

VII REUNIÓN CIENTÍFICA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MUTAGÉNESIS AMBIENTAL



**3,4 y 5 de Julio
1996
Sevilla**

**Organizado por:
Grupo de Cultivo Celular y Radiobiología
Dpto. de Biología Celular
Universidad de Sevilla**



VII REUNION CIENTIFICA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MUTAGENESIS AMBIENTAL

SEVILLA, 3, 4 y 5 de Julio de 1.996

**Organizado por el Departamento de
Biología Celular de la Universidad de Sevilla**

COMITE ORGANIZADOR

**Felipe Cortés
Pablo Escalza
Paula Daza
Nuria Pastor**

**Joaquín Piñero
Santiago Mateos
M^a José Flores
Eduardo Tello**

**Trini Ortiz
Inma Domínguez
Manuela López-Baena
M^a Angeles Ledesma**

SEDE DE LA REUNION

**Paraninfo de la Universidad de Sevilla
Edificio Central de la Universidad - Rectorado.
c/ San Fernando**

Reunión reconocida de Interés Sanitario por el Ministerio de Sanidad y Consumo y de Interés Medioambiental por la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía.

Colaboran:

- Vicerrectorado de Investigación - Univ. de Sevilla**
- Vicerrectorado de Extensión Universitaria - Univ. Sevilla**
- Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía**
- Dirección General de Universidades e Investigación de la Junta de Andalucía**
- Fundación El Monte**
- Viral S.A.**
- Biomol**
- Técnicas Médicas MAB**
- Izasa**

INDICE

PROGRAMA	I - XI
RESUMENES DE PONENCIAS	1 - 4
RESUMENES DE COMUNICACIONES	5 - 27
INDICE DE AUTORES	28 - 30

DÍA 3, MIERCOLES

**19:00 ACTO DE APERTURA DE LA VII REUNIÓN DE
LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MUTAGÉNESIS
AMBIENTAL**

19:30 PONENCIA

**DNA-ALQUILTRANSFERASAS: REPARACIÓN Y
ESPECIFICIDAD MUTAGÉNICA.**

Pueyo C.

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba.
Avda. de Medina Zahara s/n 14071-Córdoba.**

DÍA 4, JUEVES

9:00 PONENCIA

**THE MOLECULAR BASIS OF SENSITIVITY TO
IONISING RADIATION IN MAMMALIAN CELLS.**

McMillan T.J.

**Environmental and Biological Sciences, Lancaster
University, Lancaster, LA1 4YQ, U.K.**

10:30 PAUSA CAFE

COMUNICACIONES.-

Moderador: S. Mateos

11:00

**DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE 8-OHdG
EN MUTANTES DE *ESCHERICHIA COLI*
DEFICIENTES EN DEFENSAS ANTIOXIDATIVAS.**

**Alhama J., Rodríguez-Ariza A., Ruiz-Laguna J.,
Pueyo C., López-Barea J.**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba.
14071-Córdoba.**

11:15

**ADN-ALQUILTRANSFERASAS DE *E. COLI*
POTENCIAN LA CITOTOXICIDAD DE
DIBROMOALCANOS EN CÉLULAS DE
MAMÍFERO.**

Abril¹ N., Pueyo¹ C., Margison² G.P.

**¹Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular.
Universidad de Córdoba. ²Paterson Inst. Cancer Res.,
Christie Hosp. NHS Trust, Manchester, U.K.**

DIA 4, JUEVES

11:30

HETEROGENEITY OF DNA REPAIR AT THE CHROMOSOME LEVEL.

Surrallés, J., Darroudi F., Natarajan A.T.

MGC, Department of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis, Sylvius Laboratories, Leiden University, Wassenaarseweg 72, 2333 AL Leiden, The Netherlands.

11:45

DOSIS BAJAS DE RAYOS X Y REPARACIÓN G2 EN LINFOCITOS HUMANOS.

PINCHEIRA¹ J.V., LÓPEZ-SÁEZ² J.

¹Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile. ²Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma, Madrid.

12:00 DESCANSO

12:30

ACTIVIDAD ANEUGÉNICA DE LA COLCHICINA EVALUADA MEDIANTE TÉCNICAS DE FISH EN EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN LINFOCITOS HUMANOS.

Ramírez M.J., Puerto S., Carbonell E., Creus A., Marcos R.

Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

DIA 4, JUEVES

12:45

EVALUACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO INDUCIDO POR EL BENCENO Y EL TOLUENO EN LINFOCITOS HUMANOS UTILIZANDO EL ENSAYO DEL COMETA (SCGE).

Pitarque M., Ribas G., Carbonell E., Creus A., Marcos R.

Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

13:00

INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS EN PACIENTES CON HIPERTIROIDISMO TRATADOS CON EL ISÓTOPO RADIACTIVO YODO-131.

Gutierrez¹ S., Carbonell¹ E., Galofré² P., Creus¹ A., Marcos¹ R.

¹Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

²Servei de Medicina Nuclear, Ciutat Sanitària i Universitària Vall d'Hebron, Pg. Vall d'Hebron 119, 08035 Barcelona.

DIA 4, JUEVES

13:15

DETECCION DE ROTURAS CROMOSÓMICAS EN LAS REGIONES 1Q12, 9Q12 Y 16Q11.2 INDUCIDAS POR MELPHALAN EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS USANDO HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA MULTICOLOR.

De la Peña¹ E., Schuler² M., Eastmond² D.A.

¹Genotoxicología/Mutagénesis Ambiental. Centro de Ciencias Medioambientales. CSIC. Madrid.

²Environmental Toxicology Graduate Program, Departament of Entomology, University of California, Riverside, U.S.A.

DIA 5, VIERNES

10:00 PONENCIA

**DAÑO AL ADN Y APOPTOSIS EN EL SISTEMA
HEMATOPOYÉTICO.**

Oliver F.J., Collins¹ M.K.L., López-Rivas A.

Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC,
Granada.

¹Institute of Cancer Research, Londres, Gran
Bretaña.

11:30 PAUSA CAFE

COMUNICACIONES

Moderador: F. Cortés

12:00

**RATONES DEFICIENTES EN P⁵³ COMO MODELO
PARA ESTUDIAR LOS MECANISMOS DE
ONCOGÉNESIS TRAS IRRADIACIÓN.**

Real A., Bauluz C., De Vidania R.

Carcinogénesis Ambiental. IMA. CIEMAT. Madrid.

12:15

**INHIBICIÓN DE LA POLI (ADP-RIBOSILACIÓN)
Y GENOTOXICIDAD DE INHIBIDORES DE LAS
ADN TOPOISOMERASAS: ACTIVIDADES ENZI-
MÁTICAS, DAÑO CROMOSÓMICO EN G2 Y
SUPERVIVENCIA CELULAR.**

López-Baena M., Piñero, J., Ortiz, T., Domínguez,
I., Pastor, N., Cortés, F.

Dpto. de Biología Celular. Universidad de Sevilla.

DIA 5, VIERNES

12:30

MODULACIÓN MEDIANTE LIGASA DEL FAGO T4 DEL DAÑO INDUCIDO POR BLEOMICINA EN CÉLULAS DE OVARIO DE HÁMSTER CHINO (CHO6).

Flores, M.J., Ortiz, T., Piñero, J., Cortés, F.
Dpto. de Biología Celular. Universidad de Sevilla.

12:45

CALCULO DEL PORCENTAJE DE CÉLULAS EN FASE QUE CAUSAN INTERFERENCIA EN EL ANÁLISIS DE LAS ROTURAS DE DOBLE CADENA EN EL ADN MEDIANTE ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSADO.

Mateos^{1,2}, S., McMillan^{2,3}, T.J.

¹Dpto. de Biología Celular, Universidad de Sevilla;
²Radiotherapy Research Unit, Institute of Cancer Research, Sutton, U.K.

13:00

RADIOSENSIBILIDAD Y REPARACIÓN DEL DAÑO CAUSADO POR RADIACIÓN IONIZANTE Y ENZIMAS DE REPARACIÓN EN EL ADN DE TRES LÍNEAS CELULARES EPITELIALES.

Daza¹ P., McMillan² T.J., Pfeiffer³ P.

¹Dpto. de Biología Celular. Universidad de Sevilla

²Inst. de Investigaciones contra el Cancer. Sutton, U.K.

³Inst. Genética. Universidad de Colonia

DIA 5, VIERNES

13:15

ANÁLISIS DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS INDUCIDAS POR RAYOS X EN CÉLULAS DE HAMSTER CHINO MEDIANTE LA TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA.

Domínguez¹, I., Boei², J.J.W.A., Balajee³, A.S., Natarajan², A.T.

¹Dpto. de Biología Celular. Universidad de Sevilla.

²Dpto. de Genética y Mutagénesis Química. Universidad de Leiden, Holanda.

³Laboratorio de Genética Molecular. NIH, Baltimore, USA.

13:30

EL ENSAYO DEL COMETA (SCGE) EN CÉLULAS VEGETALES SUPERIORES.

Carrera P., De Miguel M., Navarrete M.H.

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma, CSIC, Madrid.

14:00 DESCANSO

16:00 PONENCIA

RIESGO GENOTÓXICO E IRRADIACIÓN TERAPÉUTICA. ESTUDIO EN PACIENTES TRATADOS CON YODO RADIACTIVO.

Marcos, R.

Grup de Mutagénesi, Departament de Genética i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

DIA 5, VIERNES

17:30 PAUSA CAFE

COMUNICACIONES

Moderador: M.A.Comendador

18:00

INFLUENCIA DE LA MUTACIÓN *MUS308* DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* EN LA MUTAGENICIDAD DE DIETILSULFATO.

Valdés N., Comendador M.A., Sierra, M.

Área de Genética. Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. 33071-Oviedo

18:15

MUTAGENICIDAD DE ENU EN CÉLULAS GERMINALES FEMENINAS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

Álvarez L., Tosal L., Comendador M.A., Sierra M.

Área de Genética. Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. 33071-Oviedo

18:30

ESPECTRO MOLECULAR DE MUTACIÓN INDUCIDO POR ENU EN ESTADIOS POST-MEIOTICOS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* BAJO CONDICIONES DEFICIENTES *MUS308*.

Tosal L., Comendador M.A., Sierra M.

Área de Genética. Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. 33071-Oviedo

DIA 5, VIERNES

18:45

**REEVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE
MUTACIONES DE REPARACIÓN EN EL ENSAYO
W¹ DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*.**

Ferreiro J.A., Sierra M., Comendador M.A.

**Área de Genética. Departamento de Biología
Funcional. Universidad de Oviedo. 33071-Oviedo**

19:00 DESCANSO

19:15

**CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE
DROSOPHILA MELANOGASTER SENSIBLES A
MUTAGENOS UTILIZANDO LA TÉCNICA AP-PCR.**

**López A., Cabré O., Xamena N., Creus A., Marcos
R., Velázquez A.**

**Grup de Mutagènesi, Departament de Genética i de
Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona,
08193 Bellaterra**

19:30

**ESTUDIO DE LA POSIBLE INTERACCIÓN
ENTRE ÁCIDO HÚMICO Y HERBICIDAS EN LA
INDUCCIÓN DE EFECTOS GENOTÓXICOS EN
EL ENSAYO SMART DE *DROSOPHILA*.**

Torre, C., Xamena, N., Creus, A., Marcos, R.

**Grup de Mutagènesi, Departament de Genética i de
Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona,
08193 Bellaterra.**

DIA 5, VIERNES

19:45

ANÁLISIS MOLECULAR DE REVERTIENTES Y MUTANTES DE COLORACIÓN CLARA DE OJOS INDUCIDOS POR AGENTES ALQUILANTES EN UNA CEPA PORTADORA DE UNA TETRAPLICACIÓN DEL ALELO *WHITE-IVORY*.

Suarez S., Velázquez A., Cabré O., Marcos R., Xamena N.

Grup de Mutagènesi, Departament de Genética i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

20:00

ANÁLISIS DE REVERTIENTES FENOTÍPICOS OBTENIDOS A PARTIR DE MUTANTES INSERCIONALES DEL LOCUS *WHITE* MEDIANTE TRATAMIENTOS CON AGENTES ALQUILANTES O CHOQUE TÉRMICO.

Soriano S., Baldrich E., Velázquez A., Marcos R., Cabré O., Xamena N.

Grup de Mutagènesi, Departament de Genética i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

20:30 REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD. ASAMBLEA DE SOCIOS.

RESUMENES
DE
PONENCIAS

DNA-ALQUILTRANSFERASAS: REPARACIÓN Y ESPECIFICIDAD MUTAGENICA

Carmen Pueyo. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, Avenida de Medina Azahara s/n, Córdoba (España).

Las DNA-alquiltransferasas (ATasas) son proteínas que reparan lesiones mutagénicas, principalmente O⁶-alquilG, inducidas por una amplia variedad de agentes alquilantes, monoy bifuncionales. La reparación conlleva la transferencia del grupo alquilo del aducto a un residuo de cisteína de la propia proteína en una reacción estequiométrica y suicida, de manera que la capacidad de reparación depende de la cantidad de proteína presente en la célula. Las ATasas son proteínas ubicuas, entre ellas las mejor estudiadas son las de *Escherichia coli*. Esta bacteria posee dos actividades: la codificada por el gen *ogt* de expresión constitutiva y la codificada por el gen *ada* inducible durante la adaptación a los agentes alquilantes.

El papel de las ATasas Ogt y Ada en la mutagénesis por agentes alquilantes se ha estudiado comparando la sensibilidad del tipo silvestre (*wt*) y de mutantes simples (*ogt⁻ ada⁺* y *ogt⁺ ada⁻*) y dobles (*ogt⁻ ada⁻*) frente a la acción mutagénica de un amplio espectro de agentes alquilantes monofuncionales (metilantes, etilantes, propilantes y butilantes) y bifuncionales (cloroetilnitrosoureas). Los datos indican que la principal línea de defensa celular es la proteína Ogt. Comparativamente la proteína Ada protege sólo de agentes metilantes de tipo Sn-1, como MNNG o MNU, que inducen eficientemente la respuesta adaptativa. La extraordinaria sensibilidad de los mutantes dobles (*ogt⁻ ada⁻*) a la acción mutagénica de agentes metilantes y etilantes se ha correlacionado con la ausencia de actividad ATasa y la incapacidad de estas células para reparar *in vivo* los aductos O⁶-metilG y O⁶-etilG. Las ATasas de *E. coli* se han comparado con ATasas de mamíferos (humana, de ratón y de rata) transformando bacterias *ogt⁻ ada⁻* con plásmidos multicopia que llevan los correspondientes genes procarióticos o los cDNA eucarióticos, y estudiando su sensibilidad a la acción mutagénica de agentes alquilantes. Los datos sugieren que la proteína Ogt puede servir de modelo de la ATasa humana.

Los espectros de mutaciones directas inducidas por agentes alquilantes monofuncionales y bifuncionales en bacterias con y sin actividad ATasa demuestran que: (i) la reparación de lesiones pre-mutagénicas por ATasa desempeña un papel relevante en la distribución final de mutaciones en el blanco genético analizado (gen *lacI*), (ii) la preferencia por reparar lesiones ubicadas en determinadas secuencias de DNA varía según el tamaño del grupo alquilo, y (iii) la reparación por escisión de nucleótidos presenta una especificidad distinta y complementaria a la de la actividad ATasa.

The molecular basis of sensitivity to ionising radiation in mammalian cells.

Trevor J. McMillan, Division of Biological Sciences, Institute of Environmental and Biological Sciences, Lancaster University, Lancaster, LA1 4YQ, U.K.

It is clear that mammalian cells differ widely in their sensitivity to the lethal and mutagenic effects of ionising radiation. Theoretically this can be controlled at the level of damage induction, repair or manifestation. We have performed a number of studies to see which molecular factors most closely relate to radiosensitivity in human tumour cells in order to establish the most critical steps in this process. This has been done with the aim of identifying endpoints that can be used to reliably assess radiosensitivity of normal and tumour cells in a rapid clinical test and to identify targets for the artificial manipulation of radiosensitivity.

In measuring DNA double-strand breaks (DSB) using pulsed-field gel electrophoresis immediately after irradiation we have found a very close correlation between radiosensitivity and initial damage in a series of 20 human tumour cell lines. This suggests that the chemical scavenging ability of cells is important for our survival endpoints. Although technically more difficult, we have also found the rate of rejoining of DSB to correlate with sensitivity, but the significance of the two main components in the kinetics of rejoining remains unclear. By using foreign DNA molecules as probes for repair processes we have found that DSB that have been rejoined may not have been brought together with high accuracy in sensitive cells when compared with resistant cells, although strangely mutations at the *hprt* locus are lower in some sensitive cells.

At the genetic level it appears that radiosensitivity may be related in some way to the status of the p53 gene since in general p53 is functional in sensitive cells but non-functional in resistant cells. This does not relate to the occurrence of apoptosis in these cells so the mechanism by which the p53 exerts an influence remains to be characterised.

There are therefore many points in the post-irradiation events that can influence the final cell fate when looking at survival or mutation. For tumour cells we believe the level of damage induction to be a major factor but this is unlikely to be the case for all cells.

DAÑO AL ADN Y APOPTOSIS EN EL SISTEMA HEMATOPOYETICO.

F.J. Oliver, M.K.L. Collins* y A. López-Rivas.

Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC, Granada, España.

*Institute of Cancer Research, Londres, Gran Bretaña.

Diversos tratamientos que producen daño en el ADN inducen la eliminación de las células diana mediante un proceso de muerte celular programada o apoptosis. Este es el caso de la irradiación gamma, los rayos X y compuestos inhibidores de enzimas claves de la organización del ADN como las topoisomerasas y enzimas del metabolismo de los deoxinucleótidos (dNTP). Por otra parte, la resistencia de determinadas células tumorales a quimio y radioterapia es debida en parte a la sobreexpresión de genes como bcl-2 ó a mutaciones en genes supresores como p53, que regulan el proceso de apoptosis.

El tratamiento de las células hematopoyéticas BAF3 dependientes de interleuquina-3 (IL3) con rayos X, etopósido, metotrexato (MTX), fluorodeoxiuridina (FdU) e hidroxiaurea (HU), induce rápidamente la muerte de las mismas por apoptosis. El tratamiento con MTX, FdU e HU, inhibidores de enzimas del metabolismo de dNTP, produce importantes alteraciones del balance de dNTP en las células BAF3. Por otra parte, la pérdida del factor de supervivencia IL3 induce en estas células un rápido desbalance de los niveles de dNTP que precede a la activación de la ruta de proteasas ICE y a la fragmentación de la cromatina, características de la apoptosis. Estos resultados indican que alteraciones en el balance de deoxinucleótidos y el posible daño al ADN, pueden ser un factor importante en el mecanismo de apoptosis en células hematopoyéticas. Basándonos en estos resultados, hemos analizado el metabolismo de dNTP en células BAF3 inducidas a apoptosis por la pérdida del factor de supervivencia IL3. Nuestros resultados indican que la actividad timidina kinasa (TK) desempeña un papel central en el control de los niveles de dNTP en células BAF3 y está regulada por la IL3. Además, tanto en transfecciones transitoria: como en células que expresan establemente la actividad TK del virus herpes, existe una inhibición clara del proceso de apoptosis, lo que sugiere que la regulación de la actividad TK por factores de supervivencia puede ser una etapa importante en el mecanismo de control de la apoptosis.

Por otra parte, nuestros resultados sugieren que la activación de las proteasas ICE, que desempeñan un papel fundamental en la ejecución del proceso apoptótico en situaciones de daño al ADN, pueden ser una posible diana de la acción de compuestos contaminantes ambientales con capacidad promotora de tumores en carcinógenesis.

RIESGO GENOTÓXICO E IRRADIACIÓN TERAPÉUTICA. ESTUDIO EN PACIENTES TRATADOS CON YODO RADIACTIVO.

Marcos, R.

Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona.

A pesar de los conocidos efectos genotóxicos asociados con la exposición humana a fuentes emisoras de radiación ionizante, las indudables ventajas prácticas que el uso de estas fuentes representa en medicina ha extendido su uso, tanto con fines diagnósticos como terapéuticos.

Aunque actualmente se dispone de gran cantidad de información sobre estudios epidemiológicos realizados con pacientes expuestos a distintas fuentes de irradiación con finalidad médica, los resultados obtenidos son objeto de controversia debido tanto al cálculo de los efectos biológicos inducidos por bajas dosis o dosis fraccionadas, como por la existencia de importantes variaciones individuales frente a los efectos de la radiación. En este contexto hay que indicar que la aparición de nuevas metodologías que incrementan la sensibilidad para detectar los distintos efectos genotóxicos ocasionados por la irradiación, pueden ayudar a aclarar el panorama.

Entre el colectivo de pacientes expuestos terapéuticamente a fuentes de irradiación, cabe citar el formado por aquéllos que sufren hipertiroidismo o cáncer de tiroides, que son usualmente tratados con el isótopo ^{131}I . Al igual que sucede con otros grupos expuestos a otras fuentes de irradiación, existe información contradictoria sobre los diferentes efectos biológicos inducidos por esta exposición. En esta ponencia se presentan resultados (incluidos los propios) obtenidos con estos colectivos en una serie de ensayos que detectan distintos tipos de daño genético.

Finalmente cabe señalar que, teniendo en cuenta que la exposición a ^{131}I puede ser también accidental, como resultado de las emisiones incontroladas de la industria nuclear, los estudios sobre la relación entre la dosis y los efectos biológicos inducidos en pacientes terapéuticamente tratados con ^{131}I pueden tener su utilidad como modelos para predecir el riesgo genotóxico asociado a dicha exposición.

RESUMENES
DE
COMUNICACIONES

Determinación de los niveles de 8-OHdG en mutantes de *Escherichia coli* deficientes en defensas antioxidativas

J. Alhama, A. Rodríguez-Ariza, J. Ruiz-Laguna, C. Pueyo, J. López-Barea.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de
Veterinaria. Universidad de Córdoba. 14071-Córdoba. ESPAÑA.

El daño en el ADN se asocia con la inducción de cáncer, por lo que un marcador de daño mutagénico podría ser útil para estimar el riesgo de cáncer en diversas poblaciones. La 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG), inducido por especies reactivas de oxígeno (EROs) ha sido propuesta como un buen marcador de carcinogénesis.

Los niveles de 8-OHdG varían considerablemente de unos estudios a otros, debido a oxidaciones que se producen durante la extracción del ADN y su digestión posterior. Por ello, hemos realizado diversos estudios para establecer las condiciones óptimas de extracción e hidrólisis del ADN, y dilucidar así los niveles de 8-OHdG que se deben a daños oxidativos reales y distinguirlos de posibles artefactos experimentales. Una vez establecidas las condiciones óptimas, los niveles de este nucleósido se han medido mediante HPLC con detección electroquímica (HPLC-EC) en ADN aislado y exhaustivamente hidrolizado.

La bacteria *Escherichia coli* se ha empleado como modelo para el estudio de los efectos biológicos del estrés oxidativo por el alto grado de conocimiento de su genética. Se conocen los genes que codifican enzimas antioxidativas -SOD (*sodA* y *sodB*) y catalasa (*katG* y *katE*)- y enzimas reparadoras -glicosilasas de 8-oxoG (*fpg*), timina glicol (*nth*) y adenina (*mutY*) y AP endonucleasas como la endo IV (*nfo*) y exo III (*xth*)-. Con el fin de dilucidar el papel de estas enzimas en la defensa celular frente al estrés oxidativo, se han cuantificado los niveles de 8-OHdG en estirpes mutantes de *E. coli*, deficientes en distintas enzimas antioxidativas o reparadoras, tras su exposición a compuestos productores de EROs.

ADN-ALQUILTRANSFERASAS DE *E. COLI* POTENCIAN LA CITOTOXICIDAD DE DIBROMOALCANOS EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

N. Abril^{1,2}, C. Pueyo¹ y G.P. Margison²

¹Depto. Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Veterinaria, Univ. Córdoba, España.

² Paterson Inst. Cancer Res., Christie Hosp. NHS Trust, Manchester, U.K.

En *Escherichia coli* hay dos ADN-alquiltransferasas (ATasas): Una es resultado de la expresión constitutiva del gen *ogt* y tiene actividad O⁶/O⁴-ATasa. La segunda es producto del gen inducible *ada*. Esta proteína Ada tiene dos dominios, uno de función similar a Ogt y otro con actividad reparadora de alquilfosfotriésteres, la cual está implicada en su papel regulador de la respuesta adaptativa. Estudios previos en bacterias han demostrado que ambas ATasas bacterianas promueven los efectos mutagénicos de dos dibromoalcanos de interés ambiental: 1,2-dibromoetano (DBE) y dibromometano (DBM) [1]. En el presente trabajo hemos examinado los efectos de la expresión de estas proteínas procarióticas sobre la citotoxicidad de DBE y DBM en células de mamífero. Se usaron fibroblastos de pulmón de hamster chino transfectadas con plásmidos portadores de los genes *ogt* (línea LH2), *ada* (línea Clone8) y versiones truncadas del gen *ada* que contienen sólo uno de los dos sitios activos de la proteína: la línea SB con el sitio activo sobre O⁶-alqG/O⁴-alqT, y la línea PT con el sitio activo sobre alquilfosfotriésteres. Los resultados claramente demuestran que la expresión de Ogt y especialmente de Ada, potencian la citotoxicidad de DBE y DBM. El efecto resultó totalmente dependiente de la función O⁶-alqG/O⁴-alqT, puesto que no hubo diferencias de citotoxicidad entre la línea PT y la línea control expuestas a estos agentes, mientras que la línea SB resultó incluso más sensible que la que expresaba la proteína Ada entera. Los resultados coinciden con los obtenidos al estudiar el grado de inhibición de la actividad ATasa en extractos de estas líneas celulares por incubación con estos dibromoalcanos. La modulación de los niveles internos de glutatión reducido demostró que este tiol está ejerciendo un efecto protector contra la citotoxicidad de DBE, y en ningún caso alivió el efecto ocasionado por las ATasas. Dos posibles hipótesis surgen a raíz de estos resultados y de los obtenidos anteriormente en bacterias: i) DBE y DBM producen aductos en las posiciones O⁶-alqG/O⁴-alqT del ADN, sin el concurso de GSH. Cuando las ATasas de *E. coli* intentan la reparación, quedan unidas al ADN a través del aducto, potenciando así su mutagenicidad y su letalidad; ii) DBE y DBM interaccionan directa y específicamente con el sitio activo reparador de lesiones premutagénicas de las ATasas y como consecuencia de esta interacción, las ATasas facilitan la modificación química del ADN por estos compuestos, quizás dirigiéndolos hacia la molécula de ADN. Estudios *in vitro* con las proteínas recombinantes permitirán determinar si es posible esta interacción directa de DBE y DBM con las ATasas o si se precisa la formación de aductos en el ADN previamente a la intervención de estas proteínas reparadoras.

[1] Abril *et al.* (1995) Mol Carcinogen 12:110-117.

Heterogeneity of DNA repair at the chromosome level

Surrallés, J., F. Darroudi and A.T. Natarajan

MGC, Department of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis, Sylvius Laboratories, Leiden University, Wassenaarseweg 72, 2333 AL Leiden, The Netherlands.

DNA repair in mammalian cells is highly heterogeneous. It is known that active genes and their transcribed strands are preferentially repaired as a consequence of transcription-coupled mechanisms and that chromatin structure plays an important role in the localization of repair events. Constitutive heterochromatin is characterized by a highly condensed state and is mainly formed by highly repetitive DNA sequences. On the other hand, and according to CpG islands distribution, some chromosomes such as #1, #19 and #20 have a high gene density when compared to chromosome #4 and #18. Another source of genome heterogeneity is the inactive status of one X chromosome in female cells. As a consequence of either lack of active genes and/or highly condensed chromatin structure, one would expect low level of DNA repair in both constitutive heterochromatin, chromosomes with low gene density, and the inactive X chromosome. With this hypothesis in mind, we have investigated in human lymphocytes which is the relative level of DNA repair in diverse chromosome regions: chromosomes #1, #4, #18, #19 and #20 (by double and triple color painting with whole chromosome PCR labelled probes); active and inactive X chromosome (by coupling BrdU immunolabeling and whole X chromosome painting FISH); and chromosome 1 heterochromatin, band 1q12 (by multicolor tandem labeling FISH with alpha satellite and classical satellite III chromosome 1 centromere-specific DNA probes). Excision repair sites originated in G0/G1 phase of cell cycle were converted to chromosome breaks by using DNA repair synthesis inhibitors (Ara-C) which block the gap-filling step of excision repair, resulting in the formation of chromosome breaks at repair sites. Our results clearly show that, although high level of overall genome DNA repair occurred, there is a extremely low level of both spontaneous and ethyl methane sulfonate-induced DNA excision repair in chromosome 1 constitutive heterochromatin, confirming our working hypothesis. This finding is consistent in both early and late G1 phase. When direct acting clastogens such as mitomycin C or X-ray were used, a high frequency of heterochromatin breakage was observed, indicating that tandem labeling is a suitable method to detect such chromosome damage. Results obtained with chromosomes #1, #4, #18, #19 and #20 showed a correlation between DNA repair and gene density: regions with high gene density showed a low spontaneous frequency of chromosome breaks but a high frequency of breaks resulting from repair events. Data on the comparison between the active and the inactive X chromosome will be also presented.

DOSIS BAJAS DE RAYOS X Y REPARACIÓN G2 EN LINFOCITOS HUMANOS

J. V. PINCHEIRA Y J. F. LÓPEZ-SÁEZ

*Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina,
Universidad de Chile, Santiago, CHILE.*

*Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma,
Madrid, ESPAÑA.*

Para evaluar el daño inducido en el DNA por bajas dosis de rayos X (1 a 40 rad) en linfocitos humanos se han determinado la frecuencia de lesiones cromosómicas que alcanzan G2 y la duración de este período del ciclo.

La frecuencia de lesiones cromosómicas se determinó por el número de aberraciones que presentaban los linfocitos irradiados, cultivados y tratados durante su periodo G2 con dos inhibidores, cafeína y 3-aminobenzamida. En los linfocitos irradiados, tanto en los tratados con los inhibidores como en los no tratados, se ha observado un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas claramente dependiente de la dosis. La respuesta a la dosis cuando se incubaron dos horas con los inhibidores fue más alta que la detectada en células control, sugiriendo que el incremento de la dosis de irradiación produce un incremento en el número de lesiones del DNA que alcanzan el período G2 para ser reparadas.

Por otra parte, la duración del periodo G2 mostró un incremento estadísticamente significativo con la dosis de rayos X desde 2,5 hasta 40 rad y una correlación positiva entre la prolongación del G2 y la frecuencia de lesiones cromosómicas que llegan a dicho período.

Como conclusión, nosotros proponemos que el análisis de estos dos parámetros citogenéticos puede mejorar la evaluación de bajos niveles de daño en el DNA inducido experimentalmente.

ACTIVIDAD ANEUGÉNICA DE LA COLCHICINA EVALUADA MEDIANTE TÉCNICAS DE FISH EN EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN LINFOCITOS HUMANOS

Ramírez M.J., Puerto S., Carbonell E., Creus A. y Marcos R.

Grup de Mutagènesi. Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

Desde el trabajo pionero de Fenech y Morley (1985) sobre el ensayo de micronúcleos en linfocitos humanos, utilizando citocalasina-B (cit-B), distintos autores han tratado de mostrar las ventajas del mismo para detectar la inducción tanto de roturas cromosómicas como de aneuploidía. Sin embargo, los agentes aneugénicos típicos rara vez inducen incrementos muy elevados en la frecuencia de micronúcleos (MN), en contraste con lo que sucede con los agentes clastogénicos estándar.

Para profundizar en el conocimiento de la actuación de los agentes aneugénicos, se ha realizado un estudio en linfocitos humanos tratados con distintas concentraciones de colchicina y evaluando distintos parámetros. Así, se ha evaluado la inducción de MN en células mono y binucleadas, la poliploidía en células mononucleadas, la no-disyunción cromosómica en células binucleadas, así como el número de células en metafase. El estudio sobre la inducción de poliploidía y de no-disyunción se ha realizado mediante la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) con sonda centromérica específica para el cromosoma X.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con colchicina induce un aumento significativo de la frecuencia de MN, tanto en células mono como binucleadas, siguiendo una relación directa dosis-efecto. Asimismo, el tratamiento induce aumentos significativos en la formación de células poliploides y en la frecuencia de no-disyunción cromosómica. Finalmente, los resultados también indican un aumento significativo en el número de células (mono y binucleadas) paradas en metafase, siguiendo una relación lineal dosis-efecto.

Estos resultados indican que gran parte de los efectos que un agente aneugénico puede inducir sobre el huso mitótico no se manifiestan como MN, ya que, además de la pérdida cromosómica detectada en el ensayo de MN, el agente puede inducir alteraciones que impidan la segregación de los cromosomas en los dos núcleos hijos, dando lugar a células poliploides e, incluso, detener la célula en metafase.

Dado que nuestros resultados muestran que muchas de las células divididas en presencia de colchicina no adquieren la morfología binucleada típica del efecto de la cit-B, la frecuencia de células binucleadas con micronúcleos es una subestima de la pérdida cromosómica inducida por el agente ensayo, así como de su actividad aneugénica.

Financiación: SAF94-0697 (CICYT) y SGR95-00512 (CIRIT)

EVALUACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO INDUCIDO POR EL BENCENO Y EL TOLUENO EN LINFOCITOS HUMANOS UTILIZANDO EL ENSAYO DEL COMETA (SCGE)

Pitarque M., Ribas G., Carbonell E., Creus A., y Marcos R.

Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

El benceno es un hidrocarburo aromático ampliamente utilizado en la industria química. Asimismo, es un componente de la gasolina y está presente en las emisiones de los motores de combustión y en el humo del tabaco. Exposiciones elevadas a este compuesto pueden provocar degeneración de la médula ósea, anemia aplásica, leucemia y anomalías del sistema inmunitario. El benceno está clasificado por la IARC como un carcinógeno del Grupo I, con suficientes evidencias de carcinogenicidad en humanos y en animales de laboratorio. Distintos trabajos han puesto de manifiesto la capacidad del benceno para producir diferentes tipos de daño genético, tales como aberraciones cromosómicas, intercambios entre cromátidas hermanas, micronúcleos y aneuploidia. Se considera que algunos de sus metabolitos como la hidroquinona, la benzoquinona, el bencenotriol y la pirocatequina son los responsables finales de la genotoxicidad y la carcinogenicidad del benceno.

El tolueno se obtiene en grandes cantidades durante los procesos de refinamiento del petróleo y se utiliza, básicamente, para la producción de benceno y como disolvente en la industria de la pintura. Los resultados obtenidos en los ensayos de genotoxicidad *in vitro* indican que el tolueno no produce efectos genotóxicos. Por otra parte, algunos trabajos muestran que, al tratar con mezclas de benceno y tolueno, se producen interacciones que modifican el metabolismo del benceno, reduciéndose el daño genético inducido.

Así, para evaluar la posible genotoxicidad de estos compuestos, se ha utilizado el ensayo del COMETA (SCGE) en linfocitos humanos. En los últimos años se ha puesto de manifiesto que esta técnica es muy sensible para el estudio de un amplio espectro de genotoxinas y puede ser aplicable al seguimiento biológico de poblaciones humanas expuestas a contaminantes ambientales. El ensayo detecta roturas del ADN, sitios alcali-lábiles y reparación por excisión incompleta.

Dado que el benceno es considerado como un promutágeno y que la presencia de eritrocitos puede modificar la respuesta genotóxica, los experimentos se han llevado a cabo con sangre completa y también con linfocitos aislados, habiéndose tratado durante 3h con benceno (1,2,3 y 5 mM) o tolueno (5, 10, 15 y 20 mM), con y sin activación metabólica.

Financiación: CT92-0221 (UE) y GRQ93-2023 (CIRIT)

INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS EN PACIENTES CON HIPERTIROIDISMO TRATADOS CON EL ISÓTOPO RADIACTIVO YODO-131

Gutiérrez S, Carbonell E, Galofré P¹, Creus A y Marcos R.

Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra. ¹Servei de Medicina Nuclear, Ciutat Sanitària i Universitària Vall d'Hebron, Pg. Vall d'Hebron 119, 08035 Barcelona.

La utilización del radionúclido yodo-131 (¹³¹I) en el tratamiento del hipertiroidismo es una práctica común en medicina nuclear desde hace unos 50 años. Este radionúclido también se encuentra en el ambiente debido a accidentes nucleares, pudiendo ser la causa de un aumento del riesgo de cáncer de tiroides en la población infantil expuesta. A pesar de las ventajas que ofrece la terapia con ¹³¹I, también se pueden producir efectos secundarios debidos a la emisión de radiación ionizante por parte del ¹³¹I. Para contribuir a la evaluación del potencial genotóxico de la exposición terapéutica al ¹³¹I, se ha realizado un estudio citogenético longitudinal analizando la frecuencia de micronúcleos (MN) en linfocitos de sangre periférica en un grupo de 28 pacientes de hipertiroidismo que recibieron, por administración oral, distintas dosis de ¹³¹I con un promedio de 582,49±66,95 MBq. El análisis se efectuó en 4 momentos distintos: una semana antes del tratamiento y una semana, un mes y tres meses después del mismo. Los resultados muestran un aumento significativo en la frecuencia de MN y de células binucleadas con micronúcleos (BNMN) después del tratamiento, que persiste hasta la última muestra analizada. Asimismo, se ha encontrado una correlación positiva y significativa entre dosis y frecuencia de BNMN para las muestras extraídas al mes y a los tres meses después del tratamiento ($r=0,45$ y $r=0,63$ respectivamente). Por otra parte, se ha observado un incremento significativo de MN y BNMN para todas las muestras analizadas después del tratamiento en el grupo de pacientes tratados con más de 500 MBq, mientras que en los pacientes que recibieron menos de 500MBq, el ligero aumento observado no fue significativo. Estos resultados indican que los pacientes de hipertiroidismo, que son tratados con dosis relativamente bajas de ¹³¹I, pueden presentar un aumento del riesgo genotóxico y, además, ponen de manifiesto la utilidad del ensayo de micronúcleos en la biomonitorización citogenética de poblaciones expuestas a fuentes radiactivas.

Dosis (MBq)	Pre-trat. (BNMN±E.E.)	1 semana (BNMN±E.E.)	1 mes (BNMN±E.E.)	3 meses (BNMN±E.E.)
≤500	22,00±3,03	24,35±3,20	23,88±4,23	23,53±2,70
>500	22,36±3,91	32,91±4,49*	34,82±4,84***	37,91±4,37**
Total	22,14±2,35	27,71±2,69	28,18±3,30*	29,18±2,69*

Financiación: SAF95-0813 (CICYT) y GRQ93-2023 (CIRIT)

DETECCION DE ROTURAS CROMOSOMICAS EN LAS REGIONES 1Q12, 9Q12 Y 16Q11.2 INDUCIDAS POR MELPHALAN EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS USANDO HIBRIDACION *IN SITU* CON FLUORESCENCIA MULTICOLOR

Eduardo de la Peña*, Maik Schuler**, David A. Eastmond**

* Genotoxicología/Mutagénesis Ambiental. Centro de Ciencias Medioambientales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España.

** *Environmental Toxicology Graduate Program, Department of Entomology, University of California, Riverside, U.S.A.*

El melphalan, agente alquilante bifuncional, usado comunmente en quimioterapia anticancerosa, se sabe que produce aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas, en linfocitos de sangre periférica de pacientes tratados; en estudios *in vitro*, induce a un exceso de roturas en la heterocromatina de la región centromérica de los cromosomas 1 y 9.

Para confirmar estos resultados mediante las nuevas técnicas de citogenética molecular, se trataron cultivos de linfocitos humanos con varias concentraciones de melphalan y, se obtuvieron linfocitos bloqueados en interfase y en citoquinésis; se utilizó el ensayo de micronúcleos en células en citoquinésis, en conjunción con la identificación centromérica, mediante la tinción de CREST, se observó un incremento significativo de micronúcleos CREST-negativo y un ligero incremento de micronúcleos CREST-positivo. Para la detección de aneuploidía y poliploidía, así como de roturas cromosómicas, se empleó hibridación *in situ* con fluorescencia multicolor (FISH) modificada, recientemente desarrollada en nuestro laboratorio, con el tándem de sondas, *alpha*-satélite y clásica-satélite adyacente, que tiene como diana la región centromérica y heterocromatina adyacente de los cromosomas 1, 9 y 16. Con dicha técnica se detectó un incremento significativo de roturas cromosómicas, que afectan a la heterocromatina centromérica no detectándose hiperdiploidía.

Se concluye que el melphalan induce a una alta frecuencia de roturas de la heterocromatina centromérica en los cromosomas 1, 9 y 16. Por tanto, consideramos que la técnica FISH multicolor con tándem de sondas específicas es una poderosa herramienta para detectar roturas cromosómicas en células en interfase de pacientes tratados con quimioterapia.

RATONES DEFICIENTES EN p53 COMO MODELO PARA ESTUDIAR LOS MECANISMOS DE ONCOGÉNESIS TRAS IRRADIACION. A. Real, C. Bauluz, R. de Vidania. Carcinogénesis ambiental. IMA. CIEMAT. Madrid.

A pesar de que el carácter mutagénico de las radiaciones ionizantes se describió hace varias décadas, en la actualidad no se conocen en detalle los eventos celulares y moleculares que conducen desde esa mutación inicial a la aparición de un cáncer radioinducido. Adicionalmente, es de especial relevancia en el campo de la Protección Radiológica acotar las incertidumbres asociadas al riesgo carcinogénico, potencialmente derivado de las exposiciones a dosis bajas de radiación. En este sentido son evidentes las dificultades de las aproximaciones tradicionales (modelos animales de carcinogénesis, estudios epidemiológicos) para aportar resultados en esa dirección.

En esta comunicación se describe un modelo experimental, que por sus características facilita el estudio de los mecanismos de oncogénesis tras exposiciones a dosis bajas de radiación, y se muestran resultados preliminares obtenidos con dicho modelo.

El modelo es el de ratones deficientes en el gen supresor de tumores p53. Estos ratones desarrollan cáncer de manera espontánea a los 5-6 meses de edad, mayoritariamente linfomas, reduciéndose de manera significativa estos períodos de latencia si los ratones son expuestos a radiación (1-3Gy). Esta característica va a permitir estudiar la progresión de eventos celulares y moleculares que conducen en último término a un cáncer.

La alta sensibilidad de estos ratones a la inducción de cáncer por radiación, se debe a la capacidad de las células para acumular daño subletal sin que por ello mueran por apoptosis, favoreciéndose su transformación oncogénica. Así, estos ratones son idóneos para el estudio de los efectos carcinogénicos asociados a dosis bajas de radiación.

El uso de ratones normales para p53 ($p53^{+/+}$), heterocigotos y homocigotos para la mutación en p53 ($p53^{+/-}$ y $p53^{-/-}$), nos proporciona células asimilables a distintos estadios de transformación maligna, permitiéndonos estudiar el efecto de la irradiación en estos estadios, así como determinar la secuencialidad de los eventos que conducen al desarrollo de cáncer.

El proceso carcinogénico se va a estudiar a nivel del sistema hematopoyético tanto por ser éste un sistema extremadamente sensible a la radiación, como por el hecho de que la mayoría de los tumores detectados en ratones deficientes en p53 sean de tipo linfomas.

Resultados del laboratorio, han confirmado la capacidad de las células de médula ósea de ratones $p53^{-/-}$ para acumular daño subletal. Las fracciones de supervivencia de precursores hematopoyéticos granulo-macrofágicos procedentes de la médula ósea de ratones deficientes en p53, son superiores a las observadas en las mismas poblaciones $p53^{+/+}$.

En la actualidad estamos realizando estudios moleculares, para caracterizar los niveles de expresión de diversos proto-oncogenes y genes supresores de tumores que puedan estar implicados en el desarrollo carcinogénico tras exposición a radiaciones ionizantes.

INHIBICIÓN DE LA POLI (ADP-RIBOSILACIÓN) Y GENOTOXICIDAD DE INHIBIDORES DE LAS ADN TOPOISOMERASAS: ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS , DAÑO CROMOSÓMICO EN G₂ Y SUPERVIVENCIA CELULAR.

M. López-Baena, J. Piñero, T. Ortiz, I. Domínguez, N. Pastor y F. Cortés.

Departamento de Biología de la Universidad de Sevilla.

Avda. Reina Mercedes nº 6 41012 Sevilla

El núcleo de células eucariotas contiene una enzima, la Poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), cuya actividad es dependiente de la presencia de roturas de doble cadena en el ADN.

La actividad de una gran variedad de enzimas entre las cuales se encuentran las topoisomerasas I y II se modifica cuando se les une covalentemente un polímero de ADP-ribosa. Las topoisomerasas son esenciales en distintos procesos metabólicos del ADN, tales como replicación, transcripción, recombinación, etc. que van acompañados de cambios topológicos en el material genético.

Por otro lado, existen inhibidores específicos de Topo I y II que son una nueva generación de eficientes drogas citotóxicas utilizadas en el tratamiento de tumores. Estas drogas no inhiben la actividad catalítica de la enzima sino que interfieren con la reunión de roturas llevadas a cabo por las topoisomerasas en el ADN, bloqueando un intermediario llamado "complejo de rotura".

En este trabajo hemos estudiado la modificación de la actividad relativa de las topoisomerasas I y II en una línea celular de hámster chino (CHO6) tras ser tratada con un inhibidor de la PARP, la 3-Aminobenzamida (3AB).

Asimismo, hemos analizado la potenciación del posible daño provocado sobre el ADN por inhibidores de topoisomerasas en la fase G₂ del ciclo celular en células que han sido pretratadas con 3AB. Igualmente hemos estudiado el efecto sobre la viabilidad celular utilizando tratamientos combinados de inhibidores de Topo y de PARP.

MODULACIÓN MEDIANTE LIGASA DEL FAGO T4 DEL DAÑO INDUCIDO POR BLEOMICINA EN CÉLULAS DE OVARIO DE HÁMSTER CHINO (CHO6)

M. J. Flores, T. Ortiz, J. Piñero y F. Cortés.

Departamento de Biología Celular de la Universidad de Sevilla.

Avda. Reina Mercedes nº 6 41012 Sevilla.

La Bleomicina (BLM) es un antibiótico radiomimético aislado de *Streptomyces verticillus* capaz de inducir roturas de cadena (simples y dobles) en el ADN, por lo que es ampliamente suministrado en quimioterapia. Varios estudios han mostrado que cuando células en cultivo son incubadas con BLM, solo un 0.1% de la BLM presente en el medio entra realmente en las células, lo cual podría explicarse por la impermeabilidad de la membrana celular a este compuesto. La electroporación es un método muy eficiente para eliminar esta barrera permitiendo la entrada de las moléculas de BLM en el citoplasma.

El objetivo del presente trabajo ha sido analizar la capacidad de la ligasa de T4 para modular el daño cromosómico producido por la BLM. El estudio se ha llevado a cabo en la línea celular de hámster chino CHO6. Estas células fueron tratadas con 300 nU de BLM y distintas dosis de ligasa (3, 6, 9, 12 y 18 U) introducidas simultáneamente por electroporación.

Los resultados muestran que la ligasa es capaz de disminuir el daño inducido por la BLM cuando se compara la frecuencia de aberraciones cromosómicas producidas por la BLM sola con aquellas frecuencias obtenidas cuando se introduce simultáneamente con la ligasa de T4. Ensayos de clonogenicidad mostraron una supervivencia mayor para aquellas células que fueron tratadas simultáneamente con BLM y ligasa de T4.

Se concluye por tanto, que en la línea CHO6 la ligasa T4 es capaz de modular el daño inducido en el ADN por la BLM.

CALCULO DEL PORCENTAJE DE CÉLULAS EN FASE S QUE CAUSAN INTERFERENCIA EN EL ANÁLISIS DE LAS ROTURAS DE DOBLE CADENA EN EL DNA MEDIANTE ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSADO

Santiago Mateos^{1,2} y Trevor. J. McMillan^{2,3}

¹ Departamento de Biología Celular. Universidad de Sevilla. Avda. Reina Mercedes s/n, 41012 Sevilla España.

² Radiotherapy Research Unit, Institute of Cancer Research, Cotswold Road, Sutton, Surrey SM2 5NG, United Kingdom.

³ Present address: Division of Biological Sciences, Institute of Environmental and Biological Sciences, Lancaster University, Lancaster LA1 4YQ, U.K.

En este trabajo nos propusimos ver si la técnica de electroforesis de campo pulsado correctamente evalua la incidencia de daño inducido por radiación en cultivos celulares asincrónicos. Para ello analizamos la relación entre la fracción de células que se encontraban en la fase S y la tasa de migración del DNA mediante electroforesis de campo pulsado. El estudio fue realizado empleando tres poblaciones de células en cultivo de carcinoma de vejiga humano (MGH-U1) que previamente habían sido sincronizadas. En concreto comparamos poblaciones con valores de células en fase S que oscilaron del 10 al 70 %. Cuando sometimos a electroforesis el DNA irradiado de éstas poblaciones celulares, observamos que aquel DNA con un mayor contenido en células en fase S tuvo la menor tasa de migración, aumentando ésta a medida que el porcentaje en fase S de la población disminuía. Sin embargo, cuando el daño inducido en el DNA por radiación fue provocado en células enteras (antes de su lisis) no encontramos ninguna diferencia en las curvas dosis-respuesta entre poblaciones con valores de células en fase S del 10 al 50 %. Sólo cuando la población celular analizada mediante electroforesis de campo pulsado contenía más de un 70 % de células en fase S es cuando pudimos observar diferencias significativas en cuanto al daño inducido por radiación. A los mismos resultados llegamos tras la utilización del enzima de restricción Not I para provocar daño en el DNA. Éstos datos indican el porcentaje de células en fase S que podrían afectar significativamente a la tasa de migración de una población celular. Por tanto, puesto que las poblaciones celulares asincrónicas generalmente comprenden valores de un 20-50% de células que se encuentran replicando. Nosotros pensamos, que es bastante improbable que dichas diferencias puedan ser suficientes como para modificar significativamente la tasa total de migración del DNA. En este sentido concluimos, que la electroforesis de campo pulsado nos ofrece datos de toda confianza cuando analizamos las frecuencias de daño inducido en el DNA en poblaciones asincrónicas.

RADIOSENSIBILIDAD Y REPARACIÓN DEL DAÑO CAUSADO POR RADIACIÓN IONIZANTE Y ENZIMAS DE REPARACIÓN EN EL ADN DE TRES LÍNEAS CELULARES EPITELIALES.

¹Paula Daza, ²Trevor J. McMillan y ³Petra Pfeiffer

- 1.- Departamento de Biología Celular de la Universidad de Sevilla.
- 2.- Instituto de investigación contra el cáncer, Sutton, Reino Unido.
- 3.- Instituto de Genética de la Universidad de Colonia, Alemania.

En este trabajo se han estudiado la radiosensibilidad y la reparación del daño inducido en el ADN por la radiación ionizante, tanto roturas de cadena simple (ssb) como roturas de doble cadena (dsb), de tres líneas celulares humanas: dos líneas celulares provenientes de cáncer de lengua (SCC-4 y SCC-25) y una línea celular normal llamada RHEK-1 proveniente de queratinocitos no cancerosos. La radiosensibilidad de las tres líneas se analizó mediante el uso del ensayo de supervivencia celular y los resultados indicaron que las células SCC-4 eran más radiosensibles que las SCC-25 que a su vez se comportaron como las células normales RHEK-1. Se usaron las técnicas de precipitación del ADN para el estudio de la inducción del daño y la reparación de las ssb y la electroforesis de campo pulsado para el análisis de las dsb. A pesar de la marcada radiosensibilidad presentada por la línea SCC-4, no se observaron diferencias entre las tres líneas celulares ni en la inducción del daño causado por la radiación ionizante ni en la reparación del mismo, todas las líneas presentaron la misma eficiencia reparadora. Se analizó entonces la fidelidad de la reparación de las dsb causadas por enzimas de restricción usando el ensayo de reconstitución de un plásmido. Concluimos que a pesar de que la línea radiosensible SCC-4 era capaz de reparar el ADN a "grosso modo", presentaba un defecto en la ligación de los extremos de las dsb.

ANALISIS DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS INDUCIDAS POR RAYOS X EN CELULAS DE HAMSTER CHINO MEDIANTE LA TECNICA DE HIBRIDACION *IN SITU* CON FLUORESCENCIA

¹I. Domínguez, ²J.J.W.A. Boei, ³A.S. Balajee y ²A.T. Natarajan

¹ Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

² Departamento de Genética y Mutagénesis Química, Universidad de Leiden, Leiden, Holanda

³ Laboratorio de Genética Molecular, NIH, Baltimore, Estados Unidos

El desarrollo reciente de sondas específicas para cromosomas de hámster Chino ha permitido analizar, mediante la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducida por distintas dosis de rayos X en linfocitos y fibroblastos primarios de esta especie.

La detección de aberraciones cromosómicas se ha realizado mediante FISH con dos colores, utilizándose en cada dosis sondas para cuatro cromosomas distintos. Los resultados indican que en células de hámster Chino los rayos X inducen una frecuencia de traslocaciones mayor que de dicéntricos (aproximadamente 1.4-1.5 veces más). Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores en linfocitos humanos, pero diferentes a los obtenidos en ratón, donde se ha visto que los rayos X inducen traslocaciones y dicéntricos con frecuencia similar. Se ha propuesto que las características cariotípicas de una especie pueden influir sobre las frecuencias relativas de traslocaciones y dicéntricos inducidas por radiación. Nuestros resultados apoyan esta hipótesis ya que el cariotipo de hámster Chino contiene tanto cromosomas metacéntricos como acrocéntricos, de forma similar al cariotipo humano, mientras que en el ratón todos los cromosomas son acrocéntricos.

Se ha estudiado asimismo la frecuencia de traslocaciones y dicéntricos obtenida a partir de cada cromosoma por separado, y los resultados indican que la participación de los mismos en la formación de aberraciones no es homogénea.

EL ENSAYO COMETA (SCGE) EN CÉLULAS VEGETALES SUPERIORES

P. CARRERA, M. DE MIGUEL Y M.H. NAVARRETE

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma, CSIC, Madrid, ESPAÑA.

Para valorar el daño provocado en el genoma de células vegetales superiores por diversos agentes físicos o químicos se ha utilizado con frecuencia el recuento de ana-telofases anormales, de micronúcleos o de aberraciones cromosómicas en metafase.

En células de mamífero se han aplicado los mismos métodos y, además, desde hace algunos años se está utilizando con mucho éxito un nuevo método, el SCGE, electroforesis en microgeles de células aisladas, que ofrece nuevas posibilidades de estudio con una mayor resolución, pues este método permite poner de manifiesto fracturas de cadena simple que ocurren con mil veces más frecuencia que las de cadena doble.

Los meristemos radiculares de *Allium cepa* han sido utilizados por muchos grupos de trabajo, entre ellos el nuestro, para estudios de proliferación celular, así como de los mecanismos de reparación del DNA que operan en estas células proliferantes. Este último aspecto es el que nos ha llevado a aplicar la nueva metodología del ensayo cometa a este tipo celular.

En este trabajo hemos llevado en paralelo linfocitos de sangre periférica, que se han sometido al ensayo cometa y que van a servir de referencia, y núcleos aislados de células meristemáticas de *A. cepa*. En ambos casos se han provocado lesiones en el DNA mediante la aplicación de radiación gamma. Hemos demostrado mediante una sencilla metodología que los núcleos aislados de células vegetales pueden someterse a electroforesis en microgel para valorar el daño genómico.

INFLUENCIA DE LA MUTACION *MUS308* DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* EN LA MUTAGENICIDAD DE DIETILSULFATO.

Valdés, Nancy, Miguel A. Comendador y María Sierra.

Área de Genética. Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo.
33071 Oviedo.

El estudio de la mutabilidad (cociente de las frecuencias de letales inducidos en condiciones de reparación deficiente y eficiente, respectivamente) ha mostrado ser una herramienta útil bajo dos puntos de vista. Por una parte, cuando se conoce el sistema de reparación concreto para el que se produce la deficiencia, permite describir propiedades acerca del modo de acción de un determinado compuesto. Por otra, cuando se conoce el modo de acción del compuesto, es posible hacer una aproximación al conocimiento del sistema de reparación.

Teniendo en cuenta lo anterior, se han determinado los valores de mutabilidad producidos por dos concentraciones de dietilsulfato, un agente alquilante monofuncional, cuando se utiliza la mutación *mus308*. En ambas concentraciones se produce hipomutabilidad, si bien ésta es considerablemente mayor en la concentración más alta.

Los resultados se interpretan teniendo en cuenta el papel, previamente postulado, que *mus308* pudiera estar jugando en el "bypass" de lesiones que no hubieran sido escindidas.

MUTAGENICIDAD DE ENU EN CELULAS GERMINALES FEMENINAS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

Alvarez, Lidia, Luis Tosal, Miguel A. Comendador y María Sierra.

Area de Genética. Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo.
33071 Oviedo.

Habitualmente, el test de letales recesivos ligados al sexo (SLRL) en *D. melanogaster* se lleva a cabo estudiando, en estadios postmeióticos masculinos, el efecto de los compuestos que se ensayan, siendo mucho ^{menos} utilizado, incluso con fines mecanísticos, el estudio en estadios premeióticos o en células germinales femeninas. Sin embargo, dada la distinta fisiología de estos tipos celulares cabe pensar que no necesariamente los efectos mutagénicos inducidos por un compuesto dado han de ser equivalentes en todos estos estadios celulares.

En distintos experimentos, cuyo objetivo último es determinar el espectro molecular de mutación inducido por una misma concentración de etilnitrosourea, se observó que la frecuencia de SLRL era considerablemente menor en células germinales femeninas que en espermatozoides y espermátidas, tal y como se había descrito previamente, mientras que en espermatogonias la frecuencia era intermedia. Sin embargo, las frecuencias de mutaciones inducidas en el locus *vermilion* no varían de forma proporcional.

En la comunicación se discuten las posibles razones que pueden dar cuenta de los datos expuestos.

ESPECTRO MOLECULAR DE MUTACION INDUCIDO POR ENU EN ESTADIOS POSTMEIOTICOS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* BAJO CONDICIONES DEFICIENTES *MUS308*.

Tosal, Luis, Miguel A. Comendador y María Sierra.

Area de Genética. Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo.
33071 Oviedo.

La mutación *mus308* de *D. melanogaster* parece conferir hipersensibilidad a agentes productores de enlaces cruzados y no a MMS, habiéndose sugerido un posible defecto en la reparación postreplicativa de aductos no escindidos. Recientemente, sin embargo, se ha descrito la existencia de hipermutabilidad para ENU, lo que indica que el locus *mus308* puede estar jugando algún papel en el procesamiento del daño inducido por agentes alquilantes monofuncionales.

Utilizando el sistema vermilion para la obtención del espectro de mutación, hemos aislado, en estadios postmeióticos y en un fondo genético *mus308*, un total de 25 mutaciones *vermilion*, habiéndose identificado hasta el momento 14 de ellas. El espectro obtenido está compuesto exclusivamente por mutaciones puntuales, 9 transiciones GC:AT y 5 transversiones AT:TA. El origen de estas mutaciones podría estar en la etilación del O⁶-guanina y O²-timina, respectivamente. Cuando se compara este espectro con el obtenido en condiciones normales, se observa una clara diferencia en cuanto a la frecuencia relativa de transversiones AT:TA (35,7% en condiciones *mus308* frente a 10,7% en condiciones normales). Este hecho parece indicar que *mus308* estaría influyendo en la reparación, preferentemente, de los aductos inducidos en el O²-timina, apoyando la hipótesis avanzada por Aguirrezabalaga y col. en 1995, en la que se postula que este locus estaría implicado en la reparación de aquellos aductos de vida media larga, y no escindidos, como puede ser el caso de O²-etilimina.

REEVALUACION DE LA INFLUENCIA DE MUTACIONES DE REPARACION EN EL ENSAYO w^f DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

Ferreiro, José Antonio, María Sierra y Miguel A. Comendador.

Area de Genética. Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo.
33071 Oviedo.

La mutación *mei-1* ha sido implicada en procesos de reparación, afectando al proceso de reparación post-replicativa. Sin embargo, recientemente se ha descrito que el gen *mei-1* de *Drosophila* es homólogo de *ATM* (ataxia telangiectasia mutado) humano, habiéndose postulado para estos genes un papel de chequeo de lesiones durante el ciclo celular, parte del cual se realiza controlando el gen *p53*.

Esta nueva función atribuida a *mei-1* nos ha llevado a una reevaluación de los resultados obtenidos en el ensayo *white-ivory* con líneas mutantes *mus201* y *mei-1*.

Brevemente, los resultados indican que la presencia del producto del gen *mei-1* facilita la reversión de w^f , mientras que el gen *mus201*, al reparar lesiones inducidas por varios compuestos, actuaría eliminando del DNA lesiones susceptibles de ser procesadas por un mecanismo de reparación sobre el que tendría influencia *mei-1*.

CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE *Drosophila melanogaster* SENSIBLES A MUTÁGENOS UTILIZANDO LA TÉCNICA DE AP-PCR

López A., Cabré O., Xamena N., Creus A., Marcos R. y Velázquez A.

Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona

En *Drosophila melanogaster* existen mutantes sensibles al tratamiento con mutágenos y, en general, se asume que este fenotipo está asociado a alteraciones en los procesos que intervienen en la reparación del ADN, y los estudios de reparación del ADN realizados confirman esta idea.

Utilizando la técnica de AP-PCR, pretendemos identificar alteraciones genómicas específicas, inducidas en distintos mutantes de reparación tras el tratamiento con agentes genotóxicos. La posterior caracterización molecular de las alteraciones observadas nos permitirá establecer relaciones entre el daño genético inducido y la deficiencia reparadora de un mutante concreto.

La técnica de AP-PCR consiste en la utilización de un único cebador en unas condiciones de polimerización específicas que permiten generar un patrón discreto de secuencias amplificadas, dando lugar a un *fingerprint* de ADN característico del genoma y del cebador utilizado.

Los resultados obtenidos hasta este momento son los siguientes:

- Las distintas cepas de *D. melanogaster* utilizadas muestran un *fingerprint* característico de su ADN genómico. Esta propiedad permite su identificación a nivel molecular, de forma inequívoca.
- Se han realizado tratamientos con EMS, MNNG y AAF utilizando 12 cepas de *D. melanogaster*. El análisis por AP-PCR del ADN genómico de los individuos que sobreviven al tratamiento con MNNG, muestra que este mutágeno produce alteraciones de diverso tipo, algunas de ellas relacionadas con deficiencias en mecanismos de reparación específicos.

Se discuten las alteraciones que se pueden detectar mediante la técnica de AP-PCR y la utilidad de la misma en los estudios que requieren la comparación de genomas.

Financiación: SAF95-0813 (CICYT) y SGR95-00512 (CIRIT)

ESTUDIO DE LA POSIBLE INTERACCIÓN ENTRE ÁCIDO HÚMICO Y HERBICIDAS EN LA INDUCCIÓN DE EFECTOS GENOTÓXICOS EN EL ENSAYO SMART DE DROSOPHILA

Torres C., Xamena N., Creus A. y Marcos R.

Grup de Mutagènesi. Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

Muchos de los herbicidas se aplican directamente sobre el suelo para que realicen su función. Se conoce que los compuestos orgánicos, entre los que se encuentran los herbicidas, a menudo forman complejos con la materia orgánica del suelo, por lo que la cantidad final de compuesto activo es menor que la originariamente depositada. El ácido húmico es uno de los principales constituyentes de la materia orgánica del suelo con el que los herbicidas pueden interaccionar. Así, con el fin de aportar nuevos datos sobre la posible interacción entre el ácido húmico y algunos herbicidas y la eventual modulación de su genotoxicidad, se ha utilizado el ensayo de mutación y recombinación somática (SMART) en *Drosophila melanogaster*, basado en marcadores genéticos bien conocidos que afectan a características fenotípicas de las células de las alas.

Los resultados obtenidos en la evaluación de los herbicidas hidrazida maleica (HM) y alacloro (AL) a la concentración de 10 mM, del ácido húmico a las concentraciones de 1:80 y 1:40 (g/ml), con y sin preincubación, no muestran una disminución significativa de la frecuencia de sectores mutantes tras el tratamiento larvario con la mezcla herbicida-ácido húmico, por lo que el efecto de ambos compuestos parece ser independiente. Nuestros resultados no corroboran la capacidad supuestamente desmutagénica del ácido húmico señalada por algunos autores.

Finalmente, y aprovechando las posibilidades del ensayo SMART, se ha calculado la actividad recombinogénica para cada uno de los compuestos evaluados, comparando las frecuencias de mutación de los individuos pertenecientes a los dos fenotipos obtenidos en la progenie: normal y *serrate*.

Financiación: SAF92-0525 (CICYT)

ANÁLISIS MOLECULAR DE REVERTIENTES Y MUTANTES DE COLORACIÓN CLARA DE OJOS INDUCIDOS POR AGENTES ALQUILANTES EN UNA CEPA PORTADORA DE UNA TETRAPLICACIÓN DEL ALELO *WHITE-IVORY*.

Suárez S., Velázquez A., Cabré O., Marcos R. y Xamena N.

Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

Muchas de las mutaciones del *locus white* de *Drosophila melanogaster* son debidas a inserciones de secuencias de ADN, ya sean debidas a elementos trasponibles o a fragmentos duplicados. La escisión precisa de estas secuencias debe dar lugar a una reversión fenotípica apreciable por el cambio de color de los ojos.

El mutante *white-ivory* (w^i) se caracteriza por la presencia de un fragmento de 2,96 kb duplicado en tándem en la posición 2795 de *locus white*, en su región estructural. Los individuos w^i revierten tanto a nivel somático como a nivel germinal, aunque el mecanismo exacto de esta reversión todavía no es conocido.

En un estudio previo realizado con una cepa w^i , y de acuerdo con observaciones de otros autores, hallamos que la reversión germinal inducida por agentes alquilantes es debida a la escisión precisa del fragmento duplicado en tándem.

Considerando que el sistema que se usa más frecuentemente en los ensayos de genotoxicidad está constituido por una tetraplicación del alelo w^i , consideramos oportuno ampliar este estudio a la cepa portadora de una tetraplicación de dicho alelo. Mediante tratamientos larvarios con tres agentes alquilantes (metanosulfonato de etilo, metanosulfonato de metilo y etil nitrosourea) obtuvimos diferentes individuos revertientes y otros individuos mutantes, con coloración clara de ojos, que han sido analizados a nivel molecular con las técnicas de *Southern blot* y PCR. De los resultados obtenidos hasta el momento se puede afirmar que la reversión fenotípica inducida por el tratamiento mediante agentes alquilantes es consecuencia de la escisión precisa del fragmento de 2,96 kb duplicado en tándem de al menos alguna de las cuatro copias del alelo w^i que posee la cepa. Por otro lado, algunos de los mutantes de ojos claros presentan alteraciones en alguna de las cuatro copias del alelo w^i , mientras que en la mayoría de ellos no hemos podido detectar ningún cambio apreciable. No se puede descartar, de momento, que en estos mutantes su fenotipo sea consecuencia de la pérdida de copias del alelo tetraplicado.

Financiación: SAF94-0697 (CICYT) y GRQ93-2023 (CIRIT)

ANÁLISIS DE REVERTIENTES FENOTÍPICOS OBTENIDOS A PARTIR DE MUTANTES INSERCIONALES DEL LOCUS *WHITE* MEDIANTE TRATAMIENTOS CON AGENTES ALQUILANTES O CHOQUE TÉRMICO.

Soriano, S., Baldrich, E., Velázquez, A., Marcos, R., Cabré, O. y Xamena, N.
Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

Los resultados que se presentan en esta comunicación se enmarcan dentro de un estudio más amplio en el que se analiza la respuesta observada en diferentes mutantes insercionales del locus *white* de *Drosophila melanogaster*, frente al choque térmico o al tratamiento con diferentes agentes alquilantes. Estos resultados siguen a los presentados en la Reunión anterior y se refieren a los estudios llevados a cabo con el mutante *white-honey* (w^h) y al análisis de la expresión de revertientes moleculares de *white-apricot* (w^a).

El mutante w^h proviene del mutante *white-one* (w^1), el cual presenta el elemento *Doc* (4,7kb) inserto en la posición +3696 del locus *white*, punto muy próximo al inicio de la transcripción del gen. Se caracteriza por la presencia de un elemento *B104* incompleto (5,5kb en lugar de los 8,7kb del *B104* integro) inserto en el *Doc* del w^1 . Mientras que w^1 presenta el fenotipo completamente blanco del color de los ojos, w^h presenta un color de ojos amarillo-miel. Tras el tratamiento con los agentes alquilantes EMS, ENU y MMS se han obtenido 10 revertientes fenotípicos (color de ojos completamente blanco) a nivel germinal. El análisis de estos revertientes, mediante *Southern blot*, pone de manifiesto, al igual que observamos con los revertientes parciales del mutante *white-spotted-1* (w^{sp1}), que este cambio fenotípico no es consecuencia de la escisión del elemento *B104*.

Se ha estudiado mediante la técnica de *Northern* la expresión del locus *white* en los individuos obtenidos por choque térmico de mutantes w^h y que presentan un fenotipo de ojos claros, pero con escisión del elemento *copia*. La transcripción del mRNA, tanto cualitativa como cuantitativamente, es indistinguible de la cepa Canton-S usada como control.

Los resultados conjuntos de los dos mutantes analizados ponen de relieve la importancia del papel que juegan otros loci modificadores en el control de la expresión de alelos con elementos transponibles insertos.

Financiación: SAF95-0813 (CICYT) y GRQ93-2023 (CIRIT)

INDICE DE AUTORES

	<u>Página</u>
ABRIL N.	6
ALHAMA J.	5
ALVAREZ L.	21
BALAJEE A.S.	18
BALDRICH E.	27
BAULUZ C.	13
BOEI J.J.W.A.	18
CABRÉ O.	24,26,27
CARBONELL E.	9,10,11
CARRERA P.	19
COLLINS M.K.L.	3
COMENDADOR M.A.	20,21,22,23
CORTÉS F.	14,15
CREUS A.	9,10,11,24,25,26
DARROUDI F.	7
DAZA P.	17
DE LA PEÑA E.	12
DE VIDANIA R.	13
DE MIGUEL M.	19
DOMÍNGUEZ I.	14,18
EASTMOND D.A.	12
FERREIRO J.A.	23
FLORES M.J.	15
GALOFRÉ P.	11
GUTIÉRREZ S.	11

	<u>Página</u>
LÓPEZ A.	24
LÓPEZ-BAENA M.	14
LOPEZ-BAREA J.	5
LÓPEZ-RIVAS A.	3
LÓPEZ-SÁEZ J.F.	8
MARCOS R.	4,9,10,11,24,25,26,27
MARGISON G.P.	6
MATEOS S.	16
McMILLAN T.J.	2,16,17
NATARAJAN A.T.	7,18
NAVARRETE M.H.	19
OLIVER F. J.	3
ORTIZ T.	14,15
PASTOR N.	14
PFEIFFER P.	17
PINCHEIRA J.V.	8
PIÑERO J.	14,15
PITARQUE M.	10
PUERTO S.	9
PUEYO C.	1,5,6
RAMÍREZ M.J.	9
REAL A.	13
RIBAS G.	10
RODRÍGUEZ-ARIZA A.	5
RUIZ-LAGUNA J.	5

Página

SCHULER M.	12
SIERRA M.	20,21,22,23
SORIANO S.	27
SUÁREZ S.	26
SURRALLÉS J.	7
TORRES C.	25
TOSAL L.	21,22
VALDÉS N.	20
VELÁZQUEZ A.	24,26,27
XAMENA N.	24,25,26,27