

Reparación del DNA en xeroderma pigmentosum. Efecto de diversas dosis de radiación ultravioleta y del tiempo de cultivo

E. MADRIGAL B. *

Departamento de Morfología,
Laboratorio de Genética Humana,
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N.
Prol. de Carpio y Plan de Ayala
11340 México, D. F.

J. PARRINGTON

Galton Laboratory
University College London

MADRIGAL BUJADAR, E. y J. PARRINGTON, 1982. Reparación del DNA en xeroderma pigmentosum. Efecto de diversas dosis de radiación ultravioleta y del tiempo de cultivo. *An. Esc. nac. Cienc. biol., Méx.* 26: 153-159.

RESUMEN: Se desarrollaron cultivos de fibroblastos a partir de biopsias de piel humana normal y de pacientes con xeroderma pigmentosum. Dichas células se sometieron a radiación ultravioleta y a una inhibición de la replicación semiconservativa, para medir la capacidad de reparación del DNA.

Se determinó en observaciones periódicas hechas en 24 horas de cultivo, que la reparación del DNA en las células del paciente fue baja constantemente, mientras que las células normales tuvieron una alta reparación durante las primeras 4 horas de cultivo y disminuyó dicho nivel de manera gradual.

Se comprobó que al usar varias dosis de radiación ultravioleta, la reparación del DNA en las células de los pacientes mostró una curva de respuesta inferior a la de las células normales, pero congruente con el estado clínico del individuo.

INTRODUCCIÓN

Los mecanismos de reparación del DNA incluyen básicamente la fotorreactivación, la reparación por recombinación posterior a la replicación del DNA y la forma típica de la reparación oscura. En el primer caso, una enzima fotorreactivante se combina con dímeros de timida producidos por la radiación ultravioleta, y este complejo enzima sustrato, bajo el estímulo de la luz visible, elimina la dimerización quedando la cadena del DNA en su forma original (Rupert, 1962). En el segundo proceso se efectúan incisiones y recombinaciones entre las cadenas del DNA, de tal modo que los sitios dañados son eliminados.

* Becario de C.O.F.A.A.

(Howard Flanders, 1968). En la reparación oscura, la lesión ocasionada por la radiación induce una deformación en la estructura helicoidal del DNA que es reconocida por una endonucleasa, la que produce rupturas cerca de los nucleótidos dañados, a continuación una exonucleasa actúa separando el residuo lesionado más un determinado número de nucleótidos normales; para la reconstrucción de la cadena, la DNA polimerasa agrega mononucleótidos aprovechando como molde la cadena opuesta no dañada y como iniciador el extremo de la cadena afectada, finalmente, una ligasa interviene cerrando la cadena del DNA. Por este mecanismo los dímeros no son alterados químicamente sino separados del DNA por un sistema que aprovecha la complementariedad de las cadenas (Hanawalt *et al.*, 1967; Madrigal, 1974).

En la enfermedad xeroderma pigmentosum la capacidad de reparación está disminuida, especialmente la reparación oscura, como consecuencia de un defecto en la endonucleasa que impide su funcionamiento normal, alteración que está determinada genéticamente con un tipo de herencia autosómica recesiva (Parrington *et al.*, 1971).

En cultivos de células, la cantidad de reparación puede variar dependiendo de diversos parámetros; en este trabajo se trata de establecer posibles diferencias entre la reparación de células normales y afectadas al tratarlas con varias dosis de radiación y efectuar lecturas periódicas del nivel de reparación durante 24 horas de cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para determinar el efecto del tiempo de cultivo en la reparación del DNA, el estudio se realizó en 2 individuos normales femeninos de 31 y 36 años y un enfermo de 4 años con xeroderma pigmentosum.

Para hacer el cultivo de fibroblastos se siguió la técnica de Harnden modificada (Harnden, 1960; Harnden, 1974), los fragmentos de piel se incluyeron en extracto embrionario de pello y plasma de pollo (Difco) y se colocaron en frascos de cultivo con medio mínimo esencial Eagle (Glaxo), 20 % de suero fetal de ternera y 1 % de glutamina (Flow), penicilina 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ estreptomycin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y bicarbonato de sodio al 6 %. Antes de incubarse a 37° C los cultivos se sometieron a una corriente de CO_2 al 5 %.

Para obtener suficiente material se hicieron subcultivos separando las células con tripsina (Difco, 1:250) al 0.5 % en solución de Hanks. El medio nutritivo se cambió 2 veces por semana. Para hacer los experimentos las células se desarrollaron en cajas de petri con 4 cubreobjetos adheridos en el fondo.

Media hora antes de la irradiación se agregó hidroxurea 10⁻³ M (Sigma) para inhibir la síntesis semiconservativa. Los cultivos se lavaron con solución de Hanks y se irradiaron con una lámpara Philips TUV, 6 W (longitud de onda 250 nm) a una distancia de 11.4 cm del nivel celular, con una intensidad de 342 erg/cm^2 y 40 segundos de radiación. En cada ocasión dos de los cubreobjetos se usaron como testigos por lo que se cubrieron con una gruesa mica negra.

Se agregó medio de cultivo con hidroxurea y timidina tritiada ($1 \mu\text{Ci/ml}$) y las células se incubaron a 37°C durante 4 horas. Las células se fijaron con metanol-ácido acético (3:1) 15 minutos, se lavaron 3 veces con solución salina 0.9 % y 3 veces (15 minutos cada ocasión) con ácido perclórico 0.25 M a 4°C . Las operaciones anteriores a excepción de la irradiación se hicieron a las 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas.

Cada cubreobjeto se transfirió a un tubo que contenía 15 ml de líquido de centelleo al 0.5 % (2, 5-bis (5.5 butil benzoaxol 2 il) teofeno) y se colocó en baño maría a 60°C por 30 minutos, finalmente los tubos se pusieron en un contador de centelleo (*Packard Scintillation Spectrometer* modelo 3375) y se obtuvieron promedios de cuenta de una hora en cada tubo. En cada caso la cantidad de reparación del DNA se obtuvo restando a las células irradiadas el marcado de fondo registrado en los testigos. En algunos casos se tiñó un cubreobjeto para contar las células y ajustar los resultados. Los datos reportados se obtuvieron de dos experimentos hechos en condiciones estrictamente semejantes.

Para ver el efecto de varias dosis de radiación se siguió el mismo proceso; las dosis empleadas fueron 43, 86, 71 y 342 erg/mm^2 . Las lecturas de la cantidad de reparación se hicieron a las 4 horas de incubación. El análisis se hizo en un individuo normal y tres pacientes, en uno de los cuales los signos clínicos eran moderados.

RESULTADOS

En el experimento de 24 horas los resultados mostraron que la reparación total de las células del enfermo (581), corresponde solamente al 16.7 % de la que tuvieron los testigos (3466). Esta diferencia se manifiesta con mayor evidencia en las primeras 4 horas (9.2 % del normal). Los valores de los testigos disminuyeron paulatinamente hasta las 16 horas, con un valor en ese momento equivalente al 18.3 % del valor inicial, después se mantuvieron sólo con una ligera variación, 20.8 % a las 20 y 24 horas.

La reparación de las células del paciente es baja en las 6 etapas analizadas, sin embargo, a partir de las 16 horas se observó un incremento en relación al valor normal, de tal modo que a las 24 horas el nivel fue de 27.2 %. El establecimiento en algunas etapas, de los valores de la reparación en relación al número de células, mostró que dichos valores son congruentes con los obtenidos directamente del contador de centelleo (tabla 1, fig. 1).

Los niveles de reparación del DNA medidos en cultivos de fibroblastos, y usando varias dosis de radiación, fueron observados en células de un testigo (S) y de tres pacientes (A, I y K), al comparar los valores obtenidos en los pacientes en relación al que mostró el normal, se observó que su reparación fue escasa, en el primer paciente, sólo alcanzó el 3.4 % y en el siguiente el 10 %, notándose claramente que con las distintas dosis empleadas el nivel se mantuvo aproximadamente igual. En cambio en el enfermo menos afectado clínicamente (K), la reparación alcanzó el 42.1 % y además los valores aumentaron en cada dosis usada, de manera que con 171 erg/mm^2 el aumento fue 30.5 % en relación a la

dosis anterior y con 342 erg/mm² fue de 41.6 %. En la muestra testigo el incremento fue constante hasta la tercera dosis, a partir de la cual parece estabilizarse la respuesta (tabla 2, fig. 2).

DISCUSIÓN

De acuerdo con lo establecido por Robbins y Kraemer en linfocitos (1972), la reparación en los individuos normales es muy alta las primeras tres horas después de la radiación, disminuye considerablemente en las tres siguientes y después de ese lapso desaparece por completo, en cambio, en los afectados por la enfermedad, el nivel se manifiesta bajo y constante hasta las 18 hs de cultivo, disminuye aún más a las 23 hs y no se observa a las 33 hs; esto significa que a pesar de la importancia del funcionamiento del mecanismo enzimático, si se comparan las cantidades totales en ambos tipos de individuos, los pacientes muestran al final mayor cantidad de reparación. Para valorar esta situación, así como el efecto de varias dosis de luz ultravioleta en fibroblastos, consideramos adecuado hacer las medicaciones con contador de centelleo porque el proceso es más rápido; nuestros resultados coinciden con el planteamiento anterior, sin embargo, los testigos no suprimen por completo su actividad sino que la disminuyen notablemente. Los datos indican que las lesiones son reparadas con eficacia y rapidez ya que los mayores niveles de reparación se observan en las primeras horas después de la radiación, sin embargo el sistema mantiene su acción durante más tiempo, lo que garantiza la eliminación completa de las lesiones moleculares. En los individuos afectados, como era de esperarse, los niveles de reparación son bajos en todo el tiempo de cultivo.

Los valores obtenidos al aplicar varias dosis de radiación comprueban que un individuo con manifestaciones clínicas moderadas se comporta en forma intermedia entre aquellos que están más afectados y los testigos, esto indica que existe una correlación entre el aspecto clínico y el comportamiento en la reparación.

De acuerdo con datos previos (Clarkson *et al.*, 1972), la respuesta a la radiación se presenta desde dosis sumamente bajas, y al aumentar éstas, se llega a una estabilización que termina en una franca declinación. Con las dosis usadas en este informe el límite máximo de reparación se ubica entre las dos últimas, sin embargo, para definir la curva de dosis-respuesta con precisión es indispensable utilizar mayor número de magnitudes de luz ultravioleta. En las células de individuos con las características típicas de xeroderma pigmentosum, deficientes en su sistema enzimático de reparación, independientemente de la dosis empleada, la respuesta es similar.

Las curvas obtenidas ante incrementos en el estímulo de agentes ambientales no son estrictamente específicas, así, se presentan curvas semejantes con la luz ultravioleta y el ácido nitroso, e igual semejanza tiene el uso de rayos X y el metilmetano sulfonato (Clarkson *et al.*, 1972), esto sugiere que independientemente de las lesiones iniciales en el DNA, los mecanismos de reparación comparten líneas de desarrollo común ante diferentes problemas.

SUMMARY

Fibroblasts cultures of normal human skin biopsies and belonging to persons with xeroderma pigmentosum were developed. The cells were irradiated with ultraviolet light and the semiconservative replication of DNA was inhibited in order to measure the amount of DNA repair.

In a 24 hours culture of cells we measured the DNA repair periodically. It was determined that the patient cells repair was low constantly, but in the normal cells were high during the first 4 hours and decreased gradually afterwards.

It was also determined that with several doses of ultraviolet radiation, the DNA repair in the patients cells showed a dose response curve lower than in normal cells but according with the clinical symptoms of the individual.

BIBLIOGRAFÍA

- CLARKSON, J. M. & H. J. EVANS, 1972. Unscheduled DNA synthesis in human leukocytes after exposure to UV light, gamma rays and chemical mutagens. *Mut. Res.* **14**: 413-430.
- HANAWALT, P. C. & R. H. HAYNES, 1967. The repair of DNA. *Sci. Amer.* **216**: 36-43.
- HARDEN, D. G., 1960. A human skin culture technique used for cytological examination of number of different pathological conditions. *Brit. J. Exp. Path.* **41**: 31-40.
- HARDEN, D. G., 1974. Skin culture and solid tumor techniques. In: *Human Chromosome Methodology*. J. J. Yunis Ed. Academic Press. Cap. 9.
- HOWARD FLANDERS, P., 1968. DNA repair. *Ann. Rev. Biochem.* **37**: 175-200.
- MADRIGAL, E., 1974. Los mecanismos de reparación del DNA a nivel molecular y celular. *Acta Politécnica. Méx.* **15**: 179-187.
- PARRINGTON, J. M., J. D. A. DELHANTY & H. P. BADEN, 1971. Unscheduled DNA synthesis UV induced chromosome aberrations and SV40 transformation in cultured cells from xeroderma pigmentosum. *Ann. Hum. Genet.* **35**: 149-160.
- ROBBINS, J. H. & K. H. KRAEMER, 1972. Prolonged ultraviolet induced thymidine incorporation into xeroderma pigmentosum lymphocytes. Studies on its duration, amount, localization and relationship to hidroxiurea. *Biochem. Biophys. Acta* **277**: 7-14.
- RUPERT, C. S., 1962. Photoenzymatic repair of ultraviolet damage in DNA. Formation of an enzyme substrate complex. *J. Gen. Physiol.* **45**: 725-741.

TABLA 1

Niveles de reparación del DNA en 24 horas medidos con contador de centelleo. Cultivo de fibroblastos de individuos normales y un enfermo de xeroderma pigmentosum. (Y)

Tiempo de cultivo	Clave	Reparación	Reparación por millón de células
0 - 4 hs.	C	1066	16441
	S	1419	20034
	Y	114	2801
4 - 8 hs.	C	1100	
	S	802	
	Y	223	
8 - 12 hs.	C	500	
	S	550	
	Y	87	
12 - 16 hs.	C	224	
	S	233	
	Y	30	
16 - 20 hs.	C	211	5150
	S	308	4938
	Y	58	1425
20 - 24 hs.	C	203	4550
	S	316	4934
	Y	69	1460

TABLA 2

Niveles de reparación ante varias dosis de luz ultravioleta. Cultivo de fibroblastos. S: testigo; A, I: hermanos con xeroderma típico, K: xeroderma moderado.

Clave	Dosis erg/mm ²	Reparación neta	Reparación por millón de células
S	43	1226	12551
	86	1355	13665
	171	2639	26613
	342	2619	26022
A	43	100	2069
	86	105	1944
	171	124	2296
	342	102	1809
I	86	221	4680
	342	196	4151
K	86	601	
	171	905	
	343	1283	

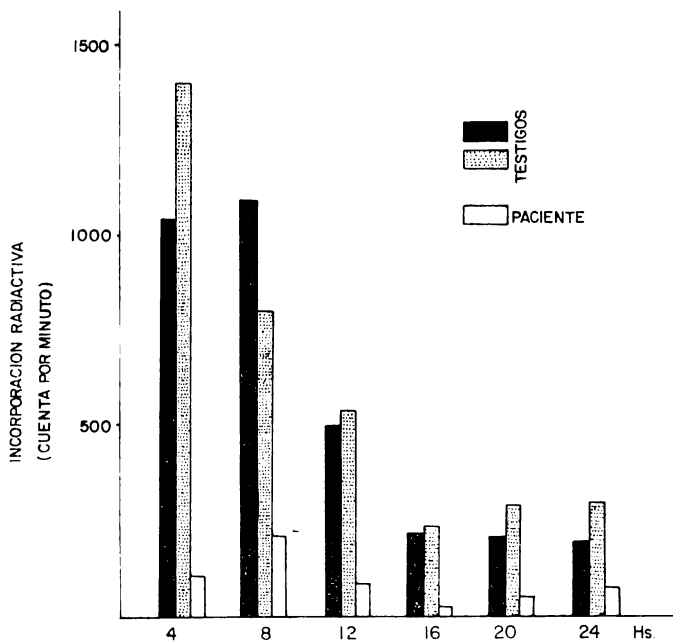


Fig 1 NIVELES DE REPARACION DEL DNA EN 24 HS. CULTIVO DE FIBROBLASTOS.

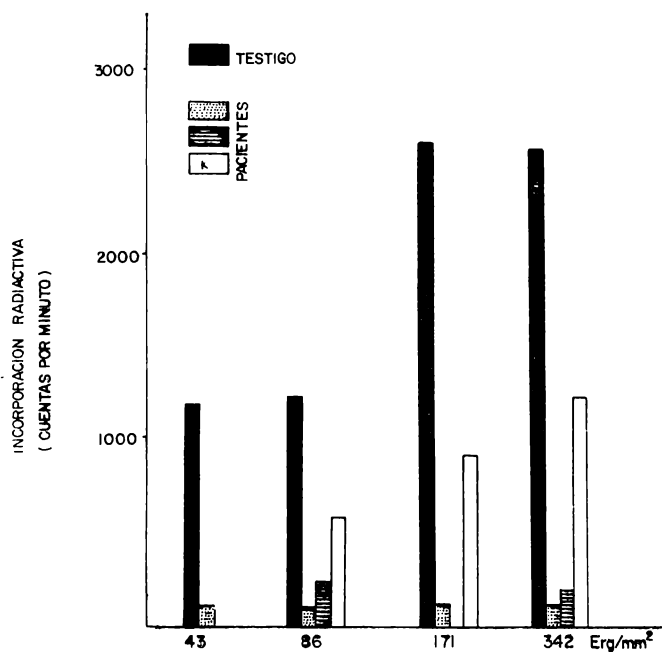


Fig. 2 NIVELES DE REPARACION ANTE VARIAS DOSIS DE LUZ ULTRAVIOLETA. CULTIVO DE FIBROBLASTOS.