

# *XVII Jornadas de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental*

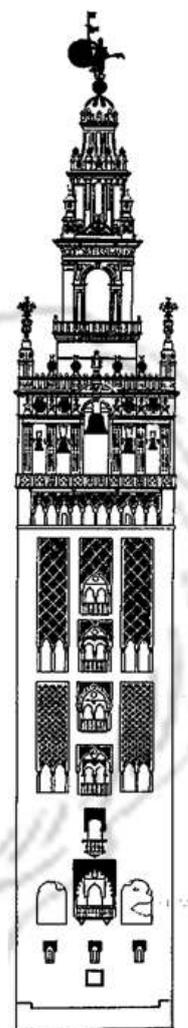
Sevilla, del 23 al 26 de Junio de 2008

Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

CellCulture  
RADIOBIOLOGY &  
RESEARCH GROUP



c.viral



## SEMA 2008, Bienvenida

El Grupo de ***Cultivo Celular y Radiobiología*** de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla, en nombre de la **Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental (SEMA)**, tiene el placer de invitarle a la XVII Reunión Científica de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental, que se celebrará en **Sevilla del 23 al 26 de Junio de 2008**.



SEMA 2008, Plano de situación de la sede del congreso



## SEMA 2008, transportes

Todas las líneas pasan o acaban en el Prado de San Sebastián. Para ir al centro hay que caminar o transbordar y coger el Metrocentro



## SEMA 2008, transportes



Bonobús 10 viajes  
con transbordo 6 €



Bonobús 10 viajes  
sin transbordo 5 €



Tarjeta turística 1  
día 3.25 €



Tarjeta turística 3  
días 7.50 €

Estos bonobuses se pueden adquirir en estancos, quioscos y puntos de venta de tussam.

El billete univiaje vale 1.10 € y se compra en el propio autobús.

Existe un servicio especial aeropuerto y su billete vale 2.10 €. Un taxi desde el aeropuerto vale aproximadamente 25€.

SEMA 2008, Visita a los Reales Alcázares de Sevilla

**DESDE SEDE DEL CONDRESO BUS 34**

**DESDE RESIDENCIA SAN ESTANISLAO DEL CAMPO BUS 33**



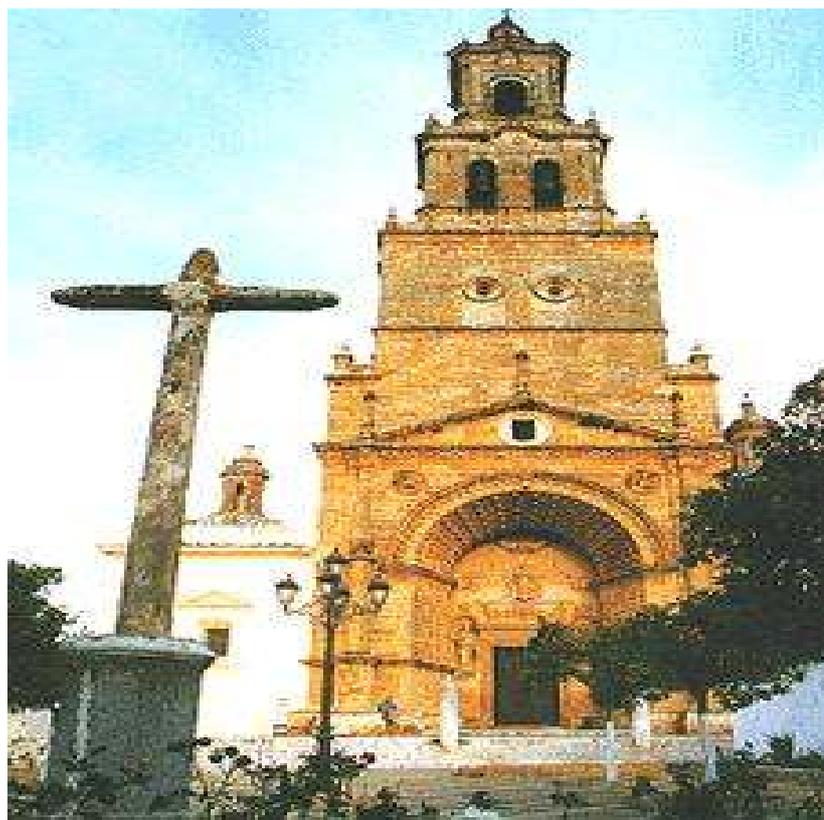
**23 de junio de 2008**

**Reales Alcázares  
21 horas**



**Casa de la provincia  
22.30 horas (cóctel)**

SEMA 2008, Visita a Utrera



Santa María la mayor

**Miércoles 25 de junio de 2008**

**Bus para Utrera parte desde la sede del congreso a las 19.45  
con parada en CM San Estanislao a las 20 horas.**

## Comité organizador

Presidente: Felipe Cortés Benavides.

Secretario: Santiago Mateos Cordero.

Tesorera: Inmaculada Domínguez García.

Vocales: Paula Daza Navarro.

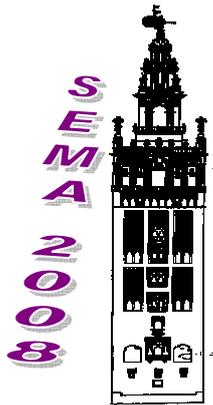
José Torreblanca López.

Nuria Pastor Carrillo.

Manuel Luís Orta Vázquez.

José Manuel Álvarez Orozco

Manuela Barrera Caro



## Comité científico

Dr. Ricardo Marcos Dauder. Universidad Autónoma de Barcelona

Dra. Carmen Pueyo de la Cuesta. Universidad de Córdoba

Dra. Luisa Maria Sierra Zapico. Universidad de Oviedo

Dr. Amadeu Creus Capdevila. Universidad Autónoma de Barcelona

Dr. Juan López Barea. Universidad de Córdoba

Dr. Miguel Angel Comendador García. Universidad de Oviedo

Dra. Carmen Barrueco Fernández-Cuervo. Ministerio de Sanidad y Consumo

Dr. Eduardo de la Peña de Torres. Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Dr. Guillermo Repetto Kuhn. Instituto Nacional de Toxicología de Sevilla



## Sede de la Reunión

**Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla** (Edificio verde). Salón de Grados “Profesor Julio Pérez Silva” Avda de la Reina Mercedes nº 6 41012 Sevilla

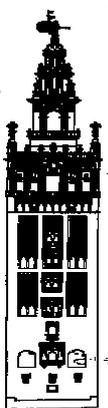


## Colaboran

Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental  
Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de Sevilla  
Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía  
Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía  
Facultad de Biología de Sevilla  
Excma Diputación Provincial de Sevilla  
Patronato del Real Alcázar de Sevilla

Eulabor  
C. Viral  
Biomol

S  
E  
M  
A  
  
2  
0  
0  
8



*Programa general*  
*XVII Jornadas de la*  
*Sociedad Española de*  
*Mutagénesis*  
*Ambiental*

Sevilla, del 23 al 26 de Junio de 2008

Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

CellCulture  
RADIOBIOLOGY &  
RESEARCH GROUP



c.viral



## Programa general

---

**Lunes, 23 de Junio de 2008**

14.00-15.30	Entrega de la documentación
15.45	Inauguración oficial de la Reunión
16.00	Conferencia inaugural
17.15	Pausa-café
17.45	1ª Sesión de comunicaciones.
21:00	Visita guiada a los Reales Alcázares de Sevilla
22.30	Cóctel de bienvenida



## Programa general

---

**Martes, 24 de Junio de 2008**

09.30	2ª Sesión de comunicaciones
11.00	Pausa-Café
11.30	Conferencia invitada
13.00	3ª Sesión de comunicaciones
14.00	Almuerzo
15.45	4ª Sesión de comunicaciones



## Programa general

---

### Miércoles, 25 de Junio de 2008

09.30	5ª Sesión de comunicaciones
11.00	Pausa-Café
11.30	6ª Sesión de comunicaciones
13.15	ASAMBLEA ANUAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MUTAGÉNESIS AMBIENTAL
14.00	Almuerzo
20.00	Visita a Utrera y cena de clausura



## Programa general

---

**Jueves, 26 de Junio de 2008**

10.00	7ª Sesión de comunicaciones
11.00	Pausa-café
11.30	Conferencia de clausura
13.00	Clausura de la Reunión
14.00	Almuerzo



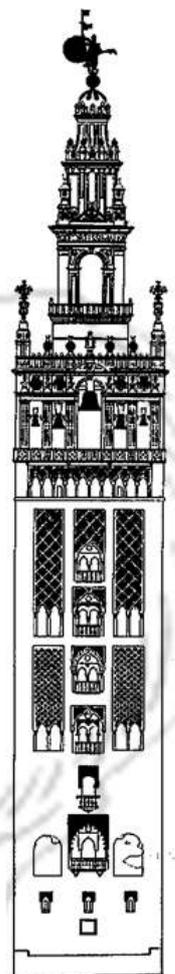
*Programa científico  
XVII Jornadas de la  
Sociedad Española de  
Mutagénesis  
Ambiental*

Sevilla, del 23 al 26 de Junio de 2008  
Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

CellCulture  
RADIOBIOLOGY &  
RESEARCH GROUP



c.viral



Programa científico: lunes, 23 de Junio de 2008

---

**CONFERENCIA INAUGURAL**

**16.00 “RENOVACIÓN TECNOLÓGICA EN LOS ESTUDIOS DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL MEDIANTE LA INTEGRACIÓN DE RESPUESTAS ÓMICAS.”**

**Dra. Carmen Pueyo de La Cuesta.** Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba.

**Moderador: Dr. Eduardo de la Peña** CSIC, Centro de Ciências Ambientales. Madrid

**17.15** Pausa-café

**1ª Sesión de comunicaciones: Inestabilidad génica y mutaciones**

**Moderador: Dr. José Torrebanca** Departamento de Biología Celular. Universidad de Sevilla

**17.45** 1. Prieto-Álamo MJ, Abril N, Osuna-Jiménez I, Pueyo C.

Universidad de Córdoba

**IDENTIFICACIÓN DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN LENGUADO (*Solea senegalensis*) EN RESPUESTA A LPS O CuSO<sub>4</sub> MEDIANTE LA OBTENCIÓN DE GENOTECAS SUBSTRACTIVAS (Supression Subtractive Hybridization PCR)**

**18.00** 2. Osuna-Jiménez I<sup>1</sup>, Williams TD<sup>2</sup>, Prieto-Álamo MJ<sup>1</sup>, Abril N<sup>1</sup>, Chipman JK<sup>2</sup>, Pueyo C<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidad de Córdoba. <sup>2</sup>University of Birmingham. United Kingdom .

**ANÁLISIS DE LA RESPUESTA HEPÁTICA DE *Solea senegalensis* AL TRATAMIENTO CON LPS O CuSO<sub>4</sub> MEDIANTE EL USO DE MICROARRAYS HETERÓLOGOS.**

**18.15** 3. Fuentes-Almagro CA, Jurado J, Osuna-Jiménez I, Prieto-Álamo MJ, Pueyo C Universidad de Córdoba.

**EFFECTO DEL SILENCIAMIENTO TRANSITORIO SIMULTÁNEO DE LOS GENES *Prdx1*, *Prdx3* Y *Gclc* EN LOS PATRONES DE EXPRESIÓN PROTEICOS DE CÉLULAS HEPA 1-6**

**18.30** 4. Aguilar-Melero P, Prieto-Álamo MJ, Pueyo C. Universidad de Córdoba.

**EFFECTO DE LA INHIBICIÓN ESTABLE DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *Prdx1* EN LA LÍNEA DE HEPATOCARCINOMA HUMANO HEPG2**

## Programa científico: martes, 24 de Junio de 2008

---

### 2ª Sesión de comunicaciones: Inestabilidad génica y mutaciones

**Moderador: Dr. Santiago Mateos** Departamento de Biología Celular. Universidad de Sevilla.

**9.30** 1. Akdi A.<sup>1</sup>, Galofré P.<sup>2</sup>, Marcos R.<sup>1</sup>, Velázquez A.<sup>1</sup>  
Universitat Autònoma de Barcelona . <sup>2</sup>Servei de Medicina Nuclear, Hospital Josep Trueta, Girona

**ASOCIACIÓN DEL GEN *WDR3* CON LA SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE TIROIDES**

**9.45** 2. González-Flores E., Pastor S., Velázquez A., Marcos R.  
Universitat Autònoma de Barcelona

**ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS DE LOS GENES ERCC1, ERCC2, ERCC5 Y EL CÁNCER DE TIROIDES.**

**10.00** 3. García, J., Comendador, M.A., y Sierra, L.M. Universidad de Oviedo  
**DAÑO EN EL ADN, INESTABILIDAD GENÉTICA Y ENSAYO DEL COMETA.**

**10.15** 4. Michán C., Pueyo C Universidad de Córdoba.

**DEFENSAS OXIDATIVAS Y NITROSATIVAS EN *Candida albicans*: RESPUESTA A MICONAZOL Y MACRÓFAGOS**

**10.30** 5. Orta Vázquez M.L., Mateos S. y Cortés F. Universidad de Sevilla  
**LA HIPOMETILACIÓN EXTENSIVA INDUCIDA POR LA 5-AZACITIDINA EN EL GENOMA AFECTA AL CORRECTO FUNCIONAMIENTO DE LA TOPOISOMERASA I *IN VIVO*.**

**10.45** 6. Ramírez JM<sup>1</sup>, Huerta I<sup>1</sup>, Barasoain M<sup>1</sup>, Téllez M<sup>1</sup>, Criado B<sup>2</sup>, Ortiz E<sup>3</sup>, González J<sup>4</sup>, Flores P<sup>5</sup>, Arrieta I<sup>1</sup>

<sup>1,3,4,5</sup>Universidad del País Vasco, <sup>2</sup>Cooperativa de Ensino Superior Politecnico e Universitario (CESPU). Porto, Portugal.

**EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA CAPACIDAD GENOTÓXICA DE ANTIHIPERTENSIVOS ALFA BLOQUEANTES. ESTUDIO DE MARCADORES DE GENOTOXICIDAD EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA**

Programa científico: martes, 24 de Junio de 2008

---

**11.00 Pausa-café**

**CONFERENCIA INVITADA**

**11.30. INESTABILIDAD GENÉTICA ASOCIADA AL ENSAMBLAJE DE LA CROMATINA**

**Dr. Félix Prado** Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER) Sevilla

**Moderador: Dra. Inmaculada Domínguez** Departamento de Biología Celular. Universidad de Sevilla

**3ª Sesión de comunicaciones: Genómica y proteómica ambientales**

**13.00** 1. Chicano-Gálvez E, Alhama-Carmona J, López-Barea J. Universidad de Córdoba

**PROTEÍNAS DE PECES PLANOS CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS DE EXPRESIÓN EN RESPUESTA A INFECCIONES MICROBIANAS Y A CONTAMINANTES**

**13.15** 2. Santos E<sup>1</sup>, Chicano-Galvez E<sup>1</sup>, Alhama J<sup>1</sup>, Fernández-Caliani JC<sup>2</sup>, Gómez-Ariza JL<sup>3</sup>, López-Barea J<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidad de Córdoba, <sup>2,3</sup>Universidad de Huelva

**ESTUDIOS METAPROTEÓMICOS EN SUELOS DEL ESTERO DE DOMINGO RUBIO**

**13.30** 3. Martínez-Macías MI, Ponferrada-Marín MI, Morales-Ruiz MT, Roldán-Arjona MT, Ariza RR.

Universidad de Córdoba

**IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERVIENEN EN UNA RUTA DE DESMETILACIÓN ACTIVA DE ADN EN *ARABIDOPSIS THALIANA***

**14.00 Almuerzo**

Programa científico: martes, 24 de Junio de 2008

---

**4ª Sesión de comunicaciones: Biomonitorización de poblaciones expuestas**

**Moderador: Dr. Miguel Ángel Comendador** Departamento de Biología Funcional.  
Universidad de Oviedo

**15.45** 1. Zúñiga-Venegas L., Creus A., Marcos R. Universitat Autònoma de Barcelona  
**ESTUDIO DEL DAÑO GENÉTICO EN PAREJAS DE MADRES E HIJOS MEDIANTE  
EL ENSAYO DEL COMETA**

**16.00** 2. Stoyanova E<sup>1.</sup>, El-Yamani N<sup>1.</sup>, Coll E<sup>2.</sup>, Marcos R<sup>1.</sup>.

<sup>1</sup>Universitat Autònoma de Barcelona, <sup>2</sup>Fundació Puigvert, Barcelona.

**EVALUACIÓN DEL DAÑO GENÓMICO EN PACIENTES CON DIFERENTES NIVELES DE  
INSUFICIENCIA RENAL Y SU RELACIÓN CON FACTORES BIOQUÍMICOS Y HÁBITOS.**

**16.15** 3. Liviác D<sup>1.</sup>, Marcos R.<sup>1.</sup>, Creus A.<sup>1.</sup>, Grimalt J.<sup>2.</sup>, Fernández P.<sup>2.</sup>, Kogevinas M.<sup>3.</sup>, Villanueva C.<sup>3.</sup>,  
Font L.<sup>3.</sup>

<sup>1</sup>Universitat Autònoma de Barcelona, <sup>2</sup>IQA-CSIC. <sup>3</sup>CREAL, España

**ESTUDIO SOBRE EL RIESGO GENOTÓXICO DE SUBPRODUCTOS DE LA  
CLORACIÓN (CBPs) EN PISCINAS – RESULTADOS PRELIMINARES**

**16.30** 4. Sandoval B<sup>1,2.</sup>, Coll E.<sup>3.</sup>, Stoyanova E.<sup>1.</sup>, El-Yamani N.<sup>1.</sup>, Herreros A.<sup>3.</sup>, Andrés  
E.<sup>3.</sup>, Ballarín J.<sup>3.</sup>, Marcos R.<sup>1.</sup>

<sup>1</sup>Universitat Autònoma de Barcelona, Universidad Autónoma de Tamaulipas, México.

<sup>3</sup>Fundación Puigvert, Barcelona.

**RELACIÓN ENTRE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN PACIENTES CON  
INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA (IRC) Y EL TIEMPO DE TRATAMIENTO CON  
HEMODIÁLISIS CONVENCIONAL.**

Programa científico: miércoles, 25 de Junio de 2008

---

**5ª Sesión de comunicaciones: Daños y reparación del DNA**

**Moderador: Dr. Ricardo Marcos** Departament de Genètica i de Microbiologia,  
Universitat Autònoma de Barcelona,

**9.30 1.** Córdoba-Cañero D., Ariza R.R. y Roldán-Arjona T. Universidad de Córdoba  
**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ADN GLICOSILASA ATUNG Y ANÁLISIS DE SU CONTRIBUCIÓN A LA REPARACIÓN DE URACILO EN *ARABIDOPSIS THALIANA***

**9.45. 2** Ponferrada-Marín, M.I., Martínez-Macías, M.I., Morales-Ruiz, M.T., Roldán Arjona, M.T., Ariza R.R. Universidad de Córdoba  
**ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO E INTERACCION CON EL ADN DE LA 5meC ADN GLICOSILASA ROS1**

**10.00 3.** Sierra, L.M.<sup>1</sup>, García-Sar, D.<sup>2</sup>, Aguado, L.<sup>1</sup>, Montes-Bayón, M.<sup>2</sup>, Blanco, E.<sup>2</sup>, Sanz-Medel, A.<sup>2</sup>, Comendador, M.A.<sup>1</sup>  
<sup>1,2</sup> Universidad de Oviedo.

**CORRELACIÓN ENTRE LOS ADUCTOS INDUCIDOS POR CISPLATINO Y SUS CONSECUENCIAS GENÉTICAS EN *DROSOPHILA IN VIVO*: INFLUENCIA DEL SISTEMA NER.**

**10.15 4.** Cigdem Kaplan<sup>a</sup>, Egemen Foto<sup>a</sup>, Betul Tekiner-Gulbas<sup>b</sup>, Ozlem Temiz<sup>b</sup>, Ilkay Yildiz<sup>b</sup>, Esin Aki-Sener<sup>b</sup>, Ismail Yalcin<sup>b</sup>, and Nuran Diril<sup>a</sup>

<sup>a</sup>University of Hacettepe , <sup>b</sup>Ankara University Turkey

**NEWLY SYNTHESIZED BENZOTHAZOLES ARE MORE EFFECTIVE ON CATALYTIC ROLE OF DNA TOPOISOMERASE II THAN TOPOISOMERASE I.**

**10.30. 5** Pastor N.<sup>1</sup>, Campanella C.<sup>2</sup>, Kaplan C.<sup>3</sup>, Mateos S.<sup>1</sup>, Cortés F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Sevilla <sup>2</sup> University of Palermo, Italy <sup>3</sup> University of Hacettepe, Turkey

**CARACTERIZACIÓN DEL FÁRMACO ANTITUMORAL MERBARONA, UN INHIBIDOR DE LA ENZIMA TOPOISOMERASA II DE ADN.**

**11.00 Pausa-café**

Programa científico: miércoles, 25 de Junio de 2008

---

**6ª Sesión de comunicaciones: Genotoxicidad y antigenotoxicidad**

**Moderador: Dra. Paula Daza** Departamento de Biología Celular Universidad de Sevilla

**11.30** 1. Mateos<sup>a</sup> S., Domínguez<sup>a</sup> I., Cantero<sup>a</sup> G., Pastor<sup>a</sup> N., Campanella<sup>b</sup> C, Cortés<sup>a</sup> F.  
Universidad de Sevilla, Universidad de Palermo , Italia

**CORRELACIÓN ENTRE EL ESTADO DE HIPOMETILACIÓN DEL ADN EN LA LÍNEA EM9 Y SUS ELEVADOS INDICES BASALES DE ENDORREDUPLICACIÓN.**

**11.45** 2. Domínguez I., Mateos S., Pastor N., Cantero G., Cortés F.  
Universidad de Sevilla

**EFFECTOS CITOTÓXICOS Y GENOTÓXICOS DEL AGENTE HIPOMETILANTE ZEBULARINE EN LA LÍNEA CELULAR AA8**

**12.00** 3 Zúñiga-Venegas L., Amengual D., Creus A., Marcos R.  
Universitat Autònoma de Barcelona

**OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO DEL COMETA MEDIANTE EL USO DEL GELBOND™ PARA 48 MUESTRAS**

**12.15** 4. Carmona E.R<sup>1</sup>., Gesheva T<sup>2</sup>., Creus A<sup>1</sup>., Marcos R<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universitat Autònoma de Barcelona, España. <sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

**EVALUACIÓN GENOTÓXICA DEL CLORURO DE NÍQUEL MEDIANTE LOS ENSAYOS SMART EN ALAS Y COMETA EN *DROSOPHILA MELANOGASTER***

**12.30** 5. El-Yamani N., Guillamet E., Creus A., Marcos R.

Universitat Autònoma de Barcelona

**ESTRÉS OXIDATIVO Y MECANISMOS DE GENOTOXICIDAD DEL CROMO Y DEL NIQUEL. ESTUDIO MEDIANTE EL ENSAYO DEL COMETA**

Programa científico: miércoles, 25 de Junio de 2008

---

**6ª Sesión de comunicaciones: Genotoxicidad y antigenotoxicidad**

**12.45** 6. Cosimi S.\*, Orta Vazquez M.L.\*\*\*, Mateos S.\*\*\*, Cortes F.\*\*

\*Università degli Studi della Tuscia, Viterbo Italia.

\*\*Universidad de Sevilla

**INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA EN CÉLULAS CHO POR LA MICOTOXINA  
OCRATOXINA A.**

**13.00** 7. Campanella C<sup>1</sup>, Marino Gammazza<sup>1</sup> A, Ardizzone N<sup>1</sup>, Kaplan C<sup>3</sup>, Pastor N<sup>2</sup>,  
Orta ML<sup>2</sup>, Peri G<sup>1</sup>, Marasà M<sup>1</sup>, Cappello F<sup>1</sup>, Cortes F<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>University of Palermo, Italy <sup>2</sup>Universidad de Sevilla, Spain <sup>3</sup>University of Hacettepe,  
Turkey.

**HSP60/pro-CASPASE3 COMPLEX PERSIST AFTER OXIDATIVE STRESS IN  
TUMORAL CELLS**

**13.15 ASAMBLEA ANUAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MUTAGÉNESIS  
AMBIENTAL**

**14.00 Almuerzo**

Programa científico: jueves, 26 de Junio de 2008

---

**7ª Sesión de comunicaciones: Biomarcadores de contaminación ambiental**

**Moderador: Dra. Nuria Pastor** Departamento de Biología Celular Universidad de Sevilla

**10.00** 1. Alhama J<sup>a</sup>, Romero-Ruiz A<sup>a</sup>, Blasco J<sup>b</sup>, Gómez-Ariza JL<sup>c</sup>, López-Barea J<sup>a</sup>  
<sup>a</sup>Universidad de Córdoba, <sup>b</sup>Instituto Andaluz de Ciencias Marinas-CSIC, Cádiz,  
<sup>c</sup>Universidad de Huelva

**EVALUACIÓN EN COQUINAS DE FANGO (*Scrobicularia plana*) DE LA CONTAMINACIÓN POR METALES EN EL ESTUARIO DEL GUADALQUIVIR: NIVELES DE METALOTIONEÍNAS Y CORRELACIÓN CON OTROS BIOMARCADORES**

**10.15** 2. Vioque-Fernández A<sup>1</sup>, Alves de Almeida E<sup>2</sup>, López-Barea J<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Univ. Córdoba, España. <sup>2</sup>Depto. Química y Medio Ambiente, IBILCE-UNESP, San Paulo, Brasil.

**INTEGRACIÓN DE BIOMARCADORES CONVENCIONALES Y PROTEÓMICOS EN CANGREJO ROJO AMERICANO (*Procambarus clarkii*). EFECTOS *IN VIVO* DE PLAGUICIDAS Y BIOMONITORIZACIÓN DE DOÑANA Y SU ENTORNO**

**10.30** 3. Montes-Nieto R, López-Barea J. Universidad de Córdoba  
**CONTAMINACIÓN DE ECOSISTEMAS ACUÁTICOS DEL ESTERO DE DOMINGO RUBIO: INTEGRACIÓN DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS Y APROXIMACIONES PROTEÓMICAS EN EL CANGREJO VERDE (*Carcinus maenas*).**

**10.45** 4 Daza P, Mateos S, Domínguez I, Cárdenas J.A., Cortés F.  
Universidad de Sevilla

**ESTUDIO DEL DAÑO GENÉTICO CAUSADO POR LA CONTAMINACIÓN DEL POLO QUÍMICO DE HUELVA MEDIANTE LA TÉCNICA DEL COMETA.**

**11.00** Pausa-café

Programa científico: jueves, 26 de Junio de 2008

---

**CONFERENCIA DE CLAUSURA**

**11.30. RELATIONSHIP BETWEEN DNA LESIONS, DNA REPAIR, APOPTOSIS AND CHROMOSOMAL ABERRATIONS**

**Dr. Fabrizio Palitti** Department of Agrobiolgy and Agrochemistry, University of Tuscia, Via S. C. de Lellis, snc, Viterbo, Italy.

**Moderador: Dr. Felipe Cortés** Departamento de Biología Celular. Universidad de Sevilla

**13.00 CLAUSURA DE LA REUNIÓN**

**14.00 Almuerzo**

*Resúmenes de las  
ponencias*

*XVII Jornadas de la  
Sociedad Española de  
Mutagénesis  
Ambiental*

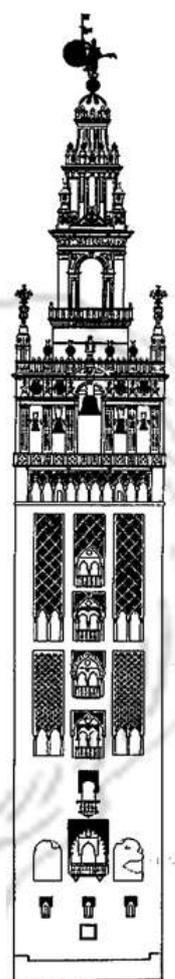
Sevilla, del 23 al 26 de Junio de 2008

Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

CellCulture  
RADIOBIOLOGY  
RESEARCH GROUP



c.viral



Ponencias XVII Reunión Científica SEMA 2008 Sevilla

**RENOVACIÓN TECNOLÓGICA EN LOS ESTUDIOS DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL  
MEDIANTE LA INTEGRACIÓN DE TECNOLOGÍA ÓMICAS**

Pueyo C, Ruiz-Laguna J, Fuentes-Almagro CA, Montes-Nieto R, Jurado J, Prieto-Álamo MJ,  
Osuna-Jiménez I, Abril N, Gómez-Ariza JL\*, López-Barea J.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. Campus  
Rabanales.14071-Córdoba. \*Departamento de Química y Ciencia de los Materiales.  
Universidad de Huelva. Campus El Carmen. 21007-Huelva.

Los seres vivos responden a las sustancias tóxicas mediante la activación de mecanismos defensivos compensatorios. Los *biomarcadores* son índices que reflejan la exposición de los organismos *bioindicadores* a distintos contaminantes. Los biomarcadores “convencionales” se basan en conocimientos previos de su papel biológico, presentando cierto sesgo en la evaluación de la calidad ambiental de cualquier ecosistema. Las nuevas tecnologías *ómicas* constituyen una estrategia multidisciplinar de utilidad y eficacia sin precedentes en la búsqueda de nuevos biomarcadores de calidad ambiental. La aplicación de las tecnologías *ómicas* en programas de biomonitorización se ve limitada porque los bioindicadores no suelen estar representados en las bases de secuencias génicas y proteicas. Este estudio plantea la utilización integrada de técnicas de genómica funcional a nivel de transcritos y proteínas en la evaluación de la calidad ambiental de ecosistemas terrestres, utilizando como bioindicador la especie aborigen *Mus spretus* y como organismo de referencia la especie modelo *Mus musculus*. El ecosistema estudiado ha sido el Estero de Domingo Rubio (DR). Los ratones se capturaron en tres zonas del estero: DR1, y en menor medida DR4, están bajo influencia mareal, recibiendo elementos tóxicos de origen pirítico del Río Tinto. Adicionalmente DR1 y DR4 reciben contaminantes orgánicos de las plantas químicas y petroquímicas adyacentes. En contraposición, DR6 está primordialmente bajo la influencia de una agricultura intensiva. Como control negativo se analizaron ratones capturados en el Parque Nacional de Doñana, y como controles positivos los capturados en las balsas de fosfoyeso del polo químico de Huelva y en los arrozales del Matochal (colindantes con Doñana).

Basándonos en las secuencias génicas de la especie modelo *M. musculus*, se diseñaron cebadores para la amplificación específica de transcritos de *M. spretus* que codifican enzimas de biotransformación. Se realizó una minuciosa cuantificación del número de moléculas de dichos transcritos mediante RT-PCR en tiempo real, demostrándose la utilidad de este novedoso análisis transcripcional en los estudios de campo. Por otra parte, estos análisis evidenciaron una gran homología entre los genomas de ambas especies de ratón, permitiéndonos demostrar la viabilidad del análisis global de transcritos (mediante microchips heterólogos) y de proteínas (mediante separación 2-D e identificación de las proteínas diferencialmente expresadas por MALDI-TOF-PMF y emparejamiento de péptidos con las bases de datos de *M. musculus*) en los estudios con ratones de vida libre. La metalómica es una tecnología de aparición muy reciente que persigue la identificación no sesgada de biomarcadores metálicos. Actualmente se están realizando estudios para definir el metaloma hepático del ratón con vistas al análisis integrado de los perfiles de expresión a nivel de transcritos, proteínas y metaloproteínas en los estudios de contaminación ambiental. **Financiación: BFU2005-02896; CTM2006-08960-C01/02; CICYE-00523. Cofinanciación FEDER.**

**INESTABILIDAD GENÉTICA ASOCIADA AL ENSAMBLAJE DE LA CROMATINA**

Clemente, M., González-Prieto, R., y F. Prado

Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER)

Sevilla, España

La replicación del DNA puede ser una fuente de inestabilidad genética. Cortes de cadena sencilla y obstáculos en el DNA pueden alterar el avance de las horquillas de replicación y generar estructuras patogénicas que activen mecanismos de control del ciclo celular y de reparación y tolerancia de daños en el DNA que pueden estar asociados a reordenamientos genómicos.

La replicación implica tanto la síntesis de DNA como su ensamblaje en cromatina. Este último es llevado a cabo por una extensa batería de complejos multiprotéicos que en un primer paso modifican y depositan las histonas para formar los nucleosomas, y en un segundo paso remodelan la cromatina para generar estructuras con funciones reguladoras específicas. Los procesos de síntesis de DNA y ensamblaje en cromatina están estrechamente coordinados tanto mediante interacciones físicas como genéticas entre los componentes del replisoma y la maquinaria de deposición y remodelado de nucleosomas.

Dada la íntima conexión entre los procesos de síntesis de DNA y ensamblaje en cromatina, nos hemos planteado la posibilidad de que problemas en el ensamblaje de los nucleosomas durante la fase S afecten a la replicación y generen inestabilidad genética. Para ello hemos alterado mediante diferentes aproximaciones genéticas el proceso de deposición de histonas en la levadura *S. cerevisiae*, y analizado sus consecuencias tanto a nivel genético como molecular. Nuestros resultados muestran que el correcto ensamblaje del DNA en cromatina es necesario para mantener la estabilidad de las horquillas replicativas y prevenir la inestabilidad genética asociada a su reparación. Asimismo, apuntan a la maquinaria de reparación por recombinación homóloga como uno de los mecanismos más importantes en el rescate de las horquillas colapsadas. La relación de estos procesos con los mecanismos de control de ciclo será también discutida.

**RELATIONSHIP BETWEEN DNA LESIONS, DNA REPAIR, APOPTOSIS AND  
CHROMOSOMAL ABERRATIONS.**

Palitti F.

Department of Agrobiolgy and Agrochemistry, University of Tuscia, Via S. C. de Lellis,  
snc, Viterbo, Italy.

Different cellular pathways are involved in response to DNA damage before gross chromosomal aberrations become visible. Among the lesions induced in DNA, double strand breaks (DSBs) have been considered to be the most important lesions leading to chromosomal aberrations (Natarajan et al., 1980). DSBs are repaired by two major pathways, namely non-homologous end joining (NHEJ) and homologous recombination repair (HRR). The relative importance of different DNA repair pathways involved in the formation of chromosomal aberrations have been determined in human DNA repair deficient syndromes as well as in mutant cell lines in the various stages of the cell cycle. A possible role of apoptosis in selective removal of cell bearing chromosomal aberrations has been shown in relationship with the proliferative status of the cell, the status of p53 and the type of induced chromosomal damage (stable or unstable). The implications of these results will be discussed in relationship with the evaluation of cytogenetic assays in mutagenicity testing and in radiation dosimetry studies.

*Resúmenes de las  
comunicaciones*

*XVII Jornadas de la  
Sociedad Española de  
Mutagénesis  
Ambiental*

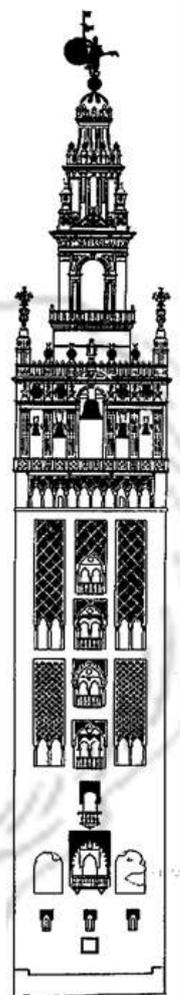
Sevilla, del 23 al 26 de Junio de 2008

Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

CellCulture  
RADIOBIOLOGY &  
RESEARCH GROUP



c.viral



Comunicaciones XVII Reunión Científica SEMA 2008 Sevilla

**IDENTIFICACIÓN DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN LENGUADO (*Solea senegalensis*) EN RESPUESTA A LPS O CuSO<sub>4</sub> MEDIANTE LA OBTENCIÓN DE GENOTECAS SUBSTRACTIVAS (*Supression Subtractive Hybridization* PCR)**

Prieto-Álamo MJ, Abril N, Osuna-Jiménez I, Pueyo C.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edificio Severo-Ochoa 2ª planta. Carretera Madrid-Cádiz km 396a, 14071-Córdoba. España.

El lenguado (*Solea senegalensis*) tiene un elevado potencial para la diversificación acuícola debido a su alto precio de mercado, su posibilidad de reproducción en cautividad y los razonables resultados obtenidos durante su cultivo. La necesidad de mejorar su cultivo y prevenir problemas sanitarios justifican los estudios encaminados a descubrir biomarcadores de respuestas asociadas a su manejo, las infecciones o la presencia de contaminantes. Todo proceso biológico provoca cambios en la expresión de los genes de un organismo y, aunque los genes ejercen su acción a nivel proteico, las respuestas génicas a situaciones de estrés suelen regularse a nivel transcripcional.

El objetivo de este trabajo ha sido la identificación de genes de lenguado expresados diferencialmente a nivel de mRNA en respuesta a LPS (25 mg/Kg, i.p.) utilizado como mimético de infecciones bacterianas o CuSO<sub>4</sub> (2 mg/kg, i.p.) utilizado como zoosanitario en piscicultura. Con este fin, se han obtenido genotecas substractivas por SSH PCR, un método muy empleado en la identificación de genes de respuesta a patógenos y condiciones de estrés en organismos no modelo. Como control se emplearon lenguados inyectados con PBS. Se obtuvieron 2 genotecas, F (forward: transcritos inducidos) y R (reverse: transcritos reprimidos), de riñón cefálico de lenguados expuestos a LPS, y otras 2 genotecas, F y R, de hígado de lenguados expuestos a CuSO<sub>4</sub>. Para ello, se combinaron a partes iguales RNAs procedentes de animales expuestos durante 6 y 24 h ( $\geq 10$  individuos por tratamiento y tiempo). Se secuenciaron 231 clones de las genotecas de riñón (121 F y 110 R) y 229 de las de hígado (112 F y 117 R). Los supuestos productos de las ESTs se identificaron mediante comparación con las bases de datos existentes (tBlastX, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Para la validación de las genotecas se seleccionaron un total de 16 transcritos que codifican proteínas implicadas en la respuesta inmune (C3, C7, CTSZ, SQSTM1, TRAF3, NCCRP1), la respuesta a estrés (PRDX1, CIRBP), el transporte y homeostasis de hierro ( $\alpha$ -globina, Ferritina, TF, HP), el metabolismo energético (TKT, NDUF4A) y los procesos de transcripción (CEBPB) y traducción de señal (ACE). En base a las ESTs obtenidas, se diseñaron cebadores específicos para su cuantificación absoluta (moléc mRNA/pg RNA total) por RT-PCR en tiempo real. Los resultados han puesto de manifiesto importantes diferencias entre transcritos en lo concerniente a: (i) Sus niveles basales, con un claro patrón de expresión tisular. (ii) Su respuesta a los tratamientos: cinética, magnitud y tipo de respuesta (inducción o represión), tratamiento (LPS vs. CuSO<sub>4</sub>) y órgano (riñón vs. hígado). Un análisis más detallado a nivel individual ( $n=8$ ) confirmó los resultados de las cuantificaciones absolutas en las muestras procedentes de mezclas de individuos. No obstante, en el caso del transcrito CTSZ, su gran variabilidad interindividual no permitió confirmar las diferencias observadas con las mezclas de individuos. **Financiación: CICYE- 00516 y cofinanciación FEDER.**

Comunicaciones XVII Reunión Científica SEMA 2008 Sevilla

**ANÁLISIS DE LA RESPUESTA HEPÁTICA DE *Solea senegalensis* AL TRATAMIENTO CON LPS O CuSO<sub>4</sub> MEDIANTE EL USO DE MICROARRAYS HETERÓLOGOS.**

Osuna-Jiménez I<sup>1</sup>, Williams TD<sup>2</sup>, Prieto-Álamo MJ<sup>1</sup>, Abril N<sup>1</sup>, Chipman JK<sup>2</sup>, Pueyo C<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edificio Severo-Ochoa 2ª planta. Carretera Madrid-Cádiz km 396a, 14071-Córdoba. España. <sup>2</sup>School of Biosciences. University of Birmingham. Birmingham B15 2TT. United Kingdom.

Las nuevas tecnologías de la era post-genómica posibilitan un análisis global de los patrones de expresión génica. La hibridación heteróloga permite analizar los cambios a nivel de transcrito de una especie utilizando microarrays fabricados con las secuencias de DNA conocidas de otra especie relacionada, soslayando la necesidad de establecer para cada especie una nueva plataforma de microarrays. Por tanto, los microarrays heterólogos constituyen una poderosa herramienta en estudios de expresión diferencial en organismos no modelo. El lenguado (*Solea senegalensis*) es un organismo no modelo de gran interés para la acuicultura española por sus grandes expectativas de mercado. Sin embargo, su cultivo se ve dificultado por diversas patologías infecciosas y su sensibilidad a diferentes situaciones de estrés. En este trabajo se ha llevado a cabo el análisis global de transcritos en *S. senegalensis* para identificar biomarcadores sensibles al estrés producido por infecciones o por el manejo acuícola, utilizando microarrays de cDNA (13K) construidos para la especie centinela *Platichthys flesus* (plataforma GENIPOL). Se ha estudiado la respuesta hepática de lenguados expuestos (i.p.) durante 6 y 24 horas a LPS, un compuesto que mimetiza infecciones bacterianas, o CuSO<sub>4</sub>, un compuesto utilizado como zoonosanitario en piscicultura debido a su acción bactericida y alguicida. Como control negativo se utilizaron individuos inyectados con PBS.

El tratamiento con LPS causó la expresión diferencial de 304 genes, observándose a las 24h un mayor número de transcritos afectados (tanto en represiones como en inducciones). En respuesta al tratamiento con CuSO<sub>4</sub> se produjeron cambios en la expresión de 225 genes, siendo similar el número de transcritos que vio afectada su expresión a los dos tiempos de exposición. Las mayores diferencias de expresión correspondieron a genes que codifican proteínas que participan en la respuesta a estrés, respuesta inmune e inflamatoria, regulación de la transcripción, plegamiento de proteínas, homeostasis de hierro y proteólisis. Los resultados obtenidos se validaron mediante la cuantificación absoluta (moléc mRNA/pg RNA total) por RT-PCR en tiempo real de 9 transcritos que se seleccionaron en base a su función y participación en procesos biológicos relevantes (TNFAIP9, HAMP, GP96, DDIT4L, NARS, AGT, PSMD3, HMGB2, y GAPDH). En aquellos casos en los que no se conocía la secuencia del gen en *S. senegalensis*, se diseñaron cebadores degenerados basados en las secuencias conocidas de otras especies de peces para obtener la secuencia parcial del cDNA de lenguado. La cuantificación absoluta de los transcritos ha puesto de manifiesto que, aunque en general, los resultados obtenidos con las dos metodologías (microarrays y RT-PCR en tiempo real) se corresponden de forma cualitativa, la cuantificación absoluta de los transcritos mediante RT-PCR en tiempo real resultó ser más sensible ya que, en todos los casos, la magnitud de los cambios detectados con esta técnica fue superior. **Financiación: CICYE-00516 y cofinanciación FEDER.**

### Comunicaciones XVII Reunión Científica SEMA 2008 Sevilla

#### **EFFECTO DEL SILENCIAMIENTO TRANSITORIO SIMULTÁNEO DE LOS GENES *Prdx1*, *Prdx3* Y *Gclc* EN LOS PATRONES DE EXPRESIÓN PROTEICOS DE CÉLULAS HEPA 1-6**

Fuentes-Almagro CA, Jurado J, Osuna-Jiménez I, Prieto-Álamo MJ, Pueyo C

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. Campus Rabanales. 14071-Córdoba

La interferencia por RNA (RNAi) es un mecanismo de silenciamiento postranscripcional iniciado por pequeñas moléculas de RNA bicatenario (siRNA) de 21-23 nucleótidos que provocan la degradación específica de mRNAs de secuencia homóloga. El silenciamiento génico mediado por RNAi se ha convertido en una herramienta esencial en el análisis funcional de genes por su alta especificidad y eficiencia. Los sistemas tiorredoxina y glutatión son los encargados de mantener el estado reducido normal de las células. La homeostasis redox desempeña un papel relevante en funciones vitales como la señalización, el metabolismo o la transcripción. Las peroxirredoxinas (Prdxs) forman una familia de tiorredoxina-peroxidasas ubicuas que reducen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, una gran variedad de peróxidos orgánicos y peroxinitritos. Recientemente, a esta función antioxidante se añade un papel importante en la regulación redox de la actividad celular. El glutatión (GSH) es el principal antioxidante que tienen las células y es sintetizado por la actuación secuencial de dos enzimas, la glutamato-cisteína ligasa (Gcl) y la GSH sintasa (Gss).

En este trabajo se ha investigado el efecto del silenciamiento transitorio simultáneo de las dos Prdxs más abundantes en el citosol (Prdx1) y en la mitocondria (Prdx3) y de la subunidad catalítica de la Gcl (Gclc), en los patrones de expresión proteica de células Hepa1-6, tanto en condiciones normales de crecimiento como sometidas a estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado mediante tratamiento con glucosa oxidasa (GO).

En primer lugar se establecieron las condiciones óptimas para el silenciamiento triple mediante cuantificación de transcritos por RT-PCR en tiempo real y de proteínas por hibridación Western. A las 48h postransfección se obtuvieron inhibiciones superiores al 75% de los 3 genes, valores similares a los obtenidos en los silenciamientos simples. En comparación con las células control (células transfectadas con un siRNA inespecífico), las células triplemente silenciadas presentaron niveles superiores de EROs, fueron más sensibles a los efectos citotóxicos del tratamiento con GO, presentaron niveles de oxidación de proteínas superiores y sobreexpusieron transcritos de respuesta a estrés oxidativo (e.g. *HO-1*).

El análisis proteómico, que se llevó a cabo mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida, reveló cambios en los perfiles de expresión en las células silenciadas en comparación con sus respectivos controles. En ausencia de tratamiento destacaron 9 manchas cuya expresión mostró diferencias significativas. De ellas 5 subieron de intensidad en las células silenciadas y 4 bajaron. El tratamiento con GO incrementó la intensidad de 16 manchas, 4 de ellas específicamente en las células silenciadas. Por el contrario, provocó la disminución de la intensidad de 36 manchas, 14 de las cuales cambiaron sólo en las células silenciadas y no en los controles tratados. Actualmente, se están identificando por espectrometría de masas las diferencias de expresión encontradas. Entre los resultados obtenidos por el momento cabe destacar el elevado porcentaje de Prdxs afectadas, 12 de las manchas diferencialmente expresadas se corresponden con distintas isoformas de 5 de las 6 Prdxs descritas. La existencia de isoformas con distinto punto isoeléctrico correspondientes a una misma Prdx apoyaría el papel de estas proteínas como sensores en la regulación redox de la célula.

**Financiación: BFU2005-02896, Cofinanciación FEDER**

Comunicaciones XVII Reunión Científica SEMA 2008 Sevilla

**EFFECTO DE LA INHIBICIÓN ESTABLE DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *Prdx1* EN LA LÍNEA DE HEPATOCARCINOMA HUMANO HEPG2**

Aguilar-Melero P, Prieto-Álamo MJ, Pueyo C.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edificio Severo-Ochoa 2ª planta. Carretera Madrid-Cádiz km 396a, 14071-Córdoba. España.

Las peroxirredoxinas (Prdx1-6) son peroxidases dependientes de tiorredoxina (Trx), que desempeñan un papel fundamental en la homeostasis redox intracelular. Por su localización citosólica y su abundancia, a Prdx1 se le supone un papel fundamental dentro de esta familia de peroxidases. Además de la destoxificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxinitritos e hidroperóxidos orgánicos, recientemente se le han atribuido numerosas funciones independientes de su actividad peroxidasa (e.g. su actuación como chaperona), siendo algunas de ellas aparentemente contradictorias (tal es el caso de su supuesto papel como proliferador celular o como supresor tumoral). Todo esto pone de manifiesto que, a pesar de los numerosos trabajos acerca de Prdx1 en diferentes sistemas biológicos, contextos genéticos y situaciones experimentales, aún existe una gran controversia acerca de su función celular y de su compleja regulación.

El objetivo de este trabajo es profundizar en el análisis funcional del gen humano *Prdx1* mediante su silenciamiento por RNAi. Para ello hemos utilizado shRNAs específicos que permiten la inhibición estable de la expresión de este gen. La línea celular seleccionada (derivada de HepG2) muestra una inhibición superior al 95%, tanto a nivel de transcrito como de proteína, en comparación con su correspondiente control negativo, una línea celular que incorpora de forma estable un shRNA inespecífico.

Las células con expresión del gen *Prdx1* inhibida presentaron una morfología alterada y un crecimiento más lento que podría relacionarse con su menor contenido en glutatión. Se ha analizado el efecto del silenciamiento de *Prdx1*, tanto en condiciones normales de crecimiento como en respuesta a estrés inducido por CdCl<sub>2</sub> (15 μM, 6h), sobre los niveles de 34 transcritos que codifican la práctica totalidad de los componentes del sistema Trx y proteínas que participan en la respuesta a estrés oxidativo, en los procesos de apoptosis, mantenimiento del citoesqueleto y diferenciación hepática. A este respecto, cabe resaltar la elevada correlación positiva entre la expresión de *Prdx1* y *AFP* (un marcador de cáncer hepático). De forma global, estos resultados sugieren que la inhibición de la expresión de *Prdx1* provoca una pérdida, al menos parcial, de las características tumorales típicas de las células no silenciadas. En relación al tratamiento con CdCl<sub>2</sub>, las células silenciadas fueron más sensibles a los efectos citotóxicos del mismo y presentaron una expresión diferencial de varios transcritos (*TrxR1*, *HO-1*, *SQSTM1*, *Bcl2* y *AFP*) en respuesta a concentraciones subletales de este compuesto.

Los estudios de expresión génica a nivel de mRNA se están completando con el análisis de los patrones de expresión proteica. Para ello se está estudiando el efecto de la inhibición de *Prdx1* sobre el proteoma celular, tanto en condiciones normales de crecimiento como en respuesta a CdCl<sub>2</sub>. Asimismo, se están comparando, en la línea inhibida y sin inhibir, los niveles de diversas modificaciones oxidativas de las proteínas (carbonilación y oxidación de grupos tioles) en ambas condiciones experimentales.  
**Financiación: MEC (BFU2005-02896) y cofinanciación FEDER.**

## **ASOCIACIÓN DEL GEN *WDR3* CON LA SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE TIROIDES**

Akdi A.<sup>1</sup>, Galofré P.<sup>2</sup>, Marcos R.<sup>1</sup>, Velázquez A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grup de Mutagènesi, Unitat de Genètica, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, España. <sup>2</sup>Servei de Medicina Nuclear, Hospital Josep Trueta, Girona, España.

En el desarrollo del cáncer de tiroides intervienen factores ambientales y genéticos. Entre los factores genéticos, los genes de susceptibilidad pueden jugar un papel importante en el desarrollo del cáncer de tiroides.

Nuestros estudios previos relacionan dos polimorfismos de la región 1p12 con la susceptibilidad al cáncer de tiroides, uno de estos polimorfismos se encuentra en el gen *WDR3*, que está implicado en la transducción de señales y en la apoptosis. Así, con el objetivo de estudiar la posible implicación de este gen en la susceptibilidad al cáncer de tiroides, se ha realizado un estudio de asociación caso-control en una población española formada por 118 individuos controles y 162 pacientes de cáncer de tiroides. Para ello, se genotiparon 11 SNPs, en el Centro Nacional de Genotipado (CeGen), que abarcan el gen *WDR3* y los genes adyacentes.

Los resultados indican que solamente un polimorfismo (rs4658973) mostró una asociación estadísticamente significativa con el cáncer de tiroides ( $p < 0,0001$ ). Sin embargo, el análisis de haplotipos con los marcadores del gen *WDR3* (6 SNPs) revela tres haplotipos fuertemente asociados con la susceptibilidad al cáncer de tiroides ( $p < 0,0001$ ). Además, dos de estos tres haplotipos muestran una clara asociación con el tipo de cáncer de tiroides papilar o folicular.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que el gen *WDR3* puede estar implicado en el cáncer de tiroides y podría ser un buen marcador de diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad.

**ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS DE LOS GENES ERCC1, ERCC2, ERCC5 Y EL CÁNCER DE TIROIDES.**

González-Flores E., Pastor S., Velázquez A., Marcos R.

Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España.

Polimorfismos en genes que codifican para proteínas involucradas en los sistemas de reparación del DNA pueden alterar su función tanto como su eficacia en la reparación del DNA e influenciar la tasa de daño al DNA y la fijación de mutaciones, incrementando así la inestabilidad genómica y conduciendo al cáncer.

En este estudio hemos evaluado el papel de cuatro polimorfismos en genes involucrados en el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos, relacionándolo con la incidencia de cáncer de tiroides, a través de un diseño caso-control (160 casos y 118 controles). Los polimorfismos seleccionados son: rs16979802 y rs3212986 (Lys504Gln) en el gen ERCC1, rs13181 (Gln751Lys) en el gen ERCC2 y rs10477768(His46His) en el gen ERCC5. Para todas las asociaciones se calcularon los odds ratio (OR) con un intervalo de confianza del 95%, así como su probabilidad estadística. También se evaluó el papel de factores de confusión como género, consumo de tabaco y alcohol.

En la población sin estratificar nuestros resultados no muestran una modulación significativa del riesgo de cáncer de tiroides por los polimorfismos estudiados. Han mostrado una disminución significativa en el riesgo de cáncer de tiroides las mujeres portadoras del genotipo heterocigoto G/C del polimorfismo rs16979802 del gen ERCC1 [0,38(IC: 0,17-0,87; p=0,021)], también las mujeres portadoras del genotipo homocigoto para el alelo variante T del polimorfismo rs1047768 del gen ERCC5 [0,35(0,13-1,91; p=0,46)], de la misma manera los bebedores y los no fumadores portadores del genotipo heterocigoto Lys/Gln del polimorfismo rs3212986 del gen ERCC1 [0,85(0,30-2,39; p=0,037)] y [0,78(0,40-1,54; p=0,037)], además los fumadores portadores del genotipo homocigoto para el alelo variante T del polimorfismo rs1047768 del gen ERCC5 [0,24(0,07-0,84; p=0,034)].

**DAÑO EN EL ADN, INESTABILIDAD GENÉTICA Y ENSAYO DEL COMETA.**

García, J., Comendador, M.A., y Sierra, L.M.

Departamento de Biología Funcional. Área de Genética e IUOPA. Universidad de Oviedo

El ensayo del cometa ha demostrado ser una herramienta muy útil en la realización de ensayos de genotoxicidad ya que pone de manifiesto la inducción de roturas en el ADN, bien como consecuencia de la acción directa de los agentes genotóxicos, bien como consecuencia de los daños inducidos por estos agentes.

Por otra parte, las roturas del ADN pueden ser el origen de procesos de inestabilidad genética. Por tanto, surge la cuestión de si el ensayo del cometa puede ser un buen instrumento en la detección de esta inestabilidad.

Para abordar esta cuestión se ha llevado a cabo el ensayo del cometa con cuatro líneas de *Drosophila melanogaster*: OKy, línea de laboratorio de fenotipo silvestre salvo para el marcador *yellow*; *mei41*, deficiente en el control del ciclo celular; *mus201*, deficiente en reparación por escisión de nucleótido; y *dmp53*, deficiente en el control de la apoptosis. Como agente inductor de daño en el ADN se ha utilizado, en las cuatro líneas, metilmetano sulfonato (MMS).

Los resultados obtenidos revelan que el ensayo del cometa no es especialmente adecuado para poner de manifiesto diferencias en estabilidad genética entre líneas.

Comunicaciones XVII Reunión Científica SEMA 2008 Sevilla

**DEFENSAS OXIDATIVAS Y NITROSATIVAS EN *Candida albicans*: RESPUESTA A MICONAZOL Y MACRÓFAGOS**

Michán C, Pueyo C

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Edificio Severo Ochoa, 2ª Pl.  
Campus de Rabanales. 14071 Córdoba

El hongo *Candida albicans* es el causante de la mayoría de infecciones fúngicas en humanos. Nuestro organismo es capaz de defenderse de *C. albicans* mediante la respuesta inmune, principalmente por macrófagos que fagocitan las células de *Candida* y las someten a compuestos oxidativos y nitrosativos para matar a estos agentes patógenos. Tioredoxinas y glutatión junto con otras proteínas asociadas, forman los sistemas responsables de mantener el equilibrio tiol-disulfuro intracelular. Las flavohemoglobinas protegen frente al estrés nitrosativo. Estamos estudiando la repuesta de estos sistemas en *C. albicans* a: (1) macrófagos, que fagocitan las células de *Candida* sometiéndolas a compuestos oxidantes y nitrosantes, y (2) miconazol, un antifúngico que además de inhibir la síntesis del ergosterol genera ROS que inducen la muerte celular del hongo. Se ha cuantificando de forma absoluta los niveles de expresión génica en presencia de macrófagos de unos 35 genes asociados a los sistemas mencionados así como a reguladores participantes en la defensa celular frente a estrés oxidativo, observándose la inducción de la transcripción en genes que codifican: flavohemoglobinas, enzimas de la síntesis de glutatión, y glutatión transferasas. Respecto de la respuesta a miconazol, se han determinado, a diversas dosis del fármaco, las tasas de crecimiento, la supervivencia y los niveles de glutatión total intracelulares en la estirpe silvestre y en mutantes reguladores (deficientes en CAP1, SSK1, SKN7 ó SHO1) relacionados con estrés oxidativo y/o morfogénesis.

FINANCIACIÓN: MEC (BFU2005-02896). Cofinanciación FEDER.

Comunicaciones XVII Reunión Científica SEMA 2008 Sevilla

**LA HIPOMETILACIÓN EXTENSIVA INDUCIDA POR LA 5-AZACITIDINA EN EL GENOMA AFECTA AL CORRECTO FUNCIONAMIENTO DE LA TOPOISOMERASA I *IN VIVO*.**

Orta Vázquez M.L., Mateos S. y Cortés F.

Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Av Reina Mercedes s/n (Sevilla). [ww.grupo.us.es/gcucera](http://ww.grupo.us.es/gcucera).

La metilación del DNA en citosina en las secuencias CpG es un fenómeno vital y finamente regulado en células de mamífero. Este fenómeno es de gran importancia en la decisión de expresar o no expresar determinados genes y está asociado con la modificación de la cromatina desde su estado de eucromatina hasta el de heterocromatina, la cual es transcripcionalmente inactiva.

La topoisomerasa I es una enzima esencial para la replicación y transcripción, que a través de corte y unión de una de las hebras de DNA relaja el estrés torsional que se genera durante dichos procesos. A través de su mecanismo de acción se explica la citotoxicidad de compuestos como la camptotecina (CPT) y sus derivados. Tras el corte de una cadena del DNA, la topo I se queda unida covalentemente al extremo 3', formando el conocido complejo de rotura. La CPT estabiliza este complejo, con el cual colisiona la horquilla de replicación en progreso generándose roturas de cadena doble en el DNA.

El objetivo del trabajo ha consistido en valorar cómo el grado de metilación en el genoma influye en el funcionamiento de la topoisomerasa I, ya que modificaciones en la estructura de la cromatina inducidas por la metilación podrían cambiar su actividad *in vivo*.

Como herramienta para inducir una hipometilación gradual extensiva se ha empleado un análogo de la desoxicitidina, concretamente la 5aza-2'-desoxicitidina, que a través de su incorporación en el genoma crea una situación de hipometilación conforme avanzan las rondas de replicación, lo cual se ha comprobado en este trabajo con el análisis del corte en el DNA de enzimas de restricción sensibles a metilación.

La hipótesis de trabajo se basa en primer lugar en que si existe un fallo en el establecimiento del complejo de rotura cuando el DNA está hipometilado, en presencia de CPT habrá menos roturas que en una cromatina sin modificar. Las roturas del DNA se han analizado mediante ensayo cometa (detección de roturas de cadena simple y de doble cadena) y electroforesis en campo pulsante (detección de roturas de doble cadena, exclusivamente), y nuestros resultados muestran claramente que, efectivamente, lo que sucede es lo cabría esperar de acuerdo con nuestra hipótesis.

Por otra parte, revertiendo los complejos de rotura en presencia de CPT con alta fuerza iónica, se ve que la topo I unida a DNA es menor en un DNA hipometilado, e incluso menor que en un control sin CPT. Por último se ha empleado el *In Vivo* Complex of Enzyme (ICE) Assay para aislar complejos de rotura y se ha corroborado la menor cantidad de los mismos en cromatinas modificadas de este modo.

### Comunicaciones XVII Reunión Científica SEMA 2008 Sevilla

#### **EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA CAPACIDAD GENOTÓXICA DE ANTIHIPERTENSIVOS ALFA BLOQUEANTES. ESTUDIO DE MARCADORES DE GENOTOXICIDAD EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA**

Ramírez JM<sup>1</sup>, Huerta I<sup>1</sup>, Barasoain M<sup>1</sup>, Télez M<sup>1</sup>, Criado B<sup>2</sup>, Ortiz E<sup>3</sup>, González J<sup>4</sup>, Flores P<sup>5</sup>, Arrieta I<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dpto. de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco (UPV/EHU).

<sup>2</sup> Dpto. Genética, Biología Molecular e Inmunología. Cooperativa de Ensino Superior Politecnico e Universitario (CESPU). Porto, Portugal.

<sup>3</sup> Dpto. de Especialidades Médico-Quirúrgicas. Facultad de Medicina. Universidad del País Vasco (UPV/EHU).

<sup>4</sup> Dpto. de Medicina Interna. Facultad de Medicina. Universidad del País Vasco (UPV/EHU)

<sup>5</sup> Dpto. de Enfermería. Escuela de Enfermería. Universidad del País Vasco (UPV/EHU)

De acuerdo con la Sociedad Española de Hipertensión (SEH, 2007) hablamos de esta patología cuando se detectan cifras de presión arterial por encima de un valor que, por consenso, se ha fijado en 140/90 mmHg. En España, su incidencia entre la población general adulta es de aproximadamente un 35 %, llegando hasta el 40 % en edades medias y a más del 60 % en personas mayores de 60 años. Así, afecta a unos 10 millones de individuos adultos y, por tanto, se considera un problema de salud pública.

La hipertensión arterial requiere un tratamiento farmacológico largo y continuado. A la hora de prescribir un fármaco es de vital importancia el conocimiento de la relación beneficio/riesgo. Sin embargo, y de acuerdo con Brambilla and Martelli (2006), para muchos fármacos antihipertensivos los datos publicados no permiten la evaluación del riesgo genotóxico y carcinogénico en humanos.

Investigaciones realizadas por nuestro grupo han evaluado la capacidad genotóxica de fármacos beta bloqueantes y calcio antagonistas (Télez *et al.* 2000; Télez *et al.* 2001). Actualmente estamos analizando la capacidad genotóxica de antihipertensivos alfa bloqueantes. De los 14 fármacos de este grupo que hay en el mercado, sólo se conocen resultados obtenidos en 8, en 6 de los cuales no se incluyen estudios en humanos y en 3 de ellos el número de ensayos es prácticamente inexistente. Entre estos está la Doxazosina, que es objeto de este análisis.

El estudio se ha realizado antes del inicio del tratamiento, a los tres y los doce meses del tratamiento con el antihipertensivo. Hemos analizado la frecuencia de aberraciones cromosómicas (CA), intercambios entre cromátidas hermanas (SCE) y micronúcleos (MN) a partir de los datos obtenidos en cultivos de linfocitos de sangre periférica.

Los resultados obtenidos muestran:

- Un incremento de CAs a los doce meses de tratamiento y unas frecuencias similares antes del inicio y a los tres meses. La localización cromosómica de las aberraciones ha señalado la implicación de los sitios frágiles 1p21, 2p24 y 5q31, 3 loci cromosómicos asociados con la hipertensión (Tomaszewski *et al.* 2002; Angius *et al.* 2002; Collaku *et al.* 2004).
- Un incremento de SCEs a los tres meses y unas frecuencias similares antes del inicio y después de un año de tratamiento.
- Un aumento progresivo de la frecuencia de MN a lo largo del tratamiento.

Comunicaciones XVII Reunión Científica SEMA 2008 Sevilla

**PROTEÍNAS DE PECES PLANOS CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS DE EXPRESIÓN EN RESPUESTA A INFECCIONES MICROBIANAS Y A CONTAMINANTES**

Chicano-Gálvez E, Alhama-Carmona J, López-Barea J.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Campus de Rabanales. Universidad de Córdoba, España

En los últimos años, el cultivo del lenguado ha tenido gran desarrollo como alternativa para la diversificación de especies disponibles en el mercado mediante acuicultura. Parracho y acedía son dos serias opciones para conseguir una más amplia oferta en la piscicultura andaluza. La limitación más grave del cultivo de peces planos es la dificultad para hacer un diagnóstico precoz de situaciones sanitarias adversas, que pueden causar graves mortandades en las explotaciones. El conocimiento de su respuesta a situaciones patológicas y contaminantes modelo permitirá competir en condiciones ventajosas en los mercados.

En éste trabajo se trataron individuos juveniles de lenguado, parracho y acedía con poli I:C y lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*, como modelos de infecciones víricas y bacterianas, respectivamente. Además, la presencia de contaminantes en agua o alimento genera estrés oxidativo que afecta al crecimiento, reproducción, resistencia a enfermedades y supervivencia de los peces, y a los consumidores. Por ello, se estudió también la respuesta al sulfato de cobre, frecuentemente usado en acuicultura para el tratamiento de ectoparásitos, y que genera especies reactivas de oxígeno (EROs).

Las muestras de animales expuestos a dichos tratamientos a distintos tiempos se analizaron por electroforesis bidimensional en geles de 18 cm de ancho y rango de pH 4-7. Los geles resolvían unas 2000 proteínas, cuya expresión diferencial respecto de sus controles se analizó tras digitalizar los geles y su análisis de imagen. La aproximación proteómica empleada en nuestro estudio ha permitido detectar cambios en el proteoma hepático de peces expuestos, que se aprecian en 121 y 196 proteínas agrupadas en 9 PES distintas en lenguado y parracho, respectivamente, y 219 proteínas agrupadas en 6 PES diferentes en acedía. Estos patrones de expresión proteica diferencial pueden ser utilizados como método de diagnosis de posibles enfermedades en una población.

Además, la identificación de proteínas alteradas en respuesta a los distintos tratamientos podría permitir diseñar métodos de diagnóstico precoz de enfermedades y desarrollar vacunas. Por ello, se llevó a cabo la secuenciación e identificación de proteínas pertenecientes a las PES anteriormente citadas mediante distintas herramientas bioinformáticas. SE han identificado numerosas proteínas, cuyo significado biológico se discutirá en la presentación. Además, con estas proteínas se podría llegar a desarrollar posibles ensayos bioquímicos aún más específicos que permitan un análisis rápido y fiable del estado sanitario de los cultivos extensivos en piscifactoría.

**Financiación: Proyecto Excelencia Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía, AGR00516**

Comunicaciones XVII Reunión Científica SEMA 2008 Sevilla

**ESTUDIOS METAPROTEÓMICOS EN SUELOS DEL ESTERO DE DOMINGO RUBIO**

Santos E<sup>1</sup>, Chicano-Galvez E<sup>1</sup>, Alhama J<sup>1</sup>, Fernández-Caliani JC<sup>2</sup>,  
Gómez-Ariza JL<sup>3</sup>, López-Barea J<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Depto Bioquímica y Biología Molecular, E. S. Ochoa, Campus Rabanales, Univ. Córdoba,  
14071 Córdoba, España

<sup>2</sup>Depto de Geología, Facultad de Ciencias Experimentales, Univ. Huelva, 21007 Huelva,  
España

<sup>3</sup>Depto Química y CC de los Materiales, Facultad de Ciencias Experimentales, Univ. Huelva,  
21007 Huelva, España

En el pasado geológico de la Tierra, los microorganismos han tenido papeles primarios al formar las condiciones ambientales que existen hoy, siendo los agentes de la biogeoquímica, los ciclos del alimento y degradación de los residuos naturales y antropogénicos del planeta. La Metagenómica es la ordenación, montaje y anotación directos de DNAs de comunidades microbianas. Aunque esta aproximación experimental está proporcionando información valiosa, la función ecológica exacta que predicen las secuencias identificadas a nivel metagenómico es casi imposible de establecer sin saber qué proteínas se sintetizan en condiciones específicas. Muchas reacciones importantes en el suelo están catalizadas por enzimas microbianas que aseguran la homeostasis planetaria. Esto se puede estudiar mediante una metodología aún mas reciente, la Metaproteómica, análisis proteómico de comunidades microbianas mezcladas. Estos estudios se basan en separación de las proteínas presentes en suelos o aguas por 2D-PAGE, seguida de su identificación mediante su secuenciación *de novo* (LC-ESI-MS/MS).

Con otros 8 grupos del Plan Andaluz de Investigación, estamos estudiando la contaminación del Estero de Domingo Rubio, un subsistema de la Ría de Huelva muy contaminado por hidrocarburos y vertidos industriales, minerales piríticos y plaguicidas. Tales estudios se realizan en el marco de un Proyecto de Investigación de Excelencia financiado por la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (J. Andalucía). A pesar de la dificultad de analizar proteínas presentes en una matriz tan compleja como el suelo, cargada de sales y ácidos húmicos, y tras hacer numerosos intentos para llevar a cabo su limpieza hemos conseguido optimizar un protocolo que permite la extracción de proteínas de suelos y la separación con gran resolución de hasta 2500 proteínas en geles de 18 cm por IEF en gradientes entre pH 4-7.

Esta aproximación metaproteómica se ha aplicado en tres tipos de suelos del Estero de Domingo Rubio, un suelo control escasamente contaminado situado bajo el Campus de la Rábida, y otros tres de la margen contraria del Estero, contaminados por metales del río Tinto, vertidos de la Petroquímica, y plaguicidas agrícolas, respectivamente. Al comparar los tres tipos de suelos entre sí y con el de referencia hemos identificado numerosas proteínas que muestran cambios significativos de expresión. También crecimos en medio rico comunidades microbianas del suelo control que fueron expuestas a dos contaminantes modelo, fenol y Cr(VI), para extraer las proteínas de los microorganismos expuestos y realizar análisis metaproteómicos. Tras ambos tipos de aproximaciones, *in situ* e *in vivo*, hemos identificado muchas proteínas de expresión significativamente alterada. Muchas están relacionadas con el estrés oxidativo provocado por los metales y compuestos orgánicos que contaminan la zona.

**Financiación: Proyecto Excelencia CICYE-00523.**

Comunicaciones XVII Reunión Científica SEMA 2008 Sevilla

**IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERVIENEN EN UNA RUTA DE  
DESMETILACIÓN ACTIVA DE ADN EN *ARABIDOPSIS THALIANA***

Martínez-Macías MJ, Ponferrada-Marín MI, Morales-Ruiz MT, Roldán-Arjona MT, Ariza RR.  
Departamento de Genética, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Gregor  
Mendel, 1ª Planta, 14071- Córdoba

ROS1 (REPRESSOR OF SILENCING 1) es una ADN glicosilasa bifuncional que activa la expresión de genes silenciados en *Arabidopsis thaliana*, iniciando el borrado de 5-metilcitosina (5-meC) mediante un mecanismo análogo a la reparación por escisión de bases (BER). ROS1 es una ADN glicosilasa/liasa, que cataliza la rotura del enlace N-glicosídico que une la 5-meC al esqueleto azúcar-fosfato, creando un sitio abásico. La reacción transcurre mediante una  $\beta$ -eliminación que genera un residuo de aldehído  $\alpha$ ,  $\beta$ - insaturado, seguida de una  $\delta$ -eliminación que libera dicho aldehído y deja un grupo 3'-fosfato en el lado 5' de la incisión. Este grupo ha de ser procesado para generar un extremo 3'-OH adecuado para que una ADN polimerasa inserte una citosina no metilada.

Nuestro objetivo es la identificación de proteínas que intervienen con posterioridad a ROS1 en esta ruta de desmetilación activa. En células de mamífero la proteína XRCC1 interacciona con varias proteínas de BER, coordinando los diferentes pasos de la reparación. Nuestra hipótesis es que AtXRCC1 (el ortólogo en *Arabidopsis* de XRCC1) podría coordinar diferentes pasos de la ruta de activación epigenética iniciada por ROS1, mediante interacciones proteína-proteína. Por otra parte, en mamíferos el extremo 3'- fosfato generado tras una  $\beta$ , $\delta$ -eliminación es convertido en un grupo 3'OH por una polinucleótido quinasa 3' fosfatasa (PNKP) El ortólogo de PNKP en *Arabidopsis* es AtZDP, lo que la convierte en un buen candidato para procesar el grupo 3'-fosfato generado tras la escisión de 5-meC catalizada por ROS1.

Para explorar las posibles interacciones entre ROS1 y AtXRCC1/AtZDP hemos purificado distintas versiones recombinantes de estas tres proteínas. En primer lugar hemos usado proteínas ROS1 y AtXRCC1 puras para determinar mediante ensayos de "pull-down" si ambas son capaces de interactuar *in vitro*. La proteína de fusión His-ROS1 se unió a una columna de níquel-agarosa y se incubó en presencia de MBP (Maltose Binding Protein) o de una fusión MBP-AtXRCC1. La proteína ROS1 unida a la columna retuvo específicamente MBP-AtXRCC1 pero no MBP. También usamos MBP-AtXRCC1 unida a una columna de amilosa para demostrar que retiene específicamente la proteína His-ROS1. Mediante el empleo de diferentes fragmentos de ROS1 purificados hemos podido determinar que la región de ROS1 responsable de su interacción con AtXRCC1 se encuentra fuera de su dominio catalítico, en los primeros 522 aminoácidos de la región amino-terminal de la proteína. Mediante ensayos de pull-down análogos también hemos demostrado que AtZPD interacciona *in vitro* con ROS1. En la actualidad, estamos examinando mediante ensayos de doble híbrido en levadura si las interacciones ROS1-AtXRCC1 y ROS1-AtZDP también tienen lugar *in vivo*. La identificación de proteínas que actúan con posterioridad a ROS1 en la desmetilación de ADN permitirá avanzar en la comprensión de esta ruta de control epigenético.

**ESTUDIO DEL DAÑO GENÉTICO EN PAREJAS DE MADRES E HIJOS MEDIANTE  
EL ENSAYO DEL COMETA**

Zúñiga-Venegas L., Creus A., Marcos. R.

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

El ensayo del cometa es una técnica ampliamente utilizada en los estudios de genotoxicidad principalmente por su sensibilidad, su rapidez y su bajo coste. Consiste principalmente en la medición de roturas en el DNA de células individuales, por lo que su fácil aplicación en linfocitos humanos la hace ser una de las técnicas mas empleadas en estudios de biomonitorización. Además, gracias a la inclusión de una etapa de digestión del DNA con endonucleasas (marcador específico de daño oxidativo) después de la lisis, el ensayo permite también identificar bases oxidadas. Con el objeto de establecer relaciones entre los niveles de daño genético observados en parejas de madres e hijos (sangre periférica y de cordón umbilical, respectivamente), este estudio ha evaluado el daño oxidativo en 27 parejas mediante la versión alcalina del ensayo del cometa utilizando, además, dos endonucleasas: formamidopirimidinana glicosilasa (Fpg) que detecta purinas oxidadas y endonucleasa III (EndoIII) que detecta pirimidinas oxidadas.

Los resultados obtenidos muestran una buena asociación entre el daño observado en madres y en sus hijos; siendo esta asociación significativa tanto para los niveles de daño basal, como para los niveles de purinas oxidadas. Los incrementos de daño oxidativo inducido por ambas enzimas, respecto a sus respectivos daños basales, muestran ser significativos en hijos y solamente para la enzima Fpg, en madres. Como resumen de este trabajo, el análisis de los resultados sugiere que el nivel de daño oxidativo en las madres es significativamente mayor que el de los hijos.

Comunicaciones XVII Reunión Científica SEMA 2008 Sevilla

**EVALUACIÓN DEL DAÑO GENÓMICO EN PACIENTES CON DIFERENTES NIVELES DE INSUFICIENCIA RENAL Y SU RELACIÓN CON FACTORES BIOQUÍMICOS Y HÁBITOS.**

Stoyanova E<sup>1</sup>, El-Yamani N<sup>1</sup>., Coll E<sup>2</sup>., Marcos R<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra; <sup>2</sup>Fundació Puigvert, Barcelona. España.

Los pacientes con insuficiencia renal crónica sometidos a tratamiento de hemodiálisis y los pacientes pre-diálisis representan una población de alto riesgo con incidencia elevada de patologías cardiovasculares, envejecimiento prematuro, incidencia elevada de patología cancerosa y reducción en la capacidad de reparar el DNA. Esto se observa tanto en pacientes sometidos a tratamiento de hemodiálisis, como en pacientes pre-diálisis (que presentan insuficiencia renal pero todavía no han empezado el tratamiento). Además, también se observa un aumento de la inestabilidad genómica y niveles elevados de anomalías cromosómicas estructurales y de intercambios entre cromátidas hermanas. Se presume que este aumento de inestabilidad genómica puede ser debido a la acumulación de sustancias genotóxicas en el dialisato o en el plasma de estos pacientes. Estas sustancias pueden inducir daño en el DNA y también pueden ser la causa de la alta incidencia de cáncer.

El objetivo de este trabajo ha sido la evaluación del daño genotóxico en linfocitos de sangre periférica de estos pacientes y analizar posibles correlaciones de este daño con las diferentes patologías, así como con distintas sustancias plasmáticas que se encuentran elevadas en la uremia (marcadores de inflamación, marcadores de estrés oxidativo, etc.)

En este estudio han participado 78 pacientes en hemodiálisis (HD), de  $61 \pm 13$  años de edad con un tiempo medio en HD de 37 meses y, además, 50 pacientes de pre-diálisis y 50 controles sanos. El nivel de daño genético se ha evaluado en linfocitos de sangre periférica mediante la versión alcalina del ensayo del cometa, utilizando las enzimas específicas de reparación: endonucleasa III y formamidopirimidina glicosilasa, para detectar la posible inducción de daño oxidativo. Los dos parámetros que hemos utilizados para evaluar el daño son el porcentaje de DNA en la cola y el OTM (Olive tail moment). El análisis estadístico de los resultados muestra correlaciones del daño genético observado con algunos parámetros como el tiempo de tratamiento en HD, el grado de uremia y parámetros clínicos-analíticos. Actualmente en este estudio de biomonitorización se sigue evaluando el daño en los pacientes pre-diálisis y en los controles sanos.

**ESTUDIO SOBRE EL RIESGO GENOTÓXICO DE SUBPRODUCTOS DE LA CLORACIÓN (CBPs) EN PISCINAS – RESULTADOS PRELIMINARES.**

Liviac D.<sup>1</sup>, Marcos R.<sup>1</sup>, Creus A.<sup>1</sup>, Grimalt J.<sup>2</sup>, Fernández P.<sup>2</sup>, Kogevinas M.<sup>3</sup>, Villanueva C.<sup>3</sup>, Font L.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, <sup>2</sup>IQA-CSIC.

<sup>3</sup>CREAL, España.

Toda agua destinada a consumo humano tiene que ser desinfectada químicamente antes de su distribución, esta desinfección consigue disminuir los agentes patógenos que en algún momento causaron grandes epidemias. Sin embargo, esta medida de precaución provoca la producción de compuestos químicos (los subproductos de la desinfección), los cuales son objeto de creciente interés debido a los datos que se poseen sobre su potencialidad genotóxica. Además, la exposición a estos compuestos, a través del agua de consumo, es crónica lo que es un factor de mayor riesgo.

Otra fuente de exposición a los CBPs es la derivada de las actividades que se desarrollan en las piscinas, fundamentalmente por inhalación y a través de la epidermis. Al ser de uso público, los niveles de cloración a los que se somete el agua de las piscinas, son mucho mayores que en el agua de consumo y, además, hay que tener en cuenta que el agua que en ellas se encuentra recircula por periodos largos de tiempo, tras sucesivas cloraciones, lo que supone la formación de una mayor cantidad de CBPs, en comparación al agua de consumo.

El objetivo del estudio ha sido evaluar el efecto genotóxico de la exposición a estos compuestos presentes en el agua de piscina en 50 voluntarios; de los cuales se obtuvieron muestras de sangre antes y después de nadar por un tiempo determinado. Los resultados iniciales no parecen indicar la inducción de efectos genotóxicos como resultado de dicha exposición, al ser analizadas las muestras mediante los ensayos de micronúcleos y del cometa. Sin embargo, todavía faltan por realizar análisis estadísticos más complejos, de tipo multivariante, para poder evaluar los efectos reales de esta exposición.

**RELACIÓN ENTRE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA (IRC) Y EL TIEMPO DE TRATAMIENTO CON HEMODIÁLISIS CONVENCIONAL.**

Sandoval B.<sup>1,2</sup>, Coll E.<sup>3</sup>, Stoyanova E.<sup>1</sup>, El-Yamani N.<sup>1</sup>, Herreros A.<sup>3</sup>, Andrés E.<sup>3</sup>, Ballarín J.<sup>3</sup>, Marcos R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grup de Mutagènesi, Unitat de Genètica, Departament de Genètica y Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, España. <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Tamaulipas, México. <sup>3</sup>Unidad de Diálisis, Servicio de Nefrología de la Fundación Puigvert, 08025 Barcelona, España.

La IRC corresponde a la situación clínica derivada de la pérdida de función renal permanente, con carácter progresivo, y se caracteriza principalmente por una alta incidencia de patología cardiovascular y cáncer. Como mecanismos responsables de la IRC se pueden citar la microinflamación, la uremia, así como el incremento de las reacciones del oxígeno y del carbonilo con distintos componentes celulares tales como proteínas, lípidos de membranas y especialmente el DNA. En pacientes afectados de IRC en pre-diálisis o diálisis, se ha citado la existencia de una alta incidencia de daño en el DNA, con respecto a la población sana. El objetivo del presente estudio es evaluar si el mejor control del estado urémico de la sangre por medio de la hemodiálisis convencional disminuye las lesiones en el DNA.

Utilizando como biomarcador de daño genético la frecuencia de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica se han evaluado 70 pacientes, con una media de edad de  $63 \pm 13$  años, y con un tiempo en el programa de hemodiálisis convencional con membranas sintéticas de baja permeabilidad de 2 a 259 meses. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que hay una relación inversamente proporcional entre la frecuencia de micronúcleos y el tiempo en hemodiálisis; sin embargo, esta tendencia no llega a ser significativa. Se asume que la disminución de las lesiones en el DNA es consecuencia de la disminución de los niveles de toxinas observada a lo largo del proceso de hemodiálisis convencional.

Comunicaciones XVII Reunión Científica SEMA 2008 Sevilla

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ADN GLICOSILASA ATUNG Y ANÁLISIS DE SU CONTRIBUCIÓN A LA REPARACIÓN DE URACILO EN *ARABIDOPSIS THALIANA***  
Córdoba-Cañero D., Ariza R.R. y Roldán-Arjona T.

Dpto, Genética (Ftad. Ciencias), Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif. Gregor Mendel (C5), 1ª pl, Ctra Madrid-Cádiz Km.396, C.P. 14071, Córdoba

El uracilo es una lesión frecuente en el ADN que surge como consecuencia de la desaminación espontánea de citosina o mediante incorporación errónea de dUMP en lugar de dTMP durante la replicación. El uracilo procedente de la desaminación de la citosina da lugar a transiciones C:G→T:A si no es reparado antes de la replicación. Para eliminar el uracilo de su ADN las células emplean la ruta de reparación por escisión de bases, iniciada por uracil ADN glicosilasas (UDGs) clasificadas en cuatro familias y presentes en bacterias, arqueobacterias y eucariotas. Aunque se han descrito UDGs en sistemas microbianos y animales, aún no se han identificado y caracterizado en plantas. En este trabajo hemos caracterizado bioquímicamente AtUNG, una uracil ADN glicosilasa de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. AtUNG pertenece a la familia 1 de UDGs, cuyo arquetipo es la enzima Ung de *E. coli*. AtUNG se expresó como proteína recombinante en *Escherichia coli* y se purificó hasta homogeneidad mediante cromatografía de intercambio iónico y de afinidad. AtUNG es una uracil ADN glicosilasa monofuncional que elimina uracilo en sustratos mono y bi-catenarios. La enzima exhibe una mayor eficiencia en pares U:G (procedentes de la desaminación de la citosina) que en pares U:A (procedentes de la incorporación errónea de dUMP), y su eficacia depende de la secuencia que flanquea la lesión. La actividad de AtUNG se ve fuertemente inhibida en presencia de UGI (Uracil DNA Glycosylase Inhibitor), un inhibidor genérico de las UDGs de la Familia 1. Esto concuerda con la presencia en AtUNG de residuos clave para el reconocimiento y la catálisis conservados en las uracil ADN-glicosilasas de esta familia. Para determinar la importancia funcional de AtUNG en la planta hemos analizado la capacidad reparadora de uracilo de extractos celulares procedentes de plantas silvestres y de plantas mutantes *atung*<sup>-/-</sup>. Mientras que los extractos silvestres repararon el uracilo presente en el ADN con la misma especificidad que la proteína AtUNG recombinante, los extractos procedentes de plantas *atung*<sup>-/-</sup> no mostraron ninguna actividad uracil DNA glicosilasa detectable. Esto sugiere que AtUNG es la principal, si no la única, enzima reparadora de uracilo en *Arabidopsis*. Las plantas mutantes *atung*<sup>-/-</sup> no muestran alteraciones fenotípicas obvias, al menos en las condiciones de crecimiento utilizadas en este estudio. Nuestro objetivo a medio plazo es analizar la posible acumulación de uracilo y/o mutaciones a lo largo de sucesivas generaciones en las plantas mutantes.

Comunicaciones XVII Reunión Científica SEMA 2008 Sevilla

**ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO E INTERACCION CON EL ADN DE LA 5meC ADN  
GLICOSILASA ROS1**

Ponferrada-Marín, M.I., Martínez-Macías, M.I., Morales-Ruiz, M.T., Roldán Arjona, M.T.,  
Ariza R.R.

Departamento de Genética, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales., Edif Gregor  
Mendel, Primera Planta, 14071-Córdoba

La metilación del ADN es un proceso epigenético que participa en la regulación de la expresión génica bloqueando la unión de factores de transcripción y propiciando la estructura "cerrada" de la cromatina. En mamíferos la metilación de ADN se restringe a secuencias CpG, pero en plantas además existen además niveles de metilación apreciables en el contexto simétrico CpNpG y en contextos asimétricos. La metilación de ADN es un proceso reversible. En Arabidopsis el gen REPRESSOR OF SILENCING1 (ROS1) codifica una ADN glicosilasa que inicia el borrado de 5-metilcitosina (5-meC) mediante un mecanismo análogo a la reparación por excisión de bases. Sin embargo, las propiedades estructurales de ROS1 que explican su capacidad para reconocer y escindir residuos de 5-meC se desconocen.

Mediante ensayos de incisión con oligonucleótidos sintéticos hemos demostrado que ROS1 es una ADN glicosilasa/liasa que cataliza la eliminación de 5-meC apareada con guanina, adenina, timina o citosina. ROS1 también elimina timina del ADN, pero sólo cuando se encuentra apareada erróneamente con guanina. Esto sugiere que puede procesar el producto de la desaminación espontánea de la 5-meC pero no otros tipos de apareamientos erróneos. En sustratos simétricos con una 5-meC en una secuencia CpG central, ROS1 necesita al menos 5 pares de bases a cada lado para procesarla de forma efectiva. No obstante, empleando sustratos en los que la secuencia CpG no ocupa la posición central hemos encontrado que ROS1 necesita más espacio en el lado 5' que en el lado 3'. Estos resultados sugieren que el contacto de ROS1 con su sustrato no se lleva a cabo de forma simétrica con respecto a la secuencia diana. Por otra parte, ensayos de actividad frente a un sustrato con tres secuencias CpG metiladas demuestran que ROS1 actúa de forma procesiva, escindiendo varias 5-meC sin disociarse del ADN.

Mediante el análisis de la actividad enzimática de diversos dominios estructurales de ROS1 y de sus versiones mutantes hemos demostrado que tanto el dominio ADN glicosilasa como la región carboxilo-terminal de la proteína son necesarios para su actividad 5 metilcitosina ADN glicosilasa. En ensayos de retardo en gel (band-shift) ROS1 se une al ADN metilado y ADN sin metilar con la misma afinidad. En esta unión desempeñan un papel esencial los 230 aminoácidos de su extremo amino terminal, y los 313 aminoácidos de su extremo carboxilo terminal. Nuestra hipótesis actual es que, al igual que en el resto de ADN glicosilasas, el dominio glicosilasa de ROS1 se une al ADN por el surco menor, mientras que el dominio carboxi-terminal (y posiblemente el amino-terminal) contactan el ADN a lo largo del surco mayor. En este modelo la proteína interaccionaría fuertemente con el ADN través de múltiples regiones, lo que explicaría su contacto asimétrico con el sustrato y el carácter procesivo de su actividad enzimática

**CORRELACIÓN ENTRE LOS ADUCTOS INDUCIDOS POR CISPLATINO Y SUS  
CONSECUENCIAS GENÉTICAS EN DROSOPHILA *IN VIVO*: INFLUENCIA DEL  
SISTEMA NER.**

Sierra, L.M.<sup>1</sup>, García-Sar, D.<sup>2</sup>, Aguado, L.<sup>1</sup>, Montes-Bayón, M.<sup>2</sup>, Blanco, E.<sup>2</sup>, Sanz-Medel, A.<sup>2</sup>, Comendador, M.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dpto. Biología Funcional. Área de Genética, e IUPOA. Universidad de Oviedo.

<sup>2</sup> Dpto. Química Física y Analítica. Universidad de Oviedo.

Detectar y cuantificar aductos inducidos por agentes antitumorales como cisplatino puede ser una buena herramienta en la predicción de la respuesta a la quimioterapia si se puede establecer una relación entre los niveles de aductos y los daños que provocan en el DNA.

Por esta razón, el método de detección de enlaces cruzados G-G inducidos por cisplatino, mediante HPLC ligada a IPC-MS se ha implementado y se ha evaluado en células somáticas de *Drosophila in vivo*, relacionando los niveles de aductos con la respuesta que producen en el ensayo del cometa, analizando neuroblastos, y en el ensayo SMART de ojos.

Los resultados obtenidos muestran que existe una correlación directa entre estos parámetros.

Además, se ha repetido el análisis en ausencia del sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER), usando la línea mutante *mus201*, para determinar la sensibilidad del método de detección.

En este caso, los resultados de los ensayos genéticos no parecen tener relación con los niveles de aductos detectados, y no se ha encontrado aún una explicación a este resultado.

Comunicaciones XVII Reunión Científica SEMA 2008 Sevilla

**Newly Synthesized Benzothiazoles Are More Effective On Catalytic Role Of DNA Topoisomerase II Than Topoisomerase I.**

Cigdem Kaplan<sup>\*a</sup>, Egemen Foto<sup>a</sup>, Betul Tekiner-Gulbas<sup>b</sup>, Ozlem Temiz<sup>b</sup>, Ilkay Yildiz<sup>b</sup>, Esin Aki-Sener<sup>b</sup>, Ismail Yalcin<sup>b</sup>, and Nuran Diril<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Molecular Biology Section, Faculty of Science, University of Hacettepe, Ankara, Beytepe, Turkey

<sup>b</sup> Pharmaceutical Chemistry Dept Faculty of Pharmacy, Ankara University, Ankara, Tandogan, Turkey

DNA topoisomerase are enzymes act on DNA topology. They have been used as important targets for cancer therapy in a long time for clinical chemotherapy. Unfortunately, it has been reported that the cancer cells have been developing resistance to the present drugs which act on DNA topoisomerases. In the last few years, benzazole and related heterocyclic derivatives benzoxazoles and benzothiazoles, also benzazines were determined as topoisomerase I, HIV-I reverse transcriptase and potent topoisomerase II inhibitors. These kinds of compounds were studied extensively for their antitumor and antimicrobial activities. Owing to having low toxic effects, benzazole derivatives have been preferred to be compounds possess chemotherapeutic activity for the men. For this reason, the 18 new benzathiazole derivatives were synthesized at Ankara University, Faculty of Pharmacy. First aim of the research is that screening of inhibitory effects of 18 newly synthesized benzothiazole derivatives on catalytic roles of eukaryotic DNA topoisomerase I and II by relaxation assay. We used 6 main compounds and their 6 tosylated and 6 flouoroborated derivatives. We found that the compounds have a little affect on calf thymus DNA topoisomerase I under the doses of 10 mM, but contrary most of them are highly effective on recombinant human DNA topoisomerase II  $\alpha$  at doses in  $\mu$ M range. Also, we realize that especially the compounds carrying flouoroborate functional group are most effective in all for DNA topoisomerase II. For DNA topoisomerase I, main compounds did not show any inhibition activity, but two of tosylated compounds (BM3, BM6) and five flouoroborated compounds (BM1HBF, BM3HBF, BM4HBF, BM6HBF and BM7HBF) were found inhibitors of topo I at doses between 2-10 mM. BM7HBF has been pointed most active compound on topo I. For DNA topoisomerase II, all of the benzothiazoles had shown inhibitor activity in 0,01  $\mu$ M- 10 mM dose range. Most effective compound is also found BM7HBF and then respectively BM3, BM1HBF, BM6HBF, BM4HBF, BM3HBF, M9, M6, M7, M2, BM4, BM6, M10, BM2HBF, BM7, M15, BM1, BM2.

**CARACTERIZACIÓN DEL FÁRMACO ANTITUMORAL MERBARONA, UN INHIBIDOR DE LA ENZIMA TOPOISOMERASA II DE ADN.**

Pastor N.<sup>1</sup>, Campanella C.<sup>2</sup>, Kaplan C.<sup>3</sup>, Mateos S.<sup>1</sup>, Cortés F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

<sup>2</sup>Human Anatomy Section, Department of Experimental Medicine, University of Palermo, Italy

<sup>3</sup>Molecular Biology Section, Faculty of Science, University of Hacettepe, Ankara, Beytepe, Turkey

Las topoisomerasas de ADN de tipo II (topo II) son enzimas nucleares que participan en un gran número de procesos fundamentales relacionados con el ADN. Éstas regulan el grado de superenrollamiento de la molécula de ADN y eliminan lazos y nudos del material genético, ya que son capaces de transportar una doble hélice intacta a través de una rotura transitoria generada en la otra molécula de ADN. Dada la importancia de la enzima para la célula, no resulta sorprendente que la topo II sea el principal blanco de una moderna generación de agentes anticancerígenos de probada eficacia en el tratamiento de una variedad de tumores. Todos los agentes que interfieren con la topo II son capaces de interferir con al menos un paso de su ciclo catalítico. Agentes capaces de estabilizar el complejo covalente ADN-topo II (conocido como *complejo de rotura*), son conocidos en general como venenos de topo II, mientras que otros agentes que actúan en otros pasos del ciclo catalítico de esta enzima se les consideran propiamente como inhibidores catalíticos. Éstos últimos engloban a un grupo químicamente heterogéneo de compuestos que podrían interferir con la unión entre el ADN y la enzima, estabilizar el complejo no covalente ADN-topo II (entre los que se encuentra la **merbarona**), o impedir la unión del ATP a la enzima, necesaria para que la enzima lleve a cabo la fase final de su mecanismo de acción.

Nosotros hemos elegido la **merbarona** para nuestro trabajo, ya que ha existido cierta controversia en cuanto a su mecanismo y efectos desde que fuese ensayada en el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de Estados Unidos y hemos llevado a cabo distintos experimentos con la finalidad de examinar la capacidad de inhibición del compuesto sobre la topo II y sus posibles consecuencias sobre la célula a nivel de crecimiento, por ejemplo. La inhibición de la topo II con **merbarona**, nos ha demostrado la función de la enzima en la segregación cromosómica, al provocar el fármaco la aparición de células endorreduplicadas.

De nuestros experimentos se puede concluir también que la merbarona no es un inhibidor catalítico limpio ya que hemos observado cierto daño en el ADN, como se ha comprobado mediante el *ensayo del cometa*.

**CORRELACIÓN ENTRE EL ESTADO DE HIPOMETILACIÓN DEL ADN EN LA LÍNEA EM9 Y SUS ELEVADOS INDICES BASALES DE ENDORREDUPLICACIÓN.**

Mateos<sup>a</sup> S., Domínguez<sup>a</sup> I., Cantero<sup>a</sup> G., Pastor<sup>a</sup> N., Campanella<sup>b</sup> C, Cortés<sup>a</sup> F.

<sup>a</sup>Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, España

<sup>b</sup>Departamento de Medicina Experimental, Sección de Anatomía Humana, Universidad de Palermo, Italia

En este trabajo hemos utilizado dos líneas celulares de hamster Chino; la línea parental AA8 y un mutante derivado de la misma (EM9) deficiente en reparación por escisión de bases que porta una mutación en el gen *XRCC1*. Esta variante celular, entre otras características, presenta en comparación con la línea parental una alta frecuencia basal tanto de intercambios entre cromátidas hermanas como de endorreduplicación. En una publicación anterior (Mutat. Res 578 (2005) 33-42) mostrábamos que en la línea parental AA8 era posible inducir endorreduplicación de una manera dosis-dependiente después de tratar sus células con el nucleósido análogo de la citidina 5-azacitidina (5-azaC), el cual actúa como un poderoso agente hipometilante tras su incorporación al ADN. El objetivo que nos hemos planteado ahora ha sido conocer si el alto índice basal de endorreduplicación que presenta el mutante EM9 está relacionado de manera paralela con un menor nivel de metilación de su ADN, comparado con la línea parental. Experimentos diseñados para cuantificar el nivel de metilación del ADN en ambas líneas celulares mediante el ensayo que utiliza las enzimas de restricción *Hpa II/Msp I* muestran de manera significativa un menor contenido en desoximetilcitosina en el ADN de la línea mutante. Por otro lado, la remetilación de dicho ADN con el agente metilante budesonide redujo significativamente la frecuencia basal de endorreduplicación en relación a los valores controles. Basados en la correlación observada entre los niveles de metilación del ADN y las frecuencias de endorreduplicación, proponemos la hipótesis de que el estado de hipometilación del ADN de la línea celular EM9 es probablemente el responsable de los altos índices basales de endorreduplicación que presenta la línea.

**EFFECTOS CITOTÓXICOS Y GENOTÓXICOS DEL AGENTE HIPOMETILANTE  
ZEBULARINE EN LA LÍNEA CELULAR AA8**

Domínguez I., Mateos S., Pastor N., Cantero G., Cortés F.

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

Las células tumorales tienden a presentar hipermetilación en genes supresores de tumores, y consecuentemente silenciamiento de los mismos.

Los agentes que inhiben la metilación de citosina y reactivan genes silenciados mejor caracterizados y más ampliamente usados son los análogos de nucleósidos 5-azacitidina (azacitidina), cuyo uso ha sido recientemente aprobado por la FDA, y la 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina). Sin embargo la toxicidad e inestabilidad en solución de estos compuestos han complicado su uso clínico.

El zebularine (2(1H)-pyrimidinone riboside) es un inhibidor de metilación del ADN recientemente identificado, que ha demostrado su actividad en células de mamífero tanto *in vitro* como *in vivo* al reactivar el gen *p16*. Aunque no es tan potente como la azacitidina o la decitabina, tiene ventajas como posible agente terapéutico administrado oralmente debido a su estabilidad química y baja citotoxicidad. Se ha descrito también un efecto mayor del zebularine en células cancerosas que no cancerosas, lo cual es siempre objetivo fundamental en cualquier posible uso terapéutico.

En este trabajo se presentan los resultados sobre los efectos citotóxicos y genotóxicos del zebularine en la línea celular AA8, que pueden contribuir a establecer su aplicación potencial.

En relación a los efectos citotóxicos, el ensayo de inhibición del crecimiento mediante el test de sulforrodamina B (SRB), mostró unos efectos similares a los producidos por otros análogos de nucleósidos en esta línea celular. El ensayo de supervivencia indicó también que el zebularine produce efectos citotóxicos sobre células no cancerosas. Para estudiar los efectos genotóxicos de este compuesto, se realizaron los ensayos del cometa y de aberraciones cromosómicas. Ambos ensayos indicaron que el zebularine produce daño moderado en el ADN, aunque sólo detectable tras un cierto tiempo de recuperación después de administrar el tratamiento.

**OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO DEL COMETA MEDIANTE EL USO DEL GELBOND™ PARA 48 MUESTRAS**

Zúñiga-Venegas L., Amengual D., Creus A., Marcos R.

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

El ensayo del cometa se ha convertido en una de las técnicas mas ampliamente utilizadas para la evaluación de daño genético, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, y en estudios de biomonitorización. Con el objeto de incrementar la capacidad del proceso y del análisis de las muestras, se ha desarrollado un método que permite aumentar el número de geles sometidos a una misma electroforesis. Este método abandona los portaobjetos de vidrio y, en su sustitución, utiliza unos geles especiales (Gelbond™) que permiten una adherencia total de las capas de agarosa, facilitando enormemente su manipulación. En nuestro laboratorio se ha puesto a punto este método con el que hemos logrado aumentar el número de muestras de 18 (18 portaobjetos) a 48 (1 Gelbond), lo que supone una disminución en el material a manipular, en el tiempo empleado en la realización de la técnica, y en la cantidad de muestra y de material.

En esta presentación se expone la metodología utilizada, así como los resultados obtenidos en comparación con el protocolo estándar. Para esta estandarización hemos utilizado linfocitos aislados de sangre periférica y los hemos expuesto a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno.

Uno de los objetivos futuros que se pretende alcanzar utilizando esta técnica, es el poder llegar a aumentar a 192 la cantidad de muestras que puedan ser sometidas a una misma electroforesis (4 geles simultáneamente) y así poder evaluar también, y al mismo tiempo, el daño oxidativo con la utilización de las endonucleasas formamidopirimidina glicosilasa y endonucleasa III, las cuales detectan pirimidinas y purinas oxidadas, respectivamente, produciendo incisiones en las hebras de DNA.

**EVALUACIÓN GENOTÓXICA DEL CLORURO DE NÍQUEL MEDIANTE LOS ENSAYOS SMART EN ALAS Y COMETA EN *DROSOPHILA MELANOGASTER***

Carmona E.R<sup>1</sup>, Gesheva T<sup>2</sup>., Creus A<sup>1</sup>., Marcos R<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Grup de Mutagenesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, España.

<sup>2</sup>Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

El níquel es un metal pesado bastante abundante en el medio ambiente y que puede estar presente en el agua, suelo, aire, plantas y alimentos. Además, la alta producción de níquel por diversas actividades industriales, como por ejemplo la metalurgia, ha llevado inevitablemente a una contaminación ambiental por estos compuestos, representando una amenaza para la salud humana.

Aunque numerosos estudios han evaluado los efectos tóxicos, genotóxicos y carcinogénicos de diferentes compuestos de níquel, aún no están bien aclarados los mecanismos de acción por los cuales pueden causar genotoxicidad. De esta forma, nuevos estudios que involucren el uso de ensayos de corta duración en eucariotas, y que sean capaces de detectar un amplio rango de eventos mutacionales, son importantes a la hora de conocer y aclarar los efectos del níquel sobre el material genético.

Actualmente, en nuestro grupo de trabajo se está llevando a cabo una evaluación genotóxica de algunos compuestos de níquel utilizando diversos ensayos. En esta comunicación se presentan los resultados que hemos obtenido hasta ahora con los ensayos *in vivo* de mutación y recombinación somáticas (SMART) en alas y del cometa, usando como organismo modelo *D. melanogaster*. Los resultados obtenidos con el cloruro de níquel (NiCl<sub>2</sub>), indican que este compuesto no incrementa significativamente la frecuencia de ninguna de las tres categorías de clones mutantes (sectores sencillos, dobles y grandes), por lo que no presenta actividad genotóxica detectable en este ensayo SMART. En este momento se está realizando la evaluación genotóxica del NiCl<sub>2</sub> con el ensayo del cometa en hemocitos de *D. melanogaster*, para completar nuestra visión de la actividad de este compuesto en *Drosophila*.

**ESTRÉS OXIDATIVO Y MECANISMOS DE GENOTOXICIDAD DEL CROMO Y DEL NIQUEL. ESTUDIO MEDIANTE EL ENSAYO DEL COMETA**

El-Yamani N., Guillamet E., Creus A., Marcos R.

Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España.

La exposición crónica a los compuestos de cromo y níquel se ha asociado a un incremento de la incidencia de cáncer en los individuos expuestos. Estos metales son capaces de una activación potente y selectiva de las vías que producen estrés oxidativo.

En nuestro estudio, hemos investigado la genotoxicidad y los mecanismos de actuación del cromo y del níquel. Respecto al cromo, hemos seleccionado un compuesto hexavalente y otro trivalente; el primero como metal que se utiliza extensamente en la industria, y el segundo reconocido como elemento esencial para la función de la insulina y requerido en el metabolismo normal de los carbohidratos. Respecto al níquel, hemos seleccionado compuestos con valencia II y IV, ambos utilizados en la industria moderna en forma de aleaciones.

Mediante el ensayo del cometa, usando la línea celular linfoblastoide TK6, hemos mostrado que después de un tratamiento con Cr<sup>III</sup> y Cr<sup>VI</sup> a 800 y 1000  $\mu$ M, existe una respuesta positiva dosis-dependiente. La misma respuesta se ha observado con el Ni<sup>II</sup> y el Ni<sup>IV</sup> a diferentes dosis. El análisis estadístico del parámetro OTM, indicativo del nivel de daño genético inducido, muestra que el Cr hexavalente causa un daño genotóxico superior al producido por el Cr trivalente.

El tratamiento adicional con las enzimas de reparación *Fpg* y *Endo III*, revela que el nivel de daño encontrado es más alto que el causado en las células TK6 no tratadas con estas enzimas. En paralelo, un estudio de reparación del daño genético generado por los compuestos metálicos evaluados muestra que las células TK6 reparan eficientemente el daño. Finalmente, y para estudiar el mecanismo modulador de la acción de los metales seleccionados, estos se han ensayado frente a la acción de la radiación gamma. Los resultados preliminares indican que un pretratamiento con 2 Gy aumenta significativamente el daño detectado y alarga el tiempo necesario para repararlo.

### Comunicaciones XVII Reunión Científica SEMA 2008 Sevilla

#### **INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA EN CÉLULAS CHO POR LA MICOTOXINA OCHRATOXINA A.**

Cosimi S.\*, Orta Vazquez M.L.\*\*, Mateos S.\*\*, Cortes F.\*\*

\*Università degli Studi della Tuscia, Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica, Viterbo Italia.

\*\*Universidad de Sevilla, Facultad de Biología, Departamento de Biología Celular.

La Ochratoxina A (OTA) es una micotoxina producida por diferentes especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. Fue aislada por primera vez en 1965, y desde 1970 se ha encontrado en diferentes productos como el café, cereales, legumbres, avellanas, cerveza etc. La International Agency of Research on Cancer (IARC) ha clasificado las ocratoxinas como posibles especies químicas de acción cancerígena para el hombre (Pitt, 2000). Se piensa que la OTA está relacionada con dos patologías renales humanas, la Nefropatía Endémica Balcánica (BEN), y los tumores uroteliales. Ya que el riñón es el órgano diana de la OTA, y es rico en peroxidases, se ha propuesto la implicación de la ruta metabólica oxidativa en el mecanismo de acción de la OTA.

Se ha demostrado que la OTA puede inducir síntesis no programada de DNA, así como intercambios entre cromátidas hermanas, micronúcleos y apoptosis (Follmann *et al* 1995, Donmez-Altuntas *et al* 2003, Stetina & Votava 1986, Horvath *et al* 2002). Se ha descrito la presencia de aductos en el DNA, pero se piensa que pueden ocurrir a través de productos derivados de la toxicidad de la OTA. Sin embargo la toxicidad de este compuesto esta muy acorde con la inducción de estrés oxidativo (Leire A. 2007; Palmas N. 2007).

Nuevas pruebas de la participación del estrés oxidativo y/o la generación de radicales libres vienen de las observaciones *in vitro* (Scaaf *et al* 2002), que demostraron que la OTA causaba un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), una reducción del GSH intracelular, y la producción de 8-oxoguanina en células LLC-PK1 y en células primarias de túbulo proximal de rata.

Hay varios trabajos que relacionan estrés oxidativo con poliploidía (Gorla G. R., 2001), y como el estrés oxidativo es un factor fundamental en la toxicidad de la OTA, nuestro objetivo ha ver si había inducción de poliploidía, así como de células endorreducidas. Para examinar la citotoxicidad y calcular las concentraciones de OTA se ha usado la técnica de la sulforodamina B (SRB), estando el IC 50 entre 15 y 20  $\mu$ M. Dosis cercanas a estas concentraciones se probaron durante tres horas, permitiendo posteriormente 18 horas de recuperación en medio fresco, y los resultados fueron negativos en cuanto a la inducción tanto de endorreducción como de poliploidía.

En una fase posterior se utilizaron concentraciones más altas de OTA (superiores a 200  $\mu$ M). Con estas dosis, se ha podido observar la formación de células poliploides y de aberraciones cromosómicas pero no de un número significativo de células endorreducidas.

También se ha observado la formación de células poliploides mediante citometría de flujo. El análisis mediante el citofluorímetro ha confirmado los resultados de los análisis citogenéticos, ya que la OTA ha sido capaz de inducir un porcentaje significativo de células poliploides. Por otra parte, se ha podido observar asimismo la presencia de células apoptóticas.

Comunicaciones XVII Reunión Científica SEMA 2008 Sevilla  
**HSP60/pro-CASPASE3 COMPLEX PERSIST AFTER OXIDATIVE STRESS IN  
TUMORAL CELLS**

Campanella C<sup>1</sup>, Marino Gammazza<sup>1</sup> A, Ardizzone N<sup>1</sup>, Kaplan C<sup>3</sup>, Pastor N<sup>2</sup>, Orta ML<sup>2</sup>, Peri G<sup>1</sup>, Marasà M<sup>1</sup>, Cappello F<sup>1</sup>, Cortes F<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Human Anatomy Section Department of Experimental Medicine University of Palermo via del Vespro 129, 90127 Palermo - ITALY ph. +39 0916553518 fax +39 0916553580

[www.unipa.it/anatomy](http://www.unipa.it/anatomy)

<sup>2</sup>Departamento de Biología Celular, Universidad de Sevilla, Av. Reina Mercedes 6, 41012 Sevilla. Tel.: +34 954557039 Fax: +34 954610261; [www.grupo.us.es/gcucera](http://www.grupo.us.es/gcucera)

<sup>3</sup>Molecular Biology Section, Department of Biology, Faculty of Science, University of Hacettepe, 06800, Ankara/ Turkey.

The heat shock protein 60KDa (Hsp60) is overexpressed in cancer cells. It is not yet clear what role Hsp60 plays in activation of apoptosis during oxidative stress (OS). The aim of the present study was to investigate the effects of OS on Hsp60 expression in a tumoral cell line, and its molecular interactions with pro-caspase3 and p53. NCI-H292 cells (mucoepidermoid carcinoma cells) were exposed to different concentrations of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for 24 hours. Cell viability was assessed by the Trypan blue and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assays. DNA damage was assessed by the Comet assay and apoptosis was measured using the AnnexinV cytofluorimetric test. Exposure to increasing concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resulted in a reduction of the cell viability, in an increase in DNA damage, and in the appearance of apoptotic cells. The presence and expression of Hsp60, p53, p-C3)and p21 was determined by western blotting and immunocytochemistry before and after OS. Immunocytochemistry and western blotting showed that p-C3 persisted at high levels. The complex between Hsp60 and p-C3 was present before OS and persisted also after it, while the complex between Hsp60 and p53 was always undetectable. Nevertheless, the presence of wild type (wt) p53 was confirmed by RT-PCR and the transcription of p21 after OS suggested p53 activation. We postulate that, although OS induces apoptosis in the NCI-H292 cells, Hsp60 exerts an anti-apoptotic effect, since its interaction with p-C3. Further studies may confirm these data in other cell lines and may address new anticancer strategies based on blocking Hsp60's action.

Comunicaciones XVII Reunión Científica SEMA 2008 Sevilla

**EVALUACIÓN EN COQUINAS DE FANGO (*Scrobicularia plana*) DE LA CONTAMINACIÓN POR METALES EN EL ESTUARIO DEL GUADALQUIVIR: NIVELES DE METALOTIONEÍNAS Y CORRELACIÓN CON OTROS BIOMARCADORES**

Alhama J<sup>a</sup>, Romero-Ruiz A<sup>a</sup>, Blasco J<sup>b</sup>, Gómez-Ariza JL<sup>c</sup>, López-Barea J<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus de Rabanales, Universidad de Córdoba, España

<sup>b</sup>Instituto Andaluz de Ciencias Marinas-CSIC, Campus Río San Pedro, Puerto Real, Cádiz, España

<sup>c</sup>Departamento de Química y Ciencia de los Materiales, Universidad de Huelva, España

En coquinas de fango (*S. plana*) se midieron Metalotioneínas (MTs) y otros biomarcadores para evaluar la contaminación por metales del Estuario del Guadalquivir, zona muy sensible tras el vertido de Aznalcóllar (1998). Las MTs son proteínas (6-8 kDa) con múltiples Cys (20-30%) útiles como biomarcadores, pues aumentan en situaciones de contaminación por metales y de estrés oxidativo. Las MTs se cuantificaron por RP-HPLC con detección fluorescente, tras derivatizar sus grupos -SH con el reactivo fluorescente monobromobimano, en extractos de glándula digestiva calentados a 95 °C 10 min y en muestras sin calentar. Los resultados se han comparado con los obtenidos por Polarografía de Pulso Diferencial, el método más popular de análisis de MTs en moluscos bivalvos, que requiere de un tratamiento térmico previo de la muestras.

El contenido de MTs medido por RP-HPLC-FD en muestras sin calentar fue significativamente mayor que en muestras calentadas y por DPP, lo que sugiere que parte de las MTs desaparecen durante el tratamiento por calor. El papel celular clave de estas proteínas, especialmente en bivalvos expuestos a altas concentraciones de metales, podría explicar los altos niveles de MTs obtenidos (89-199 mg g<sup>-1</sup> proteína; 1,3-3,9 mg g<sup>-1</sup> p fresco). También se estudió las correlaciones entre contenido de MTs, niveles de metales, defensas antioxidativas y daño oxidativo a lípidos. Los niveles de MTs medidos por RP-HPLC-FD en extractos sin calentar se correlacionan mejor con los niveles de metales y de los otros biomarcadores, que los obtenidos en muestras calentadas o por determinados DPP. En relación a los metales, se encontró una correlación positiva muy significativa de MT con Zn, Pb, Ni, Fe y Mn. En relación a los otros biomarcadores, se obtuvo una correlación negativa de las MTs con 6-fosfogluconato deshidrogenasa y glioxalasa II, y una correlación positiva con catalasa y glutatión-S-transferasa. Además de la inducción de las MTs, la inhibición de la glioxalasa II se correlacionaba muy bien con el contenido de metales (Pb, Zn, Cd, Fe y Mn).

En conclusión, la cuantificación de los niveles de MTs totales por RP-HPLC-FD en muestras sin calentar permite evaluar la contaminación por metales con mayor sensibilidad y especificidad que otros métodos bien establecidos. Nuestros resultados sugieren que los metales detectados en la orilla izquierda del Estuario del Guadalquivir no provienen del accidente de la mina de Aznalcóllar, sino que son transportados por el río y se depositan en su orilla cóncava, especialmente cuando la marea alta consigue detener el flujo normal del río.

Alhama et al (2006) *J. Chromatogr. A* 1107, 52-58  
doi:10.1016/j.envpol.2008.02.022

Doñana 2005, CVI-151; FQM-141.

Romero-Ruiz et al (2008) *Environ. Pollut.*,  
**Financiación: CTM2006-08960-CO2;**

Comunicaciones XVII Reunión Científica SEMA 2008 Sevilla

**INTEGRACIÓN DE BIOMARCADORES CONVENCIONALES Y PROTEÓMICOS EN CANGREJO ROJO AMERICANO (*Procambarus clarkii*). EFECTOS *IN VIVO* DE PLAGUICIDAS Y BIOMONITORIZACIÓN DE DOÑANA Y SU ENTORNO**

Vioque-Fernández A<sup>1</sup>, Alves de Almeida E<sup>2</sup>, López-Barea J<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Depto Bioquímica y Biología Molecular, E. S. Ochoa, Campus Rabanales, Univ. Córdoba, 14071 Córdoba, España.

<sup>2</sup>Depto. Química y Medio Ambiente, IBILCE-UNESP, 15054-000, San José de Rio Preto, San Paulo, Brasil.

En el cangrejo rojo americano, *Procambarus clarkii*, se han estudiado los efectos de dos plaguicidas, clorpirifos (organofosforado) y carbaril (carbamato) tras exponerlos durante 2 y 7 días a dos concentraciones, tanto en los niveles de esterasas y biomarcadores convencionales de estrés oxidativo, como sobre la alteración de la expresión de proteínas. Con aproximaciones similares, combinando biomarcadores convencionales y proteómicos, hemos evaluado también la calidad de los ecosistemas acuáticos del Parque Nacional de Doñana (PND) y su entorno. En este estudio hemos realizado 4 campañas de muestreo a lo largo de los años 2003 y 2004 en 2 sitios control, situados dentro del corazón del PND (lucio del Palacio y laguna de Santa Olalla) y 6 sitios problema, a lo largo de los arroyos de la Rocina (Rocina alta y casa Bernabé), el Partido (Partido alto y puente del Ajolí) y los arrozales situados al Este de Doñana junto al arroyo Guadiamar (Villafranco y el Matochal).

Tras separar las proteínas de branquias y tejido nervioso por 2-DE, el análisis de imagen de los respectivos proteomas (>2.000 manchas, pl 4-7 y 14-150 KDa) mostró muchas proteínas con diferencias significativas de intensidad entre los distintos tratamientos. La exposición a clorpirifos alteró 72 proteínas (27 en branquias y 45 en t. nervioso) mientras en presencia de carbaril se alteraron 35 proteínas (18 en branquias y 17 en t. nervioso), siendo en su mayoría sobre-expresiones cuantitativas. Del análisis de 12 biomarcadores convencionales, el clorpirifos inhibió las actividades carboxilesterasa, acetilcolinesterasa, EROD asociada al citocromo P450 y catalasa y bajó los niveles de glutatión oxidado, aunque aumentó la glutatión-S-transferasa citosólica. Los efectos del carbaril en las esterasas fueron menores, pero ambas se recuperaron tras retirar el plaguicida. Además, este plaguicida carbamato aumentó las actividades EROD, glutatión-S-transferasa citosólica y catalasa, pero inhibió la glutatión peroxidasa y disminuyó los niveles de glutatión reducido.

El estudio proteómico en branquias de cangrejos de Doñana mostró diferencias significativas de expresión en 35 proteínas. El análisis del tipo de alteraciones (aumento/disminución) y el estudio cuantitativo de los cambios detectados en cada una de ellas permitió su asignación a 4 patrones de expresión proteica, correspondientes a zonas limpias, y otras poco, moderadamente o muy contaminadas, respectivamente. Estas 35 proteínas presentaron dos tendencias, intensas en sitios de referencia pero ausentes en los contaminados, y la contraria. El estudio de los biomarcadores convencionales mostraba que en sitios contaminados se inhibían las actividades catalasa, glucosa-6P-deshidrogenasa, carboxilesterasa y acetilcolinesterasa, pero aumentaron los niveles de malondialdehído, metalotioneínas y glutatión. **Financiación: Proyecto CTM2006-08960-CO2.**

Comunicaciones XVII Reunión Científica SEMA 2008 Sevilla

**CONTAMINACIÓN DE ECOSISTEMAS ACUÁTICOS DEL ESTERO DE DOMINGO RUBIO:  
INTEGRACIÓN DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS Y APROXIMACIONES  
PROTEÓMICAS EN EL CANGREJO VERDE (*Carcinus maenas*).**

Montes-Nieto R, López-Barea J.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Edificio Severo Ochoa, Campus de  
Rabanales,  
Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba, España

Las herramientas proteómicas, incluyendo la separación de proteínas por electroforesis en dos dimensiones (2-DE) y su identificación por espectrometría de masas (MS), permiten estudiar los efectos de los contaminantes en los organismos, detectando proteínas con niveles alterados, que tras su identificación y validación podrían ser útiles como biomarcadores de contaminación. En este trabajo hemos aplicado esta aproximación al estudio de ecosistemas acuáticos del Estero de Domingo Rubio, un pequeño subsistema de la Ría de Huelva que recibe contaminantes de origen minero, industrial y agrícola. Para ello hemos muestreado cangrejos verdes (*Carcinus maenas*) en la desembocadura del Estero (DR1). Ante la imposibilidad de encontrar una referencia adecuada en esa misma zona, hemos usado cangrejos tomados al Sur de la Bahía de Cádiz, en la desembocadura del Caño Sancti Petri (TOR).

Para corroborar el grado de contaminación de ambos puntos de muestreo se analizaron también en hepatopáncreas de estos cangrejos una batería de biomarcadores convencionales, incluyendo algunas actividades enzimáticas relacionadas con el estrés oxidativo (SeGSHPx, Cat, G6PDH, 6PGDH) y la biotransformación (EROD, GST), algunos daños oxidativos (peroxidación lipídica, estados redox del glutatión), y diversas esterasas (CbE, AChE), que nuestro grupo ha desarrollado y validado como biomarcadores bien establecidos de contaminación. Los resultados demostraron importantes diferencias en las respuestas de los biomarcadores en animales procedentes de ambas zonas estudiadas, compatibles con la presencia en el Estero de Domingo Rubio de metales, contaminantes orgánicos y plaguicidas de origen agrícola.

Las proteínas citosólicas de branquias de *C. maenas* se separaron por 2-DE en geles 2-DE de 18 cm y rango de pH 4-7. Estas condiciones permitían obtener geles con  $\approx 500$  proteínas bien resueltas que por análisis de imagen mostraron diferencias significativas de intensidad en 15 spots entre TOR y DR1. Al no estar secuenciado el proteoma de *C. maenas*, fue imposible la identificación de tales spots por huella peptídica, sin embargo, la secuenciación *de novo* de algunos péptidos por cromatografía líquida acoplada a nanoelectropray y secuenciación *de novo* por trampa iónica, permitió identificar 6 de las proteínas que mostraban expresión diferencial. Entre ellas se encuentra un factor de transcripción (ATF7), un componente del citoesqueleto (ankirina), una enzima que participa en síntesis de ATP (succinil-CoA sintasa), otra que podría inhibirse expuesta al estrés oxidativo (aldehído deshidrogenasa) y dos transportadores de membrana de tipo ABC. Los resultados obtenidos confirman que es mucho más ventajosa la combinación de varias modalidades de biomarcadores que el uso de una sola.

**Financiación: Proyecto Excelencia CICYE-00523; CTM2006-08960-CO2.**

**ESTUDIO DEL DAÑO GENÉTICO CAUSADO POR LA CONTAMINACIÓN DEL  
POLO QUÍMICO DE HUELVA MEDIANTE LA TÉCNICA DEL COMETA.**

Paula Daza, Santiago Mateos, Inmaculada Domínguez, José Antonio Cárdenas y  
Felipe Cortés.

Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda.  
Reina Mercedes 6, 41012 Sevilla

El polo químico de Huelva es un foco de polución que debe ser controlado periódicamente. La finalidad de este estudio ha sido evaluar el posible riesgo medioambiental de dicho asentamiento industrial utilizando como biomarcador al ratón de campo *Mus spretus* y como técnica de detección del daño genético el ensayo del cometa o electroforesis en células aisladas.

Se tomó sangre periférica de ratones procedentes de tres esteros distintos cercanos a la zona del polo químico y se realizó el ensayo cometa utilizando como células control los leucocitos de ratones de vida libre en el parque nacional de Doñana, área protegida.

Los resultados muestran claramente que las células sanguíneas de los ratones que viven cerca de la zona contaminada poseen una mayor tasa de daño genético que las células de los ratones control. Por tanto, podemos sugerir que el análisis del daño en el ADN de células de ratones de campo, utilizando la electroforesis de células aisladas, Ensayo Cometa, es una técnica excelente para monitorizar poblaciones y así preservar el medioambiente.

*Asistentes/Autores  
XVII Jornadas de la  
Sociedad Española de  
Mutagénesis  
Ambiental*

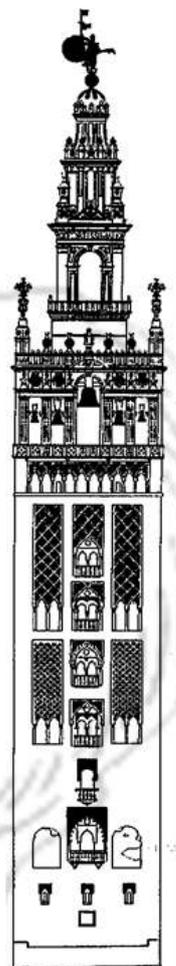
Sevilla, del 23 al 26 de Junio de 2008

Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

CellCulture  
&  
RADIOBIOLOGY  
RESEARCH GROUP



c.viral



## Asistentes XVII Reunión Científica SEMA 2008

---

Abril N  
Aguilar-Melero P  
Akdi A.  
Alhama J  
Arrieta I  
Burguete MI  
Cabré O  
Campanella C  
Cantero G  
Carmona E.R  
Comendador, M.A.  
Córdoba-Cañero D.  
Cortés F  
Cosimi S.  
Creus A  
Chicano-Gálvez E  
Daza P  
de la Peña de Torres E  
Domínguez I.  
El-Yamani N.  
Fuentes-Almagro CA  
González-Flores E  
Huerta I  
Kaplan C  
Liviác D.

López-Barea J  
Marcos R  
Martínez-Macías MI  
Mateos S  
Michán C  
Montes-Nieto R  
Orta Vázquez M.L.  
Osuna-Jiménez I  
Palitti F  
Pastor N.  
Pastor S  
Ponferrada-Marín M.I  
Prado F  
Prieto-Álamo MJ  
Pueyo C  
Ramírez JM  
Repetto Kuhn G  
Roldan MT  
Sandoval S B  
Sierra L.M.  
Stoyanova E  
Torreblanca J  
Vioque-Fernández A  
Zúñiga-Venegas

## Índice de autores XVII Reunión Científica SEMA 2008

---

### **A**

Abril N 27,31,32  
Aguado L 50  
Aguilar-Melero P 34  
Akdi A. 35  
Aki-Sener E 51  
Alhama-Carmona J 41,42,60  
Alves de Almeida E 61  
Amengual D 55  
Andrés E 47  
Ardizzone N 59  
Ariza RR 43,48,49  
Arrieta I 40

### **B**

Ballarín J 47  
Barasoain M 40  
Blanco E 50  
Blasco J 60

### **C**

Campanella C 52,53,59  
Cantero G 53,54  
Capello F 59  
Cárdenas JA 63  
Carmona ER 56  
Clemente M 28  
Coll E 45,47  
Comendador, M.A. 37,50  
Córdoba-Cañero D 48  
Cortés F 39,52,53,54,58,59,63  
Cosimi S 58,  
Creus A 44,46,55,56,57  
Criado B 40  
Chicano-Gálvez E 41,42  
Chipman JK 32

### **D**

Daza P 63  
Diril N 51  
Domínguez I. 40,54,63

### **E**

El-Yamani N 45,47,57

### **F**

Fernández P 46  
Fernández-Caliani JC 42  
Flores P 40  
Font L 46  
Foto E 51  
Fuentes-Almagro CA 27,33,

### **G**

Galofré P 35  
García J 37  
García-Sar D 50  
Gesheva T 56  
Gómez-Ariza JL 27,42,60  
González J 40  
González-Flores E 36  
González-Prieto R 28  
Grimalt J 46  
Guillamet E 57

### **H**

Herreros A 47  
Huerta I 40

### **J**

Jurado J 27,33

### **K**

Kaplan C 51,52,59  
Kogevinas M 46

**L**

Liviac D 46  
López-Barea J 27,41,42,60,61,62

**M**

Marasà M 59  
Marcos R 35,36,44,45,46,47,55,56,57  
Marino Gammazza A 59  
Martínez-Macías MI 43,49  
Mateos S 39,52,53,54,58,63  
Michán C 38  
Montes-Bayón M 50  
Montes-Nieto R 27,62  
Morales-Ruíz MT 43,49

**O**

Orta Vázquez M.L. 39,58,59  
Ortiz E 40  
Osuna-Jiménez I 27,31,32,33

**P**

Palitti F 29  
Pastor N 52,53,54,59  
Pastor S 36  
Peri G 59  
Ponferrada-Marín M.I 43,49  
Prado F 28  
Prieto-Álamo MJ 27,31,32,33,34  
Pueyo C 27,31,32,33,34,38

**R**

Ramírez JM 40  
Roldan-Arjona MT 43,48,49  
Romero-Ruíz A 60  
Ruiz-Laguna J 27,

**S**

Sandoval B 47  
Santos E 42  
Sanz-Medel A 50

Sierra L.M. 37,50  
Stoyanova E 45,47

**T**

Tekiner-Gulbas B 51  
Télez M 40  
Temiz O 51

**V**

Velázquez A 35,36  
Villanueva C 46  
Vioque-Fernández A 61

**W**

Williams TD 32,

**Y**

Yalcin I 51  
Yildiz I 51

**Z**

Zúñiga-Venegas 44,55