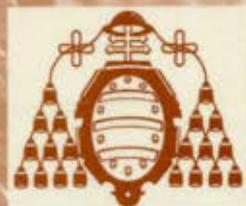


VIII REUNIÓN
CIENTÍFICA DE LA
SOCIEDAD
ESPAÑOLA DE
MUTAGÉNESIS
AMBIENTAL

Oviedo, 3 - 4 de Julio 1997



Universidad de Oviedo
Dpto. Biología Funcional
Área de Genética

VIII REUNIÓN CIENTÍFICA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MUTAGÉNESIS AMBIENTAL

OVIEDO, 3 y 4 de JULIO de 1997.

**Organizado por el Área de Genética del Departamento de Biología Funcional.
Universidad de Oviedo.**

**Reunión reconocida de Interés Sanitario por la Consejería de Sanidad del
Principado de Asturias.**

COMITÉ ORGANIZADOR

Miguel Angel Comendador García

Nancy Díaz-Valdés Farray

Luisa María Sierra Zapico

Emma Pena Alonso

Luis Tosal Peláez

Andrés Rodríguez Cea

Lidia Álvarez Fernández



R-17.955

COMITÉ CIENTÍFICO

Ricardo Marcos Dauder. Universidad Autónoma de Barcelona.

Carmen Pueyo de la Cuesta. Universidad de Córdoba.

Amadeo Creus Capdevila. Universidad Autónoma de Barcelona.

Eduardo de la Peña de Torres. CSIC Centro de Ciencias Medioambientales.

Felipe Cortés Benavides. Universidad de Sevilla.

Covadonga Caballo Diéguez. Ministerio de Sanidad.

Carmen Barrueco Fernández. Instituto de Salud Carlos III.

Luisa María Sierra Zapico. Universidad de Oviedo.

ENTIDADES Y ORGANISMOS COLABORADORES :

- Vicerrectorado de Investigación. Universidad de Oviedo.
- Vicerrectorado de Extensión Universitaria. Universidad de Oviedo.
- Consejería de Cultura. Principado de Asturias.
- Consejería de Sanidad. Principado de Asturias.
- Banco Herrero.
- Biocen. S.L.
- Dismed S.A.

SEDE DE LA REUNIÓN.

Aula Magna. Edificio Histórico de la Universidad de Oviedo.

C/ San Francisco nº 1.

PROGRAMA.**Jueves, 3 de Julio.**

- 9.0- 11.00 *Entrega de documentación*
- 11.0- 11.30 *Inauguración oficial*
- 11.30-13.00 **CONFERENCIA: "Food mutagens: genotoxicity and mechanisms of biotransformation".**
Rueff, J., Duarte Silva, I., Gaspar, J., Rodrigues, A., Kranendonk, M., Laires, A.
 Universidade Nova de Lisboa.
- 15.00 **1ª SESIÓN DE COMUNICACIONES**
Moderadores : Drs. Noel Xamena y María Sierra.
- 15.00-15.20 **"Caracterización de dos mutantes de *Drosophila melanogaster* de ojos de color claro, aislados entre los descendientes de machos *white-apricot* sometidos a choque térmico".**
Baldrich, E., Velázquez, A., Marcos, R., Xamena, N., Cabré, O.
 Universidad Autónoma de Barcelona.
- 15.20-15.40 **"Mutación somática y germinal inducidas por agentes alquilantes en el mutante *white-buff* de *Drosophila*".**
Soriano, S., Cabré, O., Xamena, N.
 Universidad Autónoma de Barcelona.
- 15.40-16.00 **"Secuenciación de las regiones flanqueantes de la duplicación en tandem del alelo *white-ivory* de *Drosophila melanogaster* y de revertientes germinales obtenidos tras el tratamiento con agentes alquilantes".**
Suárez, S., Velázquez, A., Cabré, O., Marcos, R., Xamena, N.
 Universidad Autónoma de Barcelona.
- 16.00-16.20 **"Alteración del *fingerprint* de DNA genómico de *mus-201*, un mutante deficiente en reparación por escisión de *D. melanogaster*".**
López, A., Marcos, R., Velázquez, A.
 Universidad Autónoma de Barcelona.
- 16.20-16.40 **"Análisis de la mutagenicidad de dietilsulfato en la línea *mus308* de *Drosophila melanogaster*".**
Díaz-Valdés, N., Comendador, M.A., Sierra, L.M.
 Universidad de Oviedo.
- 16.40-17.00 **"Mutaciones inducidas por ENU en células germinales femeninas de *Drosophila melanogaster*".**
Álvarez, L., Tosal, L., Comendador, M.A., Sierra, L.M.
 Universidad de Oviedo.

- 17.00-17.20 **“Espectro molecular de mutación inducido por ENU en la línea *mus201* de *Drosophila melanogaster*”.**
Tosal, L., Comendador, M.A., Sierra, L.M.
Universidad de Oviedo.
- 17.20-17.40 **“Inducción de aberraciones cromosómicas por ENU en células de cerebro de *Drosophila melanogaster*”.**
Pena, E., Sierra, L.M., Comendador, M.A.
Universidad de Oviedo.
- 17.40-18.00 ***Pausa para café***
- 18.00 **2ª SESIÓN DE COMUNICACIONES.**
Moderadores : Drs. Carmen Pueyo y Eduardo de la Peña.
- 18.00-18.20 **“El concepto de mutagénesis en una industria farmacéutica”.**
Vericat, J.A.
Synthelabo Recherche. Francia.
- 18.20-18.40 **“Influencia de la alquiltransferasa OGT de *E. coli* en la distribución de mutaciones inducidas por PNU y BNU”.**
Ferrezuelo, F., Prieto-Álamo, M.J., Jurado, J., Pueyo, C.
Universidad de Córdoba.
- 18.40-19.00 **“Estrés oxidativo en *E. coli* : Inducción del regulón Oxy-R”.**
Manchado, M., Michán, C., Abril, N., Pueyo, C.
Universidad de Córdoba.
- 19.00-19.20 **“Desarrollo de nuevas cepas test de *Escherichia coli* WP2 para la detección de mutaciones inducidas por lesiones oxidativas en el DNA”.**
Blanco, M., Urios, A.
FVIB Instituto de Investigaciones Citológicas.
- 19.20-19.40 **“Estudio del efecto genotóxico de las acetogenenas squamocina y annonacina, y de la rotenona con los ensayos de *Salmonella*/Microsoma y cultivo de linfocitos humanos”.**
Guadaño, A., Escribano, P., González, A., Gutiérrez, C., de la Peña, E.
CSIC Centro de Ciencias Medioambientales.
- 20.00 ***Recepción en el Ayuntamiento.***
- Viernes, 4 de Julio.**
- 9.00 **3ª SESIÓN DE COMUNICACIONES.**
Moderadores : Drs. Amadeu Creus y Joaquín Piñero.
- 9.00-9.20 **“El ensayo del cometa aplicado a *Drosophila*”.**

- Gaivao, I., Rodríguez, A., Sierra, L.M. y Comendador, M.A.
Universidad de Oviedo.
- 9.20-9.40 **“Daño y reparación del DNA en hepatocitos de ratón, utilizando el ensayo “COMETA”, después de tratamientos in vivo con distintas dosis de radiación γ ”.**
Carrera, P., de Miguel, M., Navarrete, M.H.
Universidad Autónoma de Madrid.
- 9.40-10.00 **“Obtención de núcleos de hepatocitos de ratón a partir de tejido sólido y su análisis por el ensayo “COMETA””.**
De Miguel, M., Carrera, P., de la Torre, C., López, J.
Universidad Autónoma de Madrid. CSIC Centro de Investigaciones Biológicas.
- 10.00-10.20 **“Utilización del ensayo del cometa (SCGE) en la biomonitorización de pacientes tratados con ^{131}I ”.**
Gutiérrez, S., Carbonell, E., Galofré, P., Creus, A., Marcos, R.
Universidad Autónoma de Barcelona. Hospital Valle de Hebrón.
- 10.20-10.40 **“Efectos del polimorfismo del gen *gst1* y acción del glutatión sobre el daño genético inducido por el bencenotriol utilizando el ensayo del cometa (SCGE)”.**
Pitarque, M., Carbonell, E., Creus, A., Marcos, R.
Universidad Autónoma de Barcelona.
- 10.40-11.00 **“Potenciación de la efectividad de un tratamiento con inhibidores de topoisomerasas en células CHO6 pretratadas con 5-azaC”.**
López Baena M., Piñero, J., Mateos, S., Ortiz, T., Cortés, F.
Universidad de Sevilla.
- 11.00-11.30 ***Pausa para café***
- 11.30-13.00 **CONFERENCIA: “Control genético de la recombinación entre secuencias repetidas en *S. cerevisiae*”.**
Aguilera, A., Prado, F., Chávez, S., Piruat, J.-I., Santos-Rosa, H., Malagón, F.
Universidad de Sevilla.
- 15.00 **4ª SESIÓN DE COMUNICACIONES.**
Moderadores : Drs. Rosa de Vidania y Ricardo Marcos.
- 15.00-15.20 **“Micronúcleos y asimetría fluctuante en trucha común (*Salmo trutta*): métodos complementarios para biomonitorizar *in situ* ecosistemas acuáticos”.**
Sánchez-Galán, S., Linde, A.R., Izquierdo, J., García-Vázquez, E.
Universidad de Oviedo.

- 15.20-15.40 **“Inducción de micronúcleos por cadmio en especies piscícolas : diferencias interespecíficas”.**
Ayllón, F., Linde, A.R., Sánchez-Galán, S., García-Vázquez, E.
 Universidad de Oviedo.
- 15.40-16.0 **“Estudio de la respuesta a la bleomicina en linfocitos de pacientes tratados con ^{131}I , utilizando el ensayo de micronúcleos (MN)”.**
 Gutiérrez, S., Carbonell, E., Galofré, P., Creus, A., Marcos, R.
 Universidad Autónoma de Barcelona. Hospital Valle de Hebrón.
- 16.00-16.20 **“Análisis mediante la técnica del “Chromosome Painting” del efecto del Ara-C sobre las lesiones inducidas *in vitro* por la bleomicina”.**
Puerto, S., Surrallés, J., Carbonell, E., Creus, A., Marcos, R.
 Universidad Autónoma de Barcelona.
- 16.20-16.40 **“Detección mediante FISH interfásico de la inducción de los efectos clastogénicos y aneugénicos del ^{131}I en pacientes con cáncer de tiroides”.**
Ramírez, M.J., Surrallés, J., Galofre, P., Creus, A., Marcos, R.
 Universidad Autónoma de Barcelona. Hospital Valle de Hebrón.
- 16.40-17.00 **“Análisis de la función del gen *xist* en células somáticas y del efecto de posición en translocaciones cromosoma X-autosoma”.**
Surrallés, J., Natarajan, A.T.
 Universidad Autónoma de Barcelona. Universidad de Leiden.
- 17.00-17.20 **“Posible relación entre los niveles de topoisomerasas I y II y la reparación del daño en el ADN inducido por radiación ionizante”.**
Pastor, N., Piñero, J., de Miguel-Rodríguez, M., Cortés, F.
 Universidad de Sevilla.
- 17.20-17.40 **“Estudio de mutagénesis *in vivo* inducida por exposición a rayos X en un modelo de ratones transgénico”.**
Martín, L., Sierra, I., Real, A., de Vidania, R., Bauluz, C.
 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas.
- 17.40-18.00 **“Alteraciones celulares en sangre periférica inducidas por radiación ionizante en función de la expresión de p53”.**
Casado, J.A., Bauluz, C., de Vidania, R., Real, A.
 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas.
- 18.00-18.30 *Pausa para café*

- 18.30-20.00 **CONFERENCIA: “Relaciones estructura-actividad (SAR): Predicciones en Mutagénesis”.**
Vericat, J.A.
Synthelabo Recherche. DESM.
- 20.0- 21.00 **Asamblea anual de la S.E.M.A.**
21.30 **Espicha de clausura.**

FOOD MUTAGENS : GENOTOXICITY AND MECHANISMS OF BIOTRANSFORMATION.

J. Rueff, I. Duarte Silva, J. Gaspar, A. Rodrigues, M. Kranendonk, A. Lares.

Dep. Genetics, Faculty of Medical Sciences, UNL, Rua da Junqueira, 96 - 1300 LISBON.

Phenolic compounds are common natural and contaminant molecules present in food products. Some phenolic molecules are also genotoxic and exert DNA lesions by various mechanisms, including the production of reactive oxygen species, biotransformation reactions and nitrosation.

Flavonols comprise a group of polyphenol compounds whose mutagenicity depends on the number and position of hydroxyl groups in one of their ring structures (B ring). In eucaryotic cells the mutagenicity of the flavonoids quercetin and myricetin, which have 2 and 3 hydroxyl groups in the B ring, respectively, seems to depend on the pH dependent-production of reactive oxygen species, whereas the mutagenicity of the flavonoid kaempferol, with only one hydroxyl group, is dependent on its activation via the cytochrome P450 monooxygenase system (1,2). Galangin does not have any hydroxyl group in the B ring and has been shown by us to be a substrate of cytochromes P450 (3). Concurrently the mutagenicity of this class of compounds can also be enhanced by nitrosation reactions which may take place in the human gut (4).

IQ is a food mutagen and carcinogen whose genotoxicity is strictly dependent on metabolisation by cytochromes P450, namely by the 1A family. When we attempted to assay the mutagenicity of IQ in V79 cells genetically engineered to express rat cytochrome P450 1A2, results were negative (5). However, when using a bacterial system expressing human cytochrome P450, recently developed in our laboratory, IQ gave a clear positive response. In the same system the strong food mutagen aflatoxin B1 was also efficiently activated to an ultimate mutagen.

(1) J. Gaspar, A. Rodrigues, A. Lares, F. Silva, S. Costa, M.J. Monteiro, C. Monteiro e J. Rueff. *Mutagenesis* (Oxford) 9 : 445-449 (1994).

(2) I. Duarte Silva, A.S. Rodrigues, J. Gaspar, R. Maia, A. Lares e J. Rueff. *Mutagenesis* (Oxford) in press (1997).

(3) I. Duarte Silva, A.S. Rodrigues, J. Gaspar, A. Lares and J. Rueff. *Mutation Research* (Amsterdam) in press (1997).

(4) J. Rueff, J. Gaspar and A. Lares. *Mutagenesis* (Oxford) 10 : 325-328 (1995).

(5) J. Rueff, C. Chiapella, J.K. Chipman, F. Darroudi, I. Duarte Silva, M. Duverger-van Bogaert, E. Fonti, H. R. Glatt, P. Isern, A. Lares, A. Leonard, M. Llagostera, P. Mossesso, A.T. Natarajan, F. Palitti, A. S. Rodrigues, A. Schinoppi, G. Turchi and G. Werle-Schneider. *Mutation Research* (Amsterdam) 353. 151-176 (1996).

NOTAS :

CONTROL GENÉTICO DE LA RECOMBINACIÓN ENTRE SECUENCIAS REPETIDAS EN *S. CEREVISIAE*.

A. Aguilera, F. Prado*, S. Chávez, J.-I. Piruat, H. Santos-Rosa§ y F. Malagón.

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, SEVILLA.

Las secuencias repetidas de DNA son muy abundantes en eucariontes y constituyen un sustrato importante para la recombinación homóloga. La recombinación es una de las rutas mayoritarias de reparación de daños en mitosis, en especial de roturas del DNA, pero puede ser fuente de aberraciones cromosómicas (deleciones, inversiones y translocaciones) que suelen estar asociadas a ciertos tipos de enfermedades hereditarias y cáncer.

Con objeto de entender los mecanismos responsables de la recombinación entre secuencias repetidas largas hemos construido una serie de sistemas basados en un repetición de 600 pb con diferentes secuencias intermedias entre 35 pb y 5.6 kb. La caracterización de los sucesos de recombinación que se producen por cortes de doble cadena realizados en diferentes lugares nos ha permitido concluir que las rutas mayoritarias de formación de deleciones son no-conservativas : (i) realineamiento y reasociación de cadenas sencillas e (ii) invasión de una cadena. Estos mecanismos no participan en la formación de inversiones y su dependencia de los genes *RAD* de recombinación son diferentes.

Respecto al control genético de la recombinación entre secuencias repetidas, hemos observado que la transcripción es un potente inductor de inestabilidad genómica por recombinación. Utilizando mutantes *hpr1*, que fueron identificados por su fenotipo hiper-recombinador, hemos observado que las deleciones están asociadas a un bloqueo de la elongación de la transcripción y hemos demostrado que Hpr1p participa en la elongación de la transcripción dependiente de RNA polII. El aislamiento de supresores del fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1* nos ha permitido identificar dos factores de transcripción de la RNA polII, Srb2p y Hrs1p, lo que sugiere que hay factores de transcripción necesarios para la iniciación de la recombinación en ausencia de Hpr1p. La interconexión entre transcripción y recombinación también la hemos puesto de manifiesto con la observación de que los mutantes *spt2*, *spt4* y *spt6*, que afectan la transcripción mediante su efecto en estructura de la cromatina, tienen un fenotipo hiper-recombinador.

Discutiremos diferentes alternativas para explicar el origen y los mecanismos de recombinación entre secuencias repetidas en *S. cerevisiae* y su control genético.

*Dirección actual : IMT, Philipps Universität, Alemania.

§Dirección actual : Institut für Biochemie, Universität Heidelberg, Alemania.

NOTAS :

RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD (SAR): PREDICCIONES EN MUTAGENESIS.

Vericat, Joan-Albert

Synthélabo Recherche, Département d'Étude sur la Sécurité du Médicament, Groupe de Toxicologie In vitro.

2-8, Route de Rouen - Z.I. de Limay-Porcheville, 78440 Gargenville (FRANCE).

Los análisis estructura-actividad (SAR) son cada vez más importantes en la evaluación precoz de nuevos productos de interés. La investigación farmacéutica usa técnicas de gran capacidad (química combinatoria, "high-through-put screening", etc.) para poder sintetizar las 10000 moléculas nuevas necesarias para que después de todas las etapas de selección, una de las 10000 pueda llegar al mercado. Gracias a ello, se comienzan a acumular gran cantidad de datos sobre estructuras químicas y efectos biológicos relacionados. Los recientes desarrollos en informática y robótica han permitido aumentar aun más la cantidad de datos disponibles así como realizar los análisis estadísticos necesarios.

Si bien las SAR comenzaron en los años 60 para intentar establecer relaciones entre estructuras químicas y actividad farmacológica, se han ido incorporando en otras disciplinas, incluida la toxicología.

Los factores más importantes para establecer SARs son la cuantificación del fenómeno biológico en estudio, la existencia de descriptores estructurales que definan las moléculas en evaluación, la disponibilidad de tecnología computacional suficiente y, en función de los descriptores elegidos, sistemas estadísticos suficientemente potentes. Los datos cualitativos no son aptos al establecimiento de SARs.

Dos son los aspectos fundamentales en los que estamos interesados en Synthélabo: (1) La determinación de toxoforos o motivos estructurales relacionados con el potencial mutagénico de nuestras estructuras químicas y (2) la utilización de bases de datos o "sistemas experto" para poder predecir, a nivel de diseño molecular, el riesgo mutagénico de una nueva molécula.

La determinación de toxoforos es un proceso que depende de los datos existentes. Por motivos técnicos y de coste, el test d'Ames es el test de mutagénesis más utilizado, del que se suele llegar a disponer de suficientes datos como para poder establecer correlaciones. La mayor limitación reside en el hecho de que el diseño experimental habitual es simple ("screening"), con un número limitado de concentraciones de producto: el objetivo es decidir si el producto "pasa" o "no pasa" y no interesa el llegar a establecer un valor exacto de potencia mutagénica. En alternativa a diseños experimentales más costosos, hemos definido parámetros matemáticos que definen la potencia mutagénica de los productos en evaluación (ello es importante para poder aprovechar los datos históricos de productos abandonados), considerando a la vez concentración de producto y número de revertientes en el punto de respuesta máxima. Una vez definidos estos parámetros, la respuesta positiva o negativa del test d'Ames se vuelve cuantificable y es posible intentar establecer las SAR. En nuestro caso, hemos aplicado este sistema a diversas familias químicas y en un caso concreto hemos podido establecer una hipótesis de intercalación en el DNA, que ha sido demostrada experimentalmente mediante experimentos de electroforesis.

La predicción del poder mutagénico es un factor muy importante para poder definir prioridades en el laboratorio. Existen dos tipos de sistemas de predicción: (1) Sistemas cuantitativos (QSAR), en los que a partir de una base de datos importante se ha podido establecer correlaciones estadísticas entre mutagénesis (y/o carcinogénesis) y ciertos descriptores estructurales de las moléculas estudiadas; así, el sistema, "rompe" la molécula en

evaluación y busca los descriptores para poder llegar a definir una probabilidad de riesgo. (2) Sistemas cualitativos en los que ciertas alertas estructurales han sido definidas por un panel de expertos; así, el sistema, cuando encuentra la alerta prevista indica un riesgo potencial. En nuestro departamento, hemos evaluado 46 nuevas estructuras químicas, artificialmente clasificadas en 10 familias diferentes, en el test d'Ames durante el periodo enero-junio 1996, comparando los resultados obtenidos experimentalmente con las predicciones derivadas del sistema DEREK (LHASA-UK) y ToxAlert (MultiCase-USA). Los resultados de concordancia (buenas predicciones totales), sensibilidad (buenas predicciones de mutagenicidad -positivos-) y especificidad (buenas predicciones de no mutagenicidad -negativos-) han sido respectivamente 67%, 100% y 48% para DEREK y 41%, 7% y 56% para ToxAlert. Estos resultados indican, que aunque los dos sistemas pueden ser una instrumento interesante para ciertas familias químicas, por el momento no son útiles para definir prioridades. De hecho, hasta que estos sistemas de predicción no lleguen a especificidades superiores al 80% su utilidad será limitada.

NOTAS :

RESÚMENES DE COMUNICACIONES

CARACTERIZACIÓN DE DOS MUTANTES DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* DE OJOS DE COLOR CLARO, AISLADOS ENTRE LOS DESCENDIENTES DE MACHOS *WHITE-APRICOT* SOMETIDOS A CHOQUE TÉRMICO.

Baldrich, Eva; Velázquez, Antonia; Marcos, Ricard; Xamena, Noel; Cabré, Oriol

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

Se han estudiado dos mutantes (M63 y M115) de *Drosophila melanogaster*, aislados entre la descendencia de machos *white-apricot* sometidos a choque térmico, que presentaban un color de ojos más claro que el de sus precursores. El análisis por la técnica de Southern indicó que, sorprendentemente, no presentaban la inserción del retrotransposón *copia* en el segundo intrón del locus *white*, característica de la cepa *w^a*, a pesar de no haberse producido la reversión al fenotipo de color salvaje. Las pruebas de alelismo confirmaron que la mutación no afecta al locus *white*, sino a otro locus, que localizamos en posición distal respecto a *white*, en el mismo cromosoma X. Un estudio más detallado de la expresión fenotípica mostró que la pigmentación de los ocelos, testículos y túbulos de Malpighi, que también depende de *white*, no se veía alterada.

El conjunto de datos obtenidos hicieron pensar que el locus afectado podía ser *zeste* [1-1,0], un modificador de *white* del que se conocen varios mutantes, de los cuales los dos más estudiados (*z¹* y *z^{op6}*) son debidos a mutaciones puntuales en el tercer exón. Se decidió analizar esta parte del gen en los dos mutantes que estábamos estudiando, para lo cual se amplificaron por la técnica de PCR y se secuenciaron 700 pares de bases. Hasta ahora se han determinado en el mutante M63 dos mutaciones con cambio de sentido, que podrían ser las responsables de la alteración fenotípica. Una de estas mutaciones es un cambio Lys→Met (A→T, 2.360) que se encuentra también en *z¹* y *z^{op6}*, mientras que la otra es el cambio Pro→Ala (C→G, 2.383) que es del mismo tipo que el cambio Pro→Leu (C→T, 2.480) descrito en el mutante *z^{op6}*.

NOTAS :

MUTACIÓN SOMÁTICA Y GERMINAL INDUCIDAS POR AGENTES ALQUILANTES EN EL MUTANTE *WHITE-BUFF* DE *DROSOPHILA*.

Soriano, Silvia; Cabré, Oriol; Xamena, Noel

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

El mutante *white-buff* (w^{bf}) de *Drosophila melanogaster* se caracteriza por la presencia de una copia del elemento transponible *B104* inserto en el cuarto intrón del locus *white* (w), en la posición -1134 según el mapa físico de Lewis (1982), dando lugar a un fenotipo de ojos claros. El elemento *B104* es un retrotransposón de 8,7 kb. La inserción de este elemento en determinados genes puede dar lugar a mutantes de fenotipo característico. Los mutantes *white-spotted-one* y *white-honey*, entre otros, tienen el color de ojos alterado por la inserción de este elemento en el gen w . En el mutante w^{bf} el elemento *B104* está inserto en la dirección de transcripción del gen w .

En esta comunicación se presentan los resultados de la reversión somática y germinal obtenidos tras la exposición de individuos w^{bf} a 3 agentes alquilantes: EMS, MMS y ENU. Es destacable la gran diferencia observada entre la frecuencia de reversión inducida somática y germinal. Mientras que, a ciertas concentraciones, la frecuencia de reversión somática llega a ser 68 veces superior a la espontánea (0,05 %), únicamente se ha obtenido un revertiente germinal en todas las muestras analizadas. Aparecen, sin embargo, individuos mutantes de ojos claros con frecuencias más elevadas. Se presenta el análisis molecular del revertiente (ojos rojos) y mutantes (ojos blancos) hallados en la línea germinal. El análisis por *Southern blot* revela que el único revertiente germinal hallado no ha perdido el elemento transponible inserto. Por otra parte, de los mutantes de ojos blancos hallados después del tratamiento, que tampoco presentan pérdida del elemento, tres de ellos no muestran alteraciones visibles en el locus w , mientras que dos presentan una delección de gran parte del mismo. Así pues, el color blanco de los ojos puede ser debido tanto a delecciones del gen como a otras causas, mientras que la reversión analizada está probablemente asociada a cambios en otros genes que interaccionan con la expresión del gen w , tal como hemos evidenciado para otros mutantes insercionales de w .

NOTAS :

SECUENCIACIÓN DE LAS REGIONES FLANQUEANTES DE LA DUPLICACIÓN EN TÁNDEM DEL ALELO *WHITE-IVORY* DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* Y DE REVERTIENTES GERMINALES OBTENIDOS TRAS EL TRATAMIENTO CON AGENTES ALQUILANTES.

Suárez, Susana; Velázquez, Antonia; Cabré, Oriol; Marcos, Ricard; Xamena, Noel

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

Diversos trabajos realizados con cepas de *Drosophila melanogaster* con el mutante *white-ivory* parecen indicar que éste es un buen sistema para la detección de mutaciones somáticas, aunque en la actualidad no se conoce bien el tipo de daño o actividad genotóxica que mide. Con la intención de aportar más información sobre el tipo de lesión que produce la reversión de este mutante, hemos analizado a nivel molecular diferentes revertientes obtenidos tras el tratamiento larvario con tres agentes alquilantes de acción diferente y conocida como son el etil metanosulfonato (EMS; CAS No. 62-50-0), el metil metanosulfonato (MMS; CAS No. 66-27-3) y la N-etil N-nitrosourea (ENU; CAS No.759-73-9). Con los individuos revertientes obtenidos se han establecido líneas cruzándolos con hembras vírgenes de cromosomas X unidos. El análisis por *Southern blot*, tanto de la zona característica del alelo w^I como de otras zonas del locus *white*, indica que la reversión se debe a la escisión del fragmento duplicado de 2,96kb. La amplificación por PCR de las regiones flanqueantes a la duplicación del alelo w^I , viene a confirmar, con más exactitud, la escisión de dicho fragmento. Con la finalidad de determinar si tal escisión es precisa, hemos secuenciado estos fragmentos amplificados por PCR en 4 individuos revertientes de origen independiente, así como en la cepa w^I de la que provienen tales revertientes. El resultado obtenido es que la escisión de las 2,96kb duplicadas en tándem es prácticamente precisa, puesto que alineando las secuencias obtenidas de estos revertientes con las de w^I son idénticas y, además, se aprecian pocas diferencias con las de la secuencia publicada del locus *white* (O'Hare et al., 1984).

NOTAS :

ALTERACIÓN DEL *FINGERPRINT* DE DNA GENÓMICO DE *MUS-201*, UN MUTANTE DEFICIENTE EN REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE *D. MELANOGASTER*.

López, Arturo; Marcos, Ricardo; Velázquez, Antonia

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

La inestabilidad en el genoma puede tener su origen en alteraciones del metabolismo del DNA, como puede ser la disfunción en los mecanismos de reparación. En *D. melanogaster* se conocen un gran número de mutantes asociados a deficiencias en la reparación del DNA, que nos permiten estudiar la relación entre la inestabilidad en el material genético y la reparación.

La cuantificación de la inestabilidad genómica en mutantes deficientes en reparación se puede realizar comparando los *fingerprints* obtenidos mediante la técnica de AP-PCR. Dado que las alteraciones genéticas inducidas dependen tanto de la interacción específica del mutágeno con el DNA como del fondo genético de la cepa tratada (salvaje o deficiente en reparación), nos proponemos cuantificar el daño inducido en el DNA y relacionarlo con la capacidad de reparación del mutante *mus-201*.

Para ello, machos adultos de la cepa salvaje *Canton-S (CS)*, tratados con AAF, se cruzaron con hembras vírgenes *CS* y *mus-201*. Al comparar el *fingerprint* individual de los descendientes con los de sus progenitores, se observa gran cantidad de cambios cualitativos y cuantitativos en el patrón de bandas obtenido con los descendientes que provienen de las hembras *mus-201*, en contraste con el patrón obtenido con los descendientes de las hembras *CS*. Estos resultados nos indican la importancia de la reparación por escisión en la inducción de daño genético por AAF. En concreto, el producto del gen *mus-201* interviene en la eliminación del daño premutacional que podría producir alteraciones diversas en el genoma tras el tratamiento con dicho mutágeno.

La validez del análisis de *fingerprints* para cuantificar el daño genético se demuestra con el clonaje y caracterización de algunas de las bandas alteradas, lo que nos proporciona, también, información adicional de la naturaleza del daño producido.

NOTAS :

ANÁLISIS DE LA MUTAGENICIDAD DE DIETILSULFATO EN LA LÍNEA *MUS308* DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

N. Díaz-Valdés, M.A. Comendador, L.M. Sierra.

Departamento de Biología Funcional. Área de Genética. Universidad de Oviedo. 33006 OVIEDO.

El locus *mus308* es uno de los aproximadamente 30 genes existentes en *D. melanogaster* implicados en la reparación de daño en el ADN. Los mutantes de este locus se caracterizan por presentar una fuerte hipersensibilidad frente a la acción tóxica de agentes que producen enlaces cruzados intercatenarios. Genéticamente los mutantes *mus308* son también sensibles a este tipo de agentes, ya que presentan bien hipermutabilidad o bien hipomutabilidad, respecto a condiciones eficientes de reparación. Además, estos mutantes presentan hipermutabilidad frente al agente alquilante monofuncional etilnitrosourea (ENU), que alquila preferentemente los átomos de oxígeno del ADN, pero no presentan cambios en la mutabilidad frente a metilmetanosulfonato (MMS), agente alquilante monofuncional que alquila fundamentalmente los átomos de nitrógeno. Éstos y otros hechos sugieren que *mus308* estaría implicado en la reparación o en el procesamiento de lesiones bien persistentes o bien que afecten a ambas cadenas del ADN (1,2).

Con el objetivo de conocer en más profundidad el papel de *mus308* en la reparación, decidimos estudiar la influencia de este locus en la mutagenicidad de dietilsulfato (DES), un agente alquilante monofuncional con características intermedias entre ENU y MMS. En un trabajo previo se determinó que, bajo condiciones deficientes *mus308*, DES da lugar a hipomutabilidad, que es considerablemente mayor con la dosis mas alta. Este resultado pone de manifiesto la participación de *mus308* en el procesamiento de lesiones inducidas por este compuesto. Además, la diferente respuesta obtenida con ENU y DES permite suponer que las lesiones que son procesadas por *mus308* son diferentes para cada compuesto.

Para estudiar más en detalle qué lesiones, entre las inducidas por DES, son reparadas por *mus308*, se han inducido mutaciones en el locus *vermillion* con el objetivo de obtener un espectro de mutación. Hasta el momento, se han recuperado 14 mutaciones diferentes, todas ellos obtenidas en F₂ y con una frecuencia de mutación de $3,6 \times 10^{-4}$. Estos resultados son diferentes de los obtenidos, para este compuesto, en condiciones normales, tanto en cuanto a la frecuencia de mutación, como en el hecho de que no se aislaran mutaciones en F₁. De las 14 mutaciones aisladas, una ha sido identificada como una traslocación entre los cromosomas X e Y, y en un primer paso hacia la caracterización del resto hemos identificado una deleción grande. El resto se trata, presumiblemente, de mutaciones puntuales o deleciones de pequeño tamaño.

(1) Aguirrezabalaga, I. et al. (1995). Mutation Research 336 : 243-250.

(2) Harris, P.V. et al. (1996). Molecular and Cellular Biology 16 : 5764-5771.

NOTAS :

MUTACIONES INDUCIDAS POR ENU EN CELULAS GERMINALES FEMENINAS DE *D. MELANOGASTER*.

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

Área de Genética. Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. 33006 OVIEDO.

A pesar de que en general los estudios de genotoxicidad se llevan a cabo en machos, evidencias experimentales muestran una respuesta diferencial entre machos y hembras frente a la acción de agentes genotóxicos, para distintos organismos. En concreto, en *D. melanogaster* se han puesto de manifiesto estas diferencias, utilizando el test de letales recesivos ligados al sexo, para el agente alquilante monofuncional etilnitrosourea (ENU). Los resultados muestran una menor sensibilidad de las células germinales femeninas a la acción de este compuesto, observada como una menor frecuencia de letales recesivos.

ENU es, probablemente, el agente genotóxico más utilizado como modelo en estudios de genotoxicidad debido al conocimiento que se tiene de su mecanismo de acción, y por ello es el compuesto para el que existen más espectros moleculares de mutación, en distintos tipos celulares y sistemas de reparación, en organismos diferentes.

Por todo lo mencionado, la obtención del espectro molecular de mutación inducido por ENU en células germinales femeninas de *D. melanogaster* puede aportar información sobre la distinta sensibilidad de las células germinales masculinas y femeninas.

El espectro obtenido hasta el momento, utilizando el sistema *vermilion*, que no muestra en frecuencia de mutación la menor sensibilidad que se observa a nivel de letales recesivos, consta de 23 mutaciones inducidas tanto en oocitos como en oogonias, de las que se han analizado 6 a nivel molecular. Los resultados muestran que todas las mutaciones recuperadas ocurren en pares A/T: 4 transiciones AT-GC y 2 transversiones AT-TA. Estos resultados discrepan de los obtenidos en estadios postmeióticos de células germinales masculinas, dominados por transiciones GC-AT resultado de la etilación del O⁶ de la guanina, y son similares a los descritos para estadios premeióticos tanto de machos de *D. melanogaster*, como de ratón *in vivo*, donde existe una reparación eficiente del aducto O⁶-etilG y son de mayor relevancia genotóxica los aductos en los oxígenos de las timinas.

NOTAS:

ESPECTRO MOLECULAR DE MUTACIÓN INDUCIDO POR ENU EN LA LÍNEA *MUS201* DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

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

Área de Genética. Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. 33006 OVIEDO.

Los espectros moleculares de mutación son una herramienta muy útil a la hora de esclarecer tanto mecanismos de mutación como la influencia que los diferentes sistemas de reparación tengan sobre los mismos. Uno de los principales, y más estudiados, sistemas de reparación del DNA es el denominado de escisión de nucleótido (NER), el cual presenta importantes homologías en *D. melanogaster* y células humanas. Sin embargo, todavía no está clara su intervención en el procesamiento de ciertos daños, como son, en *Drosophila*, las alquilaciones en los átomos de oxígeno del DNA.

Con el fin de aportar información acerca de este punto hemos empleado ENU, etilante mayoritario de los átomos de oxígeno del DNA, para inducir el espectro molecular de mutación en la línea *mus201* de *D. melanogaster*, deficiente en el sistema de reparación NER, tratando machos deficientes y cruzándolos por hembras también deficientes. Los resultados obtenidos muestran a dos niveles diferentes que *mus201* interviene en la reparación del daño causado por ENU: en relación con los letales recesivos ligados al sexo, porque ENU induce una menor frecuencia de mutación en la línea deficiente que en la normal, consecuencia de una mayor mortalidad; y respecto al locus *vermilion* cuya mutación no da lugar a letalidad, porque se encuentra una mayor frecuencia de mutación. En ambos niveles los resultados son consecuencia de la no reparación de daños.

En cuanto al espectro de mutación, hasta el momento, se han aislado 17 mutantes *vermilion*, de los cuales se han secuenciado 6, encontrándose 1 transversión AT → TA, 3 transiciones GC → AT, 1 transición AT → GC, y una delección de 35 pb comprendida entre dos secuencias repetidas. A pesar de que estos datos todavía no permiten obtener conclusiones, ya que el espectro inducido con ENU en condiciones normales de reparación muestra una clara mayoría de transiciones GC → AT, está clara cierta diferencia debido a la presencia de una delección, que no había sido encontrada con anterioridad en ninguno de los espectros inducidos con ENU en condiciones normales de reparación.

NOTAS :

INDUCCIÓN DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS POR ENU EN CÉLULAS DE CEREBRO DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

E. Pena, L.M. Sierra, M.A. Comendador.

Área de Genética. Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. 33006 OVIEDO.

Las referencias en la literatura acerca de la inducción de aberraciones cromosómicas en *D.melanogaster* son escasas y especialmente en el estudio de la acción de agentes químicos, lo que se justifica por las dificultades metodológicas que entraña este tipo de estudio. Sin embargo, ello constituye, potencialmente, una buena herramienta para tratar de correlacionar los efectos que se detectan en células somáticas utilizando diferentes ensayos, tal como los SMART de ojo y de ala, del cometa y el mismo ensayo de aberraciones cromosómicas puesto que los "endpoints" que detectan son diferentes.

Con esta idea en mente, se puso a punto una técnica que permite maximizar la obtención de metafases de células cerebrales larvales y se ha estudiado la inducción por ENU de aberraciones cromosómicas. La elección de este compuesto se basa en que a pesar de estar descrito como mutágeno puntual, por una parte, es considerable la información de que se dispone sobre él, y por otra, es un agente genotóxico de referencia en Mutagénesis, que ha dado positivo en muchos test de genotoxicidad, incluidos los de aberraciones cromosómicas, a pesar de que algunos agentes alquilantes monofuncionales no son clastógenos tan efectivos como lo pueden ser los agentes alquilantes bi o polifuncionales.

Larvas del tercer estadio se trataron durante doce horas en medio instantáneo Carolina con ENU; posteriormente, se disectaron los lóbulos cerebrales sobre una solución acuosa de NaCl (0.7%) y colchicina (10^{-4} M) y se dejaron dos horas en oscuridad. Seguidamente se transfirieron durante diez minutos a una solución de citrato sódico (1%), y se fijaron en ácido acético-metanol (1:1) durante tres minutos, para proceder al squash en ácido acético glacial y finalmente acabar con un bandeo N.

Los resultados obtenidos muestran que bajo estas condiciones ENU, a la concentración 10mM, es un potente clastógeno ya que el 100% de las metafases observadas muestran al menos una aberración; a una concentración menor, 1mM, la clastogenicidad se reduce drásticamente.

NOTAS :

EL CONCEPTO DE MUTAGENESIS EN UNA INDUSTRIA FARMACEUTICA.

Vericat, Joan Albert.

Synthélabo Recherche, Département d'Étude sur la Sécurité du Médicament, Groupe de Toxicologie In vitro.

2-8, Route de Rouen - Z.I. de Limay-Porcheville, 78440 Gargenville, FRANCE.

La mutagénesis en la industria farmacéutica, excepto en ciertos casos característicos (p.e.: productos antitumorales), suele encontrarse en la fase de desarrollo de un nuevo producto. Es decir, la molécula ha sido ya seleccionada en los estudios de "screening" farmacológico y se encuentra en una fase dedicada a establecer su metabolismo, cinética, toxicología, etc. y a desarrollar los procesos productivos.

Si bien la investigación científica, como tal, no es ni básica ni aplicada, los objetivos de la misma pueden ser diferentes. Son precisamente estos objetivos lo que define la investigación como básica o aplicada: En investigación básica, sea en mutagénesis o sea en otros temas, los experimentos se suelen realizar para probar o rechazar una hipótesis y, según los resultados, establecer una nueva hipótesis para continuar avanzando en la comprensión de un problema determinado. En mutagénesis en particular o en toxicología en general, los estudios son destinados a decidir si el producto analizado "pasa" o "no pasa"; es decir, en todo momento hay que decidir si el producto es interesante y si vale la pena continuar la inversión que se hace. Para tomar estas decisiones poco importa el mecanismo por el que el producto causa un cierto efecto biológico (mutagénesis en este caso).

Si bien este tipo de actividad en mutagénesis es prioritaria (la economía de la industria depende de los productos que llegan al mercado) también se realiza una investigación más básica con dos objetivos bien diferentes. (1) Se analizan los resultados de los estudios de "screening" para obtener información estructura-actividad (ello es muy importante para el diseño molecular y la química combinatoria). (2) Se realizan estudios explicativos para establecer la causa de ciertos resultados obtenidos en los estudios de mutagénesis y/o carcinogénesis. Lógicamente, esta actividad permite establecer modelos experimentales que, una vez convalidados, son utilizados en desarrollo para tomar decisiones sobre si "pasa" o "no pasa".

Otra diferencia fundamental en la investigación industrial es la tendencia a la horizontalidad en los proyectos, utilizando muchas competencias diferentes. En la investigación académica suele primar la especialización de sector y la individualidad.

NOTAS :

INFLUENCIA DE LA ALQUILTRANSFERASA OGT DE *E. COLI* EN LA DISTRIBUCIÓN DE MUTACIONES INDUCIDAS POR PNU Y BNU.

Ferrezuelo, Francisco; Prieto-Alamo, María José; Jurado, Juan; Pueyo, Carmen.

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. CÓRDOBA.

Los agentes alquilantes forman un grupo amplio y heterogéneo de compuestos capaces de reaccionar con centros nucleofílicos de las moléculas orgánicas, transfiriéndoles un grupo alquilo. Muchos de estos compuestos son mutágenos y carcinógenos muy utilizados como modelos en el estudio de los procesos mutagénicos y de reparación del ADN en distintos organismos. Un factor importante en la reactividad y especificidad de estos agentes es la longitud de la cadena alquílica. Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre estos compuestos han empleado principalmente agentes metilantes y etilantes.

Las ADN-alkiltransferasas (Atasas) son proteínas que reparan específicamente algunos de los daños inducidos por los agentes alquilantes. *E. coli* tiene dos Atasas: la proteína Ogt, de expresión constitutiva, y la proteína Ada, cuya síntesis se induce por exposición a dosis bajas de agentes metilantes potentes.

En este trabajo hemos analizado la influencia que la longitud de la cadena alquílica puede ejercer sobre la mutagénesis y la reparación de los daños inducidos por los agentes alquilantes. Para ello, hemos estudiado la respuesta mutagénica a propil- y butil-nitrosoureas (PNU y BNU, respectivamente) en estirpes bacterianas deficientes en Atasas, comparándolas con el correspondiente parental silvestre. Nuestros resultados indican un importante papel protector de Ogt frente a los efectos mutagénicos de estos agentes. Por el contrario, Ada no mostró papel protector alguno.

La especificidad mutagénica de PNU y BNU y la influencia de la reparación por Ogt se examinaron a nivel molecular analizando los espectros de mutación inducidos por ambos agentes en el gen *lac I* de estirpes Ogt⁺ y Ogt⁻. Ambos compuestos produjeron casi exclusivamente sustituciones de bases, la mayoría transiciones. Esto concuerda con su capacidad para inducir O⁶-alquilguanina y O⁴-alquiltimina y el papel de estos aductos en la generación de mutaciones mediante apareamientos erróneos. El análisis de distintos efectos de secuencia, y su comparación con resultados previos obtenidos con metil- y etil-nitrosoureas, sugiere que las alquilnitrosoureas reaccionan con el ADN de forma similar, independientemente de la longitud de la cadena alquílica, influidas por la base en 5'. No obstante, el grupo alquilo juega un importante papel en la modulación de la reparación efectuada por Ogt. En este caso, la influencia de la base en 3' fue más relevante.

FINANCIACIÓN: SAL91-0842-CE y PB91-0842 (CICYT); EV5V-CT91-0012 (EC)

NOTAS :

ESTRÉS OXIDATIVO EN *E. COLI*: INDUCCIÓN DEL REGULÓN OXYR.

Manchado, Manuel; Michán, Carmen; Abril, Nieves; Pueyo, Carmen.

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. CÓRDOBA.

En condiciones normales, las células presentan un equilibrio entre fuerzas pro- y anti-oxidantes. Se denomina estrés oxidativo al estado que se alcanza cuando aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y/ó estas no se eliminan correctamente. Las EROs pueden provocar graves alteraciones intracelulares, por ejemplo, mediante modificaciones de proteínas ya que oxidan diversos aminoácidos y destruyen grupos tioles.

E. coli responde a condiciones de estrés oxidativo usando reguladores que controlan la expresión de genes que participan directa o indirectamente en la defensa celular frente a las EROs. El principal regulador de este tipo es OxyR que controla la transcripción de los siguientes genes: *gorA* (glutación reductasa), *ahpFC* (las dos subunidades de la alquilhidroperoxidasa), *dps* (proteína que se une al ADN), *katG* (hidroperoxidasa I) y el propio *oxyR*.

En este trabajo se está estudiando la expresión de los distintos genes regulados por OxyR. Para ello, hemos construido estirpes mutadas en el gen *oxyR* cromosómico, que presentan expresión constitutiva (MOC25) ó son deficientes en dicho gen (MAX11). Se ha estudiado la actividad de las enzimas hidroperoxidasa I y II mediante ensayos enzimáticos en diferentes condiciones de activación.

Asimismo, se están cuantificando los niveles transcripcionales de los distintos genes controlados por OxyR en distintas fases de crecimiento, mediante la aplicación del sistema de GeneScan.

FINANCIACIÓN: PB95-0557-C02-01

NOTAS :

DESARROLLO DE NUEVAS CEPAS TEST DE *ESCHERICHIA COLI* WP2 PARA LA DETECCIÓN DE MUTACIONES INDUCIDAS POR LESIONES OXIDATIVAS EN EL DNA.

Blanco, Manuel; Urios, Amparo

FVIB, Instituto de Investigaciones Citológicas, Amadeo de Saboya 4, 46010 VALENCIA

Derivados activados del oxígeno pueden atacar al DNA y lesionarlo. Las lesiones oxidativas del DNA tienen la capacidad de generar mutaciones. Hemos desarrollado nuevas cepas test de *Escherichia coli* WP2, deficientes en la función OxyR, que muestran una gran sensibilidad a la inducción de mutaciones por agentes oxidantes. OxyR es un factor de transcripción que regula positivamente la expresión de genes que codifican enzimas antioxidantes (tales como catalasa-hidroxiperoxidasa I y alquil hidroxiperoxido reductasa). La mutagénesis detectada depende del mecanismo SOS y resulta, probablemente, de lesiones abásicas. Otras cepas test también desarrolladas son deficientes en la mutagénesis dependiente de SOS y en las glicosilasas MutY y MutM. Con estas cepas se han podido detectar mutaciones inducidas por la presencia en el DNA de lesiones 8-oxoguanina, ya sea tras el tratamiento con oxidantes (alquil hidroxiperoxidos) o con agentes carcinogénicos (benzopireno activado por la fracción S9 de hígado de rata). Las nuevas cepas se han revelado muy útiles para la detección de sustancias capaces de producir en el DNA lesiones premutagénicas de origen oxidativo. (Proyecto CICYT SAF97-0076).

Blanco et al. 1995, Mutation Res. 346:215-220

Urios et al. 1995, Mutation Res. 332:9-15

Urios y Blanco 1996, Mutation Res. 354:95-101

Urios y Blanco 1996, Mutation Res. 356:229-235

NOTAS :

ESTUDIO DEL EFECTO GENOTÓXICO DE LAS ACETOGENINAS SQUAMOCINA Y ANNONACINA, Y DE LA ROTENONA CON LOS ENSAYOS DE *SALMONELLA* / MICROSOMA Y CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS.

A. Guadaño, P. Escribano, A. González, C. Gutierrez y E. de la Peña

CSIC. Centro de Ciencias Medioambientales. c/ Serrano 115 dpdo. 28006 MADRID

Las acetogeninas annonaceas constituyen un conjunto de metabolitos secundarios, aislados de la familia Annonaceae. El interés de estos compuestos radica en su alta actividad biológica como insecticidas, antitumorales, citotóxicos, etc. Recientes trabajos han demostrado que el modo de acción de estos productos es a través de la inhibición del complejo I de la respiración mitocondrial.

Se realiza una valoración genotóxica de dos acetogeninas, squamocina y annonacina en el ensayo de *Salmonella*/microsoma con las cepas TA98 y TA100, con y sin activación metabólica y se han comparado los resultados con los obtenidos con la rotenona, un inhibidor clásico del complejo I. Con el fin de profundizar en el análisis genotóxico de estos productos se evaluó el potencial de la rotenona para inducir aberraciones cromosómicas (AC), intercambio de cromátidas hermanas (SCE) y micronúcleos (MN) en linfocitos de sangre periférica humana.

Los resultados obtenidos indican que ninguno de los compuestos presenta actividad mutagénica a las dosis ensayadas. Sin embargo las dos acetogeninas presentan un marcado efecto tóxico en ambas cepas en ausencia de activación metabólica. En presencia de activación metabólica este efecto se suprime indicando una posible detoxificación de estos productos que daría lugar a metabolitos inactivos. La rotenona no presenta efectos tóxicos a las concentraciones empleadas en *S.typhimurium*; no induce AC ni SCE en linfocitos humanos, sin embargo produce alteraciones en el ciclo celular y un aumento en la frecuencia de MN.

NOTAS :

EL ENSAYO DEL COMETA APLICADO A DROSOPHILA.

Gaivao, I., Rodríguez, A., Sierra, L.M. y Comendador, M.A.

Area de Genética. Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. 33006 OVIEDO.

El ensayo SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis), conocido como ensayo del cometa, se desarrolló como un medio rápido y barato para estimar daño en el DNA inducido por agentes físicos o químicos, ya que detecta roturas de cadena y sitios álcali-lábiles en células individuales. Este ensayo se ha aplicado, casi exclusivamente a células de mamíferos, principalmente linfocitos y cultivos celulares, si bien también se ha utilizado con otros sistemas, incluyendo plantas.

Con la idea de determinar la eficacia de este ensayo en *D. melanogaster*, especie para la que se dispone de otros ensayos somáticos, bien conocidos pero más laboriosos, se puso a punto una técnica para individualizar células de cerebros larvales que posteriormente se trataron mediante las técnicas estándar del ensayo del cometa. En los experimentos se ha utilizado la línea Berlin K, eficiente para reparación, y se han ensayado dos compuestos químicos con diferente modo de acción: etilnitrosourea y metilmetanosulfonato. Los dos compuestos produjeron un incremento significativo, respecto de las células control, tanto de la frecuencia de células con cometa como del momento de la cola del cometa.

Se concluye, por tanto, que el ensayo del cometa es una herramienta potencialmente útil para estimar daño en células somáticas de *D. melanogaster*. La importancia de esta conclusión estriba en que la comparación de los resultados obtenidos con este ensayo con los que proporcionan otros ensayos somáticos, bajo distintas condiciones, por ejemplo de reparación, permitirá un mejor conocimiento de los mecanismos implicados en la genotoxicidad de compuestos químicos.

NOTAS :

DAÑO Y REPARACIÓN DEL DNA EN HEPATOCITOS DE RATÓN, UTILIZANDO EL ENSAYO "COMETA", DESPUÉS DE TRATAMIENTOS *IN VIVO* CON DISTINTAS DOSIS DE RADIACIÓN γ .

Pilar Carrera, Marta de Miguel y Matilde H. Navarrete.

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049-MADRID.

El DNA está sometido a daño oxidativo producido por radicales libres que pueden tener diversos orígenes, desde una radiación ionizante hasta productos del metabolismo respiratorio, por ejemplo. La respuesta a este daño así como la puesta en marcha y la eficacia de los mecanismos de reparación son distintos de un tipo celular a otro y difieren según el estado en que se encuentre la célula (proliferante o no proliferante).

En este trabajo hemos estudiado el efecto de la radiación γ sobre el tejido hepático de ratones expuestos *in vivo* a la irradiación así como la reparación que ocurre en los hepatocitos durante las dos horas siguientes al tratamiento.

Los ratones fueron sometidos a 0.5 o 1 Gy o dejados como control. El hígado se extrajo inmediatamente después de la irradiación (h0) o pasadas una (h1) o dos (h2) horas de recuperación. En todos los casos se obtuvieron núcleos aislados de hepatocitos que fueron sometidos al ensayo cometa en condiciones alcalinas. De cada una de las situaciones experimentales se tomaron 80 imágenes de cometas teñidos con bromuro de etidio, con una cámara de vídeo CCD adaptada a un microscopio de fluorescencia. Para valorar el daño genómico se utilizó el parámetro "% de brillo en la cola", que correlaciona con el DNA desplazado a la cola, mediante un programa de análisis de imagen. Los cometas se clasificaron en 5 tipos, de A a E, según su daño (el % de brillo en la cola en A<7% y en E>30%). El análisis estadístico de las muestras indica que hay una diferencia muy significativa entre el control y las h0 de las dosis 0.5 y 1 Gy. Después de 2 horas de recuperación el daño provocado por 0.5 Gy de radiación γ se ha reparado casi totalmente. Con 1 Gy el daño remanente después de 2 horas es todavía apreciable. Esta metodología permite valorar con bastante precisión y rapidez el daño provocado en el DNA así como la eficacia de los mecanismos de reparación existentes en el tipo celular empleado.

NOTAS :

OBTENCIÓN DE NÚCLEOS DE HEPATOCITOS DE RATÓN A PARTIR DE TEJIDO SÓLIDO Y SU ANÁLISIS POR EL ENSAYO "COMETA".

Marta de Miguel¹, Pilar Carrera¹, Consuelo de la Torre² y José López¹.

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049-MADRID. ²:Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Velázquez, 144 ; 28006-MADRID.

En este trabajo se demuestra la posibilidad de obtener directamente núcleos aislados a partir de un tejido sólido, en este caso hígado de ratón. Hemos elegido los hepatocitos por ser un tipo celular ideal para la valoración del daño en el DNA provocado por numerosos agentes genotóxicos.

El hígado se extrae inmediatamente después de la muerte del animal y se mantiene durante 15 min en solución fisiológica sobre hielo. Con una cuchilla bien afilada se corta un pequeño fragmento dejando una superficie de 2mm² y con ella se hace contacto sobre una gota de tampón Sorensen a pH 7,2 en un porta frío. De esta forma se extraen hasta 500 núcleos. Hemos comparado los núcleos así obtenidos, una vez teñidos con Giemsa, con los que aparecen en cortes de tejido hepático de ratón y no se encuentran diferencias apreciables. Los núcleos aislados fueron sometidos inmediatamente al ensayo cometa (SCGE, electroforesis de células aisladas en microgeles) en condiciones alcalinas para valorar el daño genómico existente. Esta técnica tiene una gran sensibilidad y pequeñas variaciones experimentales pueden alterar los resultados, especialmente las condiciones de la electroforesis, por eso es necesario fijar y mantener las condiciones óptimas de trabajo.

Para valorar el daño genómico los núcleos se tiñeron después de la electroforesis con bromuro de etidio, se observaron al microscopio de fluorescencia, se tomaron imágenes con una cámara CCD y, mediante un programa de análisis de imagen, se determinó el % de DNA localizado en la cola de cada cometa. Aunque la mayoría de los núcleos procedentes de tejido control apenas presentan cola, hemos encontrado que siempre aparece una pequeña proporción de cometas con una cola apreciable. Este hecho no es exclusivo de hepatocitos y, en nuestra opinión, va a depender del tipo celular utilizado y de las condiciones experimentales empleadas.

NOTAS :

UTILIZACIÓN DEL ENSAYO DEL COMETA (SCGE) EN LA BIOMONITORIZACIÓN DE PACIENTES TRATADOS CON YODO-131.

Gutiérrez, Sara; Carbonell, Elisabet; Galofré, Pere¹; Creus, Amadeu; Marcos, Ricard
 Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra. ¹Servei de Medicina Nuclear, Ciutat Sanitària i Universitària Vall d'Hebron, Pg. Vall d'Hebron 119, 08035 BARCELONA.

El ensayo del cometa es un método sencillo y rápido que permite la detección de roturas de simple y doble cadena, así como de puntos álcali-lábiles del DNA. La mayoría de los resultados descritos *in vitro* demuestran la alta sensibilidad de este ensayo en comparación con otras técnicas convencionales de evaluación genotóxica. Esto ha conducido a que varios autores propongan su uso en la biomonitorización de poblaciones expuestas. Para contribuir a la validación del ensayo del cometa en estudios de biomonitorización, se ha realizado una evaluación del posible efecto genotóxico, inducido por la exposición terapéutica al yodo-131, mediante el análisis de la longitud y el grado de DNA dañado de la cola del cometa en células sanguíneas de 2 grupos: **a)** un grupo de 16 pacientes con hipertiroidismo que recibieron, por administración oral, un promedio de $438,91 \pm 41,06$ MBq; el análisis se efectuó en 3 momentos distintos: antes del tratamiento y una semana y un mes después del mismo; **b)** un grupo de 28 pacientes de cáncer de tiroides a quienes, después de la extirpación del tiroides, se les administró un promedio de $4167,37 \pm 112,62$ MBq; el análisis se efectuó antes del tratamiento y al cabo de una semana. Después de los tratamientos, los resultados muestran, en ambos grupos, un débil aumento de la longitud de la cola, que llega a ser significativo tan sólo en la muestra obtenida al cabo de un mes del tratamiento en el grupo de hipertiroidismo. Cuando se clasifican las células en función del grado de daño, todas las muestras post-tratamiento muestran un incremento significativo de células altamente dañadas. Teniendo en cuenta nuestros estudios previos, utilizando el ensayo de micronúcleos (MN), que mostraron un claro efecto genotóxico del yodo-131, los resultados obtenidos en este estudio indicarían que la mayoría de las lesiones inducidas por este radioisótopo, potencialmente detectables por el ensayo del cometa, han sido reparadas casi en su totalidad.

NOTAS :

EFFECTOS DEL POLIMORFISMO DEL GEN GSTT1 Y ACCIÓN DEL GLUTATIÓN SOBRE EL DAÑO GENÉTICO INDUCIDO POR EL BENCENOTRIOL UTILIZANDO EL ENSAYO DEL COMETA (SCGE).

Pitarque, Marià; Carbonell, Elisabet; Creus, Amadeu; Marcos, Ricard

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

El bencenotriol (BT) es, en términos cuantitativos, un metabolito menor del benceno, pero parece ser que juega un papel importante en la genotoxicidad y carcinogenicidad de este último. El BT es un metabolito muy inestable y se oxida rápidamente, dando lugar a especies reactivas de oxígeno que pueden producir roturas de cadena sencilla del DNA y dañar otras macromoléculas celulares. Además, los productos de la oxidación del BT, algunas quinonas y radicales de semiquinonas, pueden también causar daño genético mediante la formación de aductos en el DNA y la alteración de los microtúbulos.

El glutatión (GSH), como agente reductor en el interior de las células, confiere una protección frente a los radicales libres de oxígeno y, por otro lado, participa como coenzima en las reacciones catalizadas por las glutatión S-transferasas (GST) que tienen lugar en las últimas fases del metabolismo de diferentes xenobióticos, conjugándose con sus metabolitos para producir sustancias no tóxicas fácilmente eliminables por el organismo. Así, la acción conjunta del GSH y las GST constituye uno de los sistemas más importantes para impedir que los distintos compuestos electrofílicos desencadenen un proceso mutagénico/cancerígeno.

Con la intención de evaluar el daño genético inducido por el BT (a las concentraciones de 5, 10, 25 y 50 mM) en linfocitos humanos aislados y comprobar si la presencia de GSH (350 mg/ml) es capaz de modular esta respuesta genotóxica, hemos utilizado el ensayo de la electroforesis alcalina en gel de células aisladas (SCGE), conocido también como ensayo del cometa, que se ha mostrado muy sensible para detectar roturas de cadena sencilla del DNA. Además, se ha tenido en cuenta el genotipo GSTT1 (normal o nulo) de los donantes para averiguar si existe una diferente susceptibilidad individual frente a la acción potencialmente genotóxica del BT.

NOTAS :

POTENCIACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE UN TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE TOPOISOMERASAS EN CÉLULAS CHO6 PRETRATADAS CON 5-AZAC.

López Baena, Manuela; Piñero, Joaquín; Mateos, Santiago; Ortiz, Trinidad y Cortés, Felipe.
Departamento de Biología Celular, Universidad de Sevilla. Avda.Reina Mercedes s/n 41012-SEVILLA, Tfno (95) 4557045.

Las topoisomerasas de ADN son enzimas que catalizan los cambios topológicos que sufren las moléculas de ADN en procesos metabólicos tan importantes como la replicación, la transcripción, la reparación, la recombinación, etc.

Estas enzimas son el blanco celular de una serie de drogas ampliamente utilizadas en la terapia antitumoral, conocidas como venenos antitopoisomerasas, sin embargo, estos venenos presentan un amplio espectro de efectos secundarios negativos.

Mediante la utilización del agente hipometilante 5-azacitidina (5-azaC) hemos desarrollado un protocolo experimental que nos permitió potenciar la efectividad de un tratamiento con venenos antitopoisomerasas. La 5-azaC provocó un adelanto en la replicación desde S tardío a S temprano del ADN correspondiente a la heterocromatina constitutiva de la línea CHO6, y por lo tanto un aumento en el número de orígenes de replicación activos en S temprano susceptibles de ser bloqueados por los venenos antitopoisomerasas.

Tanto el daño cromosómico como la muerte celular reproductiva inducidos por un tratamiento con inhibidores de topoisomerasas fueron potenciados en células que previamente habían sido tratadas con 5-azaC. Esta potenciación de la capacidad clastogénica y citotóxica de los venenos antitopoisomerasas se relacionó con un incremento en la cantidad y en la actividad tanto de la topoisomerasaI como de la topoisomerasaII.

NOTAS :

MICRONÚCLEOS Y ASIMETRÍA FLUCTUANTE EN TRUCHA COMÚN (*SALMO TRUTTA*): MÉTODOS COMPLEMENTARIOS PARA BIOMONITORIZAR *IN SITU* ECOSISTEMAS ACUÁTICOS.

Sánchez Galán, Sonia; Linde, Ana Rosa; Izquierdo, Jorge I.; García Vázquez, Eva
Dpto. Biología Funcional. Área de Genética. Universidad de Oviedo, 33071 OVIEDO.

En este trabajo, se capturaron ejemplares de trucha común en distintos ecosistemas fluviales de Asturias caracterizados por presentar diferentes niveles de contaminación acuática. En las truchas, se analizaron dos variables: el número de micronúcleos por cada 1.000 eritrocitos renales, y la asimetría fluctuante. Las muestras de trucha procedentes de ríos con alto índice de contaminación presentaron valores medios de micronúcleos y de asimetría fluctuante significativamente superiores que las truchas capturadas en ríos menos contaminados. Estos resultados demuestran la sensibilidad del test del micronúcleo como bioindicador de contaminación *in situ* para ecosistemas acuáticos. Por otra parte, la asociación positiva encontrada entre el número medio de micronúcleos y la asimetría fluctuante a nivel muestral sugiere que los tests de asimetría fluctuante podrían ser potenciales indicadores de daño ambiental. Finalmente, la variación de la asimetría de los peces con la edad indica que los estudios de asimetría fluctuante en poblaciones naturales deberían ser llevados a cabo en truchas de la misma clase de edad.

NOTAS :

INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS POR CADMIO EN ESPECIES PISCÍCOLAS: DIFERENCIAS INTERESPECÍFICAS.

Ayllón Gómez, Fernando; Linde Arias, Ana Rosa; Sánchez Galán, Sonia; García Vázquez, Eva

Dpto. Biología Funcional. Área de Genética. Universidad de Oviedo, 33071 OVIEDO.

Se han inyectado intraperitonealmente dosis simples y dobles de cadmio a ejemplares de dos especies piscícolas, una de agua fría (*Phoxinus phoxinus*) y otra tropical (*Poecilia spp*); los individuos considerados como controles fueron inyectados con solución salina. El recuento de micronúcleos en eritrocitos renales indica que el cadmio indujo la formación de micronúcleos en ambas especies, ya que el número medio de micronúcleos por cada 1.000 eritrocitos fue significativamente superior en los peces inyectados con cadmio que en los controles. La media de micronúcleos fue mayor en los ejemplares de cada especie sometidos a doble dosis que en los inyectados con dosis simples, lo cual indica que el cadmio tiene un efecto genotóxico dosis-dependiente. Clasificando los micronúcleos según su morfología, se comprobó que el tipo de micronúcleos inducidos por el cadmio fue diferente en ambas especies, sugiriendo que tienen distinta sensibilidad frente al cadmio. Los resultados se discuten en relación al tipo de efecto de este metal sobre las divisiones celulares en las dos especies analizadas.

NOTAS :

ESTUDIO DE LA RESPUESTA A LA BLEOMICINA EN LINFOCITOS DE PACIENTES TRATADOS CON YODO-131, UTILIZANDO EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS (MN).

Gutiérrez, Sara; Carbonell, Elisabet; Galofré, Pere¹; Creus, Amadeu; Marcos, Ricard
Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra. ¹Servei de Medicina Nuclear, Ciutat Sanitària i Universitària Vall d'Hebron, Pg. Vall d'Hebron 119, 08035 BARCELONA.

Varios estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, han puesto de manifiesto que en distintos tipos celulares una exposición previa a bajas dosis de radiación ionizante puede conferir una menor susceptibilidad a la acción mutagénica/genotóxica de una exposición posterior a dosis más altas de radiación o de agentes radiomiméticos. Por otro lado, algunos estudios epidemiológicos han indicado una relación entre hipersensibilidad a determinados mutágenos y aumento del riesgo de cáncer.

Con la finalidad de analizar la susceptibilidad a la acción de la bleomicina, tanto antes como después de una exposición terapéutica a la radiación ionizante, se ha llevado a cabo un análisis citogenético mediante el ensayo de MN en dos grupos de pacientes (hipertiroidismo y cáncer de tiroides), tratados con distintas actividades del isótopo radiactivo yodo-131. Los cultivos de linfocitos de sangre periférica se realizaron, para ambos grupos, una semana antes del tratamiento y una semana después. Una tercera muestra fue analizada un mes después del tratamiento en el grupo de hipertiroidismo y 6 meses después en el grupo de cáncer de tiroides. Para las distintas muestras se realizaron cultivos con y sin bleomicina y, para la evaluación de los resultados obtenidos, se compararon las frecuencias de células binucleadas con micronúcleos (BNMN), antes y después de la terapia radiactiva. Asimismo, también se compararon entre sí los valores obtenidos antes del tratamiento en los dos grupos de pacientes estudiados.

NOTAS :

ANÁLISIS MEDIANTE LA TÉCNICA DEL "CHROMOSOME PAINTING" DEL EFECTO DEL ARA-C SOBRE LAS LESIONES INDUCIDAS *IN VITRO* POR LA BLEOMICINA.

Puerto, Silvia; Surrallés, Jordi; Carbonell, Elisabet; Creus, Amadeu; Marcos, Ricard

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

Durante muchos años se ha investigado la implicación de las diferentes lesiones inducidas en el DNA en la formación de las aberraciones cromosómicas. Diferentes estudios muestran que las roturas de doble cadena (DSBs) son las lesiones más involucradas. Sin embargo, no está claro si a partir de las otras lesiones inducidas en el DNA también se pueden generar DSBs, como consecuencia de algún paso de la reparación celular. En este sentido, se ha investigado la inducción de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos, bajo la influencia de inhibidores de los enzimas de reparación del DNA.

El arabinósido de citosina (Ara-C) es un análogo de la citosina que inhibe por competición a las DNA polimerasas α y δ . Para determinar el efecto del Ara-C sobre las lesiones inducidas por la bleomicina, se establecieron cultivos de linfocitos con diferentes concentraciones de bleomicina con y sin Ara-C, paralelamente. El análisis cromosómico se llevó a cabo empleando la técnica del pintado cromosómico ("chromosome painting"). La hibridación *in situ* se efectuó utilizando sondas específicas para los cromosomas 1 y 4, marcadas directa e indirectamente. Estos cromosomas representan, respectivamente, el 8,4% y el 6,3% del genoma humano. Los resultados obtenidos hasta el momento parecen indicar que el Ara-C no afecta significativamente a la reparación de las lesiones inducidas por la bleomicina. Por otra parte, se observa que el cromosoma 1 es más sensible al efecto clastogénico del Ara-C. Este comportamiento tiende a repetirse en la mayoría de los cotratamientos efectuados con bleomicina y Ara-C.

NOTAS :

DETECCIÓN MEDIANTE FISH INTERFÁSICO DE LA INDUCCIÓN DE LOS EFECTOS CLASTOGÉNICOS Y ANEUGÉNICOS DEL I¹³¹ EN PACIENTES CON CÁNCER DE TIROIDES.

Ramírez, M^a José¹; Surrallés, Jordi¹; Galofré, Pere²; Creus, Amadeu¹; Marcos, Ricard¹

¹Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra. ²Servei de Medicina Nuclear, Ciutat Sanitària i Universitària Vall d'Hebron, Pg. Vall d'Hebron 119, 08035 BARCELONA.

En los últimos años se ha detectado un aumento del cáncer de tiroides entre los niños expuestos a la radiación como consecuencia del accidente de la central nuclear de Chernobyl. Este hecho se ha relacionado con una elevada exposición al yodo radiactivo, especialmente al I¹³¹. De todas maneras, no se conoce demasiado sobre los efectos genotóxicos de la exposición al I¹³¹ en humanos. Este radioisótopo se utiliza rutinariamente en la terapia de los pacientes con cáncer de tiroides, por lo que este colectivo ofrece una oportunidad única para estudiar los daños citogenéticos inducidos por dosis bien conocidas de I¹³¹. En este estudio analizamos el daño citogenético inducido por el I¹³¹ en linfocitos de mujeres con cáncer de tiroides tratadas con dicho radioisótopo, utilizando técnicas de FISH interfásico con dos sondas: (i) sonda pancentromérica, que hibrida con los centrómeros de todos los cromosomas humanos, para conocer el origen de los micronúcleos, ya sean fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros; y (ii) sonda centromérica específica para el cromosoma X, para detectar no-disyunción cromosómica en células binucleadas y anomalías numéricas en células mononucleadas. Las muestras de sangre se tomaron antes del tratamiento y una semana después. Los resultados obtenidos indican que el I¹³¹ induce efectos clastogénicos claros y efectos aneugénicos sólo en las pacientes de mayor edad. También se observa que el cromosoma X no está implicado preferentemente en los efectos aneugénicos inducidos por el I¹³¹. Se concluye, pues, que el principal efecto inducido es la rotura cromosómica, aunque también puede producir una acción aneugénica, independiente del cromosoma X, de forma más acusada en las pacientes de edad más avanzada, al tener mayor tendencia a la pérdida cromosómica.

NOTAS :

ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DEL GEN XIST EN CÉLULAS SOMÁTICAS Y DEL EFECTO DE POSICIÓN EN TRANSLOCACIONES CROMOSOMA X-AUTOSOMA.

Surrallés, Jordi^{1,2}; Natarajan, Adayapalam T.¹

¹Department of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis, Leiden University, THE NETHERLANDS. ²Dirección actual: Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra. BARCELONA.

La extensión de la inactivación del cromosoma X inactivo (Xi) a genes autosómicos podría causar descompensación génica, con posibles consecuencias sobre la viabilidad y la transformación celular. El gen XIST (Xi specific transcripts) controla la iniciación y la extensión en *cis* del proceso de inactivación a lo largo del Xi durante la embriogénesis temprana. En este trabajo hemos analizado translocaciones entre el Xi y autosomas, inducidas *de novo*, tanto en linfocitos humanos cariotípicamente normales (46XX) como en células linfoblastoides con 3 Xi (49XXXXY), para ver el mantenimiento y extensión de la inactivación del cromosoma X respecto a la posición relativa del gen XIST. Las translocaciones del cromosoma X se detectaron por *painting* FISH y el estado de activación de los cromosomas involucrados se determinó simultáneamente usando técnicas de inmunocitogenética con anticuerpos contra la histona H4 acetilada (marcador de expresión génica) o contra BrdU incorporada al final de la fase S (marcador del Xi, que es de replicación tardía). La posición relativa, en *cis* o *trans*, del gen XIST (mapeado en Xq13) en los productos recíprocos de la translocación se localizó creando el patrón de bandas DAPI con un analizador de imágenes o, alternativamente, por FISH específico del gen XIST. Nuestro estudio proporciona evidencias visuales de que: (i) la inactivación no se extiende a autosomas translocados, independientemente de la posición del gen XIST, (ii) el gen XIST ni se requiere ni es suficiente en *cis* para mantener o inducir la inactivación y (iii) el mantenimiento de la inactivación es altamente estable y se controla de forma totalmente epigenética.

NOTAS :

POSIBLE RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE TOPOISOMERASAS I Y II Y LA REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN INDUCIDO POR RADIACIÓN IONIZANTE.

Pastor, Nuria; Piñero, Joaquín, de Miguel-Rodríguez Manolo¹ y Cortés, Felipe.

Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avda. Reina Mercedes s/n 41012 SEVILLA.

¹*Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla. Avda. Sánchez-Pizjuan s/n 41009 SEVILLA.*

Las topoisomerasas de ADN son enzimas nucleares que promueven la transformación topológica del ADN por rotura y reunión de enlaces fosfodiéster. Las topoisomerasas I y II tienen un importante papel en los procesos de replicación, transcripción, recombinación y segregación de moléculas hermanas durante la mitosis.

En los últimos años, se ha propuesto la posible implicación de las topoisomerasas de ADN en la reparación del daño producido por radiación en el ADN. Las células mutantes sensibles a radiaciones ionizantes presentan distintos grados de capacidad de reparación y de hipersensibilidad al daño provocado por rayos X o gamma. Una característica común, pero no universal, de los mutantes de rayos X es un defecto de la tasa de reparación de las roturas de cadena de ADN.

En este trabajo hemos analizado las actividades topoisomerasas en distintas líneas mutantes de roedores sensibles a rayos X y sus correspondientes líneas parentales, tanto en condiciones control como después de la exposición a radiación ionizante, con el fin de establecer diferencias, pudiendo así relacionarlas con el papel de las topoisomerasas en la reparación del daño por radiación, muy importante en la terapia antitumoral.

Debido a que los niveles de topoisomerasa II no se mantienen constantes a lo largo del ciclo celular los hemos estudiado en las distintas fases del ciclo (M, G1, S, G2) a partir de cultivos celulares sincrónicos obtenidos por "shake off" y analizado por citometría de flujo.

NOTAS :

ESTUDIO DE MUTAGÉNESIS IN VIVO INDUCIDA POR EXPOSICIÓN A RAYOS X EN UN MODELO DE RATONES TRANSGÉNICO.

Martín, Laura; Sierra, Inmaculada; Real, Almudena; de Vidania, Rosa; Bauluz, Cristina.

CIEMAT (Departamento de Impacto Ambiental de la Energía). Avenida Complutense nº 22, 28040 MADRID.

Está generalmente aceptado que en la carcinogénesis inducida por radiaciones ionizantes, el evento inicial desencadenante del proceso son las mutaciones introducidas en genes críticos y producidas como consecuencia de la interacción directa de la radiación con el DNA o a través de especies de oxígeno reactivas que en última instancia modifican al DNA.

Aunque el efecto mutagénico inducido por radiaciones ionizantes ha sido estudiado ampliamente *in vitro* tanto en bacterias y levaduras como en cultivos celulares, no es fácil analizar el potencial mutagénico de éstas *in vivo*. Sin embargo, la existencia de ratones transgénicos conteniendo genes marcadores permite determinar las frecuencias de mutación inducidas en dichos genes como consecuencia de una agresión.

En este trabajo se describe la respuesta a radiaciones ionizantes del ratón transgénico Muta Mouse, portador del gen lac Z, integrado dentro del DNA del fago Lambda, como marcador incorporado al genoma del animal.

Utilizando este modelo se han analizado las frecuencias de mutación inducidas en hígado y bazo después de irradiaciones agudas (rayos X) de cuerpo entero a 1 y 4 Gy. A partir de los ratones irradiados, se aisló el DNA genómico de los tejidos del ratón, se rescató el DNA que contiene el gen lac Z y se produjeron fagos Lambda infectivos. La frecuencia de mutación se determinó infectando una estirpe de E. Coli (lac⁻ gal E⁻) que permite, posteriormente, llevar a cabo una selección positiva de los genes lac Z que han sufrido mutación por el agente agresor. La relación del número total de fagos lac Z en la muestra y el número de fagos lac Z mutados nos permitió establecer la frecuencia de mutación de la radiación ionizante. Este modelo permite realizar el análisis comparativo de la frecuencia de mutación en distintos tejidos del animal irradiado.

Puesto que las mutaciones pueden acumularse en un tejido dependiendo de la respuesta de los mecanismos de reparación y la velocidad de proliferación del tejido afectado, fueron determinadas las frecuencias de mutación a diferentes tiempos después de la irradiación (3 - 62 días) para determinar la cinética del proceso.

Los resultados experimentales obtenidos hasta el momento, indican que en hígado se produce un aumento de mutaciones hasta los días 15 y 20 postirradiación, tras una dosis aguda de 1 y 4 Gy, respectivamente. En bazo, tras una dosis de 1 Gy, la frecuencia de mutación a lo largo del tiempo analizado se mantiene en un valor cercano a la frecuencia de mutación espontánea, mientras que tras 4 Gy se observa un incremento de la frecuencia de mutación que tiene su máximo a los 7 días postirradiación, estabilizándose posteriormente en valores próximos a los controles.

NOTAS :

ALTERACIONES CELULARES EN SANGRE PERIFÉRICA INDUCIDAS POR RADIACIÓN IONIZANTE EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE p53.

Casado, José Antonio; Bauluz, Cristina; de Vidania, Rosa; Real, Almudena.

CIEMAT. Departamento de Impacto Ambiental de la Energía. Avd. Complutense 22. 28040 MADRID.

Con objeto de profundizar en la caracterización de los procesos de oncogénesis inducidos por exposición a radiación ionizante, se ha seleccionado un modelo de ratones *knockout* para el gen supresor de tumores p53, especialmente sensible al desarrollo de cáncer radioinducido. En este modelo se están realizando estudios *in vivo* sobre alteraciones celulares y moleculares inducidas por exposición a radiación ionizante presumiblemente implicadas en el desarrollo de cánceres hematológicos. Inicialmente se han estudiado alteraciones en las células de sangre periférica de ratones tanto normales como deficientes para p53, tras exposición a dosis moderadas y altas de radiación ionizante.

Ratones hembras (C57BL/6xDBA) de 13 semanas normales para p53 (p53+/+) o deficientes para el gen (heterocigotos p53+/- y homocigotos p53-/-), se irradiaron con dosis agudas de rayos X (1 y 4Gy) con una tasa de dosis de 104 rads/min. A distintos tiempos pos-irradiación, semanalmente durante dos meses, se extrajo sangre periférica y se analizó el contenido de leucocitos y eritrocitos, así como las características morfológicas de las poblaciones celulares según los parámetros de tamaño y complejidad celular. Los animales se mantuvieron en observación y en caso de aparición de tumores se sacrificaron y se extrajeron los órganos de interés para analizar el fenotipo celular y la expresión génica.

Los resultados mostraron una mayor radiorresistencia en los primeros días pos-irradiación de los leucocitos de ratones p53 -/- con respecto a los p53 +/+ , especialmente tras irradiación con 4Gy. La radiorresistencia de los leucocitos de ratones p53+/- no mostró diferencias significativas respecto a los p53+/. No se detectaron diferencias en el contenido de eritrocitos entre las tres cepas, independientemente de la dosis de radiación utilizada. Los análisis citométricos no mostraron diferencias en la morfología de células de sangre periférica, independientemente de la cepa y de la dosis de radiación. En los seis meses transcurridos desde el inicio del experimento, los ratones p53 +/+ tanto irradiados como control no han desarrollado tumores. Todos los ratones p53 +/- irradiados con 4Gy desarrollaron linfoma de timo a los 3-6 meses pos-irradiación, si bien los controles y los irradiados con 1Gy no desarrollaron tumores. En contraste, todos los ratones p53 -/-, tanto irradiados como no irradiados, desarrollaron linfoma de timo durante los dos primeros meses de estudio. En la sangre periférica de estos ratones p53-/- con linfoma de timo se detectó mediante análisis citométrico la presencia de células morfológicamente anormales respecto a las observadas en ratones sin tumor.

La aumentada radiorresistencia de los leucocitos de ratones p53 -/- descrita, confirma el efecto que ya habíamos observado en estudios previos con precursores de médula ósea. Los periodos de latencia del tumor en ratones p53+/- se acortaban como consecuencia de la irradiación con dosis altas, fenómeno que no se observó en p53-/-, a ninguna de las dosis ensayadas. En la actualidad se está caracterizando la población de células anómalas de sangre, detectada en ratones p53-/- con linfoma de timo, a nivel de marcadores de superficie específicos de linaje y de estadio de diferenciación, ciclo celular y ploidía.

NOTAS :

LISTA DE PARTICIPANTES.

AGUILERA LÓPEZ, ANDRÉS
ÁLVAREZ FERNÁNDEZ, LIDIA
AYLLÓN GÓMEZ, FERNANDO
BALDRICH RUBIO, EVA
BLANCO PÉREZ, MANUEL
CABRÉ FABRÉ, ORIOL
CARBONELL TERUEL, ELISABET
CARRERA AGUDO, PILAR
CASADO OLEA, JOSÉ ANTONIO
COMENDADOR GARCÍA, MIGUEL ANGEL
CORTÉS BENAVIDES, FELIPE
CREUS CAPDEVILA, AMADEU
DÍAZ-VALDÉS FARRAY, NANCY
FERREZUELO MUÑOZ, FRANCISCO
GAIVAO, ISABEL
GARCÍA VÁZQUEZ, EVA
GUTIÉRREZ ENRÍQUEZ, SARA
IZQUIERDO GUTIÉRREZ, JORGE
LEÓN ANDRÉS, JUSTINO
LINDE ARIAS, ANA ROSA
LÓPEZ BAENA, MANUELA
LÓPEZ CASTEL, ARTURO
MANCHADO CAMPAÑA, MANUEL
MARCOS DAUDER, RICARDO
MARTÍN INIESTA, LAURA
MICHÁN DONA, CARMEN MARÍA
DE MIGUEL SÁNCHEZ, MARTA
PASTOR CARRILLO, NURIA
PENA ALONSO, EMMA
DE LA PEÑA DE TORRES, EDUARDO
PIÑERO BUSTAMANTE, JOAQUÍN
PITARQUE MARTÍ, MARÍA
PUERTO NAVARRO, SILVIA
PUEYO DE LA CUESTA, CARMEN
RAMÍREZ DE HARO, MARÍA JOSÉ
REAL GALLEGO, ALMUDENA
RODRÍGUEZ CEA, ANDRÉS
RUEFF, JOSÉ
SÁNCHEZ GALÁN, SONIA
SIERRA ZAPICO, MARÍA
SORIANO VALVERDE, SILVIA
SUÁREZ FIGUERAS, SUSANA
SUEIRO BENAVIDES, ROSA ANA
SURRELLÉS CALOGNE, JORDI
TOSAL PELÁEZ, LUIS
VELÁZQUEZ HENAR, M^a ANTONIA
VERICAT SACRISTA, JOAN ALBERT

Apellido y Nombre	ZAMORA	INDICE
Alfonso, C.		
Alfonso, M.	6, 13	
Alfonso, R.	12, 21	
Alfonso, S. de la	14, 20	
Alfonso, J.	15, 16, 22, 29	
Alfonso, J. C.	14, 20	
Alfonso, M.	13, 23	
Alfonso, J.	14, 18, 21	
Alfonso, Ana, M.J.	25, 26	
Alfonso, J.	20, 21, 24, 25	
Alfonso, G.	6, 22, 17, 20, 23, 24	
Alfonso, M.J.	25, 26, 27	
Alfonso, A.	26, 31, 32	
Alfonso, J.	31, 32	
Alfonso, A.	32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39	
Alfonso, J.	38, 39, 40	
Alfonso, J.	41, 42	
Alfonso, J.	43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51	
Alfonso, J.	51, 52	
Alfonso, J.	53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100	
Alfonso, J.	91, 92	
Alfonso, J.	93, 94	
Alfonso, J.	95, 96	
Alfonso, J.	97, 98	
Alfonso, J.	99, 100	

ÍNDICE DE AUTORES

NOMBRE	PÁGINAS
Abril, N.	4, 24
Aguilera, A.	5, 10
Álvarez, L.	3, 19
Ayllón, F.	6, 34
Baldrich, E.	3, 14
Bauluz, C.	6, 40, 41
Blanco, M.	4, 25
Cabré, O.	3, 14, 15, 16
Carbonell, E.	5, 6, 30, 31, 35, 36
Carrera, P.	5, 28, 29
Casado, J.A.	6, 41
Chávez, S.	5, 10
Comendador, M.A.	3, 4, 5, 18, 19, 20, 21, 27
Cortés, F.	5, 6, 32, 39
Creus, A.	5, 6, 30, 31, 35, 36, 37
Díaz-Valdés, N.	3, 18
Duarte Silva, I.	3, 9
Escribano, P.	4, 26
Ferrezuelo, F.	4, 23
Gaivao, I.	5, 27
Galofré, P.	5, 6, 30, 35, 37
García-Vázquez, E.	6, 33, 34
Gaspar, J.	3, 9
González, A.	4, 26
Guadaño, A.	4, 26
Gutiérrez, C.	4, 26
Gutiérrez, S.	5, 6, 30, 35
Izquierdo, J.	6, 33
Jurado, J.	4, 23
Kranendonk, M.	3, 9
Laires, A.	3, 9
Linde, A.R.	6, 33, 34
López Baena, M.	5, 32
López, A.	3, 17
López, J.	5, 29
Malagón, F.	5, 10
Manchado, M.	4, 24
Marcos, R.	3, 5, 6, 14, 16, 17, 30, 31, 35, 36, 37
Martín, L.	6, 40
Mateos, S.	5, 32
Michán, C.	4, 24
Miguel, M. de	5, 28, 29
Miguel-Rodríguez, M. de	6, 39
Natarajan, A.T.	6, 38
Navarrete, M.H.	5, 28

Ortiz, T.	5, 32
Pastor, N.	6, 39
Pena, E.	4, 21
Peña, E. de la	4, 26
Piñero, J.	5, 6, 32, 39
Piruat, J.-L.	5, 10
Pitarque, M.	5, 31
Prado, F.	5, 10
Prieto-Álamo, M.J.	4, 23
Puerto, S.	6, 36
Pueyo, C.	4, 23, 24
Ramírez, M.J.	6, 37
Real, A.	6, 40, 41
Rodrigues, A.	3, 9
Rodríguez, A.	5, 27
Rueff, J.	3, 9
Sánchez-Galán, S.	6, 33, 34
Santos-Rosa, H.	5, 10
Sierra, I.	6, 40
Sierra, L.M.	3, 4, 5, 18, 19, 20, 21, 27
Soriano, S.	3, 15
Suárez, S.	3, 16
Surrallés, J.	6, 36, 37, 38
Torre, C. de la	5, 29
Tosal, L.	3, 4, 19, 20
Urios, A.	4, 25
Velázquez, A.	3, 14, 16, 17
Vericat, J.A.	4, 7, 11, 12, 22
Vidania, R. de	6, 40, 41
Xamena, N.	3, 14, 15, 16



DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS PARA LA DETECCIÓN DE GENOTOXICIDAD EN PECES.

Becerril, Concepción (1), Ferrero, Mar (1), Muñoz, M^a Jesús (2), Carballo, Matilde (2), Castaño, Argelia (2).

(1) *Serv. Toxicología, CNA I.S. Carlos III- 28220 Majadahonda- MADRID*

(2) *Toxicología del medio ambiente, CISA-INIA -28130 Valdeolmos- MADRID*

La exposición de poblaciones de peces a contaminantes químicos de carácter genotóxico da como resultado alteraciones en su material genético, tanto somático como de carácter hereditario, incidiendo sobre la supervivencia de las especies expuestas.

Las características propias de la mayor parte de las poblaciones piscícolas, pequeño tamaño y alto número de cromosomas, hacen muy difícil la aplicación de los test más usuales para la detección de genotoxicidad de productos químicos (aberraciones en metafase, intercambio de cromátidas hermanas, etc.), ni siquiera aplicando técnicas de análisis automático de imagen.

La necesidad de disponer de nuevos ensayos que permitan valorar la genotoxicidad en dichos organismos nos ha llevado a poner a punto nuevas metodologías tanto "in vivo" como "in vitro".

Así, hemos desarrollado dos test "in vitro" utilizando la línea celular RTG-2 procedente de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*).

- Detección del incremento de la frecuencia de micronúcleos y alteraciones en el ciclo celular utilizando citometría de flujo.
- Detección de mutaciones mediante modificaciones en el patrón de bandas específico de la línea celular RTG-2 utilizando la técnica de RAPDs (Random Amplified polymorphic DNA).

Estos mismos test se han desarrollado como sistemas de valoración "in vivo" en eritrocitos de sangre periférica de trucha arcoiris.

Los buenos resultados obtenidos nos permiten afirmar que ambos ensayos resultan prometedores para valorar la genotoxicidad de peces. Son aún necesarios estudios de validación aplicando un mayor número de sustancias de referencia, así como estudios con muestras de campo para comprobar su eficacia como biomarcadores de genotoxicidad.

Financiado con fondos CYCIT proyecto AMB94-0655-CO2-01.