaps o brechas de nucleótidos.

1.4. La respuesta celular a la exposición a radiación ionizante

Las células están constantemente expuestas a agentes endógenos o exógenos capaces de dañar el ADN, comprometiendo por tanto su integridad. Como ha sido expuesto en el apartado anterior, entre las lesiones producidas en el ADN por exposición a RI, las rupturas de doble cadena son las más riesgosas para la salud humana, por poseer éstas una alta correlación con los procesos de mutagénesis y carcinogénesis (Lees-Miller y Meek, 2003; Jackson y Bartek, 2009; Rothkamm y Prise, 2009; Hartlerode y Scully, 2009; Kass y Jasin, 2010; Bajinskis et al., 2013).

Como consecuencia de esta amenaza constante las células de los mamíferos cuentan con sistemas de defensa celular que intentan constantemente protegerlas de estos agentes potencialmente dañinos. Un ejemplo de ello son las enzimas que protegen a las células de los RL, tales como la superóxido dismutasa, las catalasas y las peroxidasas, que han evolucionado como moléculas fundamentales en la defensa celular debido a que la formación de RL es un fenómeno natural en procesos tales como la respiración celular.

Por otra parte, también existen mecanismos de respuesta al daño en el ADN (Deckbar et al., 2011) que si bien operan a través de vías enzimáticamente separadas según el tipo de lesión generada, todos ellos en conjunto tienden a mantener la

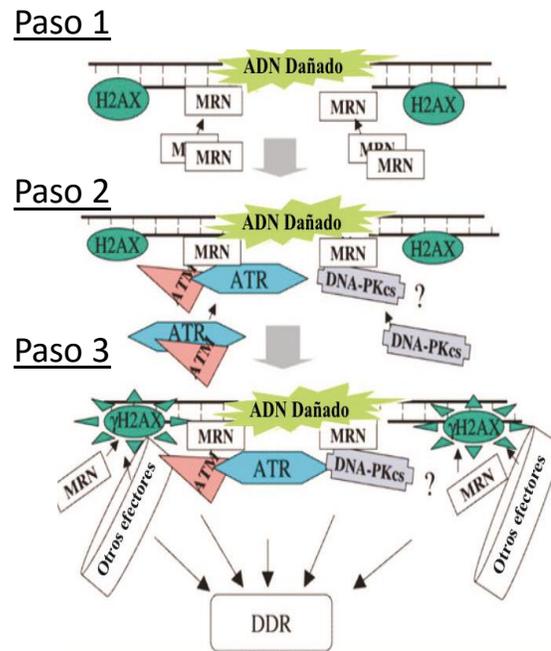
estabilidad e integridad genómica. Aun así, en caso de no poder reparar el daño generado, las células eucariotas tienen la capacidad de desviar su programación celular hacia una muerte celular programada (apoptosis), a fin de evitar los procesos que llevan a la transformación celular maligna. En este contexto se podría decir que los mecanismos de respuesta al daño en el material genético incluyen tanto a los mecanismos de reparación como a los procesos encargados de regular la progresión a lo largo del ciclo celular (van Gent et al., 2001; Jackson y Bartek, 2009).

Por otra parte, toda célula debe comprobar la fidelidad de su material genético a fin de poder replicar una copia exacta del mismo antes de dividirse. Para ello la maquinaria celular cuenta con puntos de control en cada uno de los pasos del ciclo celular, los cuales garantizan un estado óptimo antes de pasar a la siguiente fase.

Luego de detectar el daño en el ADN a través de moléculas sensoras del daño, comienza una gran amplificación y diversificación de señales comenzando con señales traductoras hacia una serie de efectores que dispararán un conjunto de eventos celulares conocidos como respuesta al daño en el ADN (DDR). Esta respuesta celular involucra principalmente al control del ciclo celular, el mantenimiento de la estabilidad telomérica, el control de la transcripción, la reparación del ADN y la apoptosis (Zhou et al., 2006).

Actualmente se considera que la DDR comienza con la unión del complejo proteico MRN al sitio de daño (Petrini y Stracker, 2003; Uziel et al., 2003; Zhou et al., 2006; Halimi et al., 2013). Este complejo recibe este nombre por las tres proteínas que lo constituyen: Mre11, Rad50 y Nbs1. La unión de MRN a la hebra de ADN conlleva al reclutamiento y activación de un grupo de moléculas efectoras pertenecientes a la familia de proteínas quinasas: la *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM), la *Ataxia Telangiectasia and Rad3-related* (ATR) y la Subunidad Catalítica de la Proteína Quinasa Dependiente de ADN (*DNA PKsc*) quienes tienen la capacidad de fosforilar la histona H₂AX. Como consecuencia de esta fosforilación la proteína Nbs1 del complejo MRN, se anclará al sitio de daño reclutando así una mayor cantidad de moléculas del complejo MRN y generando, por lo tanto, un sistema de retroalimentación positivo que resulta en una gran amplificación de la señal de daño (Uziel et al., 2003; Lavin, 2004;

Jeggo y Löbrich, 2005; Zhou et al., 2006; Löbrich, 2010; Quennet et al., 2011; Halimi et al., 2013) (Figura 6).



Fuente: Zhou et al., 2006

Figura 6. Modelo simplificado de la respuesta celular al daño en el ADN. Paso1: MRN detecta el daño en el ADN. Paso 2: MRN recluta y activa PIKKs. Paso 3: estas moléculas activadas fosforilan a la histona H₂AX, lo que conlleva al reclutamiento de una mayor cantidad de MRN y otros efectores hacia la proximidad del sitio de daño en el ADN para amplificar la señalización del daño y activar la DDR.

Debido a que ATM, ATR, y DNA-PKsc actúan como sensoras y como señales traductoras del daño en el ADN, son consideradas actualmente como uno de los puntos de inicio de toda la compleja red de DDR (Zhou et al., 2006). Resulta interesante resaltar que estas quinasas que actúan como señales traductoras del daño difieren muchas veces en sus sustratos a fosforilar. Así, mientras ATM y ATR tienen como principales sustratos factores involucrados en el control del ciclo celular como CHK1, CHK2, p53, NBS1, SMC1 (Kurz et al., 2004), DNA-PKsc tiene como principales sustratos los factores involucrados en la reparación del ADN por unión de extremos no homólogos (NHEJ) como Ku70, Ku80, Artemis, *DNA ligasa IV* y XRCC 4 (Collis et al., 2005).

Mecanismos involucrados en la reparación de DSBs

Las DSBs pueden generarse espontáneamente durante procesos celulares normales tales como la síntesis de ADN y el entrecruzamiento de la meiosis, o durante algunos procesos celulares especializados como la recombinación somática de los segmentos V(D)J al momento de “diseñar” las inmunoglobulinas en los linfocitos B o T (Rothkamm et al., 2003; Riballo et al., 2004).

La adecuada reparación de este tipo de lesiones es esencial para un mantenimiento exitoso de la integridad genómica y la futura transmisión de la información genética (Hartlerode y Scully, 2009).

Principalmente, se conocen tres mecanismos bien diferenciados enzimáticamente para la reparación de las DSBs: 1- la recombinación homóloga (*homologous recombination*, HR), 2- la unión de extremos no homólogos (*non-homologous end joining*, NHEJ) y 3- la hibridación de hebra simple (*single strand annealing*, SSA). Los dos primeros han sido documentados en la reparación de las DSBs en eucariotas superiores (Limoli, 2004; Lees-Miller y Meek, 2003; Jeggo y Lobrich, 2005; Beucher et al., 2009, Kass y Jasin, 2010), mientras que el último es un mecanismo propio de las levaduras (Illiakis, 2009).

Si bien algunos autores proponen a NHEJ como la principal vía de reparación (Jeggo, 2011) y a HR como una vía alternativa (Beucher et al., 2009), otros consideran que la contribución relativa de cada una de estas vías de reparación es exclusivamente dependiente del momento celular en el cual se implemente la injuria (Rothkamm et al., 2003; de Campos Nebel et al., 2008). Esta última idea es la de mayor consenso debido, básicamente, a dos restricciones que operan para HR: 1- la ausencia durante la mayor parte del ciclo celular de la cromátida hermana que sirve de molde para la síntesis del nuevo fragmento de ADN; 2- la presencia de una proteína quinasa dependiente de ciclinas (CDKs), la cual aumenta durante S-G2, y que promueve la escisión de los extremos de la molécula de ADN (Kass y Jasin, 2010).

La mayor parte de las DSBs (aproximadamente el 85%), son reparadas bajo una cinética rápida de reparación, que es básicamente independiente de ATM. En

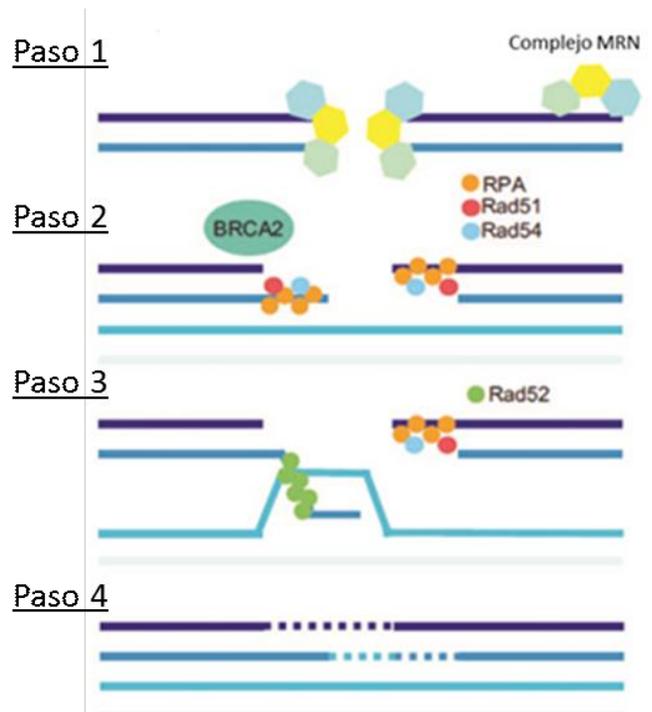
contraste, casi un 15% de las DSBs inducidas por radiación son reparadas bajo una cinética marcadamente más lenta, a través de un proceso que requiere de ATM y de sus proteínas medidoras, tales como MDC1 o 53BP1, que se acumulan en los focos inducidos por RI (Goodarzi et al., 2006).

Reparación del ADN por recombinación homóloga (HR)

Este mecanismo utiliza una homología exhaustiva a fin de restituir fielmente la secuencia en el sitio de ruptura. Es un mecanismo de reparación que ocurre durante la finalización de la fase S y principios de G2 del ciclo celular, momentos en los cuales se encuentra ya sintetizada la cromátida hermana, la cual es utilizada como molde para la reparación (Jackson y Bartek, 2009; Rothkamm y Prise, 2009; Hartlerode y Scully, 2009; Kass y Jasin, 2010).

El primer paso en este mecanismo de reparación requiere el procesamiento de la DSB con la consecuente formación de un extremo de la hebra de ADN que contenga un OH 3'. En el caso de las células de mamíferos este primer paso es llevado a cabo por el complejo proteico MRN, mencionado anteriormente, junto con la proteína CtIP (Quenet et al., 2011). La proteína CtIP está involucrada en varias vías celulares, en el caso de la reparación del ADN por HR sería quien inicia el proceso a través de la escisión del extremo de la DSB para la formación de una cadena simple de ADN (ssDNA) (Sartori et al., 2007).

Un segundo paso requiere la estabilización de la ssDNA por parte de las proteínas RPA (*Replication Protein A*) las cuales se unen rápidamente a esta hebra simple. Finalmente, esas moléculas son reemplazadas por otras dos proteínas, rad51, rad 54 y BRCA 2, quienes promueven la invasión de la hebra homóloga que servirá como molde para la posterior síntesis de ADN (Rothkamm y Prise, 2009; Hartlerode y Scully, 2009; de Campos Nebel et al., 2010) (Figura 7).



Fuente: Fell y Schild-Poulter, 2015

Figura 7. Reparación del ADN por Recombinación Homóloga (HR). Paso 1: procesamiento de los extremos 3' de la hebra de ADN por el complejo MRN. Paso 2: las proteínas RPA estabilizan la cadena simple de ADN, y unión de las proteínas que guiarán la invasión de la hebra homóloga de ADN en la región dañada. Paso 3: Síntesis de ADN utilizando la cadena homóloga como molde. Paso 4: Ligadura del ADN reparado.

Reparación del ADN por unión de extremos no homólogos (NHEJ)

Este mecanismo representa la principal vía por la cual las células eucariotas reparan las lesiones originadas por radiación ionizante (Rothkamm et al., 2003; Jeggo y Löbrich, 2005). De hecho, quizá el aspecto más interesante que reviste esta vía de reparación es la diversidad de estructuras formadas en los extremos lesionados del ADN con las que puede interactuar. Por lo cual ofrece una gran flexibilidad en la interacción proteína-sustrato, fenómeno poco común en la mayoría de los procesos bioquímicos. Esta propiedad es de importancia vital en el caso particular del daño en el ADN inducido por RI debido a la gran diversidad de estructuras que pueden formarse

en los extremos de la hebra de ADN como respuesta a la interacción de la RI o de las ROS con el ADN (Lieber, 2010).

Si bien se ha sugerido como el mecanismo principal de reparación a lo largo de todo el ciclo celular (Jeggo et al., 2011), el mismo resulta de fundamental importancia durante la fase G1 del mismo, en la cual aún no está disponible la cromátida hermana resultando por tanto inviable la reparación por HR.

Otra característica a tener en cuenta a la hora de analizar la reparación de DSBs por esta vía, es el hecho de que este mecanismo no utiliza un molde para cumplir su función, ésta ha demostrado ser la causa por la cual esta vía es propensa a cometer errores en la secuencia de nucleótidos durante la reparación del ADN. Por este motivo es conocido en la literatura como mecanismo de reparación propenso a error (Rothkamm y Prise, 2009).

Los componentes claves involucrados en la reparación por NHEJ son básicamente dos: la enzima proteína quinasa dependiente de ADN (*DNA-PK*); y el complejo XRCC 4- Lig4 (X4-L4).

La *DNA-PK* está constituida por tres subunidades: una subunidad catalítica de la *DNA-PK* (*DNA-PKsc*) y un heterodímero de unión al ADN denominado Ku, conformado por Ku70 y Ku80.

La *DNA-PKsc* pertenece a la superfamilia de las proteínas quinasas fosfoinositol 3'fosfato (PIKK). Varios sitios de autofosforilación han sido mapeados en esta proteína, de los cuales los más importantes se encuentran entre los residuos 2609 y 2647 (*clúster* ABCDE) y entre los residuos 2023 y 2056 (*clúster* PQR). Al parecer, la fosforilación del primero de ellos parece estimular el procesamiento y la unión de los extremos de ADN, mientras que la fosforilación del *clúster* PQR inhibe el procesamiento de los mismos. Este descubrimiento propulsó un modelo en el cual la *DNA-PKsc* funciona como una molécula capaz de regular el acceso a los extremos del ADN cambiando su estatus de fosforilación (Lees-Miller y Meek, 2003; Weterings et al., 2009).

El heterodímero Ku adquiere una forma de anillo con un poro central que permite rodear los extremos del ADN de la DSB gracias a los dominios amino terminales y

amino centrales de ambas proteínas constituyentes (Weterings et al., 2009; Goodarzi, 2010). La unión de esta estructura al extremo dañado de la molécula de ADN dispara el reclutamiento no sólo de la DNA-PKsc para constituir la holoenzima sino también de otras proteínas necesarias durante los últimos pasos de la reparación (Rothkamm y Prise, 2009).

Respecto del complejo X4-L4, está constituido por tres proteínas que gobiernan la funcionalidad del mismo: XRCC4, ADN ligasa IV y XLF.

XRCC4 (*X-ray cross complementing 4*) al parecer no posee ninguna actividad enzimática pero actúa como peldaño para fortalecer las interacciones entre Ku y la molécula de ADN a fin de estabilizar esta estructura y estimular la actividad ligasa de la ADN ligasa IV (Kass y Jasin, 2010).

La ADN ligasa IV, como su nombre lo indica es una enzima que tendría la capacidad de ligar tanto extremos romos como así también extremos adhesivos del ADN. Este hecho podría evitar, en determinadas ocasiones, el procesamiento de los extremos del ADN disminuyendo la predisposición a error intrínseco de este mecanismo de reparación (Ma et al., 2005). Un dato que reviste particular interés es que el complejo enzimático X4-L4 posee la capacidad de ligar una cadena de ADN independientemente de la otra hebra, lo cual permitiría que se continúe simultáneamente con el procesamiento enzimático de la otra cadena en caso de ser necesario (Ma et al., 2004). A pesar de que ha sido durante muchos años considerada como molécula fundamental para el normal desarrollo de esta vía de reparación, actualmente se ha demostrado que NHEJ también ocurre en ausencia de este complejo, lo cual sugiere que otra ligasa podría sustituir parcialmente a la ligasa IV (Yan et al., 2007).

Por último, XRCC4- *like factor* (XLF) también conocida como Cernunnos, es una enzima que modula la actividad ligasa de la ADN ligasa IV a través de una interacción directa con la proteína XRCC 4 (Yano et al., 2008).

Algunas otras proteínas involucradas en esta vía de reparación citadas en la bibliografía son Artemis y determinadas polimerasas involucradas en la nueva síntesis de la hebra de ADN en caso de ser necesario (Ma et al., 2005; Yannone et al., 2008;

Lieber, 2010; Fell y Schild-Poulter, 2015). Artemis es una endonucleasa miembro de la superfamilia de las enzimas β -lactamasas, la cual es reclutada hacia la DSB gracias a su capacidad de interactuar con la DNA-PKsc. Aparentemente esta enzima posee actividad exonucleasa 5' cuando se encuentra aislada, aunque al unirse a la DNA-PKsc forma un complejo con una variedad de funciones, incluyendo actividad endonucleasa 3', endonucleasa 5' y *hairpin opening activity*, siendo por lo tanto capaz de procesar una gran variedad de extremos dañados del ADN (Ma et al., 2002 y 2005; Yannone et al., 2008; Lieber, 2010).

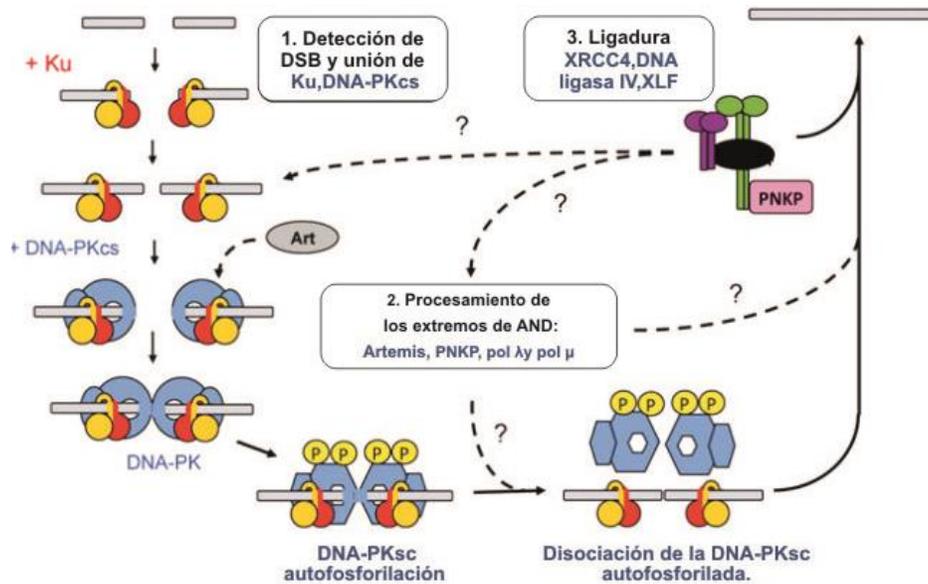
El procesamiento de lesiones complejas puede llevar a la formación de interrupciones en la molécula de ADN, las cuales deben ser completadas por determinadas ADN polimerasas. La familia de polimerasas X, incluyendo la polimerasa μ , λ y la desoxiribonucleotidiltransferasa, han sido implicadas en cumplir esta función durante NHEJ.

El primer paso de la reparación del ADN por NHEJ, consiste en el reconocimiento y la unión del heterodímero Ku a los extremos dañados de la hebra de ADN a fin de obtener el alineamiento y la estabilización de los dos fragmentos de ADN. Esta nueva estructura, es capaz de reclutar a la DNA-PKsc y activar así su función quinasa de serina-treonina.

Se propone aquí un paso bajo el nombre de sinapsis (De Fazio et al., 2002), el cual se define como el momento en que los dos extremos dañados del ADN son acercados por dos moléculas de DNA-PKsc, una en cada uno de los extremos opuestos. Artemis, junto con algunas otras proteínas reparadoras puede ser involucrada luego de este paso, en caso de ser necesario un procesamiento de los extremos de la hebra del ADN.

Finalmente, el complejo X4-L4 es reclutado por el complejo DNA-PK a fin de ligar los extremos de la molécula de ADN, finalizando así la reparación de la ruptura de doble cadena (Figura 8).

Presumiblemente la fosforilación y la desfosforilación de la DNA-PKsc, juegan un rol importante a la hora de liberar de la hebra de ADN toda la maquinaria enzimática de reparación (Lees-Miller y Meek, 2003).



Fuente: Mahaney et al., 2013

Figura 8. Modelo de reparación del ADN por unión de extremos no homólogos (NHEJ). Se propone que NHEJ ocurre en tres etapas: 1. la detección de extremo y unión, 2. el procesamiento de los extremos para eliminar aquellos grupos que no puedan unirse; 3. la finalización de la ligadura del ADN. El momento preciso en que cada proteína es reclutada y posteriormente liberada del complejo de reparación NHEJ, no está totalmente esclarecido (indicado por líneas de puntos y signos de interrogación). Ku80 se muestra en naranja y Ku70 en rojo, DNA PKcs en azul, Artemis (Art) en gris, XRCC4 dimérica en verde, XLF dímera en púrpura, LIG4 en negro y PNKP en rosa.

Mecanismos alternativos de NHEJ

Actualmente existe abundante bibliografía que sugiere que la reparación a través de NHEJ cuenta con vías alternativas. Se propone que existen dos vías simultáneas de este mecanismo de reparación y que actuarían con relativa importancia en distintos estadios del ciclo celular. La vía de reparación por NHEJ descrita originalmente, dependiente de DNA-PK y que actuaría básicamente a lo largo de todo el ciclo celular, se denomina D-NHEJ. La vía alternativa o de “*backup*” de la vía tradicional de NHEJ, involucrada principalmente en la fase G2 del ciclo celular, es B-NHEJ (Wang et al., 2006; Illiakis, 2009; Mladenov y Illiakis, 2011; Manova et al., 2012; Palmitelli et al.,

2015). D-NHEJ, es considerada como la vía “canónica” de NHEJ. Sin embargo, en la última década se ha incrementado la evidencia que sostiene que en ausencia de los factores apropiados de NHEJ existe una vía alternativa, en la cual se ha reportado la participación de otras moléculas. Como ejemplo se puede nombrar la Poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP-1) que ha sido originalmente descrita como molécula implicada en otros mecanismos de reparación, como la reparación por escisión de bases (Wang et al., 2006). Su rol en la reparación de DSBs permanece aún poco claro pero se ha propuesto que esta molécula junto con la ligasa III opera en B-NHEJ. Al parecer, PARP-1 es reclutada para la reparación de las DSBs, especialmente en ausencia de las proteínas Ku y ligasa IV. Sin embargo, debido a la baja fidelidad de este mecanismo alternativo, esta vía ha sido involucrada en procesos relacionados con inestabilidad genómica y cáncer (Wang et al., 2006; Wu et al., 2008).

Competencia y colaboración entre ambos mecanismos de reparación

La elección por parte de la célula de la vía de reparación utilizada estaría determinada por varios factores, principalmente la naturaleza de la lesión y el momento del ciclo celular en el cual se encuentra. Esta última parecería ser la razón determinante debido a las restricciones que tiene HR a la hora de disponer de la cromátida hermana mientras que NHEJ, al no necesitar molde, estaría disponible a lo largo de todo el ciclo celular (Rothkamm et al., 2003; Kass y Jasin, 2010).

Algunos autores, postulan que la competencia y colaboración entre ambos mecanismos, estaría basada en la capacidad de la célula para el procesamiento de los extremos dañados. Así, en cultivos celulares mutantes para NHEJ en proteínas que aumenten la escisión de los extremos (por ejemplo mutantes para Ku), se evidencia un incremento de HR. Mientras que mutantes para proteínas que disminuyen la escisión de los extremos dañados (por ejemplo mutantes para CtIP), llevan a un incremento de NHEJ. En este sentido, estos autores proponen que la limitación para operar HR no estaría debida exclusivamente a la disponibilidad de la cromátida hermana sino a la incapacidad de la correcta escisión de los extremos de la hebra de ADN, ya que este

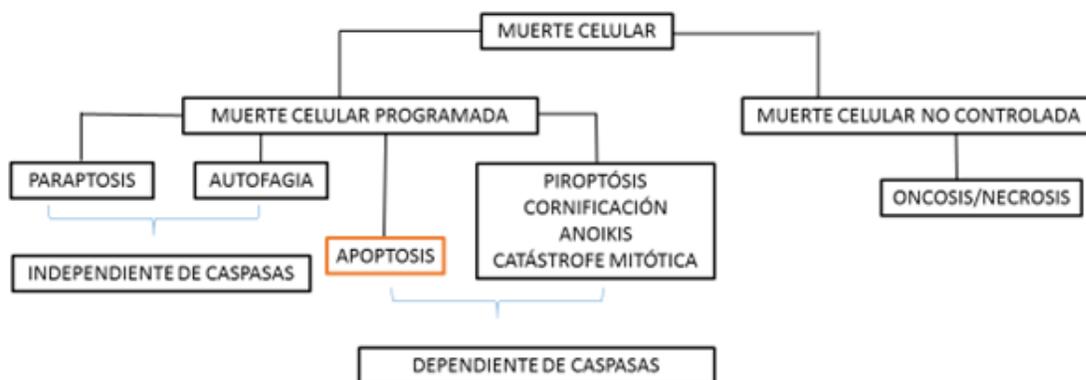
paso es promovido por proteínas kinasas dependientes de ciclinas (Kass y Jasin, 2010).

Se ha encontrado también evidencia que sugiere la colaboración entre ambas vías a efectos de aumentar la reparación del ADN para salvaguardar la integridad genómica (Pierce et al., 2001). Estudios realizados en líneas celulares y animales de laboratorio mutantes para ambos mecanismos de reparación, han demostrado poseer un fenotipo con una sensibilidad muy superior a la que cabría esperar para cultivos deficientes en cualquiera de estas vías por separado (Takata et al., 1998; Fukushima et al., 2001; Coudel et al., 2004; Mills et al., 2004).

Radiación ionizante y muerte celular

Los sistemas vivos cuentan con diversos mecanismos de muerte celular, algunos de ellos se disparan en forma controlada y son verdaderos procesos de muerte como la apoptosis, mientras que algunos otros se desarrollan en forma descontrolada o más abruptamente como la necrosis.

En el año 2009 y posteriormente en el 2012, el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (NCCD) sugiere que los términos asociados a la muerte celular podrían organizarse desde un punto de vista funcional como se detalla en la Figura 9. (Kroemer et al., 2009, Galluzzi, et al. 2012)



Fuente: *Comité para la Nomenclatura de Muerte Celular* (Kroemer et al., 2009)

Figura 9. Clasificación funcional de la muerte celular.

En los últimos años se ha acumulado evidencia que sostiene la existencia de una fuerte asociación entre la exposición a RI de células eucariotas y tres modos básicos de muerte celular: necrosis, autofagia y apoptosis; como así también una senescencia celular acelerada. La selección de cada uno de estos modos por parte de la célula depende de varios factores, tales como el tipo celular involucrado, la dosis de radiación absorbida y la tasa de división celular, entre otros (Watters, 1999, Verheij y Bartelink, 2000, Rothkamm y Lobrich, 2003; Lindsay et al., 2007; Kapy et al., 2010; Kaliberov y Buchsbaum, 2012; Surova et al., 2012) (Figura 9).

Necrosis

La necrosis, del griego “cadáver”, es la muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido, provocada por un agente nocivo que causa una lesión tan grave que no se puede reparar o curar. Durante mucho tiempo, la necrosis se ha considerado como un mecanismo de muerte celular meramente accidental y fue definida por la ausencia de rasgos morfológicos presentes en otros procesos de muerte, como pueden ser la apoptosis o la autofagia. Actualmente, está claro que la necrosis se puede producir de una manera regulada y que la muerte celular necrótica tiene un papel destacado en múltiples ajustes fisiológicos y patológicos. En estos casos, se sugiere adoptar el término de 'necrosis regulada'. Varios factores desencadenantes pueden inducir una necrosis regulada, incluyendo daño en el ADN, agentes alquilantes, citotoxinas y la ligación de receptores de muerte, por lo menos en circunstancias específicas (Kroemer, 2009).

Autofagia

La autofagia, del griego *auto*= uno mismo y *phagos*= comer, es un proceso catabólico altamente conservado en eucariotas, en el cual porciones citoplasmáticas u orgánulos deteriorados, son secuestrados en vesículas de doble membrana

(autofagosomas) y liberados dentro del lisosoma para su descomposición y eventual reciclado de las macromoléculas resultantes. En la mayoría de los casos, la autofagia constituye una respuesta citoprotectora capaz de favorecer el restablecimiento de la homeostasis y la supervivencia celular en células que intentan hacer frente a factores de estrés, mientras que en otros casos constituye un verdadero mecanismo letal (NCCD, 2012).

Apoptosis

El término es introducido por primera vez por Kerr en 1972 para definir un mecanismo de muerte celular controlada, difusamente conocido hasta aquel momento, el cual parecía jugar un rol complementario y opuesto al rol de la mitosis en la regulación de las poblaciones celulares animales. Sus características morfológicas sugerían un fenómeno inherentemente programado y celularmente activo.

Desde hace varias décadas, se propone que este tipo de muerte celular puede ser tanto iniciada o inhibida por una variedad de estímulos ambientales, ya sean éstos fisiológicos o patológicos. El mecanismo de apoptosis es críticamente importante durante el desarrollo, facilitando la remodelación de los tejidos, y en el estado adulto este proceso es el responsable del mantenimiento homeostático del número celular. También juega un rol clave en la eliminación de células transformadas o infectadas. Asimismo, se ha demostrado que la apoptosis está fuertemente involucrada en la eliminación de células cuyo ADN se encuentra dañado a causa del accionar de diversos agentes, tales como quimioterapéuticos o radiaciones.

Por todas estas razones, se reconoce actualmente que los defectos en las vías de señalización que llevan a la muerte celular por apoptosis son el punto central de muchas enfermedades, incluyendo el desarrollo y la progresión de transformaciones malignas (Johnson, 2012).

Los primeros estudios definen una serie de cambios morfológicos ordenados que llevan a la apoptosis, los cuales incluyen el encogimiento celular, la condensación de la cromatina, el vesiculado de la membrana plasmática y el fraccionamiento de la

célula en los llamados “cuerpos apoptóticos”, que se rodean de membrana plasmática y generalmente son fagocitados con posterioridad por macrófagos o células vecinas. La caracterización temprana de la apoptosis también incluye una serie de cambios bioquímicos, como por ejemplo la externalización de los fosfolípidos de la membrana plasmática, la activación de ADNasas celulares y la degradación del ADN genómico en fragmentos de longitud nucleosomal.

Un cambio muy estudiado en la apoptosis, es el observado en la familia de enzimas denominadas cisteína aspartato proteasas (CASPASAS). Las cuales constituyen una familia de proteasas que se encuentran siempre en forma de zimógenos.

Otro cambio muy estudiado en las células apoptóticas radica en la distribución de los fosfolípidos de membrana. Las células viables mantienen una distribución asimétrica de diferentes fosfolípidos entre las caras interna y externa de la membrana plasmática. Esta asimetría fue primeramente descrita para los eritrocitos pero luego se observó que ocurría en todos los tipos celulares nucleados (Devaux, 1991; Zachowski, 1993). La asimetría lipídica de la membrana plasmática es mantenida por enzimas de membrana específicas denominadas flipasas, quienes facilitan la translocación de las moléculas lipídicas desde una de las caras de la membrana hacia la otra (Higgins, 1994). Bajo condiciones fisiológicas normales, la exposición de la fosfatidilserina (PS) en la cara externa de la membrana plasmática funciona como marcador específico para la fagocitosis de las células que están en proceso de muerte. En la actualidad, ha sido ampliamente demostrado que la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática es un evento temprano en la apoptosis, independientemente del tipo celular, resultando en la exposición de los residuos de fosfatidilserina (PS). La pérdida de la asimetría seguiría a la cascada proteolítica de las caspasas, pero precedería a la condensación nuclear y ruptura del citoesqueleto celular y constituyentes de la matriz nuclear (Panganiban, 2013).

Tiempo atrás se sugería que características adquiridas durante el proceso de apoptosis, como por ejemplo la exposición de las fosfatidilserinas de la membrana plasmática, podrían tomarse como punto de no retorno. Por lo tanto, una célula que

manifestaba esa característica se consideraba finalmente muerta. Esta idea ha ido cambiando y en la actualidad se considera que una célula está muerta exclusivamente cuando se verifica, al menos, uno de los siguientes puntos:

- ha perdido la integridad de la membrana plasmática y, por lo tanto, los colorantes vitales, como el yoduro de propidio, pueden entrar en condiciones *in vitro*;
- la célula, incluido su núcleo, ha sido fragmentada en pequeños cuerpos llamados “cuerpos apoptóticos”;
- los cuerpos apoptóticos han sido fagocitados por células adyacentes *in vivo*.

La apoptosis puede ser iniciada tanto por señales extrínsecas como intrínsecas, así se describen dos grandes vías de señalización de apoptosis:

Vía extrínseca de señalización: también llamada apoptosis mediada por receptores de muerte. Esta vía comienza con la activación extracelular de los receptores de muerte transmembrana por medio de la unión de sus correspondientes ligandos extracelulares. La unión del ligando a su correspondiente receptor desencadena una cascada de señalización intracelular que lleva al clivaje autocatalítico de la procaspasa 8 con su consecuente activación. Finalmente, la forma activada de la caspasa 8 corta y activa las caspasas ejecutoras 3 y 7, que son las responsables de terminar con la destrucción proteolítica y la fragmentación del ADN (Earnshaw et al., 1999; Luce et al., 2009; Tait y Green, 2010).

Vía intrínseca de señalización: también llamada apoptosis mediada por mitocondrias. Esta vía es aparentemente activada por una variedad de agresiones celulares, como por ejemplo una baja en la concentración de determinadas citosinas, tratamientos con quimioterapéuticos o radiación, entre otros. Ese daño al ser detectado por la célula transmite señales a la mitocondria causando la liberación de Citocromo C hacia el citosol donde se une con la caspasa 9 y una proteína llamada Apaf1, formando un complejo denominado apoptosoma. La formación de este complejo resulta en un cambio conformacional de la caspasa 9 y su consecuente activación. Ésta rompe

y activa así a las caspasas efectoras, convergiendo finalmente ambas vías de señalización.

La radiación ionizante y la apoptosis

Como se describió anteriormente, la RI tiene la capacidad de generar en las moléculas del interior celular un daño tanto directo como indirecto. En el caso de las radiaciones de bajo LET, como son los rayos X, el daño indirecto cobra gran importancia y ocurre a través de la generación de ROS, las cuales son capaces de generar muchos efectos incluyendo la oxidación de macromoléculas y la activación de vías de señalización intracelular (Rhee et al., 2003; Bubici et al., 2006; Naumov y vonn Sonntag, 2008).

La vía intrínseca de la apoptosis ha sido asociada en muchas ocasiones a la apoptosis inducida por RI (Xiao y Whitnall, 2009; Surova y Zhivotovsky, 2012; Panganiban et al., 2013).

La proteína supresora de tumores p53 llamada muchas veces “proteína guardiana del genoma”, juega un papel central en esta red de respuestas al daño en el ADN. La expresión de esta proteína se incrementa una vez instaurado el daño y una serie de modificaciones post transcripcionales (fosforilaciones y acetilaciones) es la responsable de estabilizarla y activar sus funciones como factor de transcripción o de asociación a otras proteínas. Así, tanto los niveles de expresión de p53 como las modificaciones sufridas luego de su transcripción, serán responsables en gran medida de la “decisión celular” de desencadenar o no la muerte celular programada (Vaseva y Moll, 2009).

Otra camino involucrado en la vía apoptótica intrínseca inducida por radiación es la de la esfingomielina, a través de la generación de ceramidas (Kolesnick y Fuks, 2003; Finnberg et al., 2005; Kuribayashi et al., 2011). Las ceramidas, constituyen segundos mensajeros reguladores de respuestas al estrés celular, como puede ser la inducción de apoptosis. El aumento de las mismas en el interior celular parece ser una consecuencia de la hidrolización de la esfingomielina de la membrana plasmática por parte de esfingomielinasas (Lozano et al., 2001).

Capítulo II

ANTECEDENTES

II.1. Estudios de los efectos asociados con la exposición a dosis bajas de radiación ionizante

A largo del tiempo las radiaciones han mostrado tener una gran variedad de utilidades, pero casi conjuntamente con su descubrimiento han comenzado a conocerse los efectos adversos que éstas presentan para la salud humana. Así, a comienzos del siglo XX comenzó a acumularse evidencia acerca de las consecuencias negativas de la exposición a dosis altas de RI.

Actualmente los efectos deletéreos asociados a las dosis elevadas de radiación ionizante son ampliamente conocidos. Pasados ciertos umbrales, la radiación puede afectar el funcionamiento de órganos y tejidos, y producir efectos agudos tales como enrojecimiento de la piel, caída del cabello, quemaduras o síndrome de irradiación aguda. Estos efectos son más intensos con dosis más altas y mayores tasas de dosis. Por ejemplo, la dosis umbral para el síndrome de irradiación aguda es de aproximadamente 1 Sv (1000 mSv) (OMS, 2012).

Fue necesario un plazo mayor de tiempo para que los científicos comenzaran a estudiar los efectos asociados con las exposiciones a bajas dosis de este agente. Como se mencionó en el apartado anterior, la exposición a RI proviene principalmente de fuentes naturales ineludibles para cualquier ser humano, pero a ésta se suman fuentes de origen antropogénico, tales como la medicina diagnóstica, los tratamientos médicos, las utilidades industriales y de investigación, el poder nuclear, los aviones, la exploración espacial y el terrorismo radiológico, entre otros. Por lo tanto, reviste una gran importancia estudiar los efectos asociados a rangos de dosis muy bajas debido a los usos crecientes de las radiaciones en diversas disciplinas (Brenner, 2003).

Los primeros estudios a fin de mensurar el riesgo asociado a la exposición a dosis bajas de radiación ionizante (DBRI) provienen de datos epidemiológicos recolectados de individuos expuestos tanto accidental como ocupacionalmente. En este sentido, existe abundante literatura en la que se demuestra un incremento en los niveles de daño del ADN utilizando una amplia variedad de técnicas, como intercambio de cromátidas hermanas, frecuencia de micronúcleos y aberraciones cromosómicas,

entre otros (Chang et al., 1997; Cardoso et al., 2001; Hadjidekova et al., 2003; Mrdjanovic et al., 2005).

También se ha demostrado que las DBRI pueden tener efectos teratogénicos. La OMS señala que durante el desarrollo embrionario la RI puede producir daños cerebrales en el feto entre las 8 y las 15 semanas de gestación, tras la exposición prenatal aguda a dosis superiores a 100 mSv. Este umbral es relativamente más elevado hasta la semana 25 de gestación, ya que los mismos efectos en este período del desarrollo gestacional se han observado a niveles de dosis superiores a los 200 mSv. Los estudios epidemiológicos indican que el riesgo de desarrollar cáncer tras la exposición fetal a la radiación es similar al riesgo que se observa tras la exposición en la primera infancia (OMS, 2012).

Si bien la bibliografía existente concluye que existe una fuerte asociación entre la exposición a RI y el riesgo de desarrollar procesos cancerígenos, no hay un acuerdo unánime respecto de la dosis umbral necesaria para observar este tipo de asociación. Se trata de cuestiones muy difíciles de comprobar epidemiológicamente debido a las “variables de confusión”, tales como el cigarrillo, el alcohol, el sexo, la edad o incluso las exposiciones pasadas a este agente o a cualquier otro (Sigurdson y Ron, 2004; Tucker, 2008).

Por su parte, Brenner (2003) propone que uno de los principales inconvenientes a la hora de estudiar las consecuencias de la exposición a DBRI en poblaciones humanas es la limitante estadística. En este sentido plantea la necesidad de desarrollar estudios epidemiológicos progresivamente más extensos para cuantificar el riesgo con un grado de precisión adecuado. Esta limitante estadística podría resolverse mediante el diseño de modelos con animales de laboratorio o incluso *in vitro*, aunque en estos casos la dificultad estaría dada a la hora de intentar extrapolar los datos obtenidos en este tipo de estudios a poblaciones humanas.

En este sentido, autores de la Universidad de Japon (Sasaki et al., 2014) proponen que la limitante estadística en el rango de la DBRI está dada básicamente por la poca precisión en la relación dosis-respuesta encontrada en este rango de dosis. Otra limitante importante destacada por estos autores, sería la imposibilidad de conocer

con exactitud la verdadera dosis total recibida en los estudios realizados con sobrevivientes de las bombas atómicas de Hiroshima y Nagasaki. Así, a fin de sortear estos dos grandes obstáculos descritos anteriormente, estos investigadores han desarrollado un nuevo modelo estadístico no paramétrico basado en un algoritmo de redes neuronales artificiales, probado en las bases de datos de cáncer establecidos por la Fundación de Investigación de Efectos de la Radiación. A través de este modelo, concluyen que la distorsión en la relación dosis-respuesta encontrada en el rango de DBRI podría estar dada tanto por un incremento en el riesgo a desarrollar determinados tipos de cáncer; como así también por la presencia en algunos tejidos determinados de un efecto “radioprotector”.

En el apartado 3 de la Introducción, se planteó la idea de que la extrapolación de datos provenientes de dosis altas a través de un modelo lineal sin umbral parece no ajustarse adecuadamente a lo que ocurre con las dosis bajas de radiación. Esto podría deberse, en principio, a la existencia de los fenómenos no dirigidos (Morgan et al., 1996; Wright, 1999; Little, 2000; Little et al., 2002; Ballerini et al., 2002; Morgan 2003a y b; Mothersill y Seymour, 2014). Esto no significa necesariamente que los efectos sean mutuamente excluyentes, sino que son de mayor importancia en un rango de radiación que en otro. Así, los efectos no dirigidos contribuirán más fuertemente a aumentar el daño en el rango de las dosis bajas, donde los efectos dirigidos son prácticamente despreciables.

Debido a la dificultad encontrada para establecer los límites aceptables de exposición a DBRI, en los años 1993 y 1994 el Comité Científico de las Naciones Unidas para el Estudio de los Efectos de las Radiaciones Atómicas (UNSCEAR) presentó un informe a partir del cual la comunidad obtuvo una visión más completa acerca de las consecuencias asociadas a la exposición de DBRI. Este informe tiene como principal objetivo reunir todos los antecedentes en carcinogénesis radio-inducida para alertar a la población acerca de los riesgos asociados a este tipo de exposición. También se describen las respuestas adaptativas de las células y organismos a las radiaciones (Gonzalez, 1994).

A causa de la importancia de establecer límites claros a la hora de fijar los niveles permitidos de exposición a DBRI, los principales organismos internacionales de protección radiológica (UNSCEAR, ICRP y la IAEA) consideran de gran importancia evaluar los riesgos para la salud humana asociados a dicha exposición (World Nuclear Association, 2014).

Exposición crónica a dosis bajas de radiación ionizante

Los primeros estudios relacionados con la exposición crónica a DBRI fueron realizados en poblaciones humanas. Este tipo de exposición puede darse por varias razones, entre las que destacan:

- Exposiciones laborales, como la sufrida por los médicos y técnicos radiólogos, los pilotos de líneas aéreas, etc.
- Exposiciones habitacionales, en casos de personas que habitan áreas naturalmente contaminadas por radiación o contaminadas como consecuencia de conflictos o accidentes nucleares como Hiroshima, Nagasaki, Chernobyl y Goiana.
- Exposiciones terapéuticas, en algunos casos de individuos bajo tratamiento médico.

El riesgo elevado de desarrollar determinadas enfermedades encontrado en poblaciones humanas crónicamente expuestas a DBRI, ha sido ampliamente documentado a lo largo del tiempo y sigue siendo en la actualidad materia de estudio.

Dentro del rango de dosis bajas, se pueden citar una gran cantidad de trabajos llevados a cabo con poblaciones expuestas a gran variedad de dosis, tasas de dosis y fuentes de radiación que han evidenciado todas ellas un aumento en la incidencia de ACE en linfocitos de sangre periférica (Lloyd et al., 1980; Sankaranarayanan, 1982; Balakrishna y Rao, 1999; Maffei et al., 2004; Tanaka et al., 2008). Esta asociación ha sido también demostrada en modelos murinos expuestos crónicamente a DBRI (Tanaka et al., 2008).

Hagelström y colaboradores (1995) evaluando la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales (ACE) en linfocitos de sangre periférica de trabajadores de las áreas de medicina nuclear y radiodiagnóstico, evidenciaron un incremento cuatro veces mayor en estas frecuencias en aquellas personas laboralmente expuestas respecto de sus poblaciones controles. En este contexto, Angelini y colaboradores (2005), estudiando también poblaciones de trabajadores del área médica expuestos a DBRI, reportaron una frecuencia de micronúcleos (MN) significativamente más elevada respecto de las poblaciones controles. Por su parte, Changizi y colaboradores (2015) utilizando técnicas de bandeado G y tinción homogénea pusieron de manifiesto un aumento en los niveles de gaps de cromátida y cromosoma, como así también fracturas de cromátida en trabajadores del área de la medicina nuclear.

Otros autores, como Møller y Mousseau (2013), concluyeron que la contaminación de Chernobyl también ha afectado en gran medida a poblaciones no humanas. Destacando que las poblaciones de animales de vida silvestre como roedores, lobos y aves no son ya ni tan diversas ni tan abundantes como se esperaría en una región donde prácticamente no existe presión por parte del hombre. En este contexto, documentaron una menor cantidad de mamíferos en aquellas áreas de elevada contaminación respecto de las áreas menos contaminadas. Entre las aves han observado una longevidad y fertilidad reducida, cerebros de menor tamaño y mutaciones que indican un daño genético significativo comparado con las mismas especies en áreas de menor radiación.

Todos estos ejemplos constituyen una fuente invaluable de datos directos del efecto de las DBRI en los seres vivos.

Con el fin de evadir la influencia de los factores de confusión que afectan los estudios epidemiológicos, se han desarrollado modelos *in vitro*, en los cuales poblaciones de cultivos celulares son irradiadas crónicamente.

La mayor parte de los trabajos *in vitro* encontrados en la literatura corresponden al análisis de exposición crónica a DBRI con posterior exposición a dosis altas de RI a fin de estudiar la respuesta adaptativa. En este contexto es importante resaltar el trabajo publicado por Manesh (2015) en donde plantea la importancia de evaluar los

costos y beneficios asociados a este tipo de exposiciones. Con este propósito, paralelamente al estudio de la respuesta radioadaptiva, analizó cultivos de células MCF-10 expuestas a dosis finales de 100 mGy y 1 Gy administrados a diferentes tasas de dosis. Así, estableció una comparación entre dos tasas diferentes de exposición crónica: 1,4 mGy/h y 4,1 mGy/h; y una exposición aguda para cada una de las dosis finales y estudió las mutaciones ocurridas en el *X-linked hprt locus*. Los resultados encontrados para estas comparaciones son diferentes entre las dosis finales suministradas, pero dentro de cada una de ellas, no difieren según la tasa de dosis utilizada.

Trabajos llevados a cabo en nuestro laboratorio, como los de Güerci y colaboradores (2004 y 2005) al analizar y comparar la respuesta celular a exposición crónica a DBRI de una línea celular transformada (CHO-K1) con una línea no transformada (MRC-5), demostraron que la respuesta de las células en el rango de dosis bajas (5 a 50 mSv) no era el que podía esperarse por extrapolación directa del observado en el rango de las dosis altas. A su vez, se apreció una respuesta diferente entre ambas líneas celulares al analizar el nivel de daño en el ADN. Estos resultados acordaron con los obtenidos por Price (2004), quien trabajando con 2 Gy de rayos gamma, concluyó que la magnitud de la respuesta a este agente podría estar más relacionada con el tipo celular expuesto que con la dosis empleada.

Inestabilidad genómica inducida por la exposición a dosis bajas de radiación ionizante

Como se detalló anteriormente, la inestabilidad genómica se define como una serie de efectos potencialmente perjudiciales observados en la progenie de células irradiadas, varias divisiones celulares después de la exposición a la radiación. Este fenómeno es caracterizado por cambios en células derivadas o expandidas clonalmente a partir otras irradiadas (Huang, 2007, Morgan, 2003). Entre los cambios más frecuentes se pueden mencionar: rearrreglos cromosómicos, formación de micronúcleos, transformación celular, presencia de amplificaciones y/o mutaciones

génicas y reducción en la eficiencia de plaqueo (dada por mutaciones letales o muerte celular reproductiva retrasada).

Desde hace ya algunas décadas, muchos estudios han demostrado la existencia de este fenómeno como uno de los principales mecanismos de transformación celular asociado a exposición a RI. Varios autores han evidenciado la aparición de una RIGI en modelos tanto *in vivo* como *in vitro*, con exposición a una gran variedad de fuentes, dosis y tasas de radiación. Entre los primeros trabajos que aparecen en la bibliografía podemos citar a Puck y Marcus (1956) quienes por medio del estudio de la capacidad de multiplicación de células HeLa irradiadas han podido evidenciar las consecuencias a largo plazo de la exposición a RI en dosis que van desde los 2000 a 4000r. Esta respuesta celular ha sido observada posteriormente en otras líneas celulares. Por ejemplo, Trott y colaboradores (1998) observaron un aumento de daño no letal en el ADN de la progenie de células supervivientes hasta 4 semanas después de la irradiación en células de hámster chino (V79) expuestas a rayos X, neutrones y partículas alfa, alcanzando dosis de hasta 3 Gy. Holmberg y colaboradores (1993), han podido evidenciar la existencia de RIGI analizando la inestabilidad cromosómica en cultivos clonales de linfocitos primarios humanos expuestos a rayos X.

Otro abordaje utilizado para el análisis de la RIGI ha sido el estudio de mutaciones en el gen de la hypoxantina-guanina fosforibosil transferasa (hprt) en líneas celulares establecidas; encontrándose en todos los casos una elevada frecuencia de mutaciones tardías no concordantes con una relación dosis-respuesta en dosis que van de 0 a 12 Gy. (Little et al., 1990 y 1997; Chang y Little, 1992).

Si bien la evidencia acerca de los efectos a largo plazo asociados a la exposición a RI es relativamente abundante, la mayoría de los trabajos realizados han sido llevados a cabo con dosis de radiación más elevadas que las utilizadas en el presente trabajo.

Algunos autores, como Rothkamm y Lobrich (2003), estudiaron el efecto de dosis bajas de RI (desde 1,2 a 200 mGy) realizando un seguimiento relativamente corto (24 hs) a fin de evaluar la cinética de reparación de las DSBs inducidas en este rango de dosis. Paralelamente, realizaron seguimientos a plazos mayores (7-14 días) de los

cultivos irradiados, a efectos de estudiar la inducción de inestabilidad genómica por exposición a DBRI. Estos autores encontraron que si bien ocurrió una disminución en la frecuencia de DSB a corto plazo, al analizar este tipo de estructura al cabo de una o dos semanas luego de la exposición a DBRI se restablecieron los niveles basales de daño.

Por su parte, Tanaka y colaboradores (2008) evaluaron la inducción de inestabilidad cromosómica *in vivo* utilizando dosis de 20 mGy/día y encontraron un aumento estadísticamente significativo de ACE y MN en esplenocitos de ratón.

Estudios realizados en nuestro laboratorio (Ponzinibbio et al., 2008 y 2010) han puesto de manifiesto un aumento del daño en el ADN en cultivos celulares expuestos a 50 mSv de rayos X y analizados luego de 12 o 16 pasajes según la línea celular utilizada. Seoane y colaboradores (2007) observaron un aumento significativo en la frecuencia de MN, ACE y alteraciones en anafase-telofase en células CHO irradiadas con 50 mSv de rayos X, 12 y 16 pasajes después de haber recibido la radiación.

Estudios con individuos o líneas celulares deficientes en los mecanismos de reparación del ADN

Como fuera descripto, la RI daña el ADN en diversas formas, por lo que las células requieren el trabajo concertado de un número importante de enzimas de reparación a fin de recuperar la integridad estructural del mismo. Existen deficiencias en las funciones de reparación que son actualmente reconocidas como promotoras del desarrollo del cáncer (Angelini et al., 2005); lo que demuestra que la reparación del ADN cumple un rol vital en el mantenimiento fidedigno de la integridad genómica.

Ya fue mencionado en otros apartados que las DSBs son actualmente reconocidas como las lesiones más riesgosas en el ADN, siendo reparadas en células eucariotas principalmente por los mecanismos anteriormente descriptos: recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ). Se ha demostrado que algunas mutaciones en las proteínas involucradas en estas vías de reparación provocan en los seres humanos un aumento en la sensibilidad a la RI y en la

deficiencia del sistema inmune evidencian su importancia en el desarrollo de procesos carcinogénicos (Riballo et al., 1999; O'Driscoll et al., 2001; Angelini et al., 2005; Buck et al., 2006).

El rol que desempeña el heterodímero Ku en el mantenimiento de la integridad genómica ha sido ampliamente demostrado en modelos *in vivo*. A lo largo de los años se han llevado a cabo experimentos con ratones que portan mutaciones tanto en el gen que codifica para Ku70 como en el gen que codifica para Ku80, evidenciando en todos los casos la importancia de estas proteínas en el normal desarrollo de los mismos. A través de estos modelos, ha podido demostrarse un incremento en la sensibilidad a la RI y una falla en la recombinación de los segmentos génicos que codifican para las inmunoglobulinas en los linfocitos. Por otra parte, la inactivación del gen Ku80 en ratones ha sido reportada como causa de retraso en el crecimiento celular, senescencia prematura y aumento en el número de aberraciones cromosómicas. Toda esta evidencia en modelos murinos demuestra la importancia de la proteína Ku en el NHEJ, enfatizando a su vez, la importancia de este mecanismo de reparación asociado a DBRI (Nussenzweig et al., 1996; Zhu et al., 1996; Nussenzweig et al., 1997; Ouyang et al., 1997; Karanjawala et al., 1999; d'Adda et al., 2001).

Algunos modelos experimentales llevados a cabo en fibroblastos de embriones de ratón en los que se bloquean los genes que codifican para Ku70 o Ku80, también han reflejado una elevada frecuencia en la fusión de los extremos cromosómicos (Bailey et al., 1999; Samper et al., 2000; Hsu et al., 2000). Estas observaciones sugieren que Ku se encuentra también directamente involucrada en el correcto mantenimiento de los telómeros, de hecho ha sido físicamente localizada en esta región a través de estudios bioquímicos (Marangoni et al., 2000; d'Adda et al., 2001).

Por otra parte, también se han desarrollado modelos con líneas celulares humanas con bloqueo génico para Ku a través de diversas metodologías (*DNA antisense*, *cRNA*, *RNAi*). Si bien algunos investigadores sostienen que no es viable una línea celular nula en Ku (Ku^{-/-}), se han logrado muchas aproximaciones a través del desarrollo de heterocigotas Ku^{+/-} (Angelini et al., 2005). Los resultados son, en general, uniformes en cuanto al genotipo observado al bloquear esta proteína en líneas

celulares somáticas humanas: defectos en la proliferación celular, elevada sensibilidad a la RI, niveles elevados de p53, poliploidía, telómeros acortados y GCRs (*gross chromosomal rearrangement*). Esta evidencia sostiene la idea de que Ku80 podría jugar un rol más crítico para NHEJ en humanos que en el resto de los mamíferos (Marangoni et al., 2000; Sadjji et al., 2000; Omori et al., 2002; Jaco et al., 2004).

Sin embargo, Uegaki y colaboradores (2006) y Fattha y colaboradores (2010) no han encontrado diferencias en los fenotipos de líneas celulares humanas con la inactivación heterocigota tanto para Ku70 como para Ku80. Esto podría deberse a que estos estudios han sido llevados a cabo en una línea celular leucémica de pre-linfocitos B (NALM-6), la cual tiene una sobre regulación de HR, por lo que resulta menos sensible en mutaciones para NHEJ (Drexler et al., 1995; Grawunder et al., 1998; Adachi et al., 2006; Uegaki et al., 2006).

Por su parte, Illiakis y colaboradores (2009) evaluaron el rol de la proteína Ku en la vía de reparación por NHEJ en líneas celulares como HeLa y M059, sin observar tampoco una disminución de la reparación por NHEJ. Confirmando así la actividad de NHEJ en ausencia de esta proteína y la existencia, por lo tanto, de un mecanismo alternativo de reparación vía NHEJ independiente de Ku.

II.2. Antecedentes de los ensayos a utilizar

Con el propósito de evaluar la inducción de daño en el ADN como consecuencia de la exposición a dosis bajas de rayos X en cada una de las líneas, se realizó el ensayo de electroforesis en gel de células aisladas (Ensayo Cometa) con un doble análisis: cuali y cuantitativo. Por otra parte, a fin de evaluar la capacidad clastogénica o aneugénica, se llevó a cabo el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN). Finalmente, para analizar el potencial de este agente como inductor de muerte celular programada (apoptosis) se realizó el ensayo de Anexina V.

Ensayo de electroforesis de células individuales (Ensayo Cometa)

Durante la última década el Ensayo Cometa (EC), conocido también como Electroforesis de Células Aisladas (SCGE, del inglés *Single Cell Gel Electrophoresis*) se ha desarrollado como uno de los principales métodos para estimar el daño en el ADN. Por estos motivos, se ha convertido en la actualidad en una técnica ampliamente utilizada para la evaluación de los efectos adversos producidos en el ADN, principalmente en pruebas de genotoxicidad y biomonitoreos poblacionales (Östling y Johanson, 1984; Zhang et al., 2000; Tice et al., 2000; Hartmann et al., 2003; Burlinson et al., 2007). Asimismo, se ha convertido en una herramienta útil en las investigaciones relacionadas a daño y reparación en el ADN (Collins, 2004).

Este ensayo, fue descrito originalmente por Ostling y Johanson en 1984. Recibe este nombre debido a la imagen que se obtiene luego de la corrida electroforética, la cual se asemeja a un “cometa” formado por una *cabeza*, cuyo componente principal es el ADN nuclear intacto, y una *cola*, constituida por los fragmentos del ADN dañado.

La versión neutra descrita originalmente por estos autores, rápidamente fue reformulada por dos grupos de trabajo que propusieron independientemente desarrollar la lisis celular a un pH elevado (Singh et al., 1988; Olive et al., 1990). La utilización de soluciones alcalinas permite la formación de colas de cometas más pronunciadas, extendiendo el rango útil de daño que puede ser detectado (Collins et al., 2001). Esta nueva versión es la más utilizada en la actualidad y se ha constituido en el estándar de oro para la visualización de los fragmentos generados por la ruptura de una o ambas hebras del ADN.

En el año 1999, el *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures* (IWGTP) llevado a cabo en la ciudad de Washington (EEUU) alcanzó como consenso que la mejor versión del ensayo, a efectos de identificar agentes con actividad genotóxica, es la versión alcalina (pH>13) desarrollada por Singh y colaboradores en el año 1988. Esta versión es capaz de detectar rupturas de simple y doble cadena en el ADN, sitios lábiles al álcali (como por ejemplo sitios apurínicos), entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteínas, y rupturas de cadena simple asociadas con la incompleta escisión de

sitios de reparación (Choucroun y Dewitte, 2001; Tice et al., 2000). También puede utilizarse para tratar de interpretar el tipo de daño presente introduciendo en el protocolo la utilización de endonucleasas específicas para determinadas lesiones lo que permite la detección de los dímeros de pirimidina inducidos por luz UV, bases oxidadas y daño por alquilación.

Desde hace algunos años esta técnica fue implementada para su utilización en el área de la radiobiología (Olive, 1999, Olive, 2009). Así con respecto a la sensibilidad de esta técnica para evaluar el daño inducido por exposición a DBRI, hay autores que sostienen que el límite inferior de dosis en la que puede detectarse daño en el ADN a través de esta técnica se encuentra en los 5 cGy (Singh et al., 1994; Malyapa et al., 1998), la cual corresponde a 50 mSv de dosis equivalente, encontrándose por tanto por debajo de la dosis utilizada en el presenta plan de tesis doctoral.

Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN)

El análisis citogenético de las aberraciones cromosómicas estructurales (ACE) como biomarcador confiable de la evaluación del daño inducido por agentes genotóxicos es ampliamente aceptado por la comunidad científica. Sin embargo, debido a que esta técnica insume mucho tiempo y demanda de personal ampliamente entrenado, en los últimos años y para estos efectos, ha sido paulatinamente reemplazada por el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN).

La simplicidad del conteo y la aplicabilidad del ensayo CBMN, tanto *in vivo* como *in vitro* en diferentes tipos celulares, lo convirtieron en una herramienta atractiva para la evaluación de anomalías cromosómicas (Kirsch-Volders et al., 2003), posicionándose como un posible biomarcador de efecto y ensayo de biomonitoreo (Norppa y Falck, 2003).

El ensayo de micronúcleos fue propuesto por primera vez en 1976 y desde entonces ha tenido varias modificaciones, que le permitieron una mayor aplicabilidad en campos como mutagénesis ambiental, laboral y sanidad (Sierra Cano, 2011). Entre las modificaciones más importantes podría mencionarse la adición, en bajas

concentraciones, de la Citocalasina B producida por el hongo *Helminthosporium dematioideum*, la cual impide la citocinesis y la movilidad celular dando como resultado células binucleadas (BN) (Fenech y Morley 1985 a,b). De esta manera, se pudo circunscribir el análisis a aquellas células que cursaron una división celular y se encuentran en la interfase siguiente en la que pueden apreciarse micronúcleos formados como consecuencia de la inducción de fracturas de cromátida y/o cromosoma o de alteraciones en los cinetocoros. La utilización de la citocalacina y el análisis de células binucleadas permitió así, evitar el conteo de aquellas células que se hallaran en interfase pero aún no se hubieran dividido, de este modo se logra una apreciación de la frecuencia real de daño inducido (Fenech, 2007).

Dadas sus características, el ensayo CBMN ha emergido como el método de preferencia de algunas agencias regulatorias, a la hora de evaluar efectos clastogénicos y aneugénicos de determinados agentes (OECD, 2007; ICH, 2011). Esto está fundamentado en el hecho de que básicamente un micronúcleo puede consistir en un fragmento acéntrico de un cromosoma o en un cromosoma completo que no se ha distribuido adecuadamente en ninguno de los dos núcleos principales durante la anafase (Fenech, 2010).

En este contexto es importante resaltar que en caso de que un micronúcleo esté constituido por un fragmento de ADN es necesario que, como producto de la injuria, se produzca alguna de las siguientes situaciones (Fenech y Neville, 1992; Fenech et al., 1994):

- la ruptura directa de ambas cadenas de la hebra de ADN,
- la ruptura de una de las hebras de ADN que se traduzca en una ruptura de ambas cadenas de ADN luego de un ciclo de síntesis de ADN,
- el daño en una de las bases del ADN que durante su reparación conlleve a una escisión de la base dañada con la interrupción de la hebra de ADN y a la cual podría sucederle una ruptura de cadena doble como resultado de un ciclo de síntesis del ADN,
- reparación inadecuada de dos fragmentos de cromosoma con rearrreglos asimétricos dando lugar a fragmentos acéntricos.

Por su parte, en el supuesto caso de que un micronúcleo esté constituido por un cromosoma completo, podría originarse como consecuencia de:

- una alteración en la migración cromosómica debido a un daño en el huso mitótico o en el cinetocoro, o bien a causa de que la maquinaria de división que llevan a la pérdida de cromátidas o cromosomas completos (Mateuca et al., 2006),
- fragmentos derivados de la ruptura de puentes formados por rearrreglos cromosómicos, como cromosomas dicéntricos, anillos o la unión de cromátidas hermanas (Norppa y Falck, 2003).

Así este ensayo ha sido utilizado para el estudio de la genotoxicidad causada por agentes químicos, físicos o biológicos (Cebral et al., 2011; Senthilkumar et al., 2015; Safi Oz et al., 2015). Se lo ha incorporado para el estudio de la radiosensibilidad en tejidos normales o tumorales y como modelo predictivo de riesgo de desarrollo de procesos neoplásicos. En el caso particular del uso de esta técnica para el análisis del daño inducido por exposición a DBRI, se debe mencionar el trabajo de Fenech y Morley (1986), donde fue la primera vez en que se utilizó este ensayo para evaluar los efectos de las DBRI. Estos autores concluyen que exposiciones tan bajas como 5 rad de rayos X, los cuales se corresponden con 50 mSv de dosis equivalente, pueden ser fehacientemente detectadas a través de este ensayo.

Ensayo de Anexina V

La Apoptosis es un tipo de muerte celular programada que juega un importante rol en la homeostasis celular. Las células están continuamente expuestas a señales tanto intrínsecas como extrínsecas que les indican contrapuestamente *muerte* o *supervivencia*, por lo que el destino de la célula siempre dependerá del balance de estas señales en el interior celular.

La proteína Anexina V (AV) fue originalmente reportada por Bohn y colaboradores en el año 1984, bajo el nombre de proteína placentar 4 (PP4); y por Reutelingsperger un año más tarde (1985), quien le asignó el nombre de

anticoagulante vascular alfa. Luego de la secuenciación y comparación de ambas proteínas se le dio el nombre de Anexina V debido a su alta homología con las proteínas anexinas (Iwasaki et al., 1987; Kaplan et al., 1988; Maurer Fogi, 1988).

Basado en el fenómeno de que la FS es exteriorizada durante el proceso de apoptosis y en la habilidad de la AV para unirse con alta afinidad con la FS de membrana en presencia de calcio (Andree et al., 1990; Tait et al., 1989), Koopman y colaboradores (1994) fueron los primeros en describir esta metodología como marcador de apoptosis. Por este motivo, la Anexina V es utilizada conjugada con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (Anexina V-FITC) para evaluar la translocación de la FS a la membrana externa de la bicapa lipídica.

La exposición de la PS de membrana parece ser hasta el momento un fenómeno universal durante la apoptosis, no limitado a las células de mamífero, sino que ha sido reportado también en otros tipos celulares tales como células de insectos e incluso en células vegetales (O'Brien, 1997). Por su parte, Martin y colaboradores (1995) trabajando con líneas celulares de origen murino y humano, demostraron que la exposición de la PS durante la apoptosis ocurre en la mayoría de las líneas celulares bajo la acción de una gran variedad de inductores de apoptosis.

Así la utilización de la Anexina V conjugada con FITC se ha ido incrementando en la últimas dos décadas en modelos que tratan de relacionar diversos agentes con la muerte celular por vía apoptótica en una gran diversidad de líneas celulares (Zhang, et al. 2000, Wan-Lon, 2004; Fu et al. 2011, Holliday, et al. 2016; Yousef, et al. 2016).

En el marco de esta tesis cobran particular interés aquellos trabajos que utilizaron las radiaciones ionizantes como agentes capaces de inducir una muerte celular programada testeada posteriormente por esta metodología. En este sentido podemos nombrar trabajos como los de Bagher, 2015 y Enns, 2004 quienes han utilizado la AV-FITC como biomarcador de apoptosis temprana por exposición a dosis altas y bajas de RI respectivamente.

Capítulo III

HIPÓTESIS

y

OBJETIVOS DE TRABAJO

Importancia de esta investigación

En las últimas décadas la creciente utilidad encontrada por el hombre al uso de las radiaciones, ha provocado un aumento progresivo de la exposición a DBRI y, consecuentemente, de los efectos asociados. Si bien la comunidad científica continúa realizando grandes esfuerzos a fin de determinar los daños acarreados por este tipo de exposición, los datos obtenidos suelen ser muchas veces controversiales. Por su parte, las principales organizaciones mundiales de protección radiológica aseveran que los principales riesgos para la salud humana no pueden cuantificarse inmediatamente luego de la exposición, debido a que muchos de los efectos de las radiaciones se manifiestan a largo plazo.

De este modo, el presente plan de tesis tiene como finalidad abordar la problemática de las consecuencias asociadas con la exposición crónica a DBRI, así como las provocadas en la progenie de las células expuestas a una única dosis, aportando al conocimiento que se tiene hoy en día al respecto en este campo de investigación. En tal sentido, las hipótesis y objetivos planteados son las siguientes:

Hipótesis

- La exposición crónica a dosis bajas de radiación ionizante produce un aumento de daño en el ADN y en los cromosomas, y muerte celular programada en células de mamífero cultivadas *in vitro*.
- La exposición de células de mamífero cultivadas *in vitro* a una única dosis baja de radiación ionizante produce un aumento de daño en el ADN y en los cromosomas y muerte celular programada en la progenie de las células irradiadas.
- La cronicidad de la exposición condiciona la magnitud del daño genético inducido por dosis bajas de radiación ionizante.
- La eficiencia de la reparación por unión de extremos no homólogos condiciona la magnitud del daño genético inducido por dosis bajas de radiación ionizante.

Objetivos generales

- Evaluar la inducción de daño en el ADN y en los cromosomas y de apoptosis, en células de mamífero eficientes (línea celular CHO-K1) y deficientes (línea celular XRS-5) para el mecanismo de reparación por unión de extremos no homólogos, tratadas en forma crónica con dosis bajas de radiación ionizante.
- Evaluar la inducción de daño en el ADN y en los cromosomas y de apoptosis, en la progenie de células CHO-K1 y XRS-5, expuestas a una única dosis baja de radiación ionizante.
- Comparar los resultados obtenidos en ambas líneas celulares, a fin de determinar si la capacidad de reparar el daño genético mediante el mecanismo

de reparación por unión de extremos no homólogos tiene influencia sobre la radiosensibilidad de las células en alguno de los modelos planteados.

Objetivos específicos

- Analizar de manera cuali- y cuantitativa el daño citomolecular y cromosómico provocado por dosis bajas y crónicas de radiación ionizante mediante los ensayos cometa y micronúcleos en células CHO-K1 cultivadas *in vitro*.
- Evaluar la inducción de apoptosis por dosis bajas y crónicas de radiación ionizante a través del ensayo de anexina V en células CHO-K1 cultivadas *in vitro*.
- Valorar la inestabilidad genómica mediante los ensayos cometa, micronúcleos y anexina V en la progenie de células CHO-K1 cultivadas *in vitro*, expuestas a una única dosis baja de radiación ionizante.
- Analizar de manera cuali- y cuantitativa el daño citomolecular y cromosómico provocado por dosis bajas y crónicas de radiación ionizante mediante los ensayos cometa y micronúcleos en células XRS-5 cultivadas *in vitro*.
- Evaluar la inducción de apoptosis por dosis bajas y crónicas de radiación ionizante a través del ensayo de anexina V en células XRS-5 cultivadas *in vitro*.
- Valorar la inestabilidad genómica mediante los ensayos cometa, micronúcleos y anexina V en la progenie de células XRS-5 cultivadas *in vitro*, expuestas a una única dosis baja de radiación ionizante.
- Comparar los efectos de las dosis bajas de radiación ionizante en ambos tipos celulares.

Capítulo IV

MATERIALES

Y

MÉTODOS

VI.1. Líneas celulares utilizadas

Dada la fuerte asociación entre las DSBs y los procesos de tumorigénesis y carcinogénesis se trabajó simultáneamente en una línea celular eficiente para la reparación de este tipo de lesiones en el ADN (CHO-K1) y una línea derivada de ésta deficiente para la reparación de las mismas (XRS 5).

CHO-K1

La línea CHO deriva de células de ovario de hámster chino, subclonadas de un cultivo establecido a partir de una biopsia de este órgano en 1957 por Puck y colaboradores. Se cultivan fácilmente en monocapa y pueden ser sincronizadas por una variedad de técnicas. Han sido extensamente utilizadas en estudios de mutagénesis, radiosensibilidad celular, relaciones de ligamiento en células híbridas y metabolismo de macromoléculas. En 1969, Kao y Puck presentan el primer cariotipo de estas células con un número modal de 21. Reconocieron que 10 de los cromosomas normales de hámster están ausentes en las células CHO siendo reemplazados por 9 cromosomas con morfología alterada. Éstos fueron ubicados en un grupo designado como Z y los 12 cromosomas restantes se clasifican con los números 1 a 10 y la letra X del cariotipo euploide (Deaven y Petersen, 1973).

La longitud de los brazos cromosómicos, sugiere que las células CHO contienen un 3% menos de cromatina que las células normales de la especie de origen. En 1970, los mismos autores describieron el cariotipo de un subclon de esta línea: CHO-K1. Son similares a sus parentales CHO, diferenciándose por la ausencia de un pequeño cromosoma telocéntrico. Su ciclo celular varía entre 12 y 15 horas, dependiendo de las condiciones y del medio de cultivo (Dulout et al., 1996).

En cuanto a las condiciones de desarrollo, se cultivan en monocapa en frascos Falcon utilizando un medio de cultivo compuesto por:

Ham F 12	90%
Suero Bovino fetal	10%
Penicilina	50 UI/ml
Estreptomomicina	50 µg/ml

XRS-5

La línea celular XRS-5 pertenece a uno de los tres grupos complementarios de líneas celulares de roedores que han sido identificados como portadores de defectos en la reparación de DSBs. Los miembros pertenecientes a estos grupos de líneas celulares comparten fenotipos similares incluyendo, principalmente, una radiosensibilidad pronunciada y una marcada dificultad para llevar a cabo recombinación V(D)J.

Estas líneas han sido denominadas en función de sus genes no funcionales XRCC 4, XRCC 5 y XRCC 7. Los genes XRCC 5 y XRCC 7 codifican para componentes de un mismo complejo proteico denominado proteína quinasa dependiente de ADN (*DNA-PK*) (Smider et al., 1994; Taccioli et al., 1994; Blunt et al., 1995; Kirchgessner et al., 1995; Peterson et al., 1995). Particularmente el gen XRCC 5 codifica para la fracción proteica Ku80, también conocida como KuB2, Ku86, NFIV, KARP1 y KARP-1 (Gene, *Pub Med*) que representa la subunidad de mayor tamaño de la proteína heterodimérica Ku.

La línea celular XRS-5 fue una de las primeras líneas mutantes radiosensibles originada a partir de la línea celular CHO-K1 (Jeggo y Kemp, 1983, Singleton et al., 1997). En esta línea, el gen XRCC 5 se encuentra mutado exhibiendo, por lo tanto, un defecto en la reparación de DSBs del ADN. Por este motivo, ha sido ampliamente utilizada en muchos laboratorios para validar y optimizar técnicas con el propósito de mensurar la reunión de DSBs en el ADN, examinar las consecuencias de uniones defectuosas y para investigar los mecanismos involucrados en los procesos de re-unión del ADN en células de mamífero (Darroudi y Natarajan, 1989; Jeggo, 1990; Iliakis et al., 1992; Dahm-Daphi et al., 1993).

En cuanto a las condiciones de desarrollo, se cultivan de igual modo que su línea parental CHO-K1, formando monocapas en frascos Falcon utilizando un medio de cultivo compuesto por:

Ham F 12	90 %
Suero Bovino fetal	10 %
Penicilina	50 UI/ml
Estreptomomicina	50 µg/ml

IV.2. Irradiación celular

El presente plan de tesis intenta con un modelo *in vitro* colaborar con la búsqueda de las consecuencias asociadas a este tipo de exposición. Con este propósito células de mamífero cultivadas *in vitro*, han sido expuestas a una dosis de 100 mSv de RX, por ser ésta una dosis intermedia al límite superior de lo que se considera actualmente DBRI.

El equipo utilizado para la irradiación de las células fue un generador de rayos X marca DSJ de 65 kVp-5 mA.

Las condiciones de irradiación se lograron mediante la calibración del equipo utilizado, realizada bajo la dirección y supervisión de los Dres. Juan M. Andrieu (Prof. Titular Ordinario de las Cátedras de Física II y Oncología Radioterápica, UNLP) y Héctor A. Negri (Prof. Adjunto de la Cátedra Oncología Radioterápica, UNLP). Se presenta a continuación el informe técnico correspondiente extraído de la tesis doctoral de la Dra. Alba Güerci (Güerci, 2004).

Calibración Equipo generador de rayos X

Equipo calibrado: generador de rayos X marca DSJ de 65 kVp-5 mA.

Equipo dosimétrico: marca KEITHLEY

Modelo Programable Digital 35617EBS

Micro-cámara PTW N 2336/414

Determinación del campo efectivo: por medio de placas radiográficas a distintas distancias foco-superficie se determinó el diámetro del localizador, resultando de 7,2 cm.

A una distancia foco-superficie (DFS) de 25 cm, 30 cm, 35 cm, 40 cm, 45 cm, 50 cm, 55 cm y 60 cm y con el tiempo máximo de disparo 3 s, se procede a efectuar las lecturas de la micro-cámara de ionización antes descripta.

Para la distancia de trabajo elegida como DFS: 60 cm, el promedio de 15 disparos dio como resultado de la lectura:

Lc: 0,019087 nC para t: 3 s

Teniendo en cuenta el frenamiento (atenuamiento) de la pared superior del frasco porta muestra, se determinó dicho factor en 0,987 (1,3 % de absorción).

La tasa de dosis equivalente a DFS 60 cm, con atenuación, corrección de tamaño de campo y factor de cámara de 8,501 cGy/nC y con el tiempo de disparo de 3 s es:

Hr= 0,5340 mSv/s

Por lo cual, para irradiar con una dosis equivalente:

Hr: 1 mSv t: 1,87 s

Con el objeto de disminuir el error en el tiempo de disparo se recomienda trabajar a tiempo fijo y distancia variable. Para que la muestra reciba una dosis equivalente de 5 mSv en 3 s de tiempo de disparo, la misma deberá ser colocada a una distancia de 33,96 cm.

A fin de obtener una exposición diaria de 100 mSv los cultivos fueron irradiados 20 veces a una distancia de 33,96 cm del foco de disparo.

IV.3. Ensayos realizados

IV.3.a. Ensayo de electroforesis en gel de células individuales (Ensayo Cometa)

En este ensayo, la suspensión de células se mezcla con agarosa de bajo punto de fusión y se distribuye en un portaobjetos previamente tratado con agarosa de punto de fusión normal. Luego de lisar las células en una solución de detergentes en alta concentración salina, se lleva a cabo el desenrollamiento del ADN y la electroforesis en solución de pH definido según el tipo de lesión que quiera evidenciarse.

La versión alcalina de esta prueba (Singh,1988) permite la visualización de los fragmentos generados por la ruptura de una o ambas hebras del ADN. Los fragmentos

de ADN de bajo peso molecular son liberados durante la exposición a la solución de lisis y, posteriormente, a la solución de electroforesis (Choucroun y Dewitte, 2001). Dada su carga negativa, tenderán a desplazarse a través de un gel de agarosa en respuesta a un campo eléctrico. La distancia de migración de los fragmentos de ADN dependerá directamente del tamaño de los mismos. Es importante destacar que las lesiones en el ADN, resultantes en ruptura de cadena, incrementan la migración del ADN en el gel de agarosa, mientras que los enlaces cruzados de ADN-ADN y ADN-proteína resultan en un retraso en la migración comparado con sus correspondientes controles (Tice et al., 2000). Así, se asume que a mayor cantidad de rupturas se corresponde una mayor cantidad de fragmentos de bajo peso molecular aumentando la cola del cometa y, por ende, sus parámetros.

Las principales ventajas de este ensayo incluyen: a) la obtención de datos al nivel de células individuales, permitiendo posteriormente realizar análisis estadísticos robustos; b) la necesidad de obtener pocas células por punto experimental; c) la sensibilidad para detectar el ADN dañado; d) su utilización con cualquier tipo celular eucariota tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*.

Protocolo utilizado

Se implementó de acuerdo al método de Singh y colaboradores (1988) con algunas modificaciones menores (Tice, 1995). El protocolo se desarrolló de la siguiente manera:

- Las células se trataron con 1ml de solución de tripsina 0,25% concentración final durante un minuto a 37° C.
- La neutralización se realizó con 4 ml de HAM F12 suplementado con 10% de suero bovino fetal.
- Se tomaron 50 µl de solución celular y se suspendieron en 150 µl de agarosa de bajo punto de fusión (ABPF) -ver preparación de solución en el ANEXO 1.
- Se sembraron 2 portaobjetos, previamente tratados con 100 µl de agarosa de punto de fusión normal (APFN) -ver preparación de solución en el ANEXO 1.
- Las muestras se cubrieron con cubreobjetos y se mantuvieron a 4°C durante una hora.

- Posteriormente se retiraron los cubreobjetos y se mantuvieron los preparados en solución de lisis durante 2 hs a 4°C -ver preparación de solución en el ANEXO 1.
- A continuación se transfirieron a la cuba de electroforesis horizontal cubiertas con solución buffer pH >13 durante 20 minutos a 4°C -ver preparación de solución en el ANEXO 1.
- La corrida electroforética se realizó bajo las siguientes condiciones: 20 voltios, 200 mA durante 20 minutos a 4°C.
- Una vez completada la corrida electroforética el pH de las muestras se neutralizó por medio de tres lavados con Tris-Cl a temperatura ambiente -ver preparación de solución en el ANEXO 1.
- Para la visualización de las muestras los portaobjetos fueron teñidos con 20 µl de colorante Syber Green 1 -ver preparación de solución en el ANEXO 1.
- Por último, se realizó el análisis al microscopio de fluorescencia con un objetivo 40x. Se utilizó un microscopio Olympus modelo BX 40 equipado con un cubo de fluorescencia Olympus modelo U-MNB con filtro de excitación de 470-490 nm y de emisión de 520 nm de longitud de onda.

Todo el protocolo se realizó en oscuridad para evitar el daño que podría causar la luz sobre el material genético.

Análisis de las imágenes

Análisis cualitativo

Se realizaron 2 geles por punto experimental y se analizaron al azar 100 imágenes por gel. A cada una de ellas se le asignó un valor entre 0 a 4 de acuerdo con el nivel de daño observado, siguiendo los criterios de Collins (2004) detallados a continuación.

Grado 0: células sin daño en el ADN. La totalidad del ADN se encuentra en la cabeza del cometa.

Grado 1: células con daño leve en su ADN. La mayor parte del ADN se encuentra en la cabeza del cometa y pocos fragmentos en su cola.

Grado 2: células con daño intermedio en su ADN. La mayor parte del ADN se encuentra en la cabeza y varios fragmentos en la cola del cometa.

Grado 3: células con daño severo en su ADN. La menor parte del ADN se encuentra en la cabeza y muchos fragmentos en la cola del cometa.

Grado 4: células con daño grave en su ADN. La cabeza del cometa prácticamente desaparece de la imagen, ya que casi la totalidad del ADN se encuentra formando su cola.

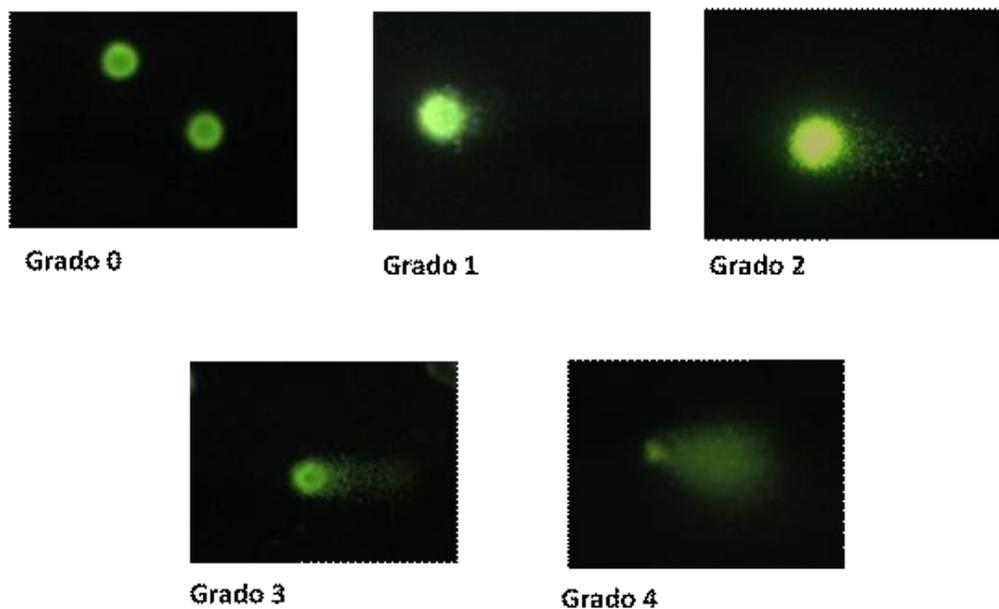


Figura 11: Clasificación de los niveles de daño según Collins 2004.

De este modo, el puntaje total obtenido para cada gel podría oscilar entre 0 "unidades arbitrarias", cuando todas las células analizadas se encuentran sin daño; a 400 "unidades arbitrarias", cuando todas las células analizadas tienen el mayor de los daños.

En base a esta clasificación, se estableció para cada uno de los geles un Índice de daño genético (ID) según la siguiente fórmula (Collins, 2004).

$$ID = \frac{1 \times NG1 + 2 \times NG2 + 3 \times NG3 + 4 \times NG4}{\text{Total de células analizadas}} \times 100$$

Posteriormente, los resultados fueron agrupados en 3 categorías distintas a saber,

Células sin daño: en esta categoría se incorporaron exclusivamente las células de G0.

Células con daño leve: se incorporaron tanto las células de G1 como las de G2.

Células con daño grave: se incorporaron tanto las células de G3 como las de G4.

Análisis Cuantitativo

El microscopio de fluorescencia se encuentra conectado a una cámara de video color Sony 3CCD-IRIS. La imagen de cada célula individual fue capturada y grabada inmediatamente.

Se tomaron 50 imágenes por cada uno de los portaobjetos preparados que, posteriormente, fueron procesadas a través del programa CASP 1.2.2 *Comet Assay Software Project* (Końca et al., 2003).

De todos los parámetros que el programa es capaz de tomar, fueron considerados los que se consignan a continuación.

Medidas primarias: aquellas medidas que surgen directamente de los perfiles densitométricos de fluorescencia (Kumaravel et al., 2009).

- % de ADN en la cola del cometa: porcentaje de ADN que se encuentra en la cola del cometa.
- longitud de la cola del cometa: largo de la cola del cometa, medido desde el borde derecho del área de la cabeza hasta el extremo de la cola (en pixeles)

Medidas secundarias:

- Olive Tail Moment (OTM): porcentaje de ADN en la cola del cometa multiplicado por la distancia entre el centro de gravedad (cg) del ADN de la cabeza y el centro de gravedad del ADN de la cola (ambos cg medidos en el eje x).

De acuerdo con Kumaravel y Jha (2006), sólo unos pocos parámetros de los que provee el análisis cuantitativo de imágenes en el ensayo cometa son fidedignos cuando se trata de evaluar el efecto de las radiaciones de bajo LET. El OTM y el % de ADN en la cola serían los más confiables.

IV.3.b. Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN)

Como se mencionó en el apartado de antecedentes de la presenta tesis doctoral, un micronúcleo (MN) puede estar constituido tanto por un fragmento de ADN como por un cromosoma completo, dando cuenta por tanto de procesos clastogénicos y/o aneugénicos, respectivamente.

Para observar el daño generado en una célula a través de este ensayo es necesario que la misma complete, al menos, un ciclo de división celular luego de la exposición (Fenech y Morley, 1985a).

Asimismo, es necesario realizar el conteo de los puentes nucleoplásmicos (NPBs) que se forman entre los núcleos de una célula BN, ya que proveen una medida de la frecuencia de rearrreglos cromosómicos (Umegaki y Fenech, 2000; Fenech et al., 2003), producto de cromosomas dicéntricos que no se han separado correctamente en anafase. Son utilizados como biomarcadores de reparación errónea del ADN y/o de fusiones teloméricas.

En la década pasada, emergió otro mecanismo de formación de conocido como brote nuclear (BUDs). Shimizu y colaboradores (1998; 2000) demostraron que la amplificación del ADN se localiza en sitios específicos de la periferia del núcleo y se elimina a través de brotes nucleares que forman los MN durante la fase S del ciclo celular. Los BUDs presentan una morfología semejante a los MN, pero se encuentran unidos por un pequeño y fino puente al núcleo celular (Lindberg et al., 2007).

Protocolo utilizado

Se implementó de acuerdo al método de Fenech y Morley (1986) con las modificaciones propuestas por Fenech (2007). El protocolo se desarrolló de la siguiente manera:

- Cultivo de las células en medio HAM-F12 suplementado con suero bovino fetal (10%).
- Luego de la exposición a la radiación las células se trataron con una concentración final de 3 µg/ml de citocalasina B -ver preparación de la solución en el ANEXO1.

- Finalizado el cultivo las células se levantaron por medio de los procedimientos de rutina utilizando tripsina 0,25%.
- La suspensión celular se centrifugó y el botón celular se resuspendió con 5 ml de fijador I -ver preparación de la solución en el ANEXO1.
- La suspensión celular se centrifugó y el botón celular se resuspendió con 5 ml de fijador II -ver preparación de la solución en el ANEXO1.
- Se repitió el procedimiento anterior.
- Luego de 24 hs de reposo en heladera, se procedió al goteo de material en portaobjetos.
- Los preparados se tiñeron con colorante Giemsa durante 10 minutos -ver preparación de solución en el ANEXO1.

Análisis de las imágenes

Se analizaron 1000 células binucleadas en cada uno de los puntos experimentales con microscopio óptico con objetivo de magnitud de 40x.

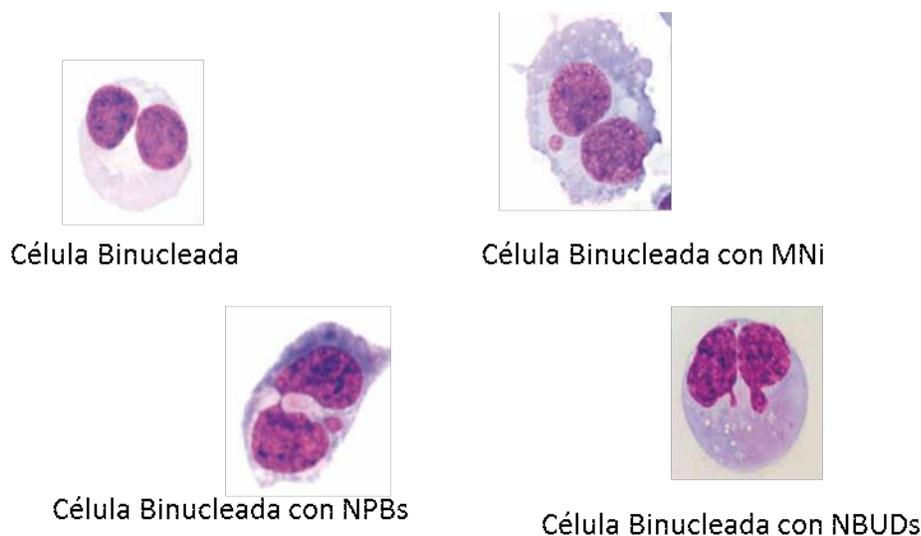
La clasificación de las células se llevó a cabo siguiendo el criterio establecido por Fenech (2007) según se detalla a continuación.

Células Binucleadas sin Micronúcleos (CB): corresponde a aquellas células que no poseen daño en el material genético.

Células Binucleadas con Micronúcleos (MN): aquellas células que poseen núcleos pequeños además del núcleo principal. Un micronúcleo es un biomarcador de ruptura cromosómica y/o pérdida de un cromosoma completo.

Células Binucleadas con Puentes nucleoplásmicos (NPBs): biomarcador de ADN mal reparado y/o extremos teloméricos fusionados.

Células Binucleadas con Brotes nucleares (NBUDs): biomarcador de la eliminación del ADN amplificado y/o complejos de reparación de ADN.



Fuente: Fenech, 2007

Figura 12: Clasificación de las células binucleadas.

IV.3.c. Ensayo de Anexina V

Actualmente se sugiere que la externalización de FS ocurre sólo cuando la célula está destinada a morir por apoptosis. La Anexina V es una proteína que se une con muy alta afinidad a la FS en presencia de iones Ca^{++} y es incapaz de penetrar la bicapa lipídica de la membrana intacta y, consiguientemente marcar células viables. Por estas características, es utilizada unida a un fluorocromo, Anexina V-FITC, para evaluar la translocación de la FS a la membrana externa de la bicapa lipídica.

Durante la observación al microscopio óptico de poblaciones celulares, puede notarse que aquellas células que evidencian aspectos morfológicos característicos de las células apoptóticas demuestran una elevada afinidad por la AV. La mayoría de estas células no son aptas para la tinción con Ioduro de Propidio (IP) indicando por lo tanto la integridad de la membrana plasmática. Cuando esta integridad se pierde, las células se tornan positivas tanto para AV como para IP, indicando un estado necrótico de estas células.

Utilizando el ensayo de AV el número de células apoptóticas en suspensión puede ser determinado por un modo rápido, simple y sensitivo (van England et al.,

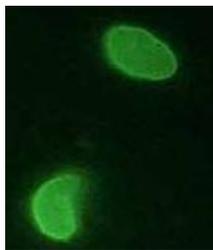
1997). Así, AV marcada con fluorocromos es desde hace ya algunos años, una técnica ampliamente utilizada para mensurar la cantidad de células apoptóticas dentro de una población celular, ya sea por citometría de flujo como por microscopía de fluorescencia.

Protocolo utilizado

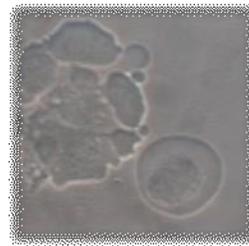
- Las células se levantaron por medio de los procedimientos de rutina utilizando tripsina 0,25%.
- Se realizaron dos lavados con buffer de unión -ver preparación de la solución en el ANEXO1.
- Luego de la última centrifugación las células se resuspendieron en 0,1 ml de solución Anexina V- FITC (1 mg/ml concentración final).
- Se incubaron 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.
- Se realizaron dos lavados con PBS.
- Luego se realizó el goteo del material sobre portaobjetos.
- Finalmente, se procedió al análisis en microscopio de fluorescencia Olympus BX equipado con un cubo de filtros de fluorescencia Olympus U-MNB (filtro de excitación de 470-490 nm; filtro emisor de 520 nm).

Análisis de las imágenes

Se analizaron 1000 células por punto experimental, las cuales se clasificaron como apoptóticas o normales, según fueran positivas o no para la tinción con Anexina V-FITC.



Células Anexina V-FITC +
Microscopía de fluorescencia



Células Anexina V-FITC +
Microscopía de contraste de fases

Figura 13: Imágenes de células apoptóticas de la línea celular CHO-K1.

IV.4 Análisis estadístico

Se utilizaron los programas Epi Info 6.0 (CDC/OMS, 2001) y Statgraphics® 5.1 (Manugistics Inc., Rockville, MD) a un nivel de confianza del 95%. La metodología estadística utilizada estuvo en función de cada una de las variables analizadas dentro de cada una de las técnicas.

- Ensayo cometa análisis cualitativo: comparación de ID a través de la Prueba de X^2 (Epinfo 6.0).
- Ensayo cometa análisis cualitativo: comparación por categoría de daño con ANOVA multifactorial (Statgraphics® 5.1).
- Ensayo cometa análisis cuantitativo: debido a la distribución no normal de los datos obtenidos para estos tres parámetros, se utilizaron las medianas para las comparaciones estadísticas con Kruskal-Wallis (Statgraphics® 5.1).
- Ensayo CBMN: comparación de las frecuencias de MN, NPBs y NBUDs a través de la Prueba de X^2 (Epinfo 6.0).
- Ensayo de AV: comparación de la frecuencia de células apoptóticas a través de la Prueba de X^2 (Epinfo 6.0).

IV.5. Diseño experimental

Se trabajó con dos modelos diferentes (Figura 14):

- Modelo de irradiación crónica (MIC): se evaluó el efecto de la exposición crónica a dosis bajas de radiación ionizante.
- Modelo de inestabilidad genómica (MIG): se valoró la posible inducción de inestabilidad genómica después de diez días de ocurrida la irradiación.

Los dos modelos experimentales mencionados se llevaron a cabo con la línea parental CHO-K1 y su derivada deficiente para la reparación en NHEJ, XRS-5.

En el desarrollo del MIC, los cultivos de ambas líneas celulares fueron irradiados diariamente durante un período de 10 días con 100 mSv de rayos X. Todos los ensayos se realizaron tanto inmediatamente después de la primera irradiación, día 1 (D1) 100

mSv (d100), como así también luego de transcurridos los días del diseño experimental, día 10 (D10), 1000 mSv (d1000).

En cambio, en el desarrollo del MIG, los cultivos de ambas líneas celulares fueron irradiados con 100 mSv de rayos X el primer día del protocolo y mantenidos en cultivo durante 10 días. Todos los ensayos se realizaron tanto inmediatamente después de la primera irradiación (D1), como así también luego de transcurridos los días del diseño experimental (D10).

El día uno se comenzó en forma simultánea el cultivo en dos frascos T25, con un porcentaje de confluencia de aproximadamente 80% para cada una de las líneas celulares. Fueron realizadas sucesivamente tres tandas experimentales.

- Uno de los frascos se utilizó como control negativo (Control D1) y se mantuvo en cultivo hasta el último día de la tanda experimental (Control D10).
- El otro se irradió con 100 mSv, posteriormente las células se resuspendieron y fraccionaron según se detalla a continuación:
 - ❖ 1/3 fue utilizado en el momento para realizar los ensayos cometa, CBMN y AV (Día 1 Irradiado, MIC y MIG).
 - ❖ 1/3 se sub-cultivó para ser irradiado en iguales condiciones todos los días hasta el día 10 de la tanda experimental (Día 10 Irradiado, MIC).
 - ❖ 1/3 se sub-cultivó hasta el día 10 de la tanda experimental para el análisis de inestabilidad genómica (Día 10 Inestabilidad, MIG).
- Se realizaron controles positivos con bleomicina (1 $\mu\text{g/ml}$) para el EC y CBMN y etanol 5% para Anexina V.

Diagrama de Trabajo

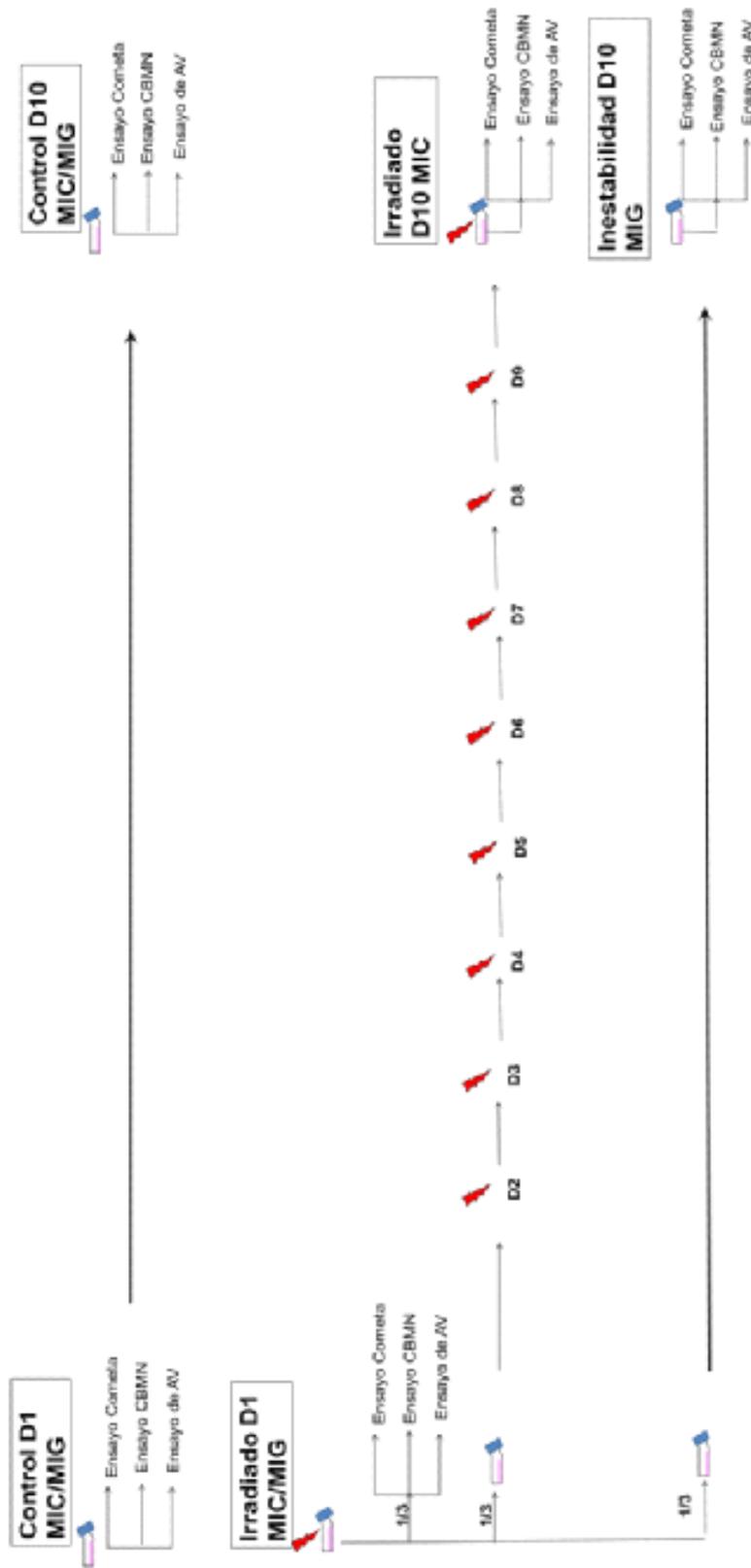


Figura 14. Modelo de Irradiación Crónica (MIC) y Modelo de Inestabilidad Genómica (MIG)

Capítulo V

RESULTADOS

Para el desarrollo del MIC, los cultivos de ambas líneas celulares fueron irradiados diariamente durante un período de 10 días con 100 mSv de rayos X. Todos los ensayos se realizaron tanto inmediatamente después de la primera irradiación, (D1d100), como así también luego de transcurridos los días del diseño experimental (D10 d1000).

Por su parte, para el MIG, las células de ambas líneas fueron mantenidas en cultivo luego de la primera irradiación para ser analizadas al finalizar el diseño experimental (D10 d100).

Con el objeto de corroborar la estabilidad de las líneas celulares a lo largo de todo el protocolo se ha realizado la comparación entre los controles negativos correspondientes al primer y el último día. No se encontraron diferencias significativas para ninguna de las técnicas implementadas.

A lo largo de todo el apartado, la significación estadística se indica con color negro en el caso de la comparación con el control para el mismo día (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$) y en color rojo para la comparación con la dosis 100 mSv en el día 1 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$). Asimismo, a igual letra se indica “sin diferencias estadísticamente significativas”; y a diferente letra “con diferencias estadísticamente significativas” ($p < 0,001$).

V.1 Resultados para la línea celular CHO-K1

Ensayo cometa análisis cualitativo

Las células fueron primeramente categorizadas según su nivel de daño en 5 categorías mutuamente excluyentes (grado 0 a 4) según se detalló en el Capítulo IV (Materiales y Métodos).

Esta primera categorización permitió, por un lado, el análisis a través de la construcción del Índice de Daño (ID) según se detalló oportunamente. Y, por el otro, las poblaciones celulares se reagruparon en las tres categorías especificadas (células sin daño, células con daño leve y células con daño grave).

Análisis comparativo por índice de daño (ID)

Al procesar los datos por medio del análisis de la varianza multifactorial, para el MIC, no se encontraron efectos significativos atribuibles a la variable día pero sí para las variables dosis ($p < 0,001$) y línea ($p < 0,001$). Estas diferencias resultaron significativas tanto para la dosis de 100 mSv respecto del control para el día 1 ($p < 0,01$) como para para la dosis de 1000 mSv en el día 10, respecto de su control ($p < 0,001$). La dosis de 1000 mSv no presentó diferencias estadísticamente significativas respecto de la inferior.

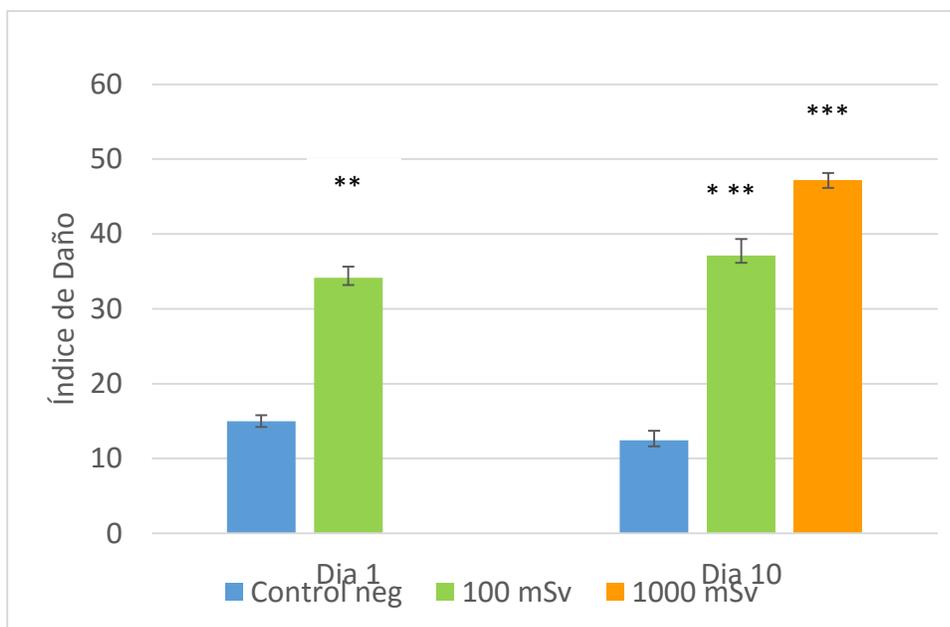
Al realizar el análisis para el MIG no se encontraron efectos significativos atribuibles a la variable día, pero sí para las variables dosis ($p < 0,001$) y línea ($p < 0,001$). Estas diferencias resultaron significativas para la población irradiada en el día 1 respecto de su control negativo ($p < 0,001$) y para la población irradiada en el día 10 también respecto de su control negativo, al final del protocolo ($p < 0,001$). Al realizar el contraste de los resultados obtenidos de las poblaciones celulares irradiadas el primer día del protocolo con los que se obtuvieron en el último día del mismo, estas diferencias no fueron significativas.

Los promedios de los ID obtenidos en las distintas tandas experimentales para cada día y para cada dosis se resumen en la Tabla 2 y se ilustran en la Figura 15.

Tabla 2: Promedios de los ID (\pm DE) obtenidos en el análisis cualitativo del Ensayo Cometa en células CHO-K1 para el MIC y el MIG.

		Día 1	Día 10
Control negativo		15,00 (\pm 2,50)	12,43 (\pm 3,17)
Irradiadas	100 mSv	34,17 (\pm 1,65)**	37,14*** (\pm 2,83)
	1000 mSv	-----	47,14 (\pm 5,12)***
Control positivo		84,56 (\pm 5,33)***	93,77 (8,41)***

Figura 15. Comparación de los promedios de los ID obtenidos en células CHO-K1 para el MIC y el MIG.



Análisis comparativo por categorías de daño

Al realizar el análisis estadístico ANOVA multifactorial, no se encontraron efectos atribuibles a la variable día para ninguna de las categorías propuestas en ninguno de los dos modelos experimentales.

Contrariamente a lo observado para la variable día, al contrastar aquellas poblaciones que han sido expuestas a la radiación respecto de las que no han sido irradiadas, se evidenció un aumento de daño estadísticamente significativo para las tres categorías establecidas (células sin daño $p < 0,001$; células con daño leve $p < 0,001$ y células con daño grave $p < 0,001$). A su vez, estas diferencias dejan de ser estadísticamente significativas al realizar la comparación entre las dos dosis utilizadas (100 y 1000 mSv) en ambos modelos en las tres categorías planteadas.

Los resultados obtenidos luego de reagrupar las poblaciones celulares en las tres nuevas categorías se resumen en la Tabla 3 y se ilustran en las Figura 16 y 17.

Tabla 3. Categorías de daño (% \pm DE) obtenidos en el análisis cualitativo del Ensayo Cometa en células CHO-K1 para el MIC y MIG.

Día (D) y dosis (d)	Células sin daño	Células con daño leve	Células con daño grave
D1 control negativo	88,78 (\pm 1,26) ^a	10,92 (\pm 1,17) ^a	0,28 (\pm 0,39) ^a
D1-d 100	76,64 (\pm 2,18) ^b	21,07 (\pm 2,03) ^b	2,28 (\pm 0,67) ^{ab}
D10 control negativo	85,83 (\pm 1,62) ^a	13,95 (\pm 1,7) ^a	0,58 (\pm 0,19) ^a
D10-d 100	73,14 (\pm 1,71) ^b	24,28 (\pm 2,02) ^b	2,57 (\pm 2,03) ^b
D10-d 1000	66,78 (\pm 2,18) ^b	30,07 (\pm 2,03) ^b	3,14 (\pm 0,67) ^b
control positivo	23,12 (\pm 1,35) ^c	56,32 (\pm 5,1) ^c	20,56 (\pm 3,1) ^c

Figura 16. Promedios e intervalos de Bonferroni obtenidos para el número de células sin daño (Fig. 16a); con daño leve (Fig. 16b) y daño grave (Fig. 16c) en células CHO-K1 para el MIC.

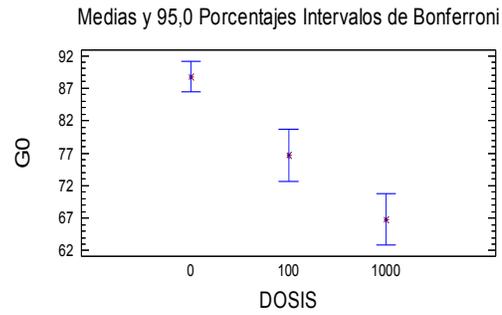


Fig.16a

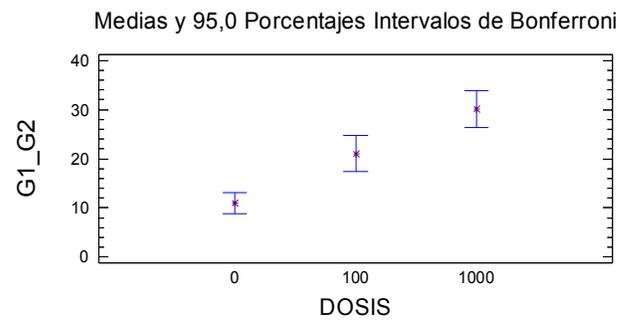


Fig.16b

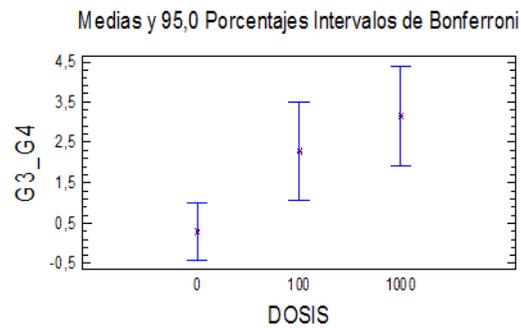


Fig.16c

Figura 17. Promedios e intervalos de Bonferroni obtenidos para el número de células sin daño (Fig. 17a); con daño leve (Fig. 17b) y daño grave (Fig. 17c) en células CHO-K1 para el MIG.

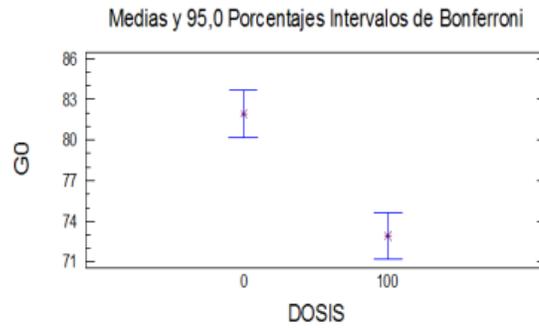


Fig. 17a

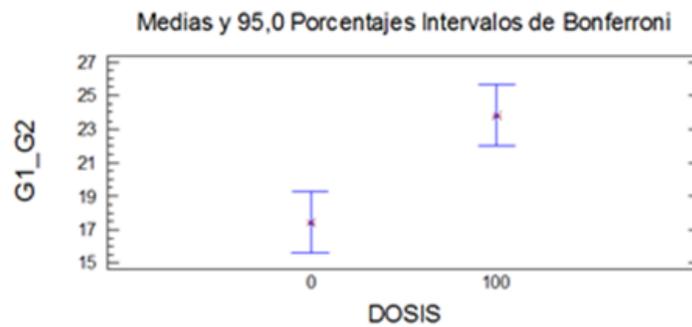


Fig. 17b

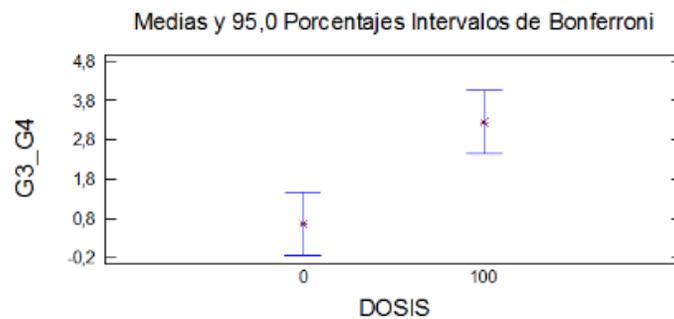


Fig.17c

Ensayo cometa análisis cuantitativo

Como se detalló en el Capítulo IV, una vez capturadas las imágenes fueron procesadas con el programa CASP para la obtención de los tres parámetros seleccionados, % de ADN en la cola del cometa, longitud de la cola del cometa y Olive Tail Moment (OTM). A su vez, para cada uno de estos parámetros se calculó el rango, el promedio y la mediana en cada uno de los puntos experimentales. Los resultados obtenidos para los distintos parámetros se resumen en las Tablas 4, 5 y 6.

Tabla 4. Resumen de datos obtenidos para el % de ADN en la cola del cometa en cada uno de los puntos experimentales en células CHO-K1 para el MIC y MIG.

Día-dosis (D-d)	Células analizadas	Rango	Mediana
D1-Control neg.	126	0,00012-59,17	0,45
D1-d 100	120	0,00019-67,85	2,37
D10-Control neg.	132	0,00018-60,67	0,52
D10-d 1000	143	0,00245-81,47	1,59
D10-d 100	162	0,00031-67,67	0,29

Tabla 5. Resumen de datos obtenidos para el largo de la cola del cometa en cada uno de los puntos experimentales en células CHO-K1 para el MIC y MIG.

Día-dosis (D-d)	Células analizadas	Rango	Mediana
D1- Control neg.	126	3-178	9
D1-d 100	120	3-136	13
D10-Control neg.	132	3-189	10
D10-d 1000	143	3-163	15
D10-d 100	162	3-89	6

Tabla 6. Resumen de datos obtenidos para OTM en cada uno de los puntos experimentales en células CHO-K1 para el MIC y MIG.

Día-dosis (D-d)	Células analizadas	Rango	Mediana
D1- Control neg.	126	0,00079-66,15	0,22
D1-d 100	120	0,00019-46,36	0,76
D10- Control neg.	143	0,00085-50,81	0,18
D10-d 1000	143	0,00166-63,98	0,70
D10-d 100	162	0,00012-23,81	0,08

Debido a que los datos obtenidos no seguían una distribución de tipo normal, se utilizaron las medianas de cada uno de los parámetros a fin de realizar un contraste de Kruskal-Wallis para cada una de las comparaciones establecidas.

En ambos modelos experimentales, al realizar el contraste de medianas inmediatamente después de la primera exposición a la radiación, las diferencias resultaron significativas desde el punto de vista estadístico para dos de los tres parámetros analizados: %de ADN en cola y OTM ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente). La semejanza entre los modelos también se mantiene al realizar los contrastes al final de los protocolos. Así se encontraron diferencias significativas al contrastar las poblaciones que recibieron una dosis total tanto de 1000 mSv como de 100 mSv respecto de sus correspondientes controles luego de transcurridos los diez días del diseño experimental, siendo en este caso significativas para los tres parámetros estudiados ($p < 0,001$ para los tres parámetros). Al realizar los contrastes entre las poblaciones irradiadas el primer día del protocolo, con las del último día, no se observó una relevancia estadística para ninguno de los parámetros.

Los resultados del análisis estadístico se resumen en la Tabla 7 y se ilustran en las Figuras 17.

Tabla 7. Contraste de Kruskal-Wallis para las medianas de los tres parámetros establecidos en células CHO-K1 para el MIC y MIG.

Contraste Analizado:			
Día dosis/Día dosis (Dd/Dd)	% de ADN	Longitud	OTM
D1 d 0/D1 d 100	p<0,01	p>0,05	p<0,05
D1 d 0/D10 d 0	p>0,05	p>0,05	p>0,05
D10 d 0/D10 d 1000	p<0,001	p<0,001	p<0,001
D1 d 100/D10 d 1000	p>0,05	p>0,05	p>0,05
D10 d 0/D10 d 100	p<0,001	p<0,001	p<0,001
D1 d 100/D10 d 100	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Figura 17. Comparación de las medianas obtenidas para el % de ADN en cola (Fig. 17a), longitud de la cola del cometa (Fig. 17b) y OTM (Fig. 17c) en células CHO-K1 para el MIC y para el MIG.

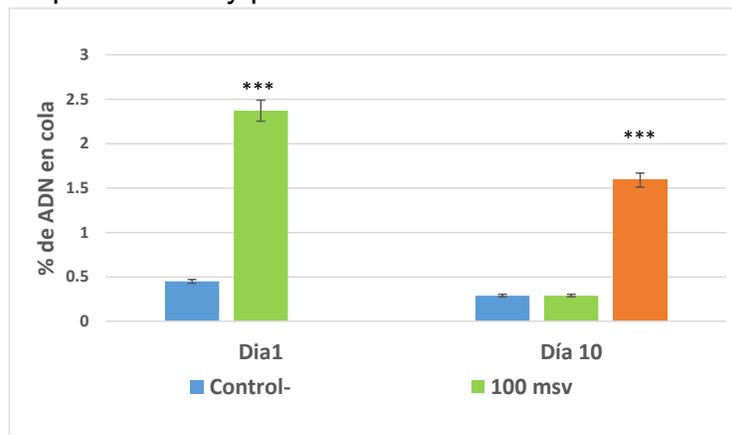


Fig. 17a

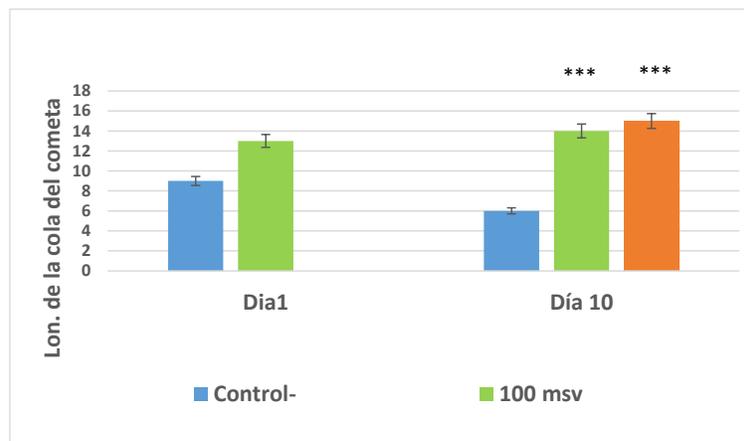


Fig.17b

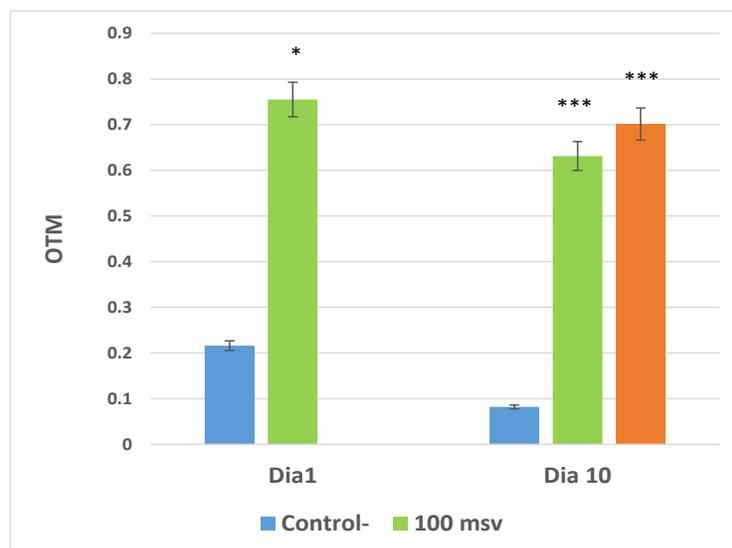


Fig. 17c

Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis

Para valorar el daño cromosómico generado por la radiación, en ambos modelos, se contabilizó la frecuencia de micronúcleos (MN), puentes nucleoplásmicos (NPBs) y brotes nucleares (NBUDs) en 1000 células binucleadas (BN).

Si bien en ninguno de los modelos establecidos la frecuencia de MN presentó efectos atribuibles a la variable día, en ambos se evidenció un aumento significativo de este parámetro como resultado de la exposición a la radiación. En este sentido, los cultivos irradiados exhibieron un aumento de daño estadísticamente significativo respecto de los controles en el día 1 en ambos modelos ($p < 0,05$). Al realizar las comparaciones en el día 10, si bien la cantidad de células con MN ha sido mayor respecto de sus controles tanto para el MIC como para el MIG, esta diferencia alcanzó relevancia significativa sólo para el primero de los casos ($p < 0,05$). Cabe resaltar que al comparar la frecuencia de MN obtenidos en las poblaciones irradiadas el primer día del protocolo con aquella obtenida el último día, no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa para ninguno de los modelos.

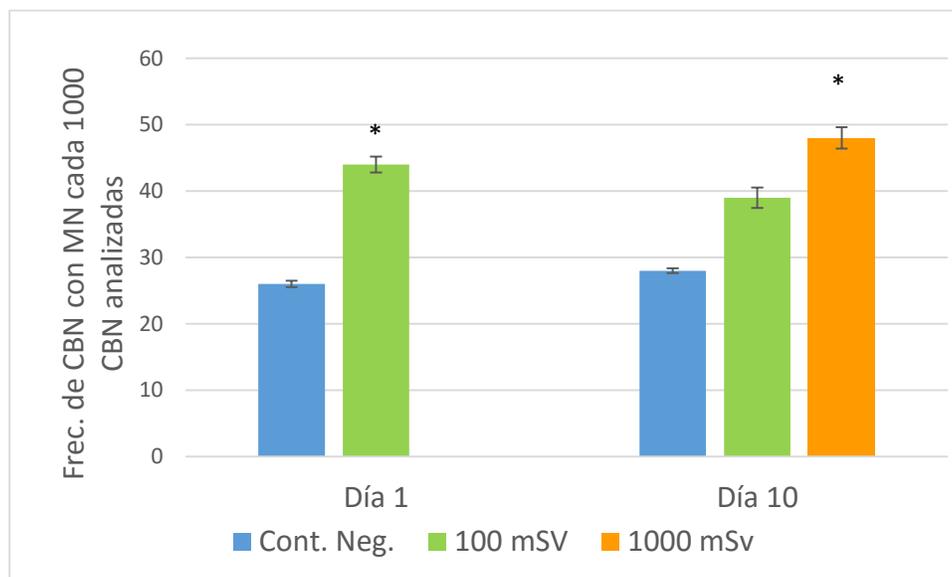
Los resultados obtenidos para los NPBs fueron dispares, mostrando valores superiores en el día 1 independientemente de la condición frente a la radiación. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En ningún caso se observaron NBUDs.

En la Tabla 8 y en la Figura 18 se resumen e ilustran los resultados obtenidos para este ensayo.

Tabla 8. Promedio de frecuencias porcentuales de MN ($\% \pm \text{EE}$) en 1000 CB en células CHO-K1 para el MIC y el MIG.

		Día 1	Día 10
Control negativo		26 ($\pm 0,47$)	28 ($\pm 0,35$)
Irradiadas	100 mSv	44 ($\pm 1,20$)*	39 ($\pm 1,55$)
	1000 mSv	-----	48 ($\pm 1,55$)*
Control positivo		75 ($\pm 1,35$)**	78 ($\pm 1,6$)**

Figura 18. Comparación de las frecuencias de MN en 1000 CB en células CHO-K1 para el MIC y el MIG.



Análisis de células apoptóticas

En ambos modelos, la frecuencia de células Anexina V positivas en el análisis realizado luego de la primer irradiación (D1 d100) aumentó en forma no significativa desde el punto de vista estadístico, respecto de su control no irradiado.

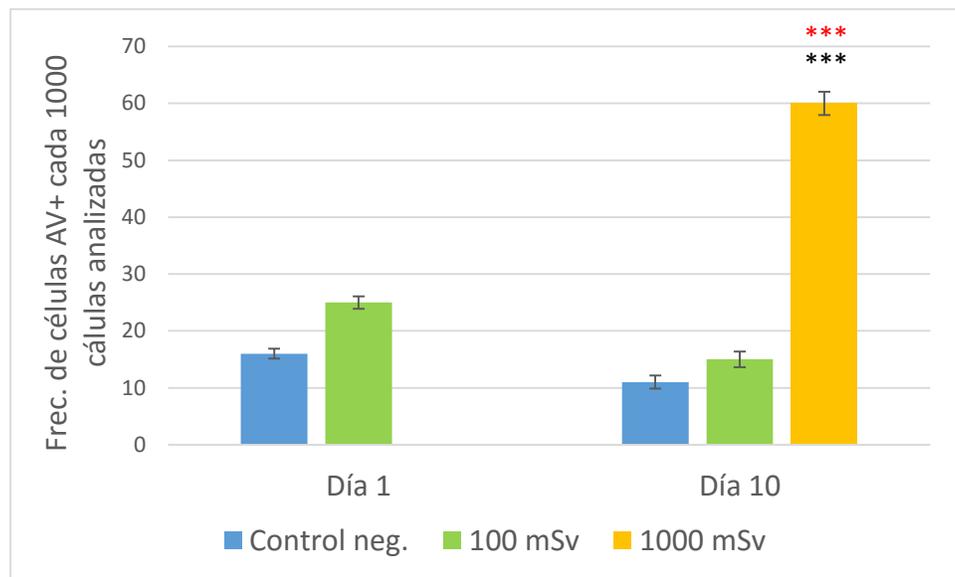
Al realizar las comparaciones para el día 10 del protocolo, los resultados encontrados fueron diferentes según se trate de un modelo u otro. Así en el caso del MIC se verificó un aumento significativo de este parámetro tanto respecto de su control negativo ($p < 0,001$) como del analizado luego de la primera exposición (D1 d100) ($p < 0,001$). Por su parte, en el MIG se encontró una disminución en la frecuencia de células vehiculizadas a apoptosis respecto de aquellas irradiadas en el día 1, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Los promedios de los resultados observados en las tres tandas experimentales como células positivas para la prueba de Anexina V (AV+) se resumen en la Tabla 9 y se ilustran en la Figura 19.

Tabla 9. Promedio de frecuencias porcentuales (\pm EE) de células AV+ en 1000 células CHO-K1 para MIC y el MIG.

		Día 1	Día 10
Control negativo		16 (\pm 0,89)	11 (\pm 1,15)
Irradiadas	100 mSv	25 (\pm 1,09)	15 (\pm 1,12)
	1000 mSv	-----	60 (\pm 1,38) ^{*****}
Control positivo		40 (\pm 3,35) ^{***}	35 (\pm 2,6) ^{***}

Figura 19. Comparación de las frecuencias de células AV+ en 1000 células CHO-K1 para el MIC y el MIG.



V.2. Resultados para la línea celular XRS-5

Ensayo cometa análisis cualitativo

Como se mencionó para su línea parental, al procesar los datos por medio del análisis de varianza multifactorial no se encontraron efectos significativos atribuibles a la variable día, pero sí para las variables dosis ($p < 0,001$) y línea ($p < 0,001$). Estos resultados se hallaron tanto para el MIC como para el MIG.

Para el análisis de los resultados obtenidos con la línea celular XRS-5 se utilizó, al igual que con su línea parental, en primer lugar el ID y, en segunda instancia, la comparación por categoría de daño.

Análisis comparativo por índice de daño (ID)

Al procesar los datos por medio de la varianza multifactorial no se encontraron efectos significativos atribuibles a la variable día, pero sí para las variables dosis ($p < 0,001$) y línea ($p < 0,001$).

Estas diferencias resultaron significativas tanto para el día 1, la dosis de 100 mSv respecto del control ($p < 0,01$), como para el día 10 respecto de su control. Por su parte, al final del protocolo, si bien se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ambos modelos experimentales, los niveles de significación alcanzados difirieron según se trate de uno u otro ($p < 0,001$ para el MIC y $p < 0,05$ para el MIG).

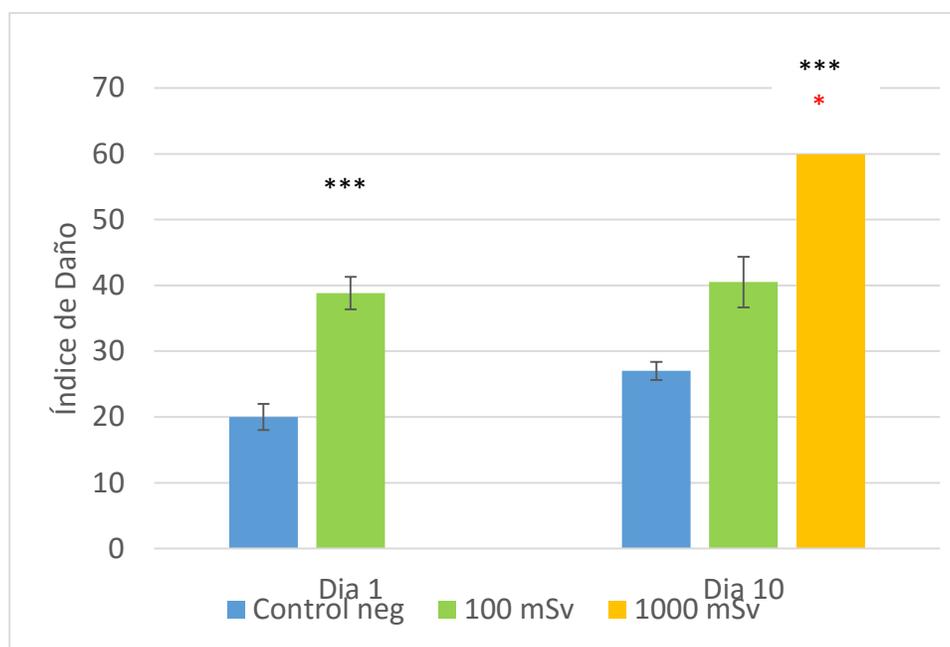
Al realizar el contraste dentro de la población irradiada de la línea celular XRS-5, entre el primer y el último día del protocolo, éste resultado estadísticamente significativo sólo en el caso del modelo de irradiación crónica ($p < 0,05$).

Los promedios de los ID obtenidos en las distintas tandas experimentales para cada día y para cada dosis se resumen en la Tabla 10 y su comparación se ilustra en la Figura 20.

Tabla 10. Promedios de los ID (\pm DE) obtenidos en el análisis cualitativo del Ensayo Cometa en células XRS-5 para el MIC y el MIG.

		Día 1	Día 10
Control negativo		20,00 (\pm 2,02)	27,00 (\pm 1,38)
Irradiadas	100 mSv	38,83 (\pm 2,45) ^{***}	40,5(\pm 3,86)
	1000 mSv	-----	60,17 (\pm 5,46) ^{****}
Control positivo		92,61(\pm 4,93) ^{***}	87,79 (5,14) ^{***}

Figura 20. Comparación de los promedios de los ID obtenidos para en células XRS-5 para el MIC y el MIG.



Análisis comparativo por categorías de daño

Al realizar el análisis estadístico ANOVA multifactorial, no se hallaron efectos atribuibles a la variable día para ninguna de las categorías propuestas ni para ninguno de los modelos planteados.

De modo contrario, se observó en ambos modelos un aumento de daño estadísticamente significativo para aquellas poblaciones que han sido expuestas a radiación respecto de las que no han sido irradiadas para todas las categorías ($p < 0,001$). Así en el primer día del protocolo se observó una disminución de la frecuencia de células sin daño ($p < 0,05$) y un aumento en la frecuencia de células con daño leve ($p < 0,05$) pero no ocurrió lo mismo en las células con daño grave. En ambos modelos, esta diferencia tomo relevancia estadística sólo en el último día del diseño experimental.

Los resultados obtenidos luego de reagrupar las poblaciones celulares de la línea celular XRS-5 en las tres categorías se resumen en la Tabla 11 y se ilustran en las Figuras 21 y 22.

Tabla 11. Categorías de daño ($\% \pm DS$) obtenidos en el análisis cualitativo del Ensayo Cometa en células XRS-5 para el MIC y MIG.

Día (D) y dosis (d)	Células sin daño	Células con daño leve	Células con daño grave
D1 control negativo	81,91 ($\pm 0,99$) ^a	17,41 ($\pm 1,06$) ^a	0,66 ($\pm 0,49$) ^a
D1-d 100	68,91 ($\pm 1,73$) ^b	29,41 ($\pm 1,83$) ^b	1,66 ($\pm 0,85$) ^a
D10 control negativo	83,67 ($\pm 2,58$) ^a	15,83 ($\pm 2,14$) ^a	0,50 ($\pm 0,84$) ^a
D10-d 100	75,17 ($\pm 2,71$) ^b	15,83 ($\pm 2,14$) ^b	0,50 ($\pm 0,84$) ^b
D10-d 1000	65,75 ($\pm 1,73$) ^b	28,25 ($\pm 1,83$) ^b	6 ($\pm 0,85$) ^b
control positivo	20,15 ($\pm 2,35$) ^c	49,24 ($\pm 3,89$) ^c	30,61 ($\pm 3,19$) ^c

Figura 21. Promedios e intervalos de Bonferroni obtenidos para el número de células sin daño (Fig. 21a); con daño leve (Fig. 21b) y daño grave (Fig. 21c) en células XRS-5 para el MIC.

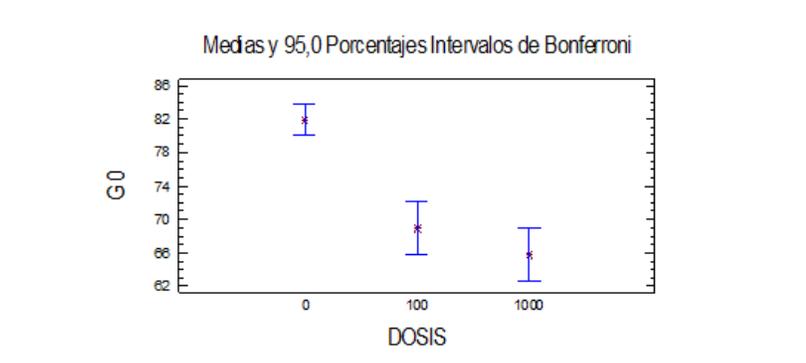


Fig. 21a

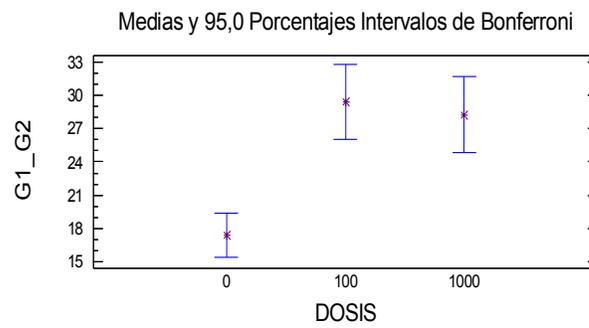


Fig. 21b

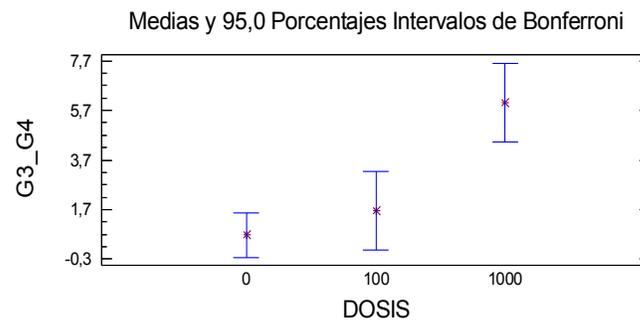


Fig. 21c

Figura 22. Promedios e intervalos de Bonferroni obtenidos para el número de células sin daño (Fig. 22a); con daño leve (Fig. 22b) y daño grave (Fig. 22c) en células XRS-5 para el MIG.

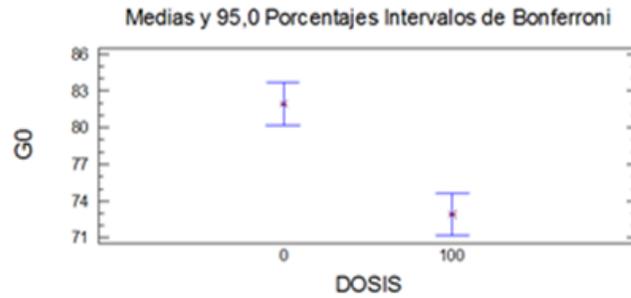


Fig. 22a

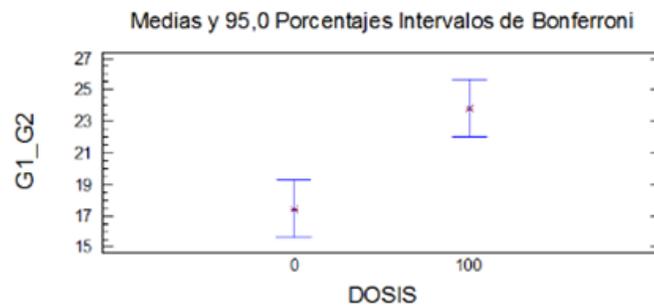


Fig. 22b

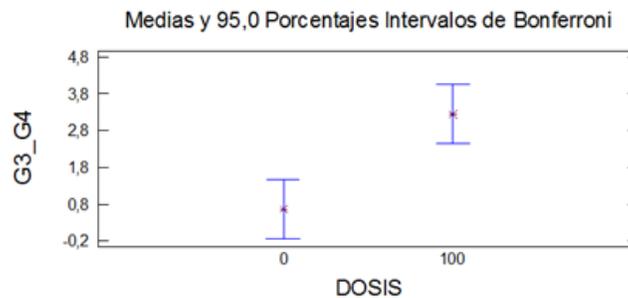


Fig. 22c

Ensayo cometa análisis cuantitativo

Al igual que para la línea CHO-K1, las imágenes fueron procesadas con el programa CASP para la obtención de los tres parámetros seleccionados (% de ADN en la cola del cometa, longitud de la cola del cometa y Olive Tail Moment). A su vez, para cada uno de estos parámetros se calculó el rango, el promedio y la mediana en cada uno de los puntos experimentales.

Los resultados obtenidos para los distintos parámetros se resumen en las Tablas 12, 13 y 14.

Tabla 12. Resumen de datos obtenidos para el % de ADN en la cola del cometa en cada uno de los puntos experimentales en células XRS-5 para el MIC y el MIG.

Día-dosis (D-d)	Células analizadas	Rango	Mediana
D1-Control neg.	152	0,000-65,74	0,15
D1-d 100	123	0,00412388-51,99	0,91
D10- Control neg.	142	0,00146065-79,47	0,40
D10-d 100	123	0,00412388-51,99	0,91
D10-d 1000	135	0,00337808-81,34	3,05

Tabla 13. Resumen de datos obtenidos para el largo de la cola del cometa en cada uno de los puntos experimentales en células XRS-5 para el MIC y el MIG.

Día-dosis (D-d)	Células analizadas	Rango	Mediana
D1- Control neg.	152	3-108	6
D1-d 100	123	3-139	10,5
D10- Control neg.	142	3-155	5
D10-d100	56	3 - 210	7
D10-d1000	135	3-176	15

Tabla 14. Resumen de datos obtenidos para el OTM en cada uno de los puntos experimentales en células XRS-5 para el MIC y MIG.

Día-dosis (D-d)	Células analizadas	Rango	Mediana
D1- Control neg.	152	0,00051-28,88	0,5560
D1-d 100	123	0,00217-42,36	0,3361
D10- Control neg.	142	0,00083-59,06	0,1001
D10-d100	56	0,00054-84,82	0,1620
D10-d 1000	135	0,00136-65,01	0,8912

Debido a que los datos obtenidos no seguían una distribución de tipo normal, se utilizaron las medianas de cada uno de los parámetros a fin de realizar un Contraste de Kruskal-Wallis para cada una de las comparaciones establecidas.

Al realizar el contraste de medianas inmediatamente después de la primera exposición a la radiación, las diferencias resultaron significativas desde el punto de vista estadístico para los tres parámetros analizados ($p < 0,001$) y para ambos modelos.

Al realizar los contrastes el último día del protocolo y comparar los resultados obtenidos en las poblaciones irradiadas respecto de sus controles, los resultados mostraron diferencias según se trate de un modelo u otro. En este sentido, al realizar la comparación para el MIG estas diferencias no resultan significativas para ninguno de los tres parámetros analizados; mientras que, contrariamente, en el MIC todos los parámetros mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto de sus controles no irradiados.

En el MIC, a diferencia de lo observado en la línea parental, la comparación entre la población irradiada el primer día del protocolo con aquella irradiada en el último día, ha resultado estadísticamente significativa en dos de los tres parámetros: % de ADN en cola y OTM ($p < 0,05$ en ambos casos). Mientras que en el MIG no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las tres medidas

al comparar la población inmediatamente después de la irradiación y transcurridos los diez días del diseño experimental.

Estos resultados se resumen en la Tabla 15 y se ilustran en la Figura 23.

Tabla 15. Contraste de Kruskal-Wallis para las medianas de los tres parámetros establecidos en células XRS-5 para el MIC y el MIG.

Contraste Analizado: Día dosis/Día dosis (Dd/ Dd)	% de ADN	Longitud	OTM
D1 d 0/D1 d 100	p<0,001	p<0,001	p<0,001
D1 d 0/D10 d 0	p>0,05	p>0,05	p>0,05
D10 d 0/D10 d 100	p>0,05	p>0,05	p>0,05
D10 d 0/D10 d 1000	p<0,001	p<0,001	p<0,001
D1 d 100/D10 d 100	p>0,05	p>0,05	p>0,05
D1 d 100/D10 d 1000	p<0,05	p>0,05	p<0,05

Figura 23. Comparación de las medianas obtenidas para el % de ADN en cola (Fig. 23a), longitud de la cola del cometa (Fig. 23b) y OTM (Fig. 23c) en células XRS-5 para el MIC y el MIG.

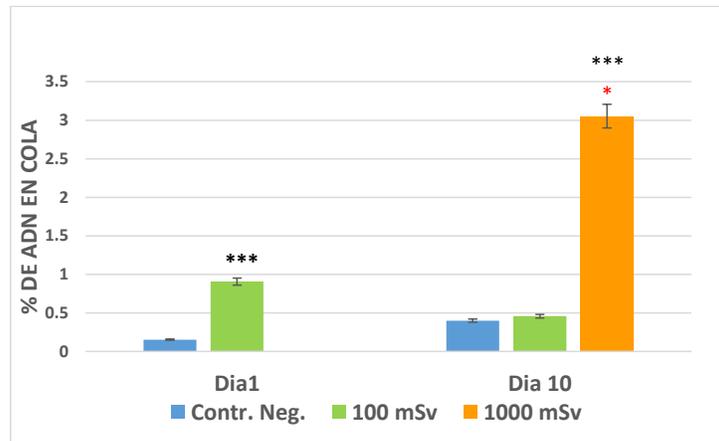


Fig. 23a

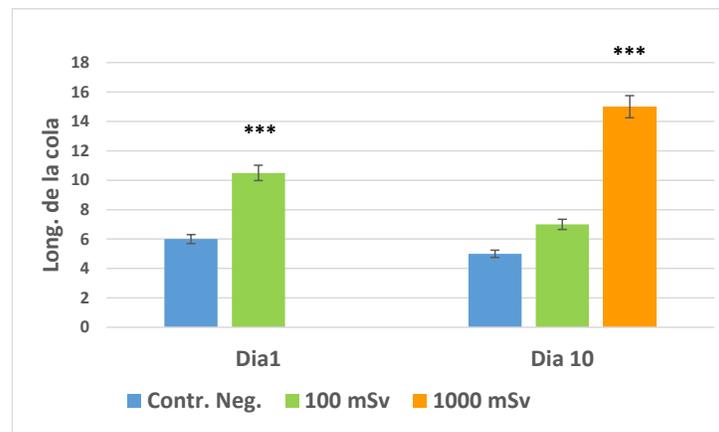


Fig. 23b

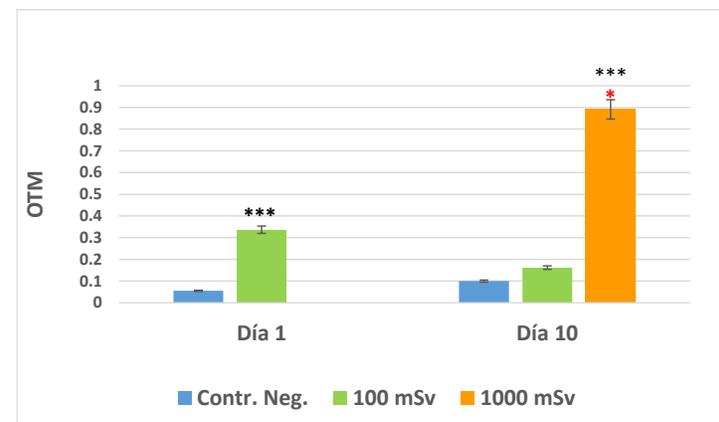


Fig. 23c

Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis

A fin de medir el daño a nivel cromosómico inducido por la radiación, se contabilizó la frecuencia de micronúcleos (MN), puentes nucleoplásmicos (NPBs) y brotes nucleares (NBUDs) en 1000 células binucleadas (BN).

Si bien la frecuencia de MN no presentó efectos atribuibles a la variable día en ninguno de los dos modelos, se ha evidenciado un aumento significativo de este parámetro en todos los casos como resultado de la exposición a la radiación.

Los cultivos irradiados exhibieron un aumento de daño estadísticamente significativo respecto de los controles en el día 1 ($p < 0,05$), pero al realizar los contrastes al finalizar el protocolo, los resultados difieren según el modelo estudiado.

En este sentido, en el MIG, la frecuencia de MN en células BN disminuyó levemente al cabo de los diez días del diseño experimental, aunque no de manera significativa. Esta leve disminución resultó en una población celular con una frecuencia de CB con MN intermedia entre la frecuencia encontrada en las poblaciones controles y los resultados obtenidos inmediatamente después de la exposición a la radiación, aunque las diferencias no resultaron significativas.

Al analizar los resultados obtenidos en el MIC, la frecuencia de CB con MN de la línea deficiente en reparación por NHEJ aumentó en forma estadísticamente significativa al final del protocolo. A diferencia de lo observado en la línea parental, en donde no se han encontrado diferencias al comparar las dosis utilizadas, en esta línea celular deficiente en el mecanismo de reparación por unión de extremos no homólogos, el incremento en el daño fue estadísticamente significativo tanto respecto de su control ($p < 0,001$) como de la frecuencia observada luego de la primera exposición ($p < 0,01$).

Al analizar los NPBs los cultivos irradiados presentaron un aumento significativo de puentes respecto de sus controles ($p < 0,01$ para el día 1 dosis final 100 mSv; y $p < 0,05$ para el día 10 dosis final 1000 mSv), aunque no entre las dos dosis utilizadas.

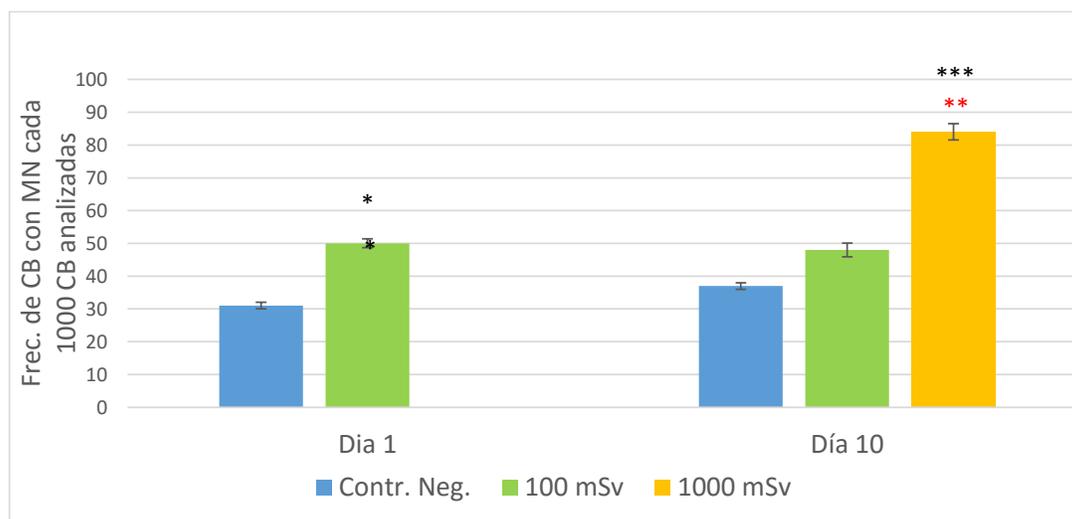
Finalmente, la existencia de NBUDs no se observó en ninguno de los tratamientos realizados.

En la Tabla 16 y en la Figura 24 se resumen e ilustran, los resultados obtenidos para este ensayo.

Tabla 16. Promedio de frecuencias porcentuales de MN ($\% \pm \text{EE}$) en 1000 CB en células XRS-5 para el MIC y el MIG.

		Día1	Día 10
Control negativo		31($\pm 0,66$)	37($\pm 0,42$)
Irradiadas	100 mSv	50($\pm 1,35$)*	48($\pm 1,96$)
	1000 mSv		84($\pm 2,06$)*****
Control positivo		107($\pm 2,73$)	121($\pm 2,49$)

Figura 24. Comparación de las frecuencias de MN en 1000 CB en células XRS-5 para el MIC y el MIG.



Análisis de células apoptóticas

La frecuencia de células Anexina V positivas luego de la primer irradiación en la línea celular XRS-5 reflejó un aumento no significativo respecto de su control no irradiado.

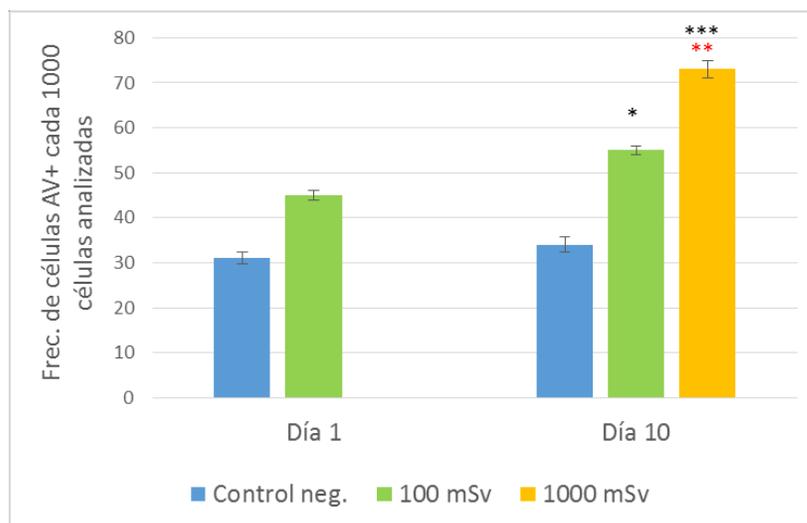
Al finalizar el protocolo en ambos diseños experimentales se observó un aumento de este parámetro que resultó significativo respecto de la población control en ambos casos ($p < 0,001$ para el MIC y $p < 0,05$ para el MIG); pero sólo en el MIC adquirió una relevancia significativa ($p < 0,01$).

Los promedios de los resultados observados en las tres tandas experimentales para la prueba de Anexina V (AV+) se resumen en la Tabla 17 y se ilustran en la Figura 25.

Tabla 17. Promedio de frecuencias porcentuales (\pm EE) de células AV+ en 1000 células XRS-5 para MIC y el MIG.

		Día1	Día 10
Control negativo		31 (\pm 1,32)	34 (\pm 1,67)
Irradiadas	100 mSv	45 (\pm 1,12)	55 (\pm 1,32)
	1000 mSv	-----	73 (\pm 1,98)****
Control positivo		60 (\pm 2,55)***	65 (\pm 2,01)***

Figura 25. Comparación de las frecuencias de células AV+ en 1000 células XRS-5 para el MIC y el MIG.



V.3. Comparación entre líneas celulares para MIC

Se realizó la comparación de los resultados obtenidos para cada uno de los biomarcadores utilizados entre las líneas celulares CHO-K1 y XRS-5. Para tal fin, se utilizó la Prueba de X^2 .

Ensayo cometa análisis cualitativo

Al procesar los datos por medio de un análisis de varianza multifactorial se han encontrado efectos significativos atribuibles a la variable línea ($p < 0,001$).

Ambas líneas presentaron un comportamiento similar para el ID, aunque las células XRS-5 mostraron valores mayores para la dosis de 1000 mSv sin ser las diferencias estadísticamente significativas. Tampoco lo fueron cuando se comparó la dosis final con su correspondiente control.

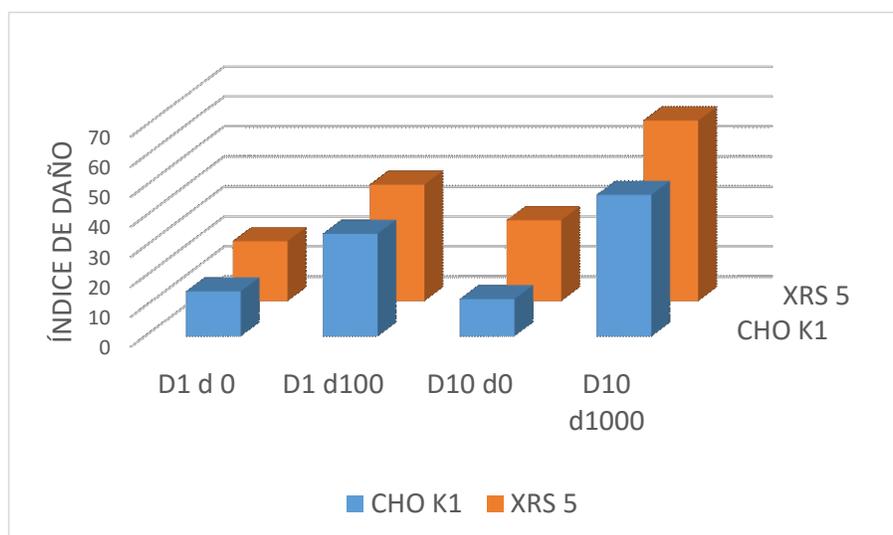


Figura 25: Comparación del ID entre ambas líneas celulares para el MIC.

Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis

En el análisis de la frecuencia de MN ocurrió algo similar a lo observado para el EC. Las células XRS-5 presentaron mayor proporción de daño, aunque en este caso al realizar las comparaciones estadísticas entre ambas líneas las diferencias resultaron significativas ($p < 0,001$ para la comparación del D10 con el D1; $p < 0,001$ para la comparación del D10 con el control D10). La comparación de la frecuencia de MN se ilustra en la Figura 27.

Figura 27: Comparación de la frecuencia de MN entre ambas líneas celulares para el MIC. Comparación de ambos días analizados, con sus respectivos controles (Fig. 27a). Gráfico de tendencias a lo largo del protocolo (Fig. 27b).

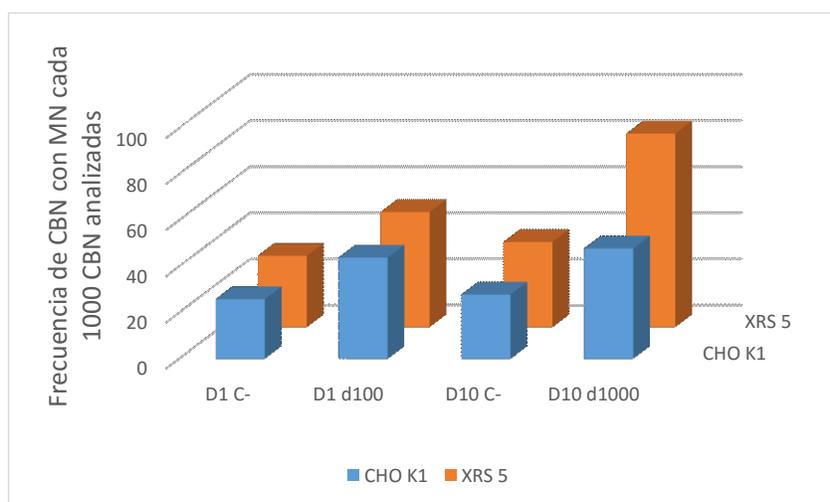


Fig. 27a

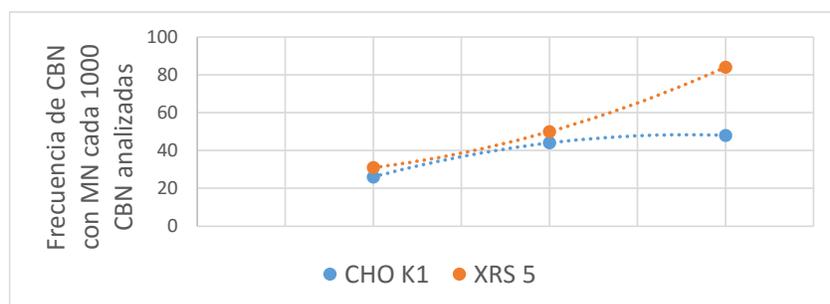


Fig. 27b

Análisis de células apoptóticas

En el caso del análisis de apoptosis temprana se observó la misma situación que para la frecuencia de MN. Las células XRS-5 mostraron una frecuencia mayor de células apoptóticas el D10 respecto tanto del D1 como del control del D10 ($p < 0,001$ y $p < 0,01$, respectivamente). La comparación de la frecuencia de células AV+ se ilustra en la Figura 28.

Figura 28: Comparación de la frecuencia de AV+ entre ambas líneas celulares para el MIC. Comparación de ambos días analizados, con sus respectivos controles (Fig. 28a). Gráfico de tendencias a lo largo del protocolo (Fig. 28b).

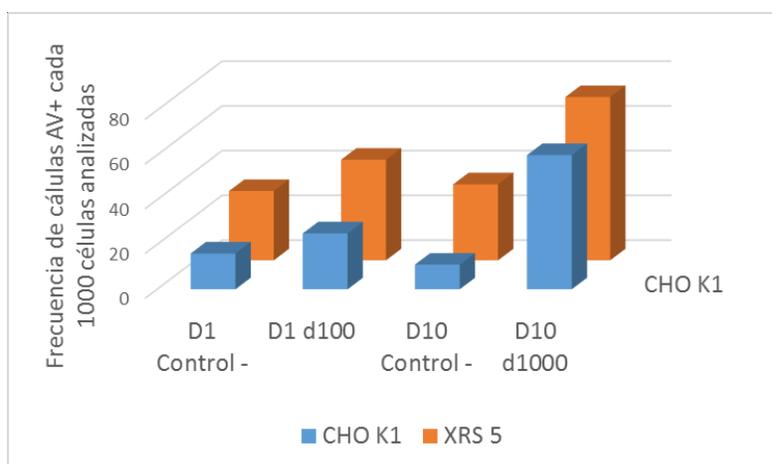


Fig. 28a

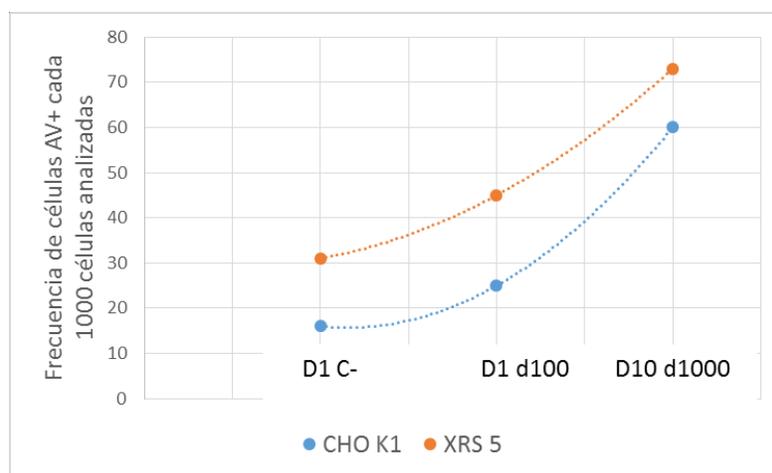


Fig. 28b

V.4. Comparación entre líneas celulares para MIG

Se realizó la comparación de los resultados obtenidos para cada uno de los biomarcadores utilizados entre las líneas celulares CHO-K1 y XRS-5. Para tal fin, se utilizó la Prueba de X^2 .

Ensayo cometa análisis cualitativo

Como puede observarse en la Figura 23, el comportamiento de ambas líneas con respecto al ID entre las células irradiadas al inicio y al final del protocolo fue similar desde el punto de vista estadístico no encontrándose diferencias significativas entre los resultados.

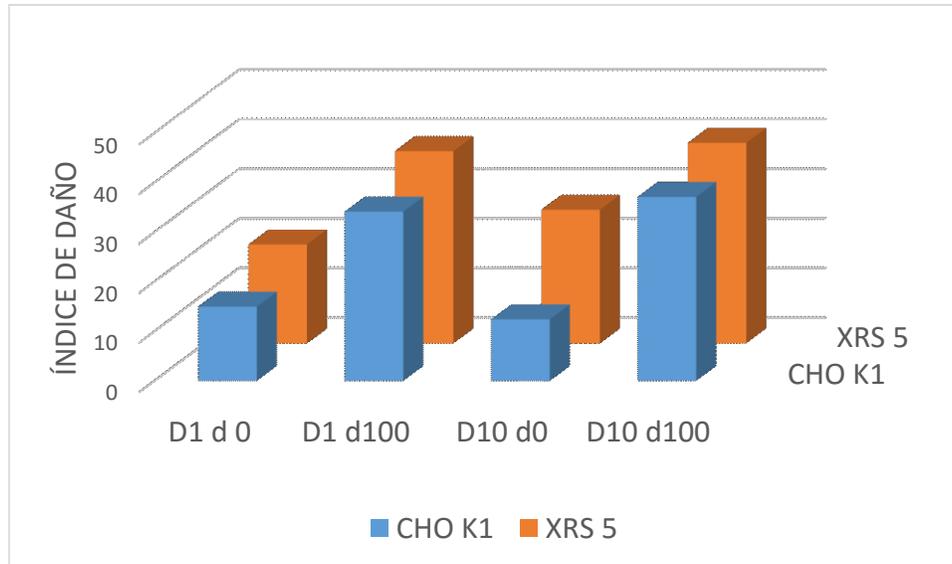


Figura 29: Comparación del ID entre ambas líneas celulares para el MIG.

Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis

El comportamiento de ambas líneas con respecto a la frecuencia de MN entre las células irradiadas al inicio y al final del protocolo fue similar desde el punto de vista estadístico. El comportamiento para este biomarcador en ambas líneas celulares puede observarse en la Figura 30.

Figura 30: Comparación de la frecuencia de MN entre ambas líneas celulares para el MIG. Comparación de ambos días analizados, con su respectivos controles (Fig 30a). Gráfico de tendencias a lo largo del protocolo (Fig.30b).

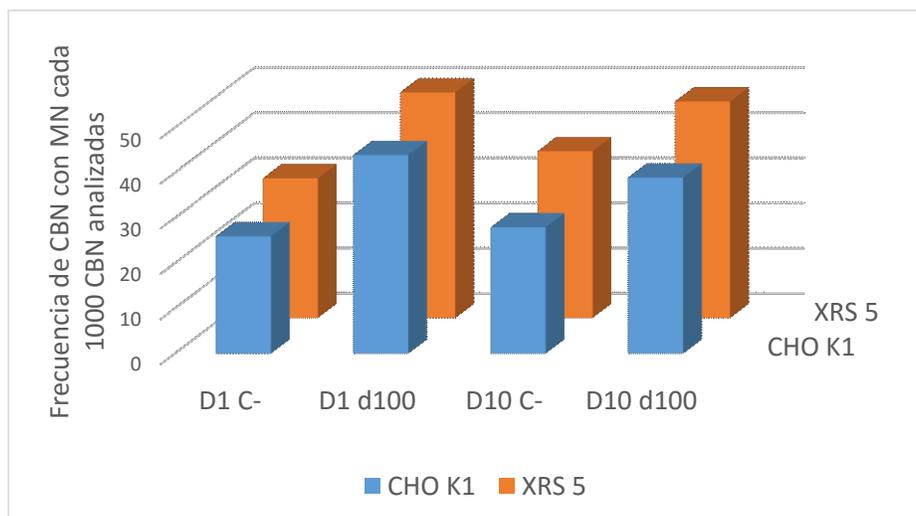


Fig. 30a

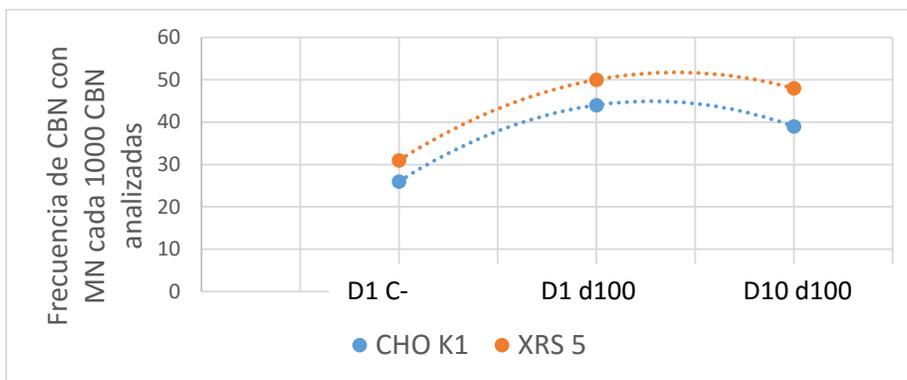


Fig. 30b

Análisis de células apoptóticas

En el caso de la frecuencia de células AV+ los resultados encontrados para ambas líneas celulares fueron diferentes, demostrándose significancia estadística entre ellos. Esta comparación se ilustra en la Figura 31.

Figura 31. Comparación de la frecuencia de AV+ entre ambas líneas celulares para el MIG. Comparación de ambos días analizados, con sus respectivos controles (Fig 31a). Gráfico de tendencias a lo largo del protocolo (Fig.31b).

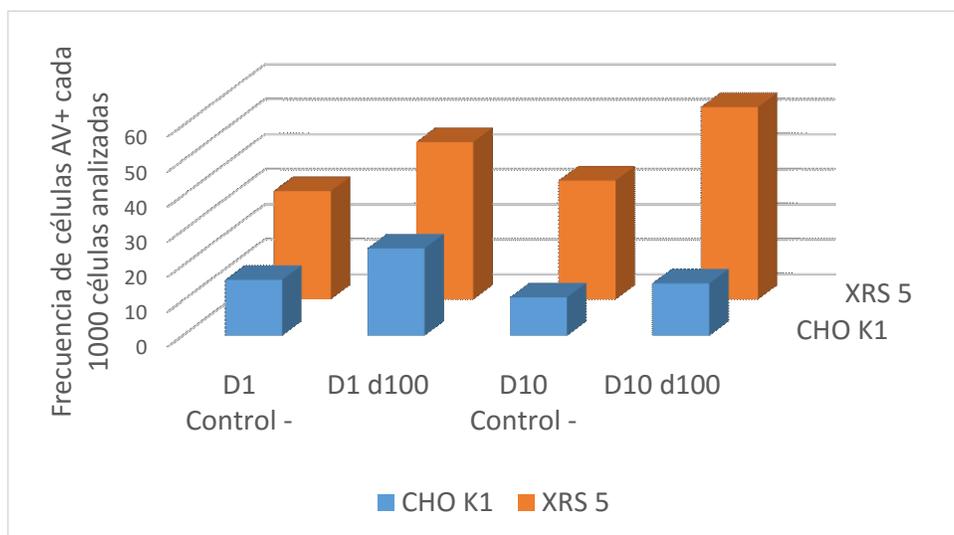


Fig. 31a

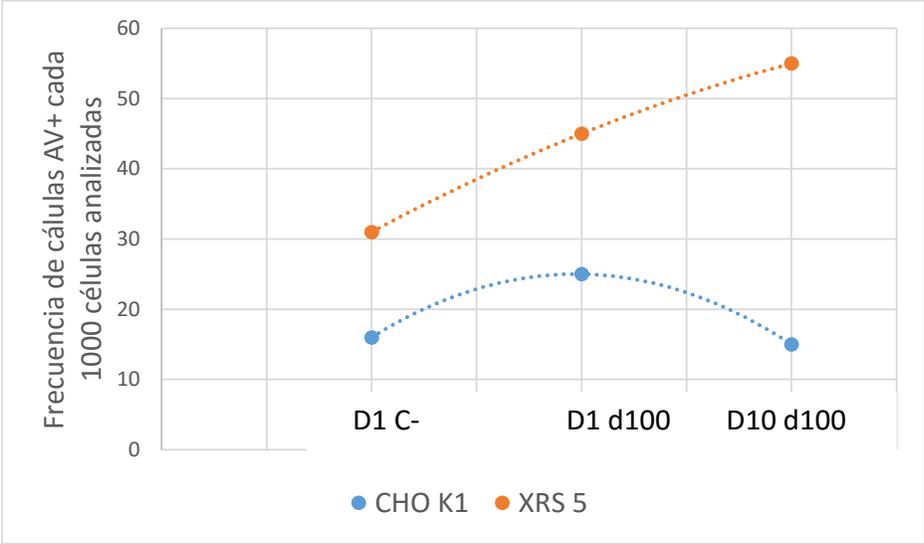


Fig. 31b

Capítulo VI

DISCUSIÓN

VI.1. Consideraciones generales

La materia viva está permanentemente expuesta a RI, ya sea por fuentes naturales como por fuentes de origen antropogénico. Por tal motivo, constituye en la actualidad una parte del medioambiente en la cual el hombre moderno debe desarrollar su vida cotidiana. El daño producido por la radiación en los sistemas biológicos está determinado por una suma de factores, tales como el tipo de radiación, el total de la dosis recibida, la tasa de dosis y el tipo celular que recibe la radiación, entre otros.

A pesar de que está bien establecido que la exposición a dosis altas puede causar diferentes enfermedades, siendo quizá el riesgo a desarrollar cáncer el de mayor importancia para la salud humana; el riesgo asociado a la exposición a DBRI, no ha sido hasta el momento totalmente elucidado a pesar de que sean realizado numerosos esfuerzos por llegar a responder este interrogante. La mayoría de los trabajos realizados en este rango de dosis, (0-200 mSv) se basaron en poblaciones crónicamente expuestas en las cuales la respuesta observada corresponde a la de un organismo en su totalidad y, por lo tanto, resulta difícil poder discriminar lo que ocurre a nivel celular. Por otra parte, al trabajar con seres humanos resulta muy difícil abstraer del análisis muchos factores de confusión, tales como la exposición a otros agentes genotóxicos, la concentración de ciertos micronutrientes, la ingesta de medicamentos y la presencia de enfermedades, entre otros (Mothersill y Seymour, 2014). Así, el desarrollo de un modelo *in vitro* con condiciones controladas y estandarizadas que intente reproducir esta exposición, disminuyendo al máximo las variables intervinientes en la respuesta a la radiación, resultaría de gran utilidad como herramienta de investigación a la hora de dilucidar la respuesta celular a este agente.

Cuando la materia viva se expone a radiación ionizante una de las consecuencias más importantes es la ocurrencia de daño en el ADN. Dentro de las lesiones que la RI puede ocasionar en esta macromolécula las rupturas de cadena doble son hasta el momento, consideradas las más peligrosas para la salud humana, debido a su extrema correlación con los procesos de mutagénesis, carcinogénesis y tumorigénesis (Lees-Miller y Meek, 2003; Gollin, 2005; Jackson y Bartek, 2009;

Rothkamm y Prise, 2009; Hartlerode y Scully, 2009; Kass y Jasin, 2010; Bajinskis et al., 2013).

Si bien las células cuentan con mecanismos de defensa contra los agentes genotóxicos, como puede ser la RI, estos pueden fallar o incluso muchas veces saturarse resultando inevitable la producción del daño en el ADN. En este sentido, una vez que el daño ha ocurrido, la célula debe ser capaz de frenar su ciclo de división a fin de repararlo y evitar que sea transmitido a la progenie. A lo largo de la evolución han surgido en los seres vivos, mecanismos que cumplen con estas funciones. Así, las células de los mamíferos cuentan con mecanismos celulares que cumplen funciones específicas, constituyendo vías independientes pero intercomunicadas. En este contexto, podemos mencionar algunos que alertan a la célula del estado general de su genoma, mientras que otros son los encargados de la reparación del mismo.

Actualmente, se propone que todas las células de los mamíferos cuentan básicamente con dos mecanismos de reparación de las DSBs, la recombinación homóloga (HR) y la unión por extremos no homólogos (NHEJ) (Limoli, 2004; Lees-Miller y Meek, 2003; Jeggo y Lobrich, 2005; Beucher et al., 2009, Kass y Jasin, 2010). En éste último caso, la proteína Ku80 ha sido reconocida durante muchos años como un componente clave de la maquinaria proteica para la reparación por NHEJ (Wang et al., 2006; Illiakis, 2009; Mladenov y Illiakis, 2011; Manova et al., 2012; Palmitelli et al., 2015).

En este contexto, para el desarrollo de esta tesis doctoral se utilizaron dos líneas celulares provenientes de ovario de hámster chino: una línea parental, CHO-K1, y una línea derivada, XRS-5, deficiente para la proteína Ku80. Se desarrollaron dos modelos en forma simultánea con cada una de estas líneas celulares: uno en el cual se avaluó la exposición crónica a dosis bajas de radiación ionizante (MIC) en el que los cultivos recibieron una dosis final de 1000 mSv (1Sv); y otro en el cual se evaluó el efecto de la inestabilidad genómica radioinducida (MIG), en el que los cultivos recibieron una dosis final de 100 mSv de rayos X. En ambos modelos, el daño en el ADN se cuantificó tanto al inicio como al finalizar el protocolo.

Si bien, como se mencionó en el apartado de Materiales y Métodos, el Ensayo Cometa en su versión alcalina, resulta en la actualidad una herramienta muy valiosa a la hora de detectar y cuantificar las lesiones impartidas sobre el ADN, esta técnica reviste algunas limitaciones que deben ser consideradas a la hora de discutir los resultados obtenidos. De esta manera, la principal limitante encontrada hasta el momento para esta metodología radica en la imposibilidad de poder discriminar los diferentes tipos de lesiones de la hebra de ADN. Por ello, en la presente tesis doctoral esta técnica fue realizada conjuntamente con el ensayo de CBMN, a fin de corroborar la presencia de fracturas de doble cadena. Por otra parte, resulta interesante resaltar que, si bien el EC en su versión alcalina permite detectar los entrecruzamientos de cadena (Olive, 1996; Pfuhrer y Wolf, 1996; Olive y Banath, 1997; Ward et al., 2000), lesión que resultaría en un acortamiento de las colas de los cometas, el análisis de las curvas de calibración de dosis respuesta de radiación parecería indicar que la radiación en sí misma no produciría este tipo de lesión en el ADN (Olive, 1995).

Como fuera descrito en la metodología, un micronúcleo puede estar constituido por un fragmento cromosómico acéntrico o bien por un cromosoma completo, el cual no queda incluido en ninguno de los dos núcleos principales luego de la duplicación del ADN y la división nuclear. Desde hace ya algunos años el desarrollo de esta técnica conjuntamente con la utilización de marcadores, tal como la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) con sondas centroméricas, ha permitido la distinción entre micronúcleos originados por ruptura cromosómica (centrómero negativos) de aquellos formados por pérdida cromosómica (centrómero positivos), permitiendo por lo tanto discriminar entre procesos clastogénicos o aneugénicos, respectivamente (Touil et al., 2002, Sari-Minodier et al., 2007). Resulta importante destacar que si bien la incorporación de sondas en la metodología constituye una ventaja a la hora de discriminar entre uno u otro efecto del agente genotóxico, presenta en la actualidad la limitación del tipo celular a utilizar en el modelo experimental. Así, mientras que la utilización clásica de esta metodología puede ser extendida a cualquier tipo celular nucleado proveniente de diversas especies animales, muy por el contrario, la incorporación de sondas acotan el campo de investigación principalmente a

poblaciones humanas, ya que no se dispone de sondas comerciales para muchas especies animales.

En todos los casos, reviste particular importancia saber que, para observar el daño generado en una célula a través de este ensayo, es necesario que la misma complete al menos un ciclo de división celular luego de la exposición (Fenech y Morley, 1985a). Lógicamente, la frecuencia de MN decaerá a medida que una célula pase por sucesivas divisiones nucleares posteriores a la exposición al agente causante del daño. Consecuentemente, la comparación de la frecuencia de MN entre poblaciones celulares en división resultaría poco confiable a menos que la frecuencia de división nuclear posterior a la injuria sea idéntica en ambas poblaciones. En este sentido, como ya fuera mencionado, la incorporación de citocalasina B en esta metodología, constituye la principal ventaja del ensayo CBMN para la identificación confiable de células que han completado sólo una división nuclear, permitiendo así la comparación entre distintas poblaciones celulares.

Como fuera referido en la Introducción, tanto en células normales como tumorales, en modelos *in vivo* e *in vitro*, se han descrito diferentes tipos de muerte celular. De todos ellos, el modelo que hasta el momento ha presentado mayor asociación con la exposición a DBRI ha sido el de apoptosis y en segundo lugar el de autofagia. Adicionalmente, hay autores que postulan que la radiación podría inducir senescencia celular acelerada, un estado en el cual la célula permanece viable pero con sus funciones alteradas, dejando de ser competente para la proliferación celular (Muller, 2009). A diferencia de lo que ocurre con el arresto en el crecimiento en células quiescentes, las cuales podrían retomar su proliferación en respuesta a un determinado estímulo fisiológico, el arresto del crecimiento en células senescentes es esencialmente irreversible (Campisi et al., 2007). La exposición a RI ha demostrado causar un aumento en los niveles de senescencia acelerada en prácticamente todos los tipos celulares, incluso se ha propuesto que este mecanismo es la respuesta desencadenada por defecto en algunos tipos celulares en los que la senescencia acelerada ocurre con dosis más bajas que aquellas requeridas para la inducción de apoptosis (Panganiban et al., 2012).

La selección por parte de la célula del proceso que conlleva a un modo específico de muerte celular o senescencia, no ha sido aún claramente definido. Hoy en día muchas investigaciones concuerdan en que esta selección depende de diversos factores: la dosis de radiación, la tasa de dosis y múltiples aspectos del contexto celular (Rothkamm y Lobrich, 2003; Lindsay et al., 2007; Kapy et al., 2010; Surova et al., 2012; Kaliberov y Buchsbaum, 2012). Por su parte, dado que las vías autofágicas pueden funcionar removiendo los componentes celulares dañados y, a su vez, servir como mecanismo para una muerte celular programada, estas vías pueden paradójicamente permitir tanto un incremento en la supervivencia como en la muerte celular en respuesta a la RI, dependiendo principalmente del contexto celular (Denton et al., 2012; Yi et al., 2013; Palumbo y Comincini, 2013).

Dadas estas consideraciones, y dado que se trata de uno de los mecanismos que reviste mayor interés biológico con respecto a los efectos de la exposición a DBRI (Waters et al., 2013), se consideró oportuna la elección del análisis de este tipo de muerte celular para el desarrollo del presente plan de tesis doctoral.

Si bien la inducción de apoptosis podría evaluarse a través del ensayo cometa (Singh, 1994) o del test de micronúcleos (Fenech, 2007) estas metodologías presentan algunas limitaciones a la hora de ser utilizadas con este propósito. Collins (2004) sostiene que cuando la célula presenta casi la totalidad de su ADN en la cola del cometa es altamente probable que en ella ocurra una muerte celular programada; pero estas células no pueden contabilizarse como apoptóticas por dos razones: 1) aún cuando las células poseen su ADN altamente dañado, muchas veces tienen la posibilidad de repararlo; 2) la apoptosis se caracteriza por la fragmentación del ADN en fragmentos del tamaño de oligómeros nucleosómicos. Estos pequeños fragmentos desaparecerían durante la lisis o la electroforesis. Así, el hecho de poder visualizar en el microscopio un pequeño porcentaje de fluorescencia normal del ADN, podría representar un residuo de ADN de alto peso molecular, no concordante con lo esperado para las células apoptóticas.

Teniendo en cuenta estas limitaciones, para la cuantificación de células vehiculizadas a apoptosis por exposición a DBRI en el presente plan de tesis ha sido

seleccionada la tinción de estas células con la proteína Anexina V conjugada con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) detectable por microscopía de fluorescencia. La técnica de Anexina V-FITC se fundamenta en la capacidad que tiene la proteína Anexina V de unirse a determinados fosfolípidos de membrana que en condiciones normales se encuentran en la cara interna de la misma pero que se evierten en condiciones de apoptosis temprana. De todos modos, es importante tener en cuenta que en la actualidad se considera que la externalización de los fosfolípidos de membrana no es considerado un punto de no retorno del proceso de muerte celular, ya que una vez disminuidos o desaparecidos los factores de “peligro” para la integridad celular este fenómeno de eversión podría revertirse.

VI.2. Modelo de Irradiación Crónica (MIC)

Análisis al inicio del MIC

Al analizar los resultados obtenidos inmediatamente después de la primera irradiación, se observa que una sola exposición a 100 mSv de RX es capaz de generar un daño en el ADN. Este hecho se manifiesta de manera estadísticamente significativa, para el aumento tanto del ID como de la frecuencia de MN en ambas líneas celulares. Es importante destacar que al inicio del diseño experimental, podría afirmarse que el daño observado corresponde a una imagen instantánea luego de la exposición. Bajo esta premisa, debido a la inmediatez entre la irradiación y el análisis realizado, se asume que no ha sido posible la intervención de los mecanismos de reparación que podrían estar atenuando el daño, como así tampoco de los efectos indirectos asociados a la RI que, contrariamente, podrían estar potenciando el mismo. Así, si bien el número de células con su ADN dañado aumenta en forma estadísticamente significativa inmediatamente luego de la primera exposición en ambas líneas celulares, el grado de daño observado es casi exclusivamente de tipo leve (grados 1 y 2).

En este punto el comportamiento fue similar en ambas líneas celulares y concordante tanto con resultados anteriores encontrados por nuestro grupo de trabajo

para dosis inferiores de rayos X (de 2,5 a 10 mSv) en la línea celular CHO-K1 (Güerci et al., 2004 y 2005); como con resultados obtenidos por otros autores quienes hallaron daño en el ADN luego de la exposición a dosis de 50 mSv de radiación ionizante en otros tipos celulares (Vijayalaxmi et al., 1993; Wojewodzka et al., 1998; Rothkamm y Löbrich, 2003; Sudprasert et al., 2006).

El análisis cuantitativo del Ensayo Cometa ha arrojado resultados similares para ambas líneas celulares, evidenciando un aumento estadísticamente significativo, en la mayor parte de los casos, para el daño en el ADN en los tres marcadores seleccionados: % de ADN en la cola de los cometas, largo de la cola y Olive Tail Moment (OTM). En este caso, se torna dificultosa la comparación con los resultados obtenidos por otros investigadores, ya que no se han encontrado trabajos con dosis bajas de radiación ionizante que hayan utilizado los parámetros cuantitativos aquí seleccionados.

Si bien, como se mencionó al inicio de este apartado, este aumento en los marcadores puede deberse a una fuente variada de lesiones en la hebra de ADN, el análisis conjunto de los resultados obtenidos con el EC y con el CBMN permiten sugerir que, al menos en cierta medida, el daño observado a través de estos biomarcadores corresponde a la presencia de rupturas de cadena doble.

Por otra parte, debido a que en la presente tesis no han sido utilizados marcadores que determinen la naturaleza de los MN encontrados no podemos, en principio, descartar la posibilidad de que el MN esté formado por un cromosoma completo. De todas formas, dada la dosis utilizada y al complementar los resultados obtenidos en este ensayo con el incremento del daño en el ADN medido a través del EC, podría sugerirse la presencia de un efecto clastogénico de la radiación ionizante en este modelo. Este tipo de lesiones podría deberse a la acción directa de la radiación o haberse ocasionado como consecuencia de la amplificación de rupturas de cadena simple (SSBs) en células que han pasado por un período de división celular, convirtiendo así una SSBs en una DSBs.

Es importante destacar que cuando se analiza el daño ocasionado en la hebra de ADN inmediatamente después de la exposición a la radiación los resultados son

semejantes tanto en la línea CHO-K1, como en su línea derivada carente de la proteína Ku80 (XRS-5).

Hasta aquí los datos obtenidos concuerdan con los resultados hallados por Rothkamm y Löbrich en 2003, quienes compararon el daño en el ADN instaurado por dosis bajas de rayos X en dos líneas celulares, una proficiente en NHEJ (MRC-5) y una deficiente para este mecanismo de reparación (180BR). Estos autores, a través de la detección de focos de histona demostraron que, al menos en estos rangos (entre 1 y 200 mGy) de dosis de rayos X, el daño en el ADN es independiente de su capacidad de reparación por NHEJ.

Al estudiar los resultados hallados para el recuento de células vehiculizadas a apoptosis, inmediatamente después de la primera irradiación, los resultados obtenidos en ambas líneas celulares han sido semejantes. En la línea celular CHO-K1, no se han hallado diferencias estadísticamente significativas entre el control negativo y las células irradiadas; mientras que en la línea XRS-5, se encontró un aumento pequeño pero no significativo en la población que recibió 100 mSv de rayos X respecto de la población utilizada como control. Este resultado es el esperado debido al poco tiempo transcurrido desde el momento en que las células fueron expuestas a la radiación y el momento en el que se realizó la marcación. La apoptosis debe ser considerada como un proceso y, si bien la externalización de la membrana plasmática es un evento considerado temprano dentro de este proceso, no es inmediato. De este modo, podría considerarse que los resultados encontrados aquí, están relacionados con el momento en que se llevó a cabo el análisis, ya que no transcurrió un lapso de tiempo suficiente como para que el proceso de apoptosis llegue, en caso de haberse desencadenado, al punto de la eversión de los fosfolípidos de membrana.

Análisis al final del MIC

Al analizar la respuesta celular a lo largo del tratamiento crónico, cabe plantearse una serie de preguntas relacionadas no solamente con las características cuali y cuantitativas del daño observado, sino también con la respuesta celular al

mismo. En este sentido, se torna importante conocer si el daño generado en la primera irradiación es detectado por la célula siendo, por lo tanto, capaz de desencadenar una respuesta, como por ejemplo detener el ciclo celular para una posterior reparación del material genético. Por el contrario, si no fuera detectado la célula podría continuar multiplicándose, sufriendo muy probablemente cambios en la secuencia de su ADN y evidenciando finalmente un efecto mutagénico.

Cuando se analizan las células que llegaron hasta el D10 del diseño experimental pueden considerarse dos aspectos. Por un lado, la comparación entre los cultivos no irradiados en ambos puntos muestrales, lo cual permite inferir el estado de “salud” de la población celular. Por otro lado, la comparación entre las células irradiadas al principio y al final de los 10 días de cultivo, lo cual permite inferir el efecto de la irradiación crónica.

El hecho de no haber encontrado diferencias significativas entre el D1 y el D10 en los cultivos utilizados como controles negativos de ambas líneas celulares, evidencia la integridad de ambas a lo largo de todo el período experimental. Teniendo en cuenta este hecho, podría sostenerse que el daño en el ADN encontrado en el D10 con una dosis final de 1000 mSv, tanto en la línea celular CHO-K1 como en la línea XRS-5, es resultado de la irradiación y no de una inestabilidad intrínseca de las líneas celulares utilizadas.

Al analizar los resultados obtenidos en el D10 es importante recordar la multiplicidad de factores que estarían interactuando en la respuesta celular a la radiación, ya que ellos podrían tanto potenciar como atenuar el daño instaurado a lo largo del diseño experimental más allá de la dosis final que hayan recibido las poblaciones celulares.

En la línea celular CHO-K1 no se han observado diferencias estadísticamente significativas, con ninguna de las técnicas, al comparar el daño en el ADN luego de la primera irradiación (d100) con aquel encontrado luego de la última irradiación (d1000). Los resultados obtenidos concuerdan con el comportamiento que podría esperarse para esta línea celular debido a que la misma dispone de toda la maquinaria enzimática necesaria para detectar el daño en el ADN y repararlo. Podríamos asumir así, en

primera instancia, que el daño fue suficiente para ser detectado por la maquinaria enzimática celular, y en segunda instancia, que el plazo de 24 hs transcurrido entre las sucesivas irradiaciones ha sido suficiente para reparar el daño instaurado luego de cada una de las exposiciones. De este modo, podría sugerirse que el daño observado en el D10 correspondería básicamente al ocurrido durante la última irradiación. En este punto los datos obtenidos también concuerdan con aquellos encontrados por Rothkamm y Lobrich en el año 2003, en otras líneas celulares que no tienen comprometidos sus mecanismos de reparación del ADN que fueron expuestas crónicamente a dosis bajas de rayos X (1,2; 5; 20 y 200 mGy).

Contrariamente a lo observado en la línea parental, las células de la línea XRS-5 mostraron un comportamiento diferente a lo largo de todo el diseño. Al analizar y comparar la población celular luego de la primera irradiación y luego de la última, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas, tanto con el EC cualitativo y cuantitativo como con el ensayo CBMN. Así, al realizar el análisis de los resultados obtenidos con el EC, se evidenciaron comportamientos muy interesantes, ya que al comparar la cantidad de células con su ADN intacto (grado 0) no se observaron diferencias entre la primera irradiación y la última. Ahora bien, cuando se analizaron las células que poseen su ADN dañado se observó que el daño fue mayor el D10 (d 1000) respecto del D1 (d 100). Se observaron diferencias significativas entre los ID y entre la proporción de células con grado 3 y 4 de daño en el ADN. Mientras que por medio del análisis cuantitativo, se observaron diferencias estadísticamente significativas en dos de los tres parámetros analizados (% de ADN en cola y OTM). Otro factor interesante a destacar en este punto en particular, es que no se han encontrado diferencias significativas en la longitud de las colas de los cometas. Así, podría inferirse que, si bien ha aumentado la cantidad de fragmentos de ADN, no ha habido cambios significativos en el tamaño de los mismos.

El aumento significativo en la frecuencia de MN asociado a los cambios encontrados a través del ensayo cometa podría estar sugiriendo un aumento en la frecuencia de las rupturas de cadena doble surgidas como resultado de la irradiación crónica a lo largo de todo el diseño experimental y a la imposibilidad de repararlas

debidamente. De esta manera, se pone de manifiesto la importancia del mecanismo de reparación por NHEJ y, consecuentemente, de la proteína Ku80 en la reparación del daño en el ADN por exposición a dosis bajas de radiación ionizante. Entre las causas del efecto clastogénico observado por este ensayo, podría incluirse la oxidación de una base del ADN que ha comenzado a repararse por BER, generando una ruptura de cadena simple, que luego al replicarse el ADN se convierte en una de cadena doble, produciendo un fragmento que queda luego rezagado. Este hecho puede considerarse plausible en las células XRS-5 debido a que carecen de una proteína fuertemente involucrada en el principal mecanismo de reparación de rupturas de cadena doble.

De todos modos, sea cual fuere la constitución de estos MN, es importante resaltar que en la línea celular XRS-5, este resultado podría corresponderse básicamente a dos situaciones. La primera explicación podría sustentarse en el fenómeno denominado “senescencia celular acelerada” (Müller, 2009), un estado en el cual la célula permanece viable pero no competente para su proliferación; lo cual llevaría a un incremento de los niveles de daño como consecuencia de las sucesivas irradiaciones. Otra explicación podría estar sustentada en una falla de los mecanismos celulares responsables de detener el ciclo celular, permitiendo por lo tanto a las células continuar dividiéndose a pesar del daño en su ADN. Esta segunda explicación parecería más apropiada, debido a que a lo largo del protocolo el ciclo celular no se vio alterado.

A diferencia de lo observado a través de las técnicas utilizadas para medir el daño en el material genético, al analizar los resultados obtenidos con el ensayo de Anexina V, las diferencias fueron estadísticamente significativas para ambas líneas celulares.

La línea celular CHO-K1 en este punto del diseño, ha evidenciado diferencias estadísticamente significativas tanto con su control sin irradiar, como con aquella población irradiada el primer día del diseño experimental que recibió 100 mSv de rayos X. Debido a que no habían sido encontradas diferencias significativas para este ensayo luego de la primera exposición, los resultados hallados en el final del diseño

experimental con una dosis final de 1000 mSv de rayos X, podrían deberse a la exposición crónica a dosis bajas de radiación ionizante.

Dado que la línea celular CHO-K1 posee todas sus capacidades para detectar y reparar el daño en el ADN, y que no se han hallado diferencias en las técnicas utilizadas para medir este tipo de daño respecto de la población que recibió 100 mSv de rayos X, los resultados encontrados para la frecuencia de células apoptóticas podrían estar vinculados a otras causas. Entre éstas, podríamos mencionar un aumento progresivo de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno, las cuales llevarían a alcanzar un nivel de saturación de los mecanismos de detoxificación celular difícil de revertir a menos que cese la exposición al estímulo perturbante.

Por otra parte, varios autores hacen especial énfasis en la importancia de la vía extrínseca de la apoptosis asociada a la exposición a dosis bajas de radiación ionizante (Bauer, 2007, Portess et al., 2007). De este modo, el incremento en la frecuencia de células destinadas a una muerte celular programada podría estar más vinculado con una respuesta a las citoquinas presentes en el medio que con el daño generado por la radiación en las macromoléculas del interior celular.

Para la línea celular XRS-5, se ha encontrado un resultado semejante. Si bien en parte el aumento en la frecuencia de células apoptóticas podría tener su fundamento en la vía extrínseca, por medio de moléculas de comunicación intercelular, como lo planteado para las células CHO-K1, es importante tener en cuenta la dificultad de esta línea celular a la hora de reparar su ADN. Así, en este caso en donde la principal vía de reparación se encuentra alterada debido a la ausencia de la proteína Ku80, los resultados encontrados podrían estar asociados al aumento en los niveles de daño en el ADN producido a lo largo de todo el diseño experimental, tal como lo reflejan el EC y el ensayo CBMN.

VI.3. Modelo de Inestabilidad Genómica (MIG)

Desde hace algunos años, los efectos biológicos asociados a la exposición a DBRI han sido el centro de atención de la radiobiología. La teoría del Target planteada originalmente por Osborne y colaboradores en el año 2000, fue rápidamente desafiada por los efectos a largo plazo observados en este tipo de exposición. Dada la imposibilidad de separar estos efectos al estudiar la respuesta celular a la exposición crónica de DBRI, se planteó paralelamente al MIC un modelo en el cual las células fueron expuestas a la radiación sólo en el primer día del mismo. Así se intentará analizar el daño subyacente en el MIC originado exclusivamente por la primera exposición.

Análisis al inicio del MIG

Al igual que lo observado en el modelo de irradiación crónica, los resultados del EC con ambas metodologías de análisis y para ambas líneas celulares, han evidenciado un aumento estadísticamente significativo de daño en la hebra de ADN, inmediatamente después de la primera irradiación.

De igual manera, la frecuencia de MN también aumentó en forma significativa en ambas líneas celulares. Este resultado, junto con los obtenidos en el EC, manifiesta dos cuestiones importantes que han sido ya ampliamente detalladas en el análisis del MIC: el hecho de que una dosis tan baja como 100 mSv de rayos X haya sido capaz de propiciar daño en el ADN; y que este daño se corresponda, al menos en parte, con fracturas de cadena doble.

Estos resultados concuerdan con datos obtenidos por otros autores en diversas líneas celulares a través no sólo del EC y ensayo de MN, sino por medio de otras técnicas, como la identificación de focos de histonas o la electroforesis en gel de campo pulsante (Vijayalaxmi et al., 1993; Wojewodzka et al., 1998; Rothkamm y Löbrich, 2003, Güerci et al., 2004 y 2005; Sudprasert et al., 2006).

Por su parte, los niveles de apoptosis analizados en ambas líneas celulares, a través de la técnica de Anexina V, no arrojaron diferencias entre las poblaciones celulares irradiadas con sus respectivos controles. Como se planteó en el MIC, cabe la posibilidad de que esto sea debido a que el análisis se realizó inmediatamente después de la irradiación, de modo que es probable que no haya transcurrido el tiempo suficiente para alcanzar el punto de eversión de la membrana plasmática, evento evidenciado a través de esta técnica.

Análisis al final del MIG

Cuando los ensayos se realizaron luego de transcurridos los diez días establecidos en este diseño experimental, los resultados mostraron niveles de daño en el ADN semejantes a los encontrados al inicio del protocolo para ambas líneas celulares. De modo contrario, la frecuencia de células vehiculizadas a apoptosis fue diferente entre una línea y otra, aunque en ninguno de los casos estas diferencias llegaron a alcanzar relevancia estadística. Por su parte, en la línea celular CHO-K1 se observó una disminución de este parámetro a lo largo del protocolo, mientras que en su línea derivada, XRS-5 se halló un incremento del mismo.

En primer lugar es importante resaltar que al igual que lo ocurrido en el modelo de exposición crónica, al comparar los cultivos utilizados como controles de ambas líneas celulares entre el primero y el último día del diseño, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas con ninguno de los ensayos utilizados. Esto es sumamente importante, ya que asegura la estabilidad de la línea pudiendo concluir finalmente que cualquier diferencia encontrada en las poblaciones celulares podría ser atribuible a la exposición a la radiación en el primer día del diseño experimental.

Al contrastar los resultados del EC para la línea celular CHO-K1 encontrados al final del protocolo con respecto a los correspondientes al inicio del mismo, luego de que la población fuera expuesta a 100 mSv de rayos X, no se ha observado ningún cambio significativo. Esta tendencia se evidenció tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo.

En esta misma línea celular la frecuencia de MN observada al finalizar el protocolo (D10 d100), resultó mayor respecto de su control en el último día pero menor respecto de la población analizada en el D1 luego de transcurrido un ciclo celular desde la exposición a la radiación (D1 d100). Si bien en ninguno de los dos casos las diferencias fueron significativas desde el punto de vista estadístico, estos resultados revelan un hecho de importancia biológica. Dado que las células de la línea CHO-K1 disponen de toda la maquinaria celular necesaria para reparar su material genético, los resultados observados con el EC y el ensayo CBMN permiten sugerir que el daño encontrado hacia el final del MIG sería un daño *de novo* en la hebra de ADN ocurrido a lo largo del protocolo.

Ahora bien, al contrastar los resultados obtenidos para el ensayo de Anexina V inmediatamente después de recibida la radiación (D1 d100), con los obtenidos luego de transcurridos los diez días del MIG (D10 d100), se observó una disminución no significativa en la frecuencia de las células vehiculizadas a apoptosis, manteniéndose en todos los casos dentro de niveles que podrían considerarse basales.

Este resultado, sumado a los obtenidos con el EC y el ensayo CBMN, sugiere que el daño en el ADN observado en el último día del MIG estaría relacionado con un desbalance generado por la radiación del día uno, que impide a las células reestablecer su fenotipo y comportamiento original. En este contexto, podría sugerirse un aumento general del estrés celular originado por concentraciones crecientes de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Shim y colaboradores en el año 2014, plantearon la idea de que el estrés oxidativo puede persistir durante mucho tiempo después de la exposición inicial en células de la progenie. Tratamientos antioxidantes, tales como la sobreexpresión de enzimas relacionadas con la respuesta celular a la presencia de especies reactivas de oxígeno, han demostrado efectividad para reducir los efectos asociados al estrés oxidativo a largo plazo (von Zglinicki, 2002, Serra et al., 2004).

Al analizar el comportamiento de las células XRS-5, se observó que los resultados encontrados a través del EC al final del MIG son semejantes a los encontrados para la línea celular CHO-K1. La comparación entre los resultados obtenidos el primero y el último día del diseño experimental para las células irradiadas

con 100 mSv de rayos X muestra diferencias no significativas. Así, podría concluirse que los niveles de daño encontrados en el ADN una vez propiciada la injuria son los mismos desde el inicio hasta el final del diseño.

Si bien las células de la línea XRS-5 son deficientes para la proteína Ku80, estrechamente involucrada en la reparación del ADN por NHEJ, actualmente es vasta la bibliografía que sostiene la existencia de mecanismos de reparación alternativos, los cuales debieron haber permitido a las células recuperar su integridad genómica en este período.

Así, los resultados obtenidos para esta línea celular en este punto experimental refuerzan nuevamente la idea sugerida al analizar los resultados hallados en la línea CHO-K1, en donde se propuso la existencia de un daño *de novo*. Estas observaciones son coincidentes para los resultados obtenidos tanto con el EC y como a través del CBMN, encontrándose el mismo nivel de daño al inicio y al final del protocolo.

Los resultados obtenidos en el MIG por medio del análisis de Anexina V mostraron un comportamiento diferencial de la línea XRS-5 respecto del observado en la línea parental, ya que se observó un aumento en el número de células apoptóticas al final del protocolo. Este aumento no resultó estadísticamente significativo al contrastarlo con el análisis realizado post-irradiación, pero sí resultó significativo al contrastarlo con la población control en el D10. Una explicación posible para este resultado podría estar basada en el hecho de que la cinética de reparación de los mecanismos alternativos en células deficientes en NHEJ difiere de aquella que puede observarse en una línea celular sin compromiso de una de las principales vías de reparación del ADN. Consecuentemente, podría ocurrir que el daño *de novo* instaurado constantemente a lo largo del protocolo, sumado a una cinética de reparación más lenta que podría saturarse rápidamente, sean responsables del aumento de la apoptosis. Así, podría observarse como resultado un nivel de daño semejante al inicial, sólo porque aquellas células que hubieren aumentado considerablemente el nivel de daño en su ADN no estarían siendo incorporadas para este análisis, ya que podrían haber sido eliminadas del cultivo por apoptosis u otro mecanismo de muerte celular. En este sentido, los resultados serían semejantes a los encontrados en estudios llevados a

cabo por Rothkamm y Löbrich en el año 2003 quienes simularon condiciones de incapacidad de reparación manteniendo los cultivos en confluencia durante todo el protocolo experimental.

Por último es importante resaltar que el hecho de encontrar células marcadas con Anexina V, en esta línea celular, pone de manifiesto que la ausencia de la proteína Ku80 no impediría en principio la vehiculización celular hacia una muerte programada.

IV.4. Comparación entre ambas líneas para el MIC

En primera instancia, es interesante diferenciar la respuesta a la radiación de ambas líneas celulares. Como se mencionó anteriormente, al evaluar el daño en el ADN luego de la primera irradiación no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas. De modo contrario, al realizar el análisis al final del período de irradiación se han encontrado diferencias en la respuesta de la línea celular XRS-5 respecto de la línea CHO-K1. A continuación se detallan las diferencias encontradas en el comportamiento de ambos tipos celulares a lo largo de todo el diseño experimental.

Al analizar simultáneamente los resultados obtenidos a través del EC para ambas líneas celulares, pueden resaltarse dos hechos interesantes. El primero de ellos es que al realizar la comparación entre el daño observado en el último día del protocolo (D10 d1000) con el primer día del mismo (D1 d100), se ha encontrado un aumento significativo en los niveles del daño en el ADN sólo en la línea deficiente para la reparación por NHEJ. Así, estos resultados podrían estar evidenciando la relevancia de la proteína Ku80 y, consecuentemente, del mecanismo de reparación por NHEJ cuando los cultivos celulares son expuestos crónicamente a DBRI.

El segundo hecho, es que en la línea XRS-5 no se observó ningún retraso en los tiempos de duplicación celular respecto de la población control. Por ello, podría sugerirse la existencia de algún mecanismo de reparación alternativo independiente de la proteína en estudio. Actualmente, existe un amplio consenso acerca de la existencia de mecanismos alternativos o complementarios de reparación por NHEJ (Wang et al.,

2006; Illiakis, 2009; Mladenov y Illiakis, 2011; Manova et al., 2012; Palmitelli et al., 2015), cuya presencia sería indispensable para que las células sobrevivieran a la irradiación crónica.

Otro resultado a destacar, es la diferencia del comportamiento de ambas líneas con respecto a la magnitud del daño observado. Nuevamente, se observó que las células XRS-5 presentaron un daño grave en su ADN de tipo significativo, mientras que no ocurrió lo mismo con las células CHO-K1. Estos resultados podrían explicarse si consideramos las posibles diferencias en la cinética de reparación del ADN, las células defectivas tardarían más en reparar el daño y, por ello, el mismo se acumularía como consecuencia de la cronicidad de la exposición.

Al igual que lo ocurrido con el EC, en el ensayo CBMN la línea XRS-5 presentó mayores frecuencias de daño respecto de su línea celular parental. Así, la frecuencia de células CHO-K1 binucleadas con MN encontrada al final del diseño experimental (D10 d1000) fue mayor que aquella observada al inicio (D1 d100) pero esta diferencia no fue significativa. De modo contrario, en la línea XRS-5 sí lo fue.

Al realizar la comparación de los resultados obtenidos para el recuento de células apoptóticas al inicio y al final del protocolo, las diferencias resultaron significativas para ambas líneas celulares. Si bien estas diferencias fueron mayores en las células CHO-K1 este resultado, sumado a aquellos hallados para los ensayos EC y CBMN, podría estar indicando una cierta independencia entre la inducción de apoptosis y el daño en el ADN en condiciones de irradiación crónica, en las que adquiriría preponderancia la vía extrínseca de la apoptosis.

VI.5. Comparación entre ambas líneas para el MIG

Al realizar el contraste entre los datos obtenidos para el diseño experimental de inestabilidad genómica, no se han hallado diferencias significativas en los niveles de daño entre ambas líneas. Esta tendencia se ha observado tanto para el EC como para el ensayo CBMN.

Ahora bien, a pesar de la observación de dichas similitudes, en ambas líneas celulares habrían ocurrido procesos diferentes que condujeron a los resultados encontrados. En la línea celular CHO-K1, el daño en el ADN observado al final del protocolo podría deberse, al menos en parte, a un daño *de novo*; ya que, estas células no presentan ninguna limitación para reparar su material genético. Shim et al. en el año 2014 propusieron que este tipo de lesiones podría deberse a la inducción de un estrés celular que puede persistir luego de la exposición inicial generando daño en el ADN de las células de la progenie. En el caso de la línea XRS-5, si bien no podemos descartar la inducción de estrés oxidativo, los resultados podrían deberse a una cinética diferente de los mecanismos de reparación alternativos, que podría resultar en un nivel de saturación de los mismos con la consecuente inducción de daño en el ADN aún varios días después de la exposición a DRBI (Mladenov e Illiakis, 2011).

Cuando se compararon los resultados obtenidos en el análisis de muerte celular, se observó una disminución de células apoptóticas para la línea parental, mientras que en la línea celular deficiente se evidenció un aumento de las mismas. Estos hallazgos podrían deberse a que las células CHO-K1, al ser capaces de reparar el material genético con mayor eficiencia, logran mantener niveles de daño compatibles con la vida, mientras que las XRS-5 no consiguen este propósito y alcanzan mayores niveles de muerte celular programada como consecuencia de los mayores niveles de daño en el ADN.

Un fenómeno que parecería estar involucrado en la muerte celular a largo plazo, por exposición a RI, es el estado de oxidación proteica. Si bien en modelos bacterianos este fenómeno parece ofrecer una resistencia a la radiación (Daly et al. 2007), en muchos modelos *in vitro* de células eucariotas, los niveles elevados de ROS y la oxidación proteica asociada a éstos, serían los principales responsables de los primeros estadios del proceso apoptótico. (Min et al., 2008, Guan, et al. 2009, England et al. 2006). Así sería muy interesante en investigaciones futuras poder comprobar los niveles de ROS intracelular relacionados con niveles de oxidación proteica en modelos semejantes a los planteados en este trabajo doctoral a fin de evaluar su correlación con procesos de resistencia o muerte celular programada.

Consideraciones finales

Debido a la gran cantidad de utilidades que las RI ofrecen al hombre moderno, es sumamente importante para la comunidad científica ahondar en el conocimiento de las respuestas celulares a las DBRI a fin de evaluar el riesgo asociado a este tipo de exposiciones (Asaithamby, A., y Chen, D.J., 2009).

Muchos han sido los estudios realizados en poblaciones crónicamente expuestas a este agente pero la multiplicidad de factores involucrados en la respuesta a la radiación así como también la variabilidad interpersonal tanto desde el punto de vista genético como desde el punto de vista de los hábitos, incrementa en gran medida la heterogeneidad de los resultados dificultando aún más la posibilidad de llegar a conclusiones concretas.

A efectos de sortear estos obstáculos en las últimas décadas se han desarrollado numerosos modelos experimentales *in vitro*, a fin de intentar dilucidar los efectos asociados a la exposición a DRBI. De todos modos, el análisis comparativo de los resultados hallados en los mismos se torna dificultoso debido a la multiplicidad de factores que deben considerarse a la hora de analizar la respuesta celular frente a este agente, tales como: tipo celular, tipo de radiación, dosis de exposición, tasa de dosis, estado de los mecanismos de reparación, momento del ciclo celular, entre otros. A esta multiplicidad de factores, deben sumarse las limitaciones intrínsecas de las técnicas utilizadas.

A su vez, muchos de estos modelos se centran principalmente en la observación de la respuesta celular a corto plazo, desde el momento de la irradiación hasta 24 o 48 hs posteriores, siendo por tanto modelos que responden a una cinética de reparación más que a los riesgos asociados a largo plazo.

Si bien el paradigma planteado por la “Teoría del *target*” ha ido cambiando con el correr del tiempo, sigue siendo el ADN la macromolécula de mayor interés para los radiobiólogos. Así el estudio de las consecuencias asociadas a DBRI ha ido ampliando su foco de atención, incluyendo los efectos sobre otras biomoléculas tanto del interior como del exterior celular que en su conjunto se denominan “microambiente celular”.

En la actualidad se asume que el daño ocasionado en las macromoléculas por las radiaciones de bajo LET, como es el caso de los rayos X, ocurre luego de la generación de especies moleculares altamente reactivas. Son principalmente importantes las especies reactivas de oxígeno, entre las que podemos mencionar a los radicales superóxido e hidróxido originados por la radiólisis del agua intracelular, y las especies reactivas de nitrógeno, como el óxido nítrico y el peroxinitrito, entre otros. Existe una vasta bibliografía que sustenta la hipótesis de que estas especies reactivas son capaces de generar efectos nocivos para la integridad celular, incluyendo la oxidación de las macromoléculas biológicas y la activación de vías de señalización intracelular. Algunos estudios también han puesto en evidencia la importancia de la oxidación proteica en procesos celulares tales como la activación de la señalización proapoptótica (Du y Gebicki, 2004; Panganiban, 2012).

Algunos autores como Ojima y colaboradores (2008), proponen que dentro del rango de las DBRI el incremento en la frecuencia de DSBs estaría ampliamente relacionado con la dosis utilizada. Sostienen así, que a dosis menores a 5 mSv adquieren mayor importancia los efectos indirectos inducidos por la radiación, mientras que a dosis mayores a ésta, las DSBs podrían ser inducidas principalmente por los efectos dosis dependientes directos de la radiación y, parcialmente, por sus efectos indirectos. Por su parte, otros autores (Crompton et al., 2002; McLachlan-Burgess et al., 2006; Little, 2010) sugieren que la respuesta a la radiación depende en mayor medida de las características celulares de la población celular que de la dosis empleada.

Sustentados por todos estos estudios, podemos sugerir que en la actualidad, está ampliamente aceptado que la RI es un agente mutagénico que ocasiona riesgos a largo plazo para la salud humana, pero resta aún mucho por dilucidar acerca de los mecanismos celulares involucrados en el desarrollo de tales procesos, así como de los límites aceptables o seguros de exposición a este agente. En este sentido, Panganiban y colaboradores en el año 2012 plantean la idea de que las consecuencias de la subestimación y sobrestimación del riesgo proveniente de la exposición a dosis bajas de RI son suficientes para justificar una re-evaluación periódica de la evidencia tanto

biológica como epidemiológica de sus efectos. Finalmente, dado que resulta imposible evadir completamente el riesgo asociado a este tipo de exposición, los principales organismos internacionales de protección radiológica (UNSCEAR, ICRP y la IAEA) han adoptado lo que denominan una aproximación “prudente” para la exposición a dosis bajas de radiación ionizante, basadas en la hipótesis del modelo lineal sin umbral. Considerando el escaso conocimiento acerca de los riesgos concretos asociados a la exposición a DBRI, no es posible con el conocimiento actual construir un modelo en el cual se identifique un nivel umbral de radiación por debajo del cual no se encuentre riesgo para la salud, por ello constantemente las asociaciones de todo el mundo están abocadas a la tarea de dilucidar los límites para dicha exposición.

En este contexto, cobran relevancia los hallazgos experimentales tendientes a demostrar el impacto que tiene la exposición ya sea crónica o única a DBRI sobre la estabilidad genómica. Así los resultados obtenidos en el presente plan de tesis intentan colaborar en esta ardua tarea científica que tiene como objeto final establecer límites seguros de exposición a este agente.

Los resultados obtenidos en el presente plan de tesis doctoral permiten afirmar que el nivel de daño generado en el ADN de células de mamífero expuestas diariamente a 100 mSv de RX durante el período planteado en el marco de este proyecto es el mismo al inicio y al final del protocolo cuando las células expuestas cuentan con toda la maquinaria celular necesaria para reparar su ADN. De modo contrario, esto no ocurre cuando las células no cuentan con la totalidad de la maquinaria enzimática destinada a la reparación del ADN. En este marco resulta importante resaltar que la línea celular CHO-K1 no sólo posee la capacidad para reparar su ADN, sino que es capaz de generar respuesta celular integral a la exposición a la radiación, de modo tal que en el caso de ver amenazada su integridad genómica sea capaz de disparar un proceso celular que culmine en la desintegración de la misma.

Plantear futuras investigaciones con la utilización de modelos celulares *in vitro* en los que puedan silenciarse la expresión de distintos genes involucrados en vías de señalización celular, tales como las relacionadas con la reparación del ADN, o con los

procesos de muerte celular, podría potenciar el conocimiento de los mecanismos involucrados en la respuesta celular ante la exposición a DBRI. A su vez estos resultados podrían incluso servir como base para la evaluación del efecto de determinadas mutaciones ante el daño inducido por las radiaciones en células cultivadas *in vitro*. Finalmente, estos conocimientos serían de utilidad a la hora de diseñar estudios epidemiológicos que analicen polimorfismos genéticos en muestras provenientes de personas ocupacionalmente expuestas a la radiación, convirtiéndose por tanto en una herramienta útil en el campo de la medicina ocupacional.

Capítulo VII

CONCLUSIONES

- En células de mamífero capaces de reparar mediante NHEJ el daño inducido con la irradiación crónica de DBRI (100 mSv), los niveles de daño en el ADN y en los cromosomas permanecen constantes, mientras que la apoptosis aumenta.
- En células incapaces de reparar mediante NHEJ el daño inducido con la irradiación crónica de DBRI (100 mSv), tanto los niveles de daño en el ADN y en los cromosomas como la apoptosis aumentan.
- La inestabilidad genómica en células eficientes para NHEJ se evidencia, exclusivamente, a través de la persistencia de los niveles de daño en el ADN y en los cromosomas generados al inicio del modelo experimental.
- La inestabilidad genómica en células deficientes para NHEJ se evidencia tanto a través de la persistencia de los niveles de daño en el ADN y en los cromosomas generados al inicio del modelo experimental, como por un aumento en la frecuencia de células apoptóticas.

Conclusión general

La eficiencia de la reparación del material genético a través de la unión de extremos no homólogos afecta tanto a la magnitud del daño genético inducido por dosis bajas y crónicas de radiación ionizante, como a la inducción de apoptosis en la progenie de células expuestas por única vez a dichas dosis de radiación.

BIBLIOGRAFÍA

- Afshar, G., Jelluma, N., Yang, X., Basila, D., Arvola, N.D., Karlsson, A., Yount, G.L., Dansen, T.B., Koller, E., Haas-Kogan, D.A. (2006). Radiation-induced caspase-8 mediates p53-independent apoptosis in glioma cells. *Cancer Res.* 66: 4223–4232.
- Ames, B.N., Lee, F.D., Durston, W.E. (1973). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 782-786.
- Andree, H.A., Reutelingsperger, C.P., Hauptmann, R., Hemker, H.C., Hermens, W.T., Willems, G.M.(1990). Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem.* 265(9):4923-8.
- Angelini, S., Kumar, R., Carbone, F., Maffei, F., Forti, G.C., Violante, F.S., Lodi, V., Curti, S., Hemminki, K., Hrelia, P. (2005). Micronuclei in humans induced by exposures to low level of ionizing radiation: influence of polymorphisms in DNA genes. *Mutat Res.* 570(1):105-17.
- Asaithamby, A., Chen, D.J. (2009). Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose gamma-irradiation. *Nucleic Acids Res.* 37(12):3912-23.
- Auerbach, C., Robson, J.M., Carr, J.G. (1947). The chemical production of mutations. *Science* 105 (2723):243-7.
- Azzam, E.I., de Toledo, S.M., Gooding, T., Little, J.B. (1998). Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. *Radiat Res.* 150(5):497-504.
- Azzam, E.I., de Toledo, S.M., Spitz, D.R., Little, J.B. (2002). Oxidative metabolism modulates signal transduction and micronucleus formation in bystander cells from alpha-particle-irradiated normal human fibroblast cultures. *Cancer Res.* 62(19):5436-42.
- Bagher Tavakoli, M., Kheirollahi, M. Kiani, A. Kazemi, M. Javanmard, S, Mohebat, L. (2015). Annexin V FITC conjugated as a radiation toxicity indicator in lymphocytes following radiation overexposure in radiotherapy programs. *Adv Biomed Res.* (4): 119.
- Bailey S.M., Meyne, J., Chen, D.J., Kurimasa, A., Li, G.C., Lehnert, B.E., Goodwin, E.H. (1999). DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 14899–14904.
- Bajinskis, A., Adayapalam, T., Natarajan, Klaus, E. (2013). DNA double Strand breaks induced by the indirect effect of radiation are more efficiently repaired by non-homologous end joining compared to homologous recombination repair. *Mutat Res.* 756(1-2):21-9.
- Balakrishnan, S., Rao, B.S. (1999). Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes of occupational workers exposed to low levels of ionizing radiation. *Mutat Res.* 442:37–42.
- Ballarini, F., Biaggi, M., Ottolenghi, A., Sapora, O. (2002). Cellular communication and bystander effects: a critical review for modelling low-dose radiation action. *Mutat Res.* 501(1-2):1-12.

- Bauer, G. (2007). Low dose radiation and intercellular induction of apoptosis: potential implications for the control of oncogenesis. *Int J Radiat Biol.* 83(11-12):873-88.
- Baverstock, K. (2000). Radiation-induced genomic instability: a paradigm breaking phenomenon and its relevance to environmentally induced cancer. *Mutat Res.* 454(1-2):89-109.
- Belka, C., Heinrich, V., Marini, P., Faltin, H., Schulze-Osthoff, K., Bamberg, M., Budach, W. (1999). Ionizing radiation and the activation of caspase-8 in highly apoptosis-sensitive lymphoma Cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 75:1257–1264.
- Belkacemi, Y., Piel, G., Rat, P., Julia, F., Touboul, E., Housset, M., Warnet, J.M. (2000). Ionizing radiation-induced death in bovine lens epithelial cells: Mechanisms and influence of irradiation dose rate. *Int. J. Cancer.* 90:138–144.
- Bello Gutierrez, J. y López de Cerain Salsamendi, A. (2001). *Fundamentos de Ciencia Toxicológica*. Ediciones Díaz de Santos, Madrid, España.
- Beucher, A., Birraux, J., Tchouandong, L., Barton, O., Shibata, A., Conrad, S., Goodarzi, A., Krempler, A., Jeggo, P.A., Loblrich, M. (2009). ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J.* 28(21):3413-27.
- Blunt, T., Finnie, N.J., Taccioli, G.E., Smith, G.C., Demengeot, J., Gottlieb, T.M., Mizuta, R., Varghese, A.J., Alt, F.W., Jeggo, P.A., Jackson, S.P. (1995). Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell.* 80:813-823.
- Bonner, W., (2003). Low-dose radiation: Thresholds, bystander effects, and adaptive responses. *PNAS.* 100(9):4973-4975.
- Brenner D.J., Doll, R., Goodhead, D.T., Hall, E.J., Land, Ch., Little, J.B., Preston, D.L., Preston, R.J., Puskin, J.S., Ron, E. Sachs, E.K., Samet, J.M., Setlow, R.B., Zaider, M., Lubin, H. (2003). Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: Assessing what we really know. *PNAS.* 100 (24):13761-66.
- Brusick, D. (2011). *Principles of Genetic Toxicology*. Second edition. Springer Sciences & Business Media. New York, USA.
- Bubici, C., Papa, S., Dean, K., Franzoso, G. (2006). Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: Molecular basis and biological significance. *Oncogene* 25: 6731–6748.
- Burlinson, B., Tice, R.R., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, S.Y., Collins, A.R., Escobar P, Honma, M., Kumaravel, T.S., Nakajima, M., Sasaki, Y.F., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M., Hartmann, A. (2007). In Vivo Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat Res.* 627(1):31-5.

Buck, D., Malivert L., de Chasseval R., Barraud A., Fondaneche M.C., Sanal, O., Plebani A., Stephan J.L., Hufnagel M., le Deist F., Fischer A., Durandy A., de Villartay, J. P. Revy P. (2006). Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell*. 124:287–299.

Campisi, J., d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8:729–740.

Cardoso, R.S., Takahashi-Hyodo, P. (2001). Evaluation of chromosomal aberrations, micronuclei and sister chromatid exchanges in hospital workers chronically exposed to IR, Tert. *Carcinog y mutag.* 21:431-49.

Cebral, E., Abrevaya, X.C., Mudry, M.D. (2011). Male and female reproductive toxicity induced by sub-chronic ethanol exposure in CF-1 mice. *Cell Biol Toxicol.* 27(4):237-48.

Chang, W.P., Little, J.B. (1992). Persistently elevated frequency of spontaneous mutations in progeny of CHO clones surviving X-irradiation: association with delayed reproductive death phenotype. *Mutat Res.* 270(2):191-9.

Chang, W.P., Hwang, B.F., Wang, D., Wang, J.D. (1997). Cytogenetic effect of chronic low-dose, low-dose rate gamma-radiation in residents of irradiated buildings. *Lancet* 350:330-333.

Changizi, V., Alizadeh, M.H., Mousavi, A. (2015). A study of professional radiation hazards in CT scan and nuclear medicine workers using GTG-banding and solid stain. *Med J Islam Repub Iran.* 29:200.

Choucroun, J.D., Gillet, D., Dorange, G., Sawicki, B., Dewitte, J.D. (2001). Comet assay and early apoptosis. *Mutat Res.* 478(1-2):89-96.

Coates, P.J., Lorimore, S.A. Wright, E.G. (2004). Damaging and protective cell signalling in the untargeted effects of ionizing radiation. *Mutat Res.* 568(1):5-20.

Collins, A. (2004). Review: The Comet Assay for DNA Damage and Repair Principles, Applications, and Limitations. *Molecular biotechnology* 26:249-261.

Collins, A. R., Duinská, M., and Horská, A. (2001). Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. *Acta Biochim. Pol.* 48:611–614.

Collis, S.J., DeWeese, T.L., Jeggo, P.A., Parker, A.R. (2005). The life and death of DNA-PK. *Oncogene.* 24(6):949-61.

Couédel, C., Mills, K.D., Barchi, M., Shen, L., Olshen, A., Johnson, R.D., Nussenzweig, A., Essers, J., Kanaar, R., Li, G.C., Alt, F.W., Jasin, M. (2004). Collaboration of homologous recombination and nonhomologous end-joining factors for the survival and integrity of mice and cells. *Genes Dev.* 18(11):1293-304.

- Crompton, N.E., Shi, Y.Q., Wuergler, F., Blattmann, H. (2002). A single low dose of X-rays induces high frequencies of genetic instability (aneuploidy) and heritable damage (apoptosis), dependent on cell type and p53 status. *Mutat Res.* 517(1-2):173-86.
- d'Adda di Fagagna, F., Hande, M.P., Tong, W.M., Roth, D.B., Lansdorp, P.M., Wang, Z.Q., Jackson, S.P. (2001). Effects of DNA nonhomologous end-joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells. *Curr. Biol.* 11:1192–1196.
- Dahm-Daphi, J., Dikomey, E., Pyttlik, C., Jeggo, P.A. (1993). Reparable and non-reparable DNA strand breaks induced by X-irradiation in CHO K1 cells and the radiosensitive mutants *xrs1* and *xrs5*. *Radiat. Biol.* 64:19-26.
- Daly, M.J., Gaidamakova, E.K., Matrosova, V.Y., Vasilenko, A., Zhai, M., Leapman, R.D., Lai, B., Ravel, B., Li, S.M., Kemner, K.M. (2007). Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. *PLoS Biol* 5, e92.
- Darroudi, F., Natarajan, A.T. (1989). Cytogenetical characterization of Chinese hamster ovary X-ray-sensitive mutant cells *xrs 5* and *xrs 6*. VII. Complementation analysis of X-irradiated wild-type CHO-K1 and *xrs* mutant cells using the premature chromosome condensation technique. *Mutat. Res.* 213:249-255.
- Deaven, L.L., Petersen, D.F. (1973). The chromosomes of CHO, an aneuploid Chinese hamster cell line: G-band, C-band, and autoradiographic analyses. *Chromosoma.* 41(2):129-44.
- de Campos-Nebel, M., Larripa, I., González-Cid, M. (2008). Non-homologous end joining is the responsible pathway for the repair of fludarabine-induced DNA double strand breaks in mammalian cells. *Mutation Research* 646:8–16.
- de Campos-Nebel, M., Larripa, I., González-Cid M. (2010). Topoisomerase II-mediated DNA damage is differently repaired during the cell cycle by non-homologous end joining and homologous recombination. *PLoS One* 5(9): e12541.
- Deckbar, D., Jeggo, P.A., Löbrich, M. (2011). Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 46(4):271-83.
- DeFazio, L.G., Stansel, R.M., Griffith, J.D., Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J.* 21:3192–3200.
- Denton, D., Nicolson, S., Kumar, S. (2012). Cell death by autophagy: Facts and apparent artefacts. *Cell Death Differ.* 19:87–95.
- Devaux, P.F. (1991). Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* 30(5):1163-73.
- Drexler, H.G., MacLeod, R.A., Borkhardt, A., Janssen, J.W. (1995). Recurrent chromosomal translocations and fusion genes in leukemia-lymphoma cell lines, *Leukemia* 9:480–500.
- Du, J., Gebicki, J.M. (2004). Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36:2334–2343.

- Dulout, F.N. (1993). Mutagénesis y Carcinogénesis ambiental en Elementos de Política Ambiental, Honorable Cámara de Diputados de la Provincia de Buenos Aires. Editores: Goin, F., Goñi, R. Pp: 693-704.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68:383–424.
- Eisberg, Von R. y Resnick, R. (1974). *Quantum Physics of Atoms, Molecules, Solids, Nuclei and Particles*. John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto.
- England, K., Driscoll, C.O., Cotter, T.G. (2006). ROS and protein oxidation in early stages of cytotoxic drug induced apoptosis. *Free Radic. Res* 40:1124–1137.
- Enns, I., Kenneth, T., Bogen, J., Wizniak, A., Murtha, D., Weinfeld, M.(2004). Low-Dose Radiation Hypersensitivity Is Associated With p53-Dependent Apoptosis. *Mol Cancer Res* 2: 557-560.
- Fattah, F. Eu, H. L., Weisensel, N., Wang, Y., Lichter, N., Hendrickson, E.A. (2010). Ku Regulates the Non-Homologous End Joining Pathway Choice of DNA Double-Strand Break Repair in Human Somatic Cells. *PLOS*. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000855>.
- Fell, V.L. y Schild-Poulter, C. (2015). The Ku heterodimer: function in DNA repair and beyond. *Mutat Res Rev Mutat Res.*763:15-29.
- Fenech, M., Morley, A.A. (1985a). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res.* 147(1-2):29-36.
- Fenech, M., Morley, A.(1985b). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios.* 43(172-173):233-46.
- Fenech, M., Morley, A.A. (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat Res.*161(2):193-8.
- Fenech, M., Neville, S. (1992). Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 19(1):27-36.
- Fenech, M., Rinaldi, J., Surralles, J. (1994). The origin of micronuclei induced by cytosine arabinoside and its synergistic interaction with hydroxyurea in human lymphocytes. *Mutagenesis* 9(3):273-291.
- Fenech, M., Chang, W., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, W. (2003). HUMN Project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated lymphocyte cultures. *Mutation Research* 534:65 – 75.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2(5):1084-104.
- Fenech, M. (2010). The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Phys.* 98(2):234-43.

Finnberg, N., Gruber, J.J., Fei, P., Rudolph, D., Bric, A., Kim, S.H., Burns, T.F., Ajuha, H., Page, R., Wu, G.S. (2005). *DR5* knockout mice are compromised in radiation-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 25:2000–2013.

Friedberg, E.C.; Walker, G.C.; Siede, W. (1995). *DNA repair and Mutagenesis*. ASM Press, Washington, D.C.

Fu, W., Jia, Z., Wang, W., Zhang, J., Fu, X., Duan X., Leung, K., Zhou. Ch., Yu, J. (2011). Proliferation and apoptosis property of mesenchymal stem cells derived from peripheral blood under the culture conditions of hypoxia and serum deprivation. *Chinese Medical Journal* 124(23):3959-3967.

Fukushima, T. Takata, M., Morrison, C., Araki, R., Fujimori, A., Abe, M., Tatsumi, K., Jasin, M., Dhar, P.K., Sonoda, E, Chiba T, Takeda S. (2001). Genetic analysis of the DNA-dependent protein kinase reveals an inhibitory role of Ku in late S-G2 phase DNA double-strand break repair. *J Biol Chem.* 276:44413–44418.

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M.O., Kepp, O., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nuñez, G., Peter, M.E., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H.U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G., Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 19(1):107-20.

Gollin, S. (2005). Mechanisms leading to chromosomal instability. *Cancer Biol* 15:33 – 42.

Gonzalez, A.J. (1994) Los efectos biológicos de las dosis bajas de radiación ionizante: Una visión más completa. *Boletín 4 del OIEA*, 37-45

Goodarzi, A.A., Yu, Y., Riballo, E., Douglas, P., Walker, S.A., Ye, R., Härer, C., Marchetti, C., Morrice, N., Jeggo, P.A., Lees-Miller SP. (2006). DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO J.* 25(16):3880-9.

Goodarzi, Jeggo, Lobrich, (2010). The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: getting the strong, silent type to relax. *DNA Repair (Amst)*. 9(12):1273-82.

Grawunder, U., Zimmer, D., Fugmann, S., Schwarz, K., Lieber, M.R. (1998). DNA ligase IV is essential for V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in human precursor lymphocytes, *Mol. Cell* 2: 477–484.

Guan, L., Han, B., Li, Z., Hua, F., Huang, F., Wei, W., Yang, Y., Xu, C. (2009). Sodium selenite induces apoptosis by ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in human acute promyelocytic leukemia NB4 cells. *Apoptosis* 14: 218–225.

Güerci, A. (2004). Evolución de alteraciones citogenéticas y lesiones genómicas inducidas por irradiación crónica con dosis bajas de radiación ionizante. Tesis doctoral, Facultad de Cs. Naturales de la UNLP.

- Güerci, A., Dulout, F.N., Seoane A. (2004). DNA damage in Chinese hamster cells repeatedly exposed to low doses of X-rays. *Cytogen Genome Res* 104:173 – 7.
- Güerci, A., Dulout, F., Grillo, C., Seoane, A. (2005). Differential response of two cell lines sequentially irradiated with low X-ray doses. *Int J Radiat Biol* 81:367 – 72.
- Hadjidekova, V.B. et al. (2003). Micronucleous frequency is increased in peripheral blood lymphocyte of nuclear power plan workers. *Radiat Res.* 160, 684-690.
- Hagelström, A.H., Gorla, N.B., Larripa, I.B. (1995). Chromosomal damage in workers occupationally exposed to chronic low level ionizing radiation. *Toxicol Lett.* 76(2):113-7.
- Halimi, M., Mohsen Asghari, S., Sariri, R., Moslemi, D., Parsian, H., (2013). Cellular Response to Ionizing Radiation: A MicroRNA Story. *Int J Mol Cell Med.* 1(4):178-84
- Harbron, R.W. (2012). Review. Cancer risks from low dose exposure to ionising radiation e Is the linear no-threshold model still relevant?. *Radiography* 18(1): 28–33
- Hartlerode and Scully (2009). Mechanisms of dsbs repair in somatic mammalian cells. *Biochem J.* 423(2):157-68.
- Hartmann, A., Schumacher, M., Plappert-Helbig, U., Lowe ,P., Suter, W., Mueller, L. (2004). Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis.* 19(1):51-9.
- Hayes, P. (2001). The research time line. *Clin Nurs Res.* 10(4):343-6.
- Hei, L., Kim, S.O., Kwon, O., Jeong, S.J., Kim, M.S., Lee, H.G., Osada, H., Jung, M., Ahn, J.S., Kim, B.Y. (2008). ATM blocks tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress. *FEBS Lett.* 583:903–908.
- Higgins, C.F. (1994). Flip-flop: the transmembrane translocation of lipids. *Cell.* 79(3):393-5.
- Holliday, R., Kist, R., Bauld, L. (2016). E-cigarette vapour is not inert and exposure can lead to cell damage. *Evid Based Dent.* 17(1):2-3.
- Holmberg, K., Fält, S., Johansson, A., Lambert, B. (1993). Clonal chromosome aberrations and genomic instability in X-irradiated human T-lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 286(2):321-30.
- Hsu H.L., Gilley, D., Galande, S.A., Hande, M.P., Allen, B., Kim, S.H., Li, G.C., Campisi, J., Kohwi-Shigematsu, T., Chen, D.J. (2000). Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining, *Genes Dev.* 14:2807–2812.
- Huang, L., Grim, S., Smith, L.E., Kim, P.M., Nickoloff, J.A., Goloubeva, O.G., Morgan WF. (2004). Ionizing radiation induces delayed hyperrecombination in Mammalian cells. *Mol Cell Biol.* (11):5060-8.
- Huang, L., Kim, P.M., Nickoloff, J.A., and Morgan, W.F. (2007). Targeted and nontargeted effects of low-dose ionizing radiation on delayed genomic instability in human cells. *Cancer Research* 67:1099–1104.

ICH, 2011. Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2 (R1). In: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.

Iliakis, G., Mehta, R., Jackson, M. (1992). Level of DNA double-strand break rejoining in Chinese hamster xrs-5 cells is dose-dependent: implications for the mechanism of radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Biol.* 61:315-321.

Iliakis, G. (2009). Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: Cell cycles, dependence. *Radiother Oncol.* 92(3):310-5

International Commission on Radiological Protection, ICRP. (1977). Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 26. Pergamon Press, Oxford.

International Commission on Radiological Protection, ICRP. (1991). ICRP Publication 60: 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Elsevier Science Pub Co

International Commission on Radiological Protection, ICRP. (2003). ICRP Publication 92: Relative Biological Effectiveness (RBE), Quality Factor (Q), and Radiation Weighting Factor (wR). Elsevier Science Ltd, Oxford, UK.

International Commission on Radiological Protection, ICRP. (2005). Publication 99: low-dose extrapolation of radiation-related cancer risk.

Iwasaki, A., Suda, M., Nakao, H., Nagoya, T., Saino, Y., Arai, K., Mizoguchi, T., Sato, F., Yoshizaki, H., Hirata, M. (1987). Structure and expression of cDNA for an inhibitor of blood coagulation isolated from human placenta: a new lipocortin-like protein. *J Biochem.* 102(5):1261-73.

Jackson M. y Bartek, A. (2009.). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461: 1701-1708.

Jaco, I., Munoz, P., Blasco, M.A. (2004). Role of human Ku86 in telomere length maintenance and telomere capping. *Cancer Res.* 64:7271-7278.

Jeggo, P. A., Kemp, L.M. (1983). X-ray sensitive mutants of Chinese hamster ovary cell line. Isolation and cross-sensitivity to other DNA damaging agents. *Mutat. Res.* 112:313-327.

Jeggo, P. A. (1990). Studies on mammalian mutants defective in rejoining double-strand breaks in DNA. *Mutat. Res.* 239:1-16.

Jeggo, P.A, Lobrich, M. (2005). Artemis links ATM to DSB Rejoining. *Cell Cycle* 4(3):359-62.

Jeggo, P.A., Geuting, V., Lobrich, M. (2011). The role of homologous recombination in radiation-induced double-strand break repair. *Radiother Oncol.* 101(1):7-12.

Johnson, D.E. (2012). Defective apoptosis signaling in cancer. En: *Cell Death Signaling in*

Cancer Biology and Treatment. Human Press. Editado por Johnson D.E, Filadelfia, Estados Unidos.

Kadhim, M., Salomaa, S., Wright, E., Hildebrandt, G., Belyakov, O.V. Prise, K., Little, M.P. (2013). Review. Non-targeted effects of ionising radiation—Implications for low dose risk. *Mutation Research* 752:84-98.

Kadhim, S.R. Moore, E.H. Goodwin. (2004). Interrelationships amongst radiation-induced genomic instability, bystander effects, and the adaptive response. *Mutat. Res.* 568:21–32.

Kaliberov, S.A., Buchsbaum, D.J. (2012). Chapter Seven—Cancer treatment with gene therapy and radiation therapy. *Adv. Cancer Res.* 115:221–263.

Kao, F.T., Puck, T.T. (1969). Genetics of somatic mammalian cells. IX. Quantitation of mutagenesis by physical and chemical agents. *J Cell Physiol.* 74(3):245-58.

Kaplan, R., Jaye, M., Burgess, W.H., Schlaepfer, D.D., Haigler, H.T. (1988). Cloning and expression of cDNA for human endonexin II, a Ca²⁺ and phospholipid binding protein. *J Biol Chem.* 263(17):8037-43.

Kapty, J., Murray, D., Mercer, J. (2010). Radiotracers for noninvasive molecular imaging of tumor cell death. *Cancer Biother. Radiopharm.* 25:615–628.

Karanjawala Z.E., Grawunder U., Hsieh, C.L., Lieber, M.R. (1999). The nonhomologous DNA end joining pathway is important for chromosome stability in primary fibroblasts, *Curr. Biol.* 9:1501–1504.

Kass E., Jasin M. (2010). Collaboration and competition between DNA double strand break repair pathways. *FBS Letters* 584:3703-3708.

Kim, I., Shu, C.W., Xu, W., Shiau, C.W., Grant, D., Vasile, S., Cosford, N.D., Reed, J.C. (2009). Chemical biology investigation of cell death pathways activated by endoplasmic reticulum stress reveals cytoprotective modulators of Ask1. *J. Biol. Chem.* 284:1593–1603.

Kim, I., Shu, C.W., Xu, W., Shiau, C.W., Grant, D., Vasile, S., Cosford, N.D., Reed, J.C. (2009). Chemical biology investigation of cell death pathways activated by endoplasmic reticulum stress reveals cytoprotective modulators of Ask1. *J. Biol. Chem.* 284:1593–1603.

Kirchgessner, C. U., Patil, C.K., Evans, J.W., Cuomo, C.A., Fried, L.M., Carter, T., Oettinger, M.A., Brown, J.M. Illiakis, G., Mehta, R., Jackson, M. (1995). DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for murine SCID defect. *Science* 267:1178-183.

Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A. (2003). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat Res.* 540(2):153-63.

Klaassen, C.D., Lawrence, D.A. (2009). Toxicological Highlight. *Toxicol Sci.* 56(1):1.

Kolesnick, R.; Fuks, Z. (2003). Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene* 22(37):5897-906.

- Końca, K., Lankoff, A., Banasik, A., Lisowska, H., Kuszewski, T., Gózdź, S., Koza, Z., Wojcik, A. (2003). A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutat Res.* 534:15-20.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T., van Oers, M.H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.*84(5):1415-20.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation* 16:3–11.
- Kumaravel, T.S., Jha, A.N. (2006). Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat Res.* 2006 Jun 16;605(1-2):7-16. Epub 2006 Apr 18.
- Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S.P., and Jha, A.N. (2009). Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology* 25:53–64.
- Kuribayashi, K., Finnberg, N., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., El-Deiry, W.S. (2011). The relative contribution of pro-apoptotic p53-target genes in the triggering of apoptosis following DNA damage in vitro and in vivo. *Cell Cycle.* 10:2380–9.
- Kurz, E.U., Lees Miller, S.P. (2004). DNA damage –induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair (Amst)* 3:889-900.
- Lai, E., Teodoro, T., Volchuk, A. (2007). Endoplasmic reticulum stress: Signaling the unfolded protein response. *Physiology* 22:193–201.
- Lavin, M.F. (2004). The Mre 11 complex and ATM: a two way functional interaction in recognising and signaling DNA double strand breaks. *DNA repair (Amst)*3:1515-20.
- Lee, H., Rotolo, J.A., Mesicek, J., Penate-Medina, T., Rimner, A., Liao, W.C., Yin, X., Ragupathi, G., Ehleiter, D., Gulbins, E. (2011). Mitochondrial ceramide-rich macromolecules functionalize bax upon irradiation. *PLoS One* 6.
- Lees-Miller, Meek K. (2003). Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie* 85:1161-73.
- Lieber, S. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem.* 79:181-211.
- Limoli, C.L., Kaplan, M.I., Corcoran, J., Meyers, M., Boothman, D.A., and Morgan, W.F. (1997). Chromosomal instability and its relationship to other end points of genomic instability. *Cancer Research* 57:5557–5563.

- Limoli, C.L., Giedzinski, E., Rola, R., Otsuka, S., Palmer, T.D., Fike, J.R. (2004). Radiation response of neural precursor cells: linking cellular sensitivity to cell cycle checkpoints, apoptosis and oxidative stress. *Radiat Res.* 161(1):17-27.
- Lindberg, H.K., Wang, X., Järventaus, H., Falck, G.C.M., Norppa, H., Fenech, M. (2007). Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mut. Res.* 617(1-2):33-45.
- Lindsay, K.J., Coates, P.J., Lorimore, S.A.; Wright, E.G. (2007). The genetic basis of tissue responses to ionizing radiation. *Br. J. Radiol.* 80(1):2–6.
- Little, J.B., Gorgojo, L., Vetrovs, H. (1990). Delayed appearance of lethal and specific gene mutations in irradiated mammalian cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 19(6):1425-9.
- Little, J.B., Nagasawa, H., Pfenning, T., Vetrovs, H. (1997). Radiation-induced genomic instability: delayed mutagenic and cytogenetic effects of X rays and alpha particles. *Radiat Res.* 148(4):299-307.
- Little, J.B. Azzam, E.I., de Toledo, S.M., Nagasawa, H. (2002). Bystander effects: intercellular transmission of radiation damage signals. *Radiat Prot Dosimetry.* 99(4):159-62.
- Little, J.B. (2000). Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 21(3):397-404.
- Little, J.B. (2007). Non-targeted effects of ionizing radiation: implications for low-dose exposures. *Radiat Biol Radioecol.* 47(3):262-72
- Lloyd, D.C., Purrott, R.J., Reeder, E.J. (1980). The incidence of unstable chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from unirradiated and occupationally exposed people. *Mutat Res.* 72(3):523-32.
- Lozano, J., Menendez, S., Morales, A., Ehleiter, D., Liao, W.C., Wagman, R.; Haimovitz-Friedman, A.; Fuks, Z.; Kolesnick, R. (2001). Cell autonomous apoptosis defects in acid sphingomyelinase knockout fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276:442–448.
- Luce, A., Courtin, A., Levalois, C., Altmeyer-Morel, S., Romeo, P.H., Chevillard, S., Lebeau, J. (2009). Death receptor pathways mediate targeted and non-targeted effects of ionizing radiations in breast cancer cells. *Carcinogenesis* 30:432–439.
- Ma Y., Lu H., Tippin B., Goodman M.F., Shimazaki, N., Koiwi, O., Hsieh, CL, Schwarz K., Lieber, M.E. (2004). A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Mol Cell* 16:710-713.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwartz, K., Lieber, M.R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis:DNA-PKcs complex in V(D)J recombination and in nonhomologous end joining. *Cell* 108:781-94.
- Ma, Y., Schwarz, K., Lieber, M.R. 2005. The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps. *DNA Repair (Amst)* 4:845-851.

- Maffei, F., Angelini, S., Cantelli Forti, G. (2004). Spectrum of chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of hospital workers occupationally exposed to low doses of ionizing radiation. *Mutat Res.* 547:91–99.
- Malyapa, R.S., Bi, C., Ahern, E.W., Roti Roti, J.L. (1998). Detection of DNA damage by the alkaline comet assay after exposure to low-dose gamma radiation. *Radiat Res.* 149(4):396-400.
- Manesh, S.S., Sangsuwan, T., Wojcik, A., Haghdoost, S. (2015). Studies of adaptive response and mutation induction in MCF-10A cells following exposure to chronic or acute ionizing radiation. *Mutation Research* 780:55–59.
- Manova, V., Singh, S.K., Iliakis, G. (2012). Processing of DNA double strand breaks by alternative non-homologous end-joining in hyperacetylated chromatin. *Genome Integr.* 3(1):4.
- Marangoni, E., Le Romancer, M., Foray, N., Muller, C., Douc-Rasy, S., Vaganay, S., Abdulkarim, B., Barrois, M., Calsou, P., Bernier, J., Salles, B., Bourhis, J. (2000). Transfer of Ku86 RNA antisense decreases the radioresistance of human fibroblasts. *Cancer Gene Ther.* 7: 339–346.
- Marder, B.A., Morgan, W.F.(1993) Delayed chromosomal instability induced by DNA damage. *Mol Cell Biol.*13:6667–77.
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C., LaFace, D.M., Green, D.R.(1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 182(5):1545-56.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 88: 1515-31.
- Maurer-Fogy, I., Reutelingsperger, C.P., Pieters, J., Bodo, G., Stratowa, C., Hauptmann, R. (1988). Cloning and expression of cDNA for human vascular anticoagulant, a Ca²⁺-dependent phospholipid-binding protein. *Eur J Biochem.* 174(4):585-92.
- Mc Lachlan-Burgess, A., Mc Carthy, S., Griffin, C., Richer, J., Cutler, R.G., Pandey, S. (2006). Differential response induced by exposure to low-dose ionizing radiation in SHSY-5Y and normal human fibroblast cells. *Appl Biochem Biotechnol.* 135(2):159-78.
- Merrifield, M., and Kovalchuk, O. (2013). Epigenetics in radiation biology: a new research frontier. *Frontiers in Genetics* 4.
- Mills, K.D., Ferguson, D.O., Essers, J., Eckersdorff, M., Kanaar, R., Alt, F.W. (2004). Rad54 and DNA Ligase IV cooperate to maintain mammalian chromatid stability. *Genes Dev.* 18:1283–1292.
- Min, S.K., Lee, S.K., Park, J.S., Lee, J., Paeng, J.Y., Lee, S.I., Lee, H.J., Kim, Y., Pae, H.O., Kim, E.C. (2008). Endoplasmic reticulum stress is involved in hydrogen peroxide induced apoptosis in immortalized and malignant human oral keratinocytes. *J. Oral Pathol. Med.* 37: 490–498.

Mitchel, R.E.J. (2006). Low doses of radiation are protective in vitro and in vivo: evolutionary origins. *Dose-Response* 4(2):75–90.

Mladenov, B., Illiakis, G. (2011). Induction and repair of DNA-DSBs: the increasing spectrum of NHEJ pathway. *Mutat Res.* 711(1-2):61-72.

Møller, A.P., Bonisoli-Alquati A, Rudolfson, G., Mousseau, T.A. (2012). Elevated mortality among birds in Chernobyl as judged from skewed age and sex ratios. *PLoS ONE* 7(4)).

Møller, A.P., Mousseau, T.A. (2013). Assessing effects of radiation on abundance of mammals and predator–prey interactions in Chernobyl using tracks in the snow. *Ecol Indic* 26:112–116.

Morgan, W.F., Day, J.P., Kaplan, M.I., McGhee, E.M., Limoli, C.L..(1996) Genomic instability induced by ionizing radiation. *Radiat Res.*146(3):247-58.

Morgan, W.F. (2003) Non-targeted and Delayed Effects of exposure to Ionizing Radiation: I. Radiation-Induced Genomic Instability and Bystander Effects In vitro *Radiat Res* 159:567–80.

Morgan, W.F. (2003). Is there a common mechanism underlying genomic instability, bystander effects and other nontargeted effects of exposure to ionizing radiation? *Oncogene* 22:7094–7099.

Morgan, W.F.(2003) Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: II. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vivo, clastogenic factors and transgenerational effects. *Radiat Res* 59:581–96.

Morgan, W.F., and Sowa, M.B. (2005). Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:14127–14128.

Morgan, W.F., Sowa, M.B. (2007). Non-targeted bystander effects induced by ionizing radiation. *Mutat Res.*616(1-2):159-64.

Morgan, W.F. (2011). Radiation-induced genomic instability. *Health Physics* 100:280–281.

Mothersill C., Seymour C. (2014). Implications for human and environmental health of low doses of ionising radiation. *Journal of Environmental Radioactivity* 133:5-9.

Mrdjanović, J., Jakimov, D., Tursijan, S., Bogdanović, G.(2005). Evaluation of sister chromatid exchanges, micronuclei, and proliferating rate index in hospital workers chronically exposed to ionizing radiation. *J Buon* 10(1) 99-103.

Mudry, M.D., Carballo, M.A., (2006). *Genética Toxicológica*. De Los Cuatro Vientos, Buenos Aires. Argentina.

Muller, M. (2009). Cellular senescence: Molecular mechanisms, in vivo significance, and redox considerations. *Antioxid. Redox Signal.* 11:59–98.

National Council on Radiation Protection, 1991, *Guidance on Radiation Received in Space Activities: Report 98*, Nat. Council on Radiat. Prot., Bethesda, MD.

Naumov, S., von Sonntag, C. (2008). The energetics of rearrangements and water elimination reactions in the radiolysis of the DNA bases in aqueous solutions (aqueous and $\cdot\text{OH}$ Attack): DFT calculations. *Radiat. Res.* 169:355-363.

Norppa, H., Falck, G.C.M. (2003). What do human micronuclei contain? *Mutagenesis.* 18(3):221.

Nussenzweig A, C., Chen, V., da Costa Soares, M., Sanchez, K., Sokol, M.C. Nussenzweig, G.C. Li, G. (1996). Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination, *Nature* 382:551–555.

Nussenzweig A. C., Sokol, K., Burgman, P., Li, L. Li, G.C. (1997). Hypersensitivity of Ku80-deficient cell lines and mice to DNA damage: the effects of ionizing radiation on growth, survival and development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:13588–93.

O'Driscoll, K.M. Cerosaletti, P.M. Girard, Y. Dai, M. Stumm, B. Kysela, B. Hirsch, A. Gennery, S.E. Palmer, J. Seidel, R.A. Gatti, R. Varon, M.A. Oettinger, H. Neitzel, P.A. Jeggo, P. (2001). Concannon, DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol. Cell* 8:1175–1185.

O'Brien, I.E., Reutelingsperger, C.P., Holdaway, K.M. (1997). Annexin-V and TUNEL use in monitoring the progression of apoptosis in plants. *Cytometry* 29(1):28-33.

OECD, 2007. *In Vitro micronucleus test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organization for Economic Co-operation and Development. OECD. Paris.

Ojima, M., Ban, N., Kai, M. (2008). DNA double-strand breaks induced by very low X-ray doses are largely due to bystander effects. *Radiat Res.* 170(3):365-71.

Olive, P.L., Banáth, J.P., Durand, R.E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res.* 122(1):86-94.

Olive, P.L. (1994). Detection of hypoxia by measurement of DNA damage in individual cells from spheroids and murine tumours exposed to bioreductive drugs. II. RSU 1069. *Int J Radiat Biol.* 66(1):23-8.

Olive, P.L. (1996). DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *International Journal of Radiation Biology* 75:395-405.

Olive, P.L., Banáth, J.P. (1997). Multicell spheroid response to drugs predicted with the comet assay. *Cancer Res.* 57(24):5528-33.

Olive, P. (1999) Review DNA damage and repair in individual cells, applications of the comet assay in radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol* 75(4) 395-405.

Olive, P. (2009). Impact of the comet assay in radiobiology. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 681:13–23.

- Olivieri, G., Bodycote, J., Wolff, S. (1984). Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science*. 223(4636):594-7.
- Omori, S., Takiguchi, Y., Suda, A., Sugimoto, T., Miyazawa, H., Tanabe, N., Tatsumi, K., Kimura, H., Pardington, P.E., Chen, F., Chen, D.J., Kuriyama, T. (2002). Suppression of a DNA double-strand break repair gene, Ku70, increases radio- and chemosensitivity in a human lung carcinoma cell line. *DNA Repair* 1:299–310.
- OMS (2012). Radiaciones ionizantes: efectos en la salud y medidas de protección. Nota descriptiva N°371.
- Osborne, J.C., Miller, J.H. Kempner, S.(2000). Molecular mass and volume in radiation target theory. *Biophys J*. 78(4): 1698–1702.
- Ostling, O., Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 123:291–298.
- Palmitelli, M., de Campos-Nebel, M., Gonzalez-Cid, M. (2015). Progression of chromosomal damage induced by etoposide in G2 phase in a DNA-PKcs-deficient context. *Chromosom Res*. 23(4):719-32
- Palumbo, S., Comincini, S. (2013). Autophagy and ionizing radiation in tumors: The “survive or not survive” dilemma. *J. Cell. Physiol*.228:1–8.
- Panganiban, R.A., Mungunsukh, O., Day, R.M.(2012). X-irradiation induces er stress, apoptosis, and senescence in pulmonary artery endothelial cells. *Int. J. Radiat. Biol*. 89(8):656-67.
- Panganiban, R.A., Andrew L.,Day, R.(2013). Review. Mechanisms of Radiation Toxicity in Transformed and Non-Transformed Cells. *Int. J. Mol. Sci*. 14:15931-58.
- Peterson, S. R., Kurimasa, A., Oshimura, M., Dynan, W.S., Bradbury, E.M., Chen, D.J. (1995). Loss of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase in DNA double-strand-break-repair mutant mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3171-3174.
- Petrini, J.J., Stracker Travis H. (2003). The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends in cell biology* 13(9):458-62.
- Pfuhler, S., Wolf, H.U. (1996). Deteccion of DNA-crosslinkingagents with the alkaline comet assay. *Environ Mol Mutagen* 27:196-201.
- Pierce, A.J., Stark, J.M., Araujo, F.D., Moynahan, M.E., Berwick, M., Jasin, M. (2001). Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends Cell Biol* 11:52-59.
- Ponzinibbio, M.V., Crudeli, C., Peral García, P., Seoane, A. (2008). Cytogenetic and cytomolecular delayed damage induced in human fibroblasts by low x-ray doses. *Journal of Basic & Applied Genetics*, 19 (1):35-41.

- Ponzinibbio, M.V. Crudeli, C., Peral García, P., Seoane, A. (2010). Low-dose radiation employed in diagnostic imaging causes genetic effects in cultured cells. *Acta Radiológica* 9: 1028-33.
- Portess, D.I., Bauer, G., Hill, M.A., O'Neill, P. (2007). Low-Dose Irradiation of Nontransformed Cells Stimulates the Selective Removal of Precancerous Cells via Intercellular Induction of Apoptosis. *Cancer Res* 67(3) :1246-1253.
- Price, W.A., Stobbe, C.C., Park, S.J., Chapman J.D. (2004). Radiosensitization of tumour cells by cantharidin and some analogues. *Int J Radiat Biol.* 80(4):269-79.
- Prise, K.M., Folkard, M., Michael, B.D. (2003). A review of the bystander effect and its implications for low-dose exposure. *Radiat Prot Dosim.* 104(4):347-55.
- Puck, T., Marcus P. (1956). Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med.* 103(5):653-66.
- Qiu, W., Leibowitz, B., Zhang, L., Yu, J. (2010). Growth factors protect intestinal stem cells from radiation-induced apoptosis by suppressing puma through the PI3K/Akt/p53 axis. *Oncogene* 29: 1622–1632.
- Quennet, V., Beucher, A., Barton O., Takeda, S., Lobrich, M. (2011). CtIP and MRN promote non-homologous end joining of etoposide-induced DNA double-strand breaks in G1. *Nucleic Acids Research* 39:62144—52.
- Reutelingsperger, C.P., Hornstra, G., Hemker, H.C. (1985). Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *Eur J Biochem.* 16;151(3):625-9.
- Rhee, S.G., Chang, T.S., Bae, Y.S., Lee, S.R., Kang, S.W. (2003). Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14:211–215.
- Riballo, E., Doherty, A., Recio, M., Fricke, A., Parker, A.R., Ku, G.Smith, C.M. Reis, C. Krempler, A. Rief, N., Dahm, K., Jackson, S.P., Gennery, A., Jeggo, P.A., Lobrich, M. (2004). A Pathway of Double-Strand Break Rejoining Dependent upon ATM, Artemis, and Proteins Locating to H2AX Foci. *Molecular Cell.* 16:715–24.
- Riballo, S.E. Critchlow, S.-H. Teo, A.J. Doherty, A. Priestley, B. Broughton, B. Kysela, H. Beamish, N. Plowman, C.F. Arlett, A.R. Lehmann, S.J. Jackson, P.A. Jeggo. (1999) Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukemia patient, *Curr. Biol.* 9:699–702.
- Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L.H., Lobrich, M. (2003). Pathways of DNA Double Strand Break repair during mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol.* 16:5706-15.
- Rothkamm, K., Lobrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low X-ray doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA:*100(9)5057–5062.
- Rothkamm, Prise, (2009). Review: new molecular targets in radiotherapy: DNA damage signaling and repair in targeted and non-targeted cells. *Eur J Pharmacol.* 625(1-3):151-5.

- Sadji, Z., Le Romancer, M., Lewin, M.J., Reyl-Desmars, F. (2000). Human colon carcinoma cell-line HCT116 transfected by antisense cDNA as a tool to study the Ku86 involvement in cell proliferation, *Cell. Signal.* 12:745–50.
- Samper, E., Goytisolo, F.A., Slijepcevic, P., van Buul, P.P.W., Blasco, M.A. (2000). Mammalian Ku86 protein prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang, *EMBO Rep.* 1:244–252.
- Safi Oz, Z., Doğan Gun, B., Gun, M.O., Ozdamar, S.O. (2015). Cytomorphometric and Morphological Analysis in Women with *Trichomonas vaginalis* Infection: Micronucleus Frequency in Exfoliated Cervical Epithelial Cells. *Acta Cytol.* 59(3):258-64.
- Sankaranarayanan, K. (1982). Effects of a chromosome-3 mutator gene on radiation-induced mutability in *Drosophila melanogaster* females. *Mutat Res.* 92(1-2):139-49.
- Sari-Minodier, I., Orsière, T., Auquier, P., Martin, F., Botta, A. (2007). Cytogenetic monitoring by use of the micronucleus assay among hospital workers exposed to low doses of ionizing radiation. *Mutat Res.* 629(2):111-21.
- Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., Jackson, S.P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature.* 450(7169):509-14.
- Sasaki, M.S., Ejima, Y., Tachibana, A., Yamada, T., Ishizaki, K., Shimizu, T., Nomura, T. (2002). DNA damage response pathway in radioadaptive response. *Mutat Res.* 504(1-2):101-18.
- Sasaki, M.S., Tachibana, A., and Takeda, S. (2014). Cancer risk at low doses of ionizing radiation: artificial neural networks inference from atomic bomb survivors. *Journal of Radiation Research* 55:391–406.
- Sawant, S.G., Randers-Pehrson, G., Metting, N.F., Hall, E.J. (2001). Adaptive response and the bystander effect induced by radiation in C3H 10T(1/2) cells in culture. *Radiat Res.* 156(2):177-80.
- Senthilkumar, C.S., Akhter, S., Malla, T.M., Sah, N.K., Ganesh, N. (2015). Increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes contributes to cancer risk in the methyl isocyanate-affected population of Bhopal. *Asian Pac J Cancer Prev.* 16(10):4409-19.
- Seoane, A., Güerci, A., Dulout, F. (2007). Genetic instability induced by low doses of x-rays in hamster cells. *Int J Radiat Biol* 83:81–7.
- Serra, M., Reverter-Branchat, G., Maurici, D., Benini, S., Shen, J.N., Chano, T., Hattinger, C.M., Manara, M.C., Pasello, M., Scotlandi, K., Picci, P. (2004). Analysis of dihydrofolate reductase and reduced folate carrier gene status in relation to methotrexate resistance in osteosarcoma cells. *Ann Oncol.* 15(1):151-60.
- Shim, G., Ricoul, H., Azzam, S. (2014). Crosstalk between telomere maintenance and radiation effects: A key player in the process of radiation-induced carcinogenesis. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2014. doi: 10.1016

- Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H., Wahl, G.M. (1998). Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J Cell Biol.* 140(6):1307-20.
- Shimizu, N., Shimura, T., Tanaka, T. (2000). Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutat Res.* 448(1):81-90.
- Sierra Cano, B.Y. (2011). Evaluación del efecto genotóxico de la Radiación Ionizante en médicos ortopedistas expuestos laboralmente, en cuatro instituciones de salud en Bogotá, Colombia. Tesis Magister. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Departamento de Toxicología Bogotá, D.C. Colombia.
- Sigurdson, A.J., Ron, E. (2004). Cosmic radiation exposure and cancer risk among flight crew. *Cancer Invest.* 22(5):743-61.
- Singh, N.P., Stephens, R.E., Schneider, E.L. (1994). Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int J Radiat Biol.* 66(1):23-8.
- Singh, P., Mc Coy M., Tice R., Schneider E. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175:184-191.
- Singleton, B.K., Priestley, A., Steingrimsdottir, H., Gell, D., Blunt, T., Jackson, S.P., Lehmann, A.R., and Jeggo, P.A. (1997). Molecular and biochemical characterization of xrs mutants defective in Ku80. *Molecular and Cellular Biology* 17:1264–1273.
- Slater, M. 2011. Non-Ionizing Radiation hazards and principles of controls. <http://www.slideshare.net/mikeslater/ionising-radiation>.
- Smider, V., Rathmell, W.K., Lieber, M.R., Chu, G. (1994). Restoration of X-ray resistance and V(D)J recombination in mutant-cells by Ku cDNA. *Science* 266:288-291.
- Streffer, (2005). Bystander Effects, adaptive response and genomic instability induced by prenatal irradiation. *Mutat Res.* 568(1):79-8
- Su, Y.H., Lee, Y.L., Chen, S.F., Lee, Y.P., Hsieh, Y.H., Tsai, J.H., Hsu, J.L., Tian, W.T., Huang, W. (2013). Essential role of β -human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 in mitochondrial oxidative DNA repair. *Environ Mol Mutagen.*54(1):54-64.
- Surova, O., Zhivotovsky, B. (2012). Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene.* 32(33):3789-97
- Taccioli, T. G., Gottlieb, T.M., Blunt, T., Priestley, A., Demengeot, J., Mizuta, R., Lehmann, A.R., Alt, F.W., Jackson, S.P., Jeggo, P.A. (1994). Ku80: product of the XRCC5 gene. Role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science* 265:1442-45.
- Tait, J. F., Gibson, D., Fujikawa, K. (1989). Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family. *J Biol Chem.* 264(14):7944-9.
- Tait, S.W., Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*11:621–632.

- Takata, M., Sasaki, M.S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., Takeda, S. (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* 17:5497–5508.
- Tamarín, R. (1996). *Principios de Genética*. Capítulo 1. Editorial Reverté. ISBN 9788429118506.
- Tanaka, K. Kohda, A., Toyokawa, T., Ichinohe, K., Oghiso, Y. (2008). Chromosome aberration frequencies and chromosome instability in mice after long term exposure to low-dose-rate gamma radiation. *Mutat Res.* 657(1):19-25.
- Tice, R.R., Strauss, G.H. (1995). The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells.* 1995 1:207-14.
- Tice, R.R. Agurell, E. Anderson, D. Burlinson, B. Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae Y., Rojas, E., Ryu J.C., Sasaki, Y.F. (2000). Single Cell Gel/Comet Assay. Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol. Mutagen.* 35(3):206-221.
- Touil, N., Aka, P.V., Buchet, J.P., Thierens, H., Kirsch-Volders, M. (2002) Assessment of genotoxic effects related to chronic low level exposure to ionizing radiation using biomarkers for DNA damage and repair. *Mutagénesis.* 17(2):223-232.
- Trosko, J.E., Chang, C.C., Upham B.L., Tai, M.H. (2005) Low-dose ionizing radiation: induction of differential intracellular signaling possibly affecting intercellular communication. *Radiat Environ Biophys.* 44(1):3-9
- Trott, K.R., Jamali, M., Manti, L., Teibe A. (1998) Manifestations and mechanisms of radiation-induced genomic instability in V-79 Chinese hamster cells. *Int J Radiat Biol.* 74(6):787-91.
- Tsang, K.Y.; Chan, D., Bateman, J.F., Cheah, K.S. (2010). In vivo cellular adaptation to ER stress: Survival strategies with double-edged consequences. *J. Cell Sci.* 123:2145–2154.
- Tubiana, M., Aurengo, A., Averbeck, D., Masse, R. (2006) Recent reports on the effect of low doses of ionizing radiation and its dose-effect relationship. *Radiat Environ Biophys* 44:245–51.
- Tubiana, M., Aurengo, A., Averbeck, D., Masse, R. (2006) The debate on the use of linear no threshold for assessing the effects of low doses. *J Radiol Prot* 26:317–24.
- Tucker, J.D. (2008). Review Low-dose ionizing radiation and chromosome translocations: A review of the major considerations for human biological dosimetry. *Reviews in Mutation Research* 659(3):211–220.
- Uegaki, K, Adachi, N., So, S., Iizumi, S., Koyama, H. (2006). Heterozygous inactivation of human Ku70/Ku86 heterodimer does not affect cell growth, double-strand break repair, or genome integrity. *DNA Repair* 5:303–311.

- Umegaki, K., Fenech, M. (2000). Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis*. 15(3):261-9.
- Upton, A.C. (2002). Carcinogenic effects of low-level ionizing radiation: problems and prospects. *In Vivo*. 16(6):527-33.
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., Shiloh, Y. (2003) Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *Eur Mol Biol Org J* 22:5612-21.
- van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B., Reutelingsperger, C.P.(1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*. 31(1):1-9.
- van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H., Kanaar, R. (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet*. 2:196–206.
- Vaseva, A.V.; Moll, U.M. (2009). The mitochondrial p53 pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1787: 414–420.
- Venkat, S., Apte, S.K., Chaubey, R.C., Chauhan, P.S.(2001). Radioadaptive response in human lymphocytes in vitro. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 20(3):165-75.
- Verheij, M., Bartelink, H. (2000). Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue Res*. 301:133–142.
- Vijayalaxmi. M., Strauss, G.H., Tice, R.R. (1993). An analysis of gamma-ray-induced DNA damage in human blood leukocytes, lymphocytes and granulocytes. *Mutat Res*.292(2):123-8.
- von Zglinicki, T.(2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci*. 27(7):339-44.
- Wang, M., Illiakis, G. (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEK pathways. *Nucleic Acids Res*. 34(21):6170-82.
- Wang, J., Zhang, Y., Xu, K., Mao, X., Xue, L., Liu, X., Yu, H., Chen, L., and Chu, X. (2014). Genome-Wide Screen of DNA Methylation Changes Induced by Low Dose X-Ray Radiation in Mice. *PLoS ONE* 9, e90804.
- Ward, T.H., Marples, B. (2000). Technical report: SYBR Green I and the improved sensitivity of the single-cell electrophoresis assay. *Int J Radiat Biol*.76(1):61-5.
- Waters, K.M.; Stenoien, D.L.; Sowa, M.B.; von Neubeck, C.; Chrisler, W.B.; Tan, R.; Sontag, R.L.; Weber, T.J. (2013). Annexin A2 modulates radiation-sensitive transcriptional programming and cell fate. *Radiat. Res.*:179, 53–61.
- Watters, D. (1999). Molecular mechanisms of ionizing radiation-induced apoptosis. *Immunology and Cell Biology* 77:263–271.
- Weterings, E., Verkaik, N.S., Keijzers, G., Florea, B.I., Wang, S.Y., Ortega, L.G., Uematsu, N., Chen, D.J., van Gent, D.C. (2008). The Ku80 Carboxi Terminus Stimulates Joing and Artemis-Mediated Processing of DNA ends. *Mol Cell Biol*. 29(5):1134-42.

- Wojewódzka, M., Kruszewski, M., Iwaneńko, T., Collins, A.R., Szumiel, I. (1998). Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation. I. Strand breakage. *Mutat Res.* 416(1-2):21-35.
- Wright, E.G. (1999). Inherited and inducible chromosomal instability: a fragile bridge between genome integrity mechanisms and tumourigenesis. *J Pathol.* 187(1):19-27.
- Wu, W., Wang M. Weizhong W., Singh K., Mussfeldt T., Iliakis G. (2007). Repair of radiation induced DNA double strand breaks by backup NHEJ is enhanced in G2. *DNA Repair (Amst)* 7(2):329-38.
- Wu, W., Wang, M., Mussfeldt, T., Iliakis, G. (2008). Enhanced use of backup pathways of NHEJ in G2 in Chinese hamster mutant cells with defects in the classical pathway of NHEJ. *Radiat Res.* 170(4):512-20.
- Wu, W., Wang, M., Wu, W., Singh, S.K., Mussfeldt, T., Iliakis, G. (2008). Repair of radiation induced DNA double strand breaks by backup NHEJ is enhanced in G2. *DNA Repair (Amst)*.7(2):329-38.
- Xiao, M., Whitnall, M.H. (2009). Pharmacological countermeasures for the acute radiation syndrome. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2:122–133.
- Yan, C., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A., Manis, J.P. (2007) IgH class switching and translocations use a robust non classical end joining pathway. *Nature* 449:478-482.
- Yannone, S.M., Khan, I.S., Zhou, R.Z., Zhou T. Povrick LF. (2008). Coordinate 5'and 3'endonucleolytic trimming of terminally blocked blunt DNA double-strand break end by Artemis nuclease and DNA-dependent protein kinase. *Nucleic Acid Res.* 36:3354-65.
- Yano, K., Morotomi-Yano, K., Wang, S.Y., Uematsu, N., Lee, K.J., Asaithamby, A., Weterings, E. Chen, D. J. (2008). Ku recruits XLF to DNA double-strand breaks. *EMBO Rep.*9(1):91-6.
- Yi, H., Liang, B., Jia, J., Liang, N., Xu, H., Ju, G., Ma, S., Liu, X. (2013). Differential roles of mir-199a-5p in radiation-induced autophagy in breast cancer cells. *FEBS Lett.* 587:436–443.
- Yokouchi, M., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Okamura, M., Du, S., Kasai, A., Takano, Y., Shitamura, A., Shimada, T., Yao, J. (2008). Involvement of selective reactive oxygen species upstream of proapoptotic branches of unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 283:4252–60.
- Yousef, B.A., Hassan, H.M., Guerram, M., Hamdi, A.M., Wang, B., Zhang, L.Y., Jiang, Z.Z.(2016). Pristimerin inhibits proliferation, migration and invasion, and induces apoptosis in HCT-116 colorectal cancer cells. *Biomed Pharmacother.* 79:112-9.
- Zachowski, A. (1993). Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J.* 294 (1):1-14.
- Zhang, H., Buchholz, T.A., Hancock, D., Spitz, M.R., Wu, X. (2000). Gammaradiation-induced single cell DNA damage as a measure of susceptibility to lung cancer: a preliminary report. *Int J Oncol* 17:399–404.

Zhang Z., Zhang, Y., Zhu, H., Yang, J., Shen, G.(2000). CD4+ T cell apoptosis induced by anti-CD4 antibodies. J Tongji Med Univ. 20(2):100-2.

Zhou, J., Lim, Ch., Li, J.J., Cai, L., Zhang, Y. (2006). The role of NBS1 in the modulation of PIKK family proteins ATM and ATR in the cellular response to DNA damage. Cancer Letters 243:9-15.

ANEXO 1

Soluciones de uso general:

- Solución de PBS (Phosphato Buffer Saline) libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} :

NaCl 0.14 M

KCl 0.004 M (0.2982 g)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 0.01 M

Llevar a 1000 ml con H_2O destilada y ajustar a pH 7.0

- Solución de Tripsina-Edta:

Tripsina-Edta 0.05/0.02 % en PBS)

Esterilizar por filtración y fraccionar a razón de 50 ml por frasco y congelar a -20°C .

- Medios de cultivo utilizado para ambas líneas celulares:

Ham F 12 90 %

Suero Fetal Bovino 10 %

Penicilina 50 UI/ml

Estreptomicina 50 μg /ml

Soluciones utilizadas para el Ensayo de Electroforésis de Células Aisladas:

➤ Agarosa de Punto de Fusión Normal (APFN):

Solución al 0,5 % (GIBCO BRL) en PBS.

Calentar varias veces sin llegar al punto de ebullición para que se disuelva la agarosa. Alicuotar y mantener a 4°C hasta su uso.

➤ Agarosa de Bajo Punto de Fusión (ABPF):

Solución al 0,5 % (GIBCO BRL) en PBS.

Calentar varias veces sin llegar al punto de ebullición para que se disuelva la agarosa. Alicuotar y mantener a 4°C hasta su uso.

➤ Solución de lisis:

NaCl 2,5 M, EDTA 100mM, Tris 10 mM

Esta última solución debe ser ajustada a pH 10 con granallas de NaOH. En caso de superar este valor de pH, debe ser corregido con HCl hasta alcanzar el valor de 10.

La solución debe prepararse previamente a la realización de la técnica. Es aconsejable que no permanezca preparada por más de tres días

En el momento de ser utilizada, por cada 100ml de buffer de lisis debe agregarse: Tritón X- 100: 1ml; DMSO: 10 ml. Una vez que se agrega el Tritón X-100 y DMSO debe mezclarse suavemente por inmersión y finalmente el almacenaje debe realizarse a 4-8 °C para evitar la cristalización.

ANEXO 1

➤ Solución de electroforesis:

- Soluciones Stock: - NaOH 10 M.
- EDTA disódico 200mM
- Solución de Trabajo: 30 ml de Solución Stock de NaOH + 5 ml de Solución Stock de EDTA, llevar volumen a un litro, con lo que se obtiene una solución cuya concentración final es de 300mM de NaOH y EDTA disódico 1mM. El buffer de electroforesis debe prepararse fresco antes de cada corrida y luego se descarta.

➤ Tampón de Neutralización:

- Tris-HCl 0,4 M a pH 7,5

➤ Solución de Tinción:

- Syber Green (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) 1 μ l en 1 ml de agua destilada.

Soluciones utilizadas para el Test de Micronúcleos:

- Solución de citocalasina-B: (Sigma, St. Louis, MO, USA).
Solución Stock: 1 mg de Cytocalasina B en 1mL de DMSO.
Solución de Trabajo Concentración final utilizada: [3µg/mL]

- Solución de Fijador Carnoy's:
Proporción 3:1, Metanol y Ac. Acético glacial.

- Solución de tinción:

Giemsa al 5% en agua.

Soluciones utilizadas para el Ensayo de Anexina V-FITC:

- Anexina V-FITC conjugate (Biosource).

- Binding Buffer:
10 mM Heppes/ NaOH pH 7,4
140mM NaCl
2,5 mM CaCl₂

- Sol de tincion FITC-Annexin V (1 mg/ml en Binding Buffer)