

**RELACIÓN ENTRE HETEROGENEIDAD  
INTRAGENÓMICA Y FORMACIÓN DE ABERRACIONES  
CROMOSÓMICAS**

**TESIS DOCTORAL**  
**Silvia Puerto Navarro**  
**2001**



 **Universitat  
Autònoma  
de Barcelona**

**FACULTAT DE CIÈNCIES  
DEPARTAMENT DE GENÈTICA I DE MICROBIOLOGIA**

**RELACIÓN ENTRE HETEROGENEIDAD  
INTRAGENÓMICA Y FORMACIÓN DE ABERRACIONES  
CROMOSÓMICAS**

TESIS DOCTORAL  
Silvia Puerto Navarro  
2001

A mis padres

Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la colaboración y apoyo de muchas personas, por ello me gustaría agradecerlos a todos vuestra ayuda y haceros partícipes de este trabajo.

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Ricard Marcos la confianza depositada en mí y la oportunidad de incorporarme a su grupo de trabajo.

También me gustaría agradecer especialmente al Dr. Jordi Surrallés su dedicación, entusiasmo y optimismo, claves en todas las etapas de la elaboración de esta tesis. Gracias, por facilitarme el trabajo y por no dar nunca nada por perdido.

También tú, M<sup>a</sup> José, has contribuido muy especialmente en esta tesis y es que tenerte como compañera de trabajo ha sido una gran suerte para mí. Quiero agradecerte sinceramente todos los buenos momentos que hemos compartido y tu ayuda y apoyo incondicional ante cualquier pequeño-gran problema. Gracias, por estar siempre ahí.

Del mismo modo, agradezco al Dr. Amadeu Creus su apoyo en los momentos críticos y la disponibilidad y rapidez en la corrección de este y otros manuscritos. En el mismo sentido, agradezco a Glòria Umbert y a Sara Gutiérrez haber dedicado tiempo personal a leer esta tesis y contribuir con sus comentarios a mejorar este trabajo. Al igual que a ti, M<sup>a</sup> José.

Al Dr. Noel Xamena, a la Dra. Antonia Velázquez y al Dr. Oriol Cabré, les agradezco su accesibilidad y disponibilidad, siempre con una actitud positiva.

Al resto de las personas que formáis o habéis formado parte del grupo de mutagénesis durante los últimos cinco años, os agradezco sinceramente vuestra acogida y apoyo durante todo este tiempo. Desde el momento que me incorporé al departamento hasta hoy el grupo ha ido cambiando y en los últimos tiempos creciendo a un ritmo trepidante. Sois muchos y no me atrevo a nombraros, pero todos habéis contribuido al buen ambiente de trabajo. Y es que creo que si el grupo de mutagénesis se caracteriza por algo, es por su gente, gente sencilla con ganas de hacer las cosas bien.

De las nuevas generaciones, con quién más me he relacionado es contigo, Marta. Hemos compartido momentos buenos y otros no tanto, pero te agradezco que me hayas permitido conocerte y descubrir una persona sensible, apasionada por la biología y con muchas ganas de hacer cosas.

Gracias, por contagiarme ese entusiasmo y permitirme soñar despierta, aunque el sueño pase por unas oposiciones.

Por otra parte, el trabajo en el laboratorio durante estos cinco años me ha permitido conocer gente de muchos lugares diferentes que de otra forma difícilmente hubiera podido conocer. Sois también muchos, pero me gustaría nombrar especialmente a Liliana Valente, la venezolana. Nunca olvidaré la cena sorpresa en su casa y a toda la gente que fuisteis. Sólo por ese recibimiento ya mereció la pena ir a Leiden. Esa noche en la mesa había comida con sabor a Venezuela, Ecuador, México, Marruecos, Cuba y Catalunya; y dos estupendos roscones de nata. Gracias, a todos por esa noche especial.

Me gustaría también agradecer al resto de los miembros de la Unidad de Genética su acogida durante estos cinco años. Siempre he tenido vuestra ayuda cuando la he necesitado incluso a veces sin necesidad de pedirla.

Agradezco también al Dr. Natarajan de la Universidad de Leiden, al Dr J. Roberts de Laboratorios Almirall S.A., al Dr. Pere Galofré del Servicio de Medicina Nuclear y a la Dra. Mercè Bertran del Servicio de Radioterapia de la Ciudad Sanitaria y Universitaria Vall d'Hebron, su colaboración y hacer posible los diferentes estudios realizados en esta tesis.

También quiero constatar que el trabajo durante estos cinco años hubiera sido más complicado sin la beca predoctoral concedida por la UAB y el soporte económico de diferentes instituciones: Generalitat de Catalunya (SGR95-00512, CIRIT), Ministerio Español de Educación y Cultura (SAF95-0813, CICYT; PM98-0179, CICYT); Ministerio Español de Sanidad (FIS, 99/1214); Consejo de Seguridad Nuclear (394/98/GTP/481.00); Fanconi Anemia Research Fund. Inc. y Comisión de la Unión Europea (Euratom Programme, FIGH-CT99-00011).

Agradezco a mis amigos el interés que han mostrado por este trabajo y el ánimo que me han ofrecido.

Y finalmente agradezco a mi familia, su apoyo y ánimo, a pesar de haber recibido la peor parte. Sin vuestro empuje tal vez no hubiera empezado este estudio, así que gracias por darme la fuerza necesaria.

# ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>IV</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. ORGANIZACIÓN DEL DNA EN EUCARIOTAS.....</b>	<b>1</b>
1.1. ORGANIZACIÓN DEL DNA EN LA CROMATINA.....	1
1.2. HETEROGENEIDAD INTRA- E INTERCROMOSÓMICA.....	5
1.3. ARQUITECTURA NUCLEAR.....	7
1.3.1. MODELO NO TERRITORIAL .....	8
1.3.2. MODELO TERRITORIAL .....	8
1.4. CARIOTIPO .....	10
<b>2. ABERRACIONES CROMOSÓMICAS .....</b>	<b>10</b>
2.1. ORIGEN DE LAS ABERRACIONES CROMOSÓMICAS DE TIPO ESTRUCTURAL .....	12
2.1.1. TEORÍAS SOBRE EL ORIGEN DE LAS ABERRACIONES CROMOSÓMICAS.....	13
2.2. AGENTE INDUCTOR .....	14
2.2.1. AGENTES S-INDEPENDIENTE .....	15
2.2.1.1. <i>RADIACIÓN IONIZANTE</i> .....	15
2.2.1.1.1. Lesión inicial: rotura de doble cadena (DSB) .....	20
2.2.1.1.2. Conversión de otras lesiones en DSB .....	21
2.2.1.1.3. Reparación de las DSBs .....	22
2.2.1.2. <i>BLEOMICINA</i> .....	27
2.2.2. AGENTES S-DEPENDIENTES .....	30
2.3. CLASIFICACIÓN DE LAS ABERRACIONES ESTRUCTURALES DE TIPO CROMOSÓMICO .....	31
2.4. DETECCIÓN DE LAS ABERRACIONES CROMOSÓMICAS .....	36
2.4.1. ANÁLISIS EN METAFASE .....	36

2.4.1.1.	<i>TINCIÓN HOMOGÉNEA CON GIEMSA</i> .....	36
2.4.1.2.	<i>TÉCNICA DE BANDAS</i> .....	37
2.4.1.3.	<i>HIBRIDACIÓN IN SITU</i> .....	37
	2.4.1.3.1.El pintado cromosómico.....	39
2.4.2.	ANÁLISIS EN INTERFASE: CONDENSACIÓN PREMATURA DE CROMOSOMAS.....	46
2.5.	PERSISTENCIA DE LAS TRANSLOCACIONES Y DE LOS DICÉNTRICOS .....	48
2.6.	DISTRIBUCIÓN DE LAS ABERRACIONES CROMOSÓMICAS .....	50
2.6.1.	RELACIÓN CON LA INDUCCIÓN, LA REPARACIÓN Y LA PERSISTENCIA .....	52
	2.6.1.1. <i>EFECTO DE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA</i> .....	53
	2.6.1.2. <i>EFECTO DE LA DENSIDAD GÉNICA</i> .....	58
	2.6.1.3. <i>EFECTO DE LAS SECUENCIAS TELOMÉRICAS</i> .....	59
	2.6.1.4. <i>EFECTO DE PROXIMIDAD</i> .....	60
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>64</b>
<b>II.</b>	<b>ARTÍCULOS</b> .....	<b>66</b>
1.	Puerto S., Surrallés J., Ramírez M.J., Carbonell E., Creus A. y Marcos R. Analysis of bleomycin–and cytosine arabinoside-induced chromosome aberrations involving chromosomes 1 and 4 by painting FISH. <i>Mutat. Res.</i> , 439: 3-11, 1999.....	<b>66</b>
2.	Puerto S., Surrallés J., Ramírez M.J., Creus A. y Marcos R. Equal induction and persistence of chromosome aberrations involving chromosomes with heterogeneous lengths and gene densities. <i>Cytogenet. Cell Genet.</i> , 87: 62-68, 1999. ....	<b>75</b>
3.	Puerto S., Marcos R., Ramírez M.J., Galofré P., Creus A. y Surrallés J. Equal induction and persistence of chromosome aberrations involving chromosomes 1, 4 and 10 in thyroid cancer patients treated with radioactive iodine. <i>Mutat. Res.</i> , 469: 147-158, 2000.....	<b>82</b>
4.	Puerto S., Marcos R., Ramírez M.J., Creus A., Boei J.J.W.A., Meijers M., Natarajan A.T. y Surrallés J. Induction, processing and persistence of radiation-induced chromosomal aberrations involving hamster euchromatin and heterochromatin. <i>Mutat. Res.</i> , 469: 169-179, 2000. ....	<b>95</b>
5.	Puerto S., Ramírez M.J., Marcos R., Creus A. y Surrallés J. Radiation-induced chromosome aberrations in a human euchromatin (17cen-p53) and heterochromatic (1cen-1q12) región. <i>Mutagenesis</i> (aceptado).....	<b>105</b>

<b>III.DISCUSIÓN.....</b>	<b>130</b>
<b>IV.CONCLUSIONES .....</b>	<b>152</b>
<b>V. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>153</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ACs</b>	Aberraciones cromosómicas
<b>ara-C</b>	1- $\beta$ -arabinofuranosilcitosina
<b>BIR</b>	Modelo de reparación por recombinación homóloga conservativo: ( <i>break-induced-replication</i> )
<b>CAB</b>	Sistema de clasificación de las ACs en familias en función del número de cromosomas/número de brazos y número de roturas implicadas en su formación ( <i>number of chromosomes/ number of arm/number of breaks</i> )
<b>CHO</b>	Células de ovario de hámster chino
<b>CpG</b>	regiones ricas en citosinas y guaninas
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DSBR</b>	Modelo de reparación por recombinación homóloga conservativo: ( <i>double-strand break repair</i> )
<b>DSBs</b>	Roturas de doble cadena
<b>EMS</b>	Metanosulfonato de etilo
<b>FISH</b>	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
<b>HJ</b>	Uniones de Holliday ( <i>Holliday junctions</i> )
<b>HRR</b>	Reparación por recombinación homóloga
<b>ICD</b>	<i>interchromosomal domain compartment model</i>
<b>LET</b>	Transferencia lineal de energía
<b>LINEs</b>	Elementos largos dispersos
<b>NER</b>	Reparación por escisión de nucleótidos
<b>NHEJ</b>	Reparación por recombinación no homóloga:( <i>non homologous end joining</i> )
<b>MARs</b>	Regiones asociadas a la matriz nuclear
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCC</b>	Condensación prematura de cromosomas
<b>PEV</b>	<i>Position-effect variegation</i>
<b>RBE</b>	Eficiencia biológica relativa
<b>SARs</b>	Regiones de unión al esqueleto cromosómico

<b>SSBs</b>	Roturas de simple cadena
<b>SDSA</b>	Modelo de reparación por recombinación homóloga conservativo: ( <i>synthesis-dependent strand annealing</i> )
<b>SINEs</b>	elementos cortos dispersos.
<b>SSA</b>	Modelo de reparación por recombinación homóloga no conservativo: ( <i>single-strand annealing</i> )
<b>STS</b>	<i>cDNA-based sequence-target site</i>
<b>UV</b>	Radiación ultravioleta

# **I. INTRODUCCIÓN**

## **INTRODUCCIÓN**

---

### **I. INTRODUCCIÓN**

El proceso de formación de las aberraciones cromosómicas de tipo estructural (ACs) es complejo y no se conoce en su totalidad. Se acepta que las ACs se forman a partir de las lesiones inducidas en el DNA. El origen va a depender del tipo de agente inductor pero, en último término, se considera que son las roturas de doble cadena (DSBs) las lesiones directamente involucradas en su formación. De hecho, se considera que las ACs se forman a partir de las DSBs no reparadas o mal reparadas. Sin embargo, no se conocen los factores que pueden modular la distribución de las ACs en el genoma. En este sentido, la estructura y la organización del DNA en los organismos eucariotas generan diferentes niveles de compactación que pueden afectar la distribución de las ACs. La heterogeneidad intragenómica puede afectar la inducción, el procesamiento y/o la persistencia de las lesiones inducidas en el DNA

### **1. ORGANIZACIÓN DEL DNA EN EUCARIOTAS**

La estructura y la organización del material genético en las células eucariotas es más compleja que en los organismos procariotas. Esta complejidad se debe a la gran cantidad de DNA por cromosoma y a la presencia de un gran número de proteínas asociadas a éste. Durante la mayor parte del ciclo celular, el material genético y las proteínas asociadas están desenrollados y dispersos por el núcleo, constituyendo la cromatina. Al empezar la mitosis, la cromatina se empaqueta formando estructuras de orden superior hasta distinguirse los cromosomas como unidades compactas. Los cromosomas sólo son distinguibles durante un breve periodo de tiempo, durante el proceso de división celular.

#### **1.1. ORGANIZACIÓN DEL DNA EN LA CROMATINA**

El término cromatina fue definido inicialmente con un significado citológico puramente descriptivo como “la sustancia que constituye el núcleo interfásico y muestra ciertas propiedades de tinción” (Flemming, 1882). En la actualidad el concepto de cromatina se utiliza también haciendo referencia a la organización molecular del material hereditario en los organismos eucariotas. En este contexto, para algunos autores la cromatina es el conjunto complejo de DNA, histonas, proteínas no histónicas y RNA presentes en los núcleos

## INTRODUCCIÓN

---

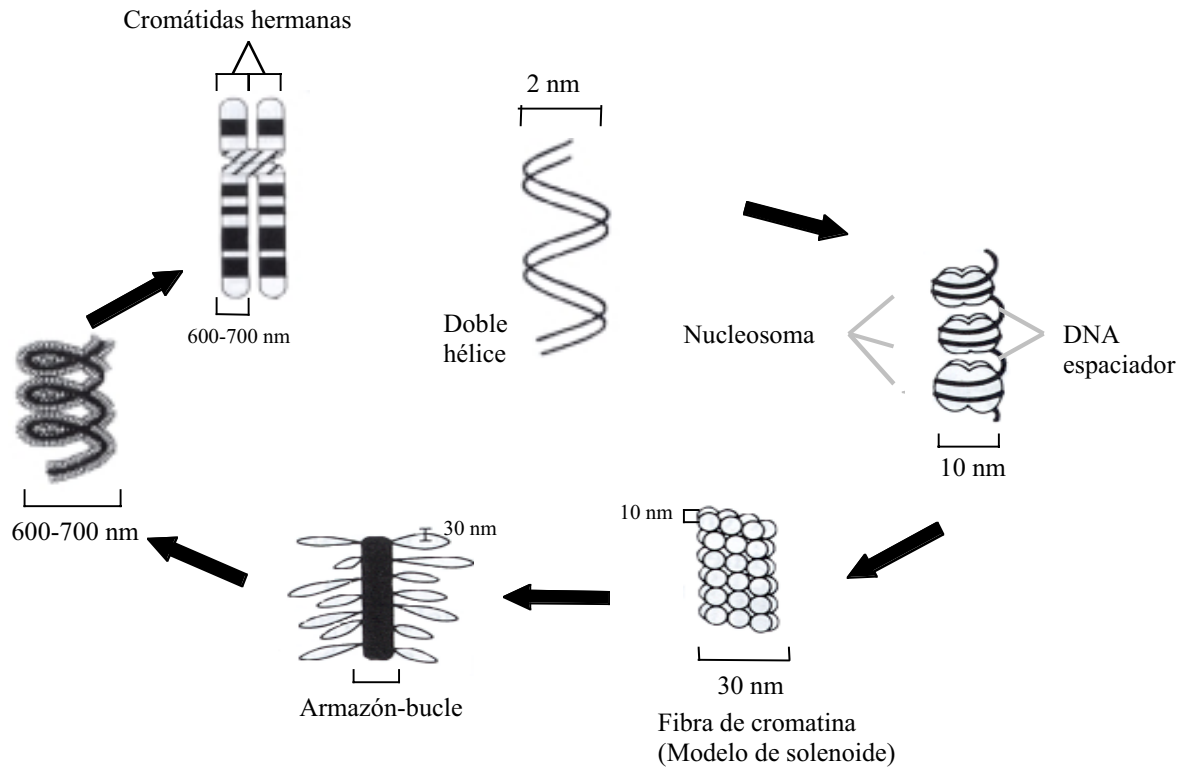
interfásicos (Rieger *et al.*, 1976). Otros autores, sin embargo, entienden por cromatina únicamente la asociación del DNA y las histonas formando estructuras con ordenación espacial regular, los nucleosomas (Kornberg, 1974).

Los primeros datos experimentales acerca de la ultraestructura de la fibra de cromatina fueron obtenidos por Olins y Olins (1974). A partir de este momento se llevaron a cabo otros muchos estudios hasta llegar al descubrimiento de la unidad fundamental de empaquetamiento, el nucleosoma (revisión en Kornberg y Lorch, 1999). Así, la asociación de las histonas con el DNA conduce a la formación del nucleosoma, partícula globular unitaria de la cromatina, que le confiere a ésta el aspecto de una “cadena de cuentas”. La cuenta, que es el nucleosoma, está constituida por un octámero de histonas, formado por 2 copias de cada una de las 4 histonas nucleosomales, H2A, H2B, H3 y H4, alrededor del cual el DNA de doble cadena da aproximadamente dos vueltas. Cada cuenta nucleosómica está separada de la siguiente por un DNA espaciador de longitud variable sobre el que interacciona la histona H1 (Noll y Kornberg, 1977). El posterior análisis del núcleo del nucleosoma llevó a sustituir el modelo inicial globular por la de un tronco oblicuo de cilindro, denominado platisoma (Finch *et al.*, 1977).

Los diferentes niveles de condensación del DNA en los organismos eucariotas se representan en la figura 1. El primer nivel de compactación del DNA desde su propia estructura helicoidal molecular, de 2 nm de diámetro, se produce con la estructura nucleosomal. La formación de los nucleosomas da lugar a fibras de 10 nm de diámetro. Adicionalmente, la estructura nucleosomal no es rígida y permite que los nucleosomas se empaqueten unos sobre otros, generándose estructuras de orden superior de la cromatina. Según el modelo de solenoide, que es el más aceptado, el DNA espaciador se empaqueta y conecta lateralmente nucleosomas consecutivos formándose la estructura helicoidal de 30 nm de diámetro (Finch y Klug, 1976). Las histonas H1 serían las responsables del empaquetamiento de los nucleosomas.

Durante el proceso de división celular, la formación de los cromosomas requiere un empaquetamiento de orden superior. El nuevo nivel de compactación se consigue a partir de la fibra de cromatina de 30 nm, al plegarse y formar dominios estructurales en forma de bucle de 30 a 100 Kb (Earnshaw, 1986). En este caso, los bucles formados están sujetos en sus bases por proteínas no histónicas que forman parte del entramado o armazón proteico presente

## INTRODUCCIÓN

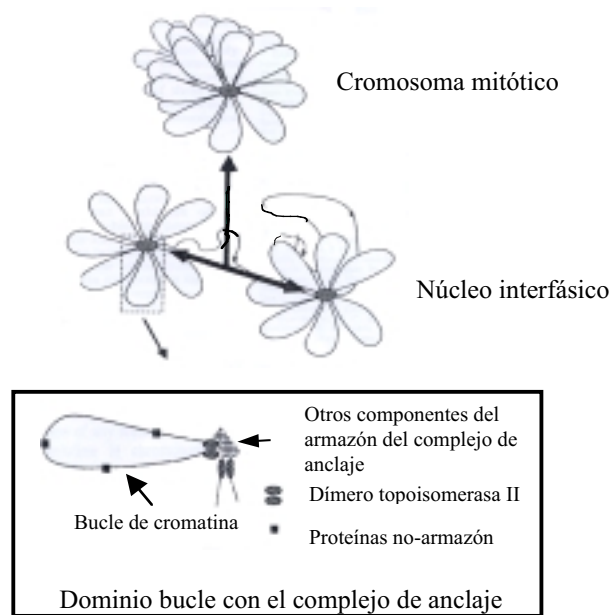


**Figura 1. Organización del DNA en eucariotas desde la doble hélice de DNA hasta el cromosoma metafásico (adaptado de Strachman y Read, 1996).**

a lo largo del eje del cromosoma mitótico (Laemmli *et al.*, 1977; Paulson y Laemmli, 1977; Saitoh y Laemmli, 1994). Se han encontrado a lo largo del DNA regiones específicamente asociadas al armazón proteico, conocidas como regiones *scaffold-associated regions* (SARs). Estas regiones de tamaño variable (de 0,6kb a varios kb) son ricas en A-T y se encuentran posiblemente situadas en posiciones específicas, en relación a la función de los genes (Mirkovitch *et al.*, 1984; Strick y Laemmli, 1995). En general, los genes transcripcionalmente activos pueden encontrarse en bucles pequeños, mientras que los menos activos pueden agruparse en bucles grandes. Los dominios bucle se ordenan radialmente, agrupándose en rosetas por interacción con los componentes del armazón (Paulson y Laemmli, 1977). En la figura 2 se detalla la organización de la fibra de cromatina al formar el complejo bucle-armazón. El armazón contiene RNA nuclear heterogéneo, topoisomerasa II y una variedad de otras proteínas no histónicas. La topoisomerasa II se localiza en la base de los bucles situados radialmente (Earnshaw y Heck, 1985). Se considera que este nivel de organización es el que se presenta en interfase (ver Manuelidis y Chen, 1990). En interfase la ordenación radial puede extenderse o contraerse dinámicamente. Por otra parte, algunas regiones transcripcionalmente activas pueden encontrarse desempaquetadas a nivel nucleosomal o de

## INTRODUCCIÓN

DNA. Durante el proceso de condensación cromosómica los complejos de anclaje se asocian lateralmente, posiblemente como consecuencia de modificaciones postsintéticas de uno o más componentes del armazón, permitiendo la unión de las ordenaciones radiales. El posterior enrollamiento del complejo bucle-armazón constituirá la cromátida del cromosoma mitótico (ver Manuelidis y Chen, 1990; Strachman y Read, 1996).



**Figura 2. Organización de la fibra de cromatina en el núcleo interfásico y en el cromosoma mitótico (adaptado de Earshaw, 1988).**

Los cromosomas adquieren su mayor nivel de condensación durante el proceso de división celular en el periodo de metafase. Este alto grado de condensación implica que los cromosomas son transcripcionalmente inertes. La estructura de los cromosomas debe ser modificada dinámicamente, en el tránsito de metafase a interfase, de forma que las funciones celulares esenciales puedan realizarse en el núcleo interfásico.

Algunas partes de los cromosomas, sin embargo, permanecen condensadas y teñidas intensamente en interfase, en comparación con otras regiones. Los términos eucromatina y heterocromatina se han utilizado ampliamente para expresar el estado de condensación de la cromatina durante el ciclo celular. En el núcleo interfásico, la mayor parte de las fibras de cromatina están menos empaquetadas que en el cromosoma mitótico. Este material, constituye la eucromatina. En comparación, en algunas regiones las fibras de cromatina están

## INTRODUCCIÓN

---

empaquetadas densamente y muestran una organización comparable a la de los cromosomas durante la mitosis; este material se denomina heterocromatina. Su grado de condensación apenas cambia a lo largo del ciclo celular. La heterocromatina puede dividirse en dos tipos: constitutiva y facultativa. La heterocromatina constitutiva está formada por regiones de DNA de secuencias repetidas que no se expresan nunca, mientras que la heterocromatina facultativa es básicamente DNA eucromático que se inactiva en determinadas células, o durante un tiempo específico del desarrollo.

Distintas investigaciones han revelado diferencias genéticas, citológicas y químicas entre la eucromatina y la heterocromatina. En general, la heterocromatina constitutiva está relacionada con la presencia de DNA satélite (DNA altamente repetitivo) y se caracteriza por su alto contenido en proteínas, por no ser transcripcionalmente activa y estar constituida por DNA de replicación tardía (Babu y Verma, 1987). Por otra parte, la heterocromatina es resistente a la digestión con nucleasas, está altamente metilada y se distingue por la falta de histonas acetiladas (Jeppesen y Turner, 1993; Surrallés *et al.*, 1996). En contraste, la eucromatina presenta un patrón de replicación temprano que corresponde a la mayor parte de los genes transcripcionalmente activos. Durante la transcripción, muchas regiones genéticamente activas son accesibles, se encuentran en una configuración abierta, como evidencia su sensibilidad a las nucleasas. La eucromatina transcripcionalmente activa presenta histonas acetiladas y está desprovista de histona H1 (Clayton *et al.*, 1993).

La diferente condensación de la cromatina en interfase puede explicarse mediante señales moleculares específicas que permitan la descondensación selectiva (ver Manuelidis, 1990). Así, la descondensación no uniforme puede ser el resultado de la unión selectiva de proteínas que impidan la descondensación local. Por otra parte, la modificación de las histonas puede facilitar la descondensación. En este sentido, la pérdida de la histona H1 junto con la acetilación de las histonas H3 y H4 puede relacionarse con la descondensación (Tazi y Bird, 1990). Adicionalmente, la metilación parece jugar un papel importante, de forma que las regiones metiladas parecen resistirse a la descondensación (Schmid *et al.*, 1983)

### 1.2. HETEROGENEIDAD INTRA E INTERCROMOSÓMICA

A pesar de la similitud estructural de todos los cromosomas en su estado de mayor condensación, al aplicar las denominadas técnicas de bandeo se pueden distinguir diferentes



## INTRODUCCIÓN

---

dominios espaciales o bandas. Las bandas observadas corresponden a segmentos cromatídicos que presentan distintas características estructurales y funcionales y que se manifiestan en propiedades de tinción específicas. Las bandas resultantes difieren en densidad génica, tiempo de replicación, composición de bases, contenido de secuencias repetidas y conformación de la cromatina (Holmquist 1992; Drouin *et al.*, 1994). Saitoh y Laemmli (1994) utilizando el fluorocromo daunomicina, altamente específico para regiones ricas en AT, demostraron que el patrón de bandas es el resultado del plegamiento diferencial de las regiones SARs a lo largo del cromosoma.

Aunque las técnicas de bandeo son muy variadas, pueden agruparse en seis clases principales: bandas Q, G, C, R, T y Feulgen. A estos tipos de bandas habría que añadirles las bandas de replicación y las bandas de restricción. Cuando las técnicas de bandeo G, Q y R se aplican a los cromosomas, estos revelan un patrón característico de bandas claras y oscuras de forma alternativa. El patrón producido por el bandeo G, Q y R es esencialmente el mismo, aunque las bandas que son G y Q positivas son R negativas y viceversa. En la tabla 1 se resumen algunas de las características de las bandas eucromáticas en mamíferos. Las características de las bandas claras/oscuras son opuestas, de forma que las bandas G positivas, Q positivas (oscuras) o R negativas (claras) presentan propiedades de regiones heterocromáticas, de hecho, muchos autores las consideran como tales (ver Sumner, 1998).

**Tabla 1. Características de las bandas cromosómicas en los mamíferos (adaptado de Sumner, 1998).**

Bandas G positivas (oscuras)	Bandas G negativas (claras)
Bandas Q positivas	Bandas Q negativas
Bandas R negativas	Bandas R positivas
DNA replicación tardía	DNA replicación temprana
DNA rico en A+T	DNA rico en G+C
Baja concentración de genes	Alta concentración de genes
Insensible a la DNAsa	Hipersensible a la DNAsa
Bajo nivel de acetilación de histonas	Alto nivel de acetilación de histonas
Alto nivel de subtipos histona H1	Bajo nivel de subtipos histona H1
Ricos en LINEs ( <i>Long Intermediate Repetitive DNA Sequences</i> )	Ricos en SINEs ( <i>Short Intermediate Repetitive DNA Sequences</i> )

## INTRODUCCIÓN

---

Las regiones de heterocromatina constitutiva corresponden a las bandas C. Estas bandas se localizan generalmente en las regiones centroméricas y pericentroméricas, en algunos telómeros, en las regiones adyacentes a los centros de organización nucleolar y, en algunos organismos, en regiones intersticiales. En general, estas regiones comprenden un porcentaje relativamente pequeño del genoma. La heterocromatina facultativa no se tiñe distintivamente con los métodos de bandeo rutinarios, en este caso, su detección se realiza a partir del patrón de replicación tardío, característico de las regiones heterocromáticas.

Sólo un pequeño porcentaje del genoma de los mamíferos contiene información codificante. Por otra parte, los genes no se encuentran distribuidos al azar en el genoma sino que se encuentran organizados en grupos (Saccone *et al.*, 1992; Yunis *et al.*, 1978; Graig y Bickmore, 1993). El extremo 5' del 50-60 % de los genes de mamíferos está asociado con regiones ricas en C y G, conocidas como islas CpG (Bird, 1987). La distribución de las islas CpG ha sido analizada por técnicas de hibridación *in situ* (Craig y Bickmore, 1994; Surrallés *et al.*, 1997). Cada subtipo de banda tiene una densidad de genes característica, que se corresponde con el contenido en CG. Las islas CpG en el genoma humano se encuentran predominantemente en las regiones de replicación temprana (bandas R), encontrando la mayor concentración de islas CpG en las bandas T, un subtipo de las bandas R (Craig y Bickmore, 1994). En las bandas R están localizados todos los genes *housekeeping* y parte de los genes específicos de tejido (Bickmore y Summer, 1989). Contrariamente, el DNA de replicación tardía (bandas G) se encuentra escasamente poblado de islas CpG. Las bandas G positivas o Q positivas contienen el 20% de los genes humanos pero están desprovistas de genes de función constitutiva (Bickmore y Summer, 1989). En cuanto a las bandas C, que constituyen las regiones de heterocromatina constitutiva, son regiones carentes de genes. La diferente distribución de las islas CpG entre los cromosomas humanos pone de manifiesto la diferente densidad génica de los cromosomas (Craig y Bickmore, 1994).

### 1.3. ARQUITECTURA NUCLEAR

La compartimentación de la eucromatina y la heterocromatina dentro del núcleo interfásico proporciona un nivel adicional de organización. Hasta el momento, se conoce poco sobre la organización tridimensional del DNA dentro del núcleo interfásico, aunque se han propuestos varios modelos. Inicialmente se consideró la organización territorial de los cromosomas; sin

## INTRODUCCIÓN

---

embargo, esta idea se ignoró durante las décadas de los años 60 y 70 hasta el punto de proponerse modelos no territoriales

### 1.3.1. MODELO NO TERRITORIAL

En los modelos no territoriales, las fibras de cromatina de los cromosomas interfásicos pueden ser consideradas como fibras poliméricas largas y flexibles (Comings, 1968), o como cadenas de polímero rectas (Vogel y Schroeder, 1974) que se extienden por todo el núcleo y que se entremezclan fuertemente con las fibras procedentes de otros cromosomas (revisión en Kreth *et al.*, 1998). Comings (1968) propuso un modelo en el cual la fibra de cromatina de cada cromosoma se une a varios puntos de fijación. Estos puntos de fijación incluyen puntos en la envoltura nuclear y en el nucleolo. Los puntos de fijación en las partes eucromáticas se encuentran ampliamente separados, mientras que los puntos en la cromatina heterocromática están muy cerca unos de otros. Entre estos puntos de anclaje las fibras de cromatina pueden estar tensas o estar dispuestas de forma más relajada.

### 1.3.2. MODELO TERRITORIAL

Diferentes evidencias experimentales han llevado de nuevo a la idea original de organización territorial. Actualmente se considera que cada cromosoma en interfase ocupa un territorio distinto. Sin embargo, no está clara la organización espacial de la molécula lineal de DNA dentro del territorio cromosómico. En este sentido, se han propuesto dos modelos diferentes de organización. El modelo *random walk/giant loop* sugiere una distribución al azar de la fibra de cromatina (Sachs *et al.*, 1995). En contraste, el *interchromosomal domain (ICD) compartment model* predice una organización tridimensional altamente organizada, y no al azar, de los territorios cromosómicos (Cremer *et al.*, 1993, 1995; Zirbel *et al.*, 1993).

El modelo *random walk/gigant loop* predice una geometría al azar del territorio cromosómico. En este modelo se considera que bucles de cromatina del orden de 3 Mpb se unen a una estructura esqueleto que se pliega al azar. Estas consideraciones hacen poco probable que se produzca una compartimentación sistemática de los dominios cromosomales subregionales, por ejemplo en subregiones ricas y pobres en genes. Por otra parte, según este modelo la localización tridimensional de una determinada secuencia mostraría una gran variabilidad; así, unas veces podría localizarse en la superficie y otras en el interior del

## INTRODUCCIÓN

---

territorio (Yokota *et al.*, 1995). La posición tridimensional de un determinado bucle podría variar substancialmente simplemente por movimientos térmicos. En cuanto al grado de entremezclamiento, este modelo considera un alto grado de entremezclamiento entre los dos dominios brazo del mismo territorio cromosómico o entre territorios cromosómicos adyacentes. Sin embargo, estas suposiciones están en conflicto con la aparentemente baja proporción de entremezclamiento que se ha observado experimentalmente, tanto entre territorios cromosómicos adyacentes, como entre dominios brazo del mismo cromosoma.

En contraste, el modelo de compartimento-ICD asume una compartimentación funcional del núcleo, con una elevada organización tridimensional de los territorios cromosómicos (Cremer *et al.*, 1996). Este modelo propone una hipotética red tridimensional de canales intranucleares, los cuales contendrían los complejos proteicos necesarios para funciones esenciales como la transcripción, la replicación o la reparación. Los canales empezarían en los poros nucleares y se expandirían por la superficie de los territorios cromosómicos, generando espacios interterritoriales. Además, ramas de la red de canales entrarían al interior de los territorios extendiéndose entre los dominios cromosómicos, como los dominios brazo, los dominios banda y los dominios bucle. Esta red de canales constituye el armazón interfásico o matriz nuclear. La composición proteica del armazón interfásico es más compleja que la del armazón cromosómico. Las regiones SARs son definidas también como regiones de unión a la matriz nuclear, denominándose MARs (*matrix attachment regions*; Mirkovitch *et al.*, 1984). Por lo tanto, las regiones SARs-MARs pueden unirse reversiblemente a ambos armazones, formándose dominios bucle y rosetas en la cromatina interfásica (ver Jackson, 1991). Los brazos cromosómicos y bandas cromosómicas formarían dominios exclusivos dentro de un territorio dado. Por lo tanto, en este modelo los territorios cromosómicos serían mutuamente excluyentes. El aparente entremezclado de la cromatina está limitado a la zona límite entre dos superficies de territorios adyacentes.

La posición cromosómica y nuclear de los genes puede influir en su actividad (Brown *et al.*, 1997; Andrulis *et al.*, 1998). En muchos eucariotas el margen del núcleo representa un lugar de represión génica (Bridger y Bickmore, 1998). La heterocromatina condensada y el DNA de replicación tardía tienden a concentrarse en la periferia nuclear (Rae y Franke, 1972; Ferreira *et al.*, 1997), mientras que el DNA de replicación temprana se localiza en el interior nuclear (Carter *et al.*, 1993). El análisis espacial, por microscopía de barrido con láser confocal, ha revelado que los genes se encuentran preferentemente localizados en la periferia

## **INTRODUCCIÓN**

---

de los territorios. Esta posición es independiente de la actividad de los genes. En contraste, los fragmentos no codificantes se distribuyen al azar o se localizan preferencialmente en el interior del correspondiente territorio (Kurz *et al.*, 1996)

No se sabe todavía si la posición relativa entre los diferentes cromosomas está estrictamente definida o resulta de un proceso al azar. Tampoco está claro si todos los cromosomas de una célula interactúan con la periferia nuclear o si algunos cromosomas específicos ocupan selectivamente posiciones definidas en el nucleoplasma. Por otra parte, en células humanas mitóticamente activas se ha observado variaciones en la distribución espacial de los territorios cromosómicos (Emmerich *et al.*, 1989; Dietzel *et al.*, 1995)

### **1.4. CARIOTIPO**

El cariotipo es el término usado para describir el complemento cromosómico de una célula con el supuesto de que los cromosomas de una célula pueden tipificar los cromosomas de un individuo o de una especie. El cariotipo varía considerablemente entre especies.

Los cromosomas que constituyen la dotación cromosómica de una especie presentan rasgos morfológicos y de tinción distintivos. La morfología del cromosoma viene determinada por la posición del centrómero, que es característica de cada cromosoma particular y es uno de los rasgos usados para distinguir miembros individuales del cariotipo. Los cromosomas también difieren en tamaño. La longitud de los cromosomas se correlaciona con el contenido de DNA. Por otra parte, cada cromosoma presenta un patrón de bandas característico, bandas que como se ha indicado implican características estructurales y funcionales distintas. De hecho, la distribución de las islas CpG ha revelado diferencias a nivel de densidad génica entre los cromosomas. Esta heterogeneidad entre los cromosomas podría afectar la formación de las ACs.

## **2. ABERRACIONES CROMOSÓMICAS**

Como norma general, la constitución cromosómica de los individuos de una especie o de las células de un individuo es constante en cuanto a la morfología y número de cromosomas.

## INTRODUCCIÓN

---

Sin embargo, pueden producirse variaciones cromosómicas, espontáneas o inducidas, que pueden afectar tanto a su estructura como a su número. Estas variaciones respecto del cariotipo de la especie constituyen las aberraciones cromosómicas (ACs). Dentro de las ACs podemos diferenciar las ACs de tipo estructural de las ACs de tipo numérico. Asimismo, las ACs pueden afectar tanto a los autosomas como a los cromosomas sexuales.

En un sentido amplio, las ACs de tipo estructural implican cambios en la secuencia lineal de los genes sobre los cromosomas, por pérdida, ganancia o reordenación de secciones particulares de los mismos, permaneciendo por lo general constante el número de cromosomas. Por otra parte, los cambios estructurales pueden implicar a una o ambas cromátidas del cromosoma, diferenciando las aberraciones de tipo cromatídico de las de tipo cromosómico. En cambio, las ACs de tipo numérico implican variaciones en el número de cromosomas, ya sea a nivel global de la dotación genómica (euploidía) o de determinados cromosomas dentro de la dotación (aneuploidía).

Con el establecimiento del cariotipo humano en 46 cromosomas (Tjio y Levan, 1956), se empezaron a investigar las consecuencias de las anomalías numéricas y estructurales. Así, se pensó que las variaciones en las características del cariotipo podían ser la causa de las alteraciones fenotípicas que daban como resultado distintas anomalías, malformaciones, disfunciones o enfermedades de las conocidas como hereditarias o congénitas. En 1959, Lejeune, Turpin y Gautier encontraron la primera anomalía cromosómica del cariotipo humano en niños con síndrome de Down; en el mismo año se detectaron las anomalías asociadas al síndrome de Turner (Ford *et al.*, 1959) y al síndrome de Klinefelter (Jacobs y Strong, 1959).

Lejos de representar sucesos poco frecuentes, en la especie humana las ACs (estructurales y numéricas) presentan una frecuencia espontánea del orden de 6 en 1000 nacimientos. Además, el análisis cromosómico de los abortos espontáneos indica que cerca del 50% de los mismos presentan anomalías cromosómicas (Boue y Boue, 1981). En términos generales, las anomalías autosómicas tienen consecuencias fenotípicas más graves que las anomalías heterocromosómicas, y las pérdidas son más graves que las ganancias.

Las ACs pueden ser inducidas al exponer las células, o el individuo, a la acción de agentes mutagénicos. Esta relación de causalidad ha hecho que las ACs sean consideradas como un

## INTRODUCCIÓN

---

buen indicador de exposición a dichos agentes. Así, las aberraciones de tipo estructural (especialmente dicéntricas) se han utilizado como marcadores para cuantificar la exposición de las poblaciones a las radiaciones ionizantes desde la década de los 60 (Bender y Gooch, 1966; Sasaki y Miyata, 1968; Lloyd *et al.*, 1975, 1980). Por otra parte, se han detectado alteraciones del cariotipo en los distintos tipos de cánceres, pudiendo ser inespecíficas o altamente específicas de un tipo particular (Yunis, 1983; Sánchez-García, 1997; Mitelman, 2000). Las reorganizaciones cromosómicas juegan un papel muy importante en la activación de protooncogenes (Cleary, 1991) y en la inactivación de genes supresores de tumores (Stranbridge, 1992). Esta relación entre presencia de ACs e incidencia de cáncer se manifiesta en los síndromes de inestabilidad cromosómica. Los individuos con enfermedades recesivas como la ataxia telangiectasia, la anemia de Fanconi, el síndrome de Bloom o el síndrome de Nijmegen, presentan una elevada frecuencia de ACs, una elevada sensibilidad a la acción de los agentes clastogénicos y un elevado riesgo de padecer cáncer (Cohen y Levy, 1989). La relación entre la frecuencia de ACs y el riesgo a desarrollar cáncer ha sido evaluada en un estudio de colaboración realizado por diferentes países nórdicos, a partir del seguimiento desde 1970 de una gran cohorte de individuos (Hagmar *et al.*, 1994; 1998). Con el mismo objetivo también se estudió una cohorte italiana (Bonassi *et al.*, 1995). En ambos estudios se ha obtenido una relación positiva entre la frecuencia de ACs y riesgo a desarrollar cáncer (Hagmar *et al.*, 1998). Por otra parte, los resultados indican que las ACs son un paso intermedio en el camino hacia el cáncer, de forma independiente a la exposición a los agentes cancerígenos (Bonassi *et al.*, 2000)

Por consiguiente, la asociación entre desórdenes genéticos y presencia de reorganizaciones cromosómicas justifica el interés en entender los mecanismos involucrados en la formación de las ACs.

### **2.1. ORIGEN DE LAS ABERRACIONES CROMOSÓMICAS DE TIPO ESTRUCTURAL**

Ha pasado mucho tiempo desde que se iniciaron los primeros trabajos experimentales en *Tradescantia* sobre la inducción de las ACs. Sin embargo, y a pesar de los múltiples esfuerzos realizados, no se conocen completamente los mecanismos involucrados en la formación de las ACs.

## INTRODUCCIÓN

---

Un paso importante fue dado por Evans al considerar que las ACs eran producidas por las células y no por las radiaciones (Evans *et al.*, 1968). Desde ese momento, se estableció la relación entre lesión primaria inducida por un agente mutágeno, su incorrecta reparación o replicación y la formación de las ACs. Los agentes mutagénicos actúan sobre el DNA generando diferentes tipos de lesiones. Las ACs se originan a partir de las lesiones inducidas en el DNA.

### 2.1.1. TEORÍAS SOBRE EL ORIGEN DE LAS ACs

Tres teorías se han propuesto para explicar el origen de las ACs de tipo estructural, desde que Karl Sax demostró que las radiaciones ionizantes inducen ACs (Sax, 1938).

La primera teoría propuesta fue la **teoría de la rotura y reunión**, introducida por Sax (Sax *et al.*, 1940) y luego formulada matemáticamente por Lea y Catchside (1942). Esta teoría considera que la radiación actúa generando roturas en el cromonema o esqueleto de la cromátida. Se considera que el corte es completo, de forma que cada rotura implica dos extremos abiertos. A partir de estos cortes, definidos como roturas primarias, se formarían todas las ACs estructurales. De hecho, las roturas primarias pueden seguir tres caminos diferentes: la restitución, la reunión ilegítima o permanecer sin unirse convirtiéndose en residuos visibles de las roturas primarias. Se considera que el 90 % de las roturas primarias siguen el camino de la restitución. En este caso, los dos extremos de la rotura vuelven a unirse permitiendo la restitución de la estructura cromosómica original. En menor frecuencia se producen uniones ilegítimas entre extremos procedentes de roturas diferentes, próximas en el tiempo y espacio, formándose como resultado los intercambios cromosómicos. Por último, en una proporción de las roturas falla tanto el proceso de restitución como el de reunión ilegítima permaneciendo, por tanto, los dos extremos de las roturas sin unirse, produciéndose las deleciones. Recientemente, Savage ha caracterizado la teoría de la rotura y reunión como “no rotura-no intercambio”, es decir para que se formen los intercambios es necesario que primero se induzcan roturas; si no hay rotura no hay intercambio (Savage, 1998)

La siguiente teoría propuesta fue la **teoría del intercambio**, introducida por Revell para aberraciones de tipo cromatídico y extendiéndose después para aberraciones de tipo cromosómico (Revell, 1955). En este caso, el evento primario no es la rotura en el esqueleto



## INTRODUCCIÓN

---

de la cromátida, como propone la teoría clásica, sino una lesión inestable, de naturaleza no bien definida, con un tiempo de vida limitado. Estas lesiones decaen, por si solas, no produciéndose ninguna discontinuidad en el cromonema y, por lo tanto, sin generarse roturas visibles. Sin embargo, si antes del decaimiento dos de estas lesiones entran en contacto pueden entrar dentro de un estado de “iniciación de intercambio” formándose un intercambio potencial, en el sentido que el proceso es reversible. El intercambio real puede producirse después de un tiempo, generándose la entidad estructural. Para Revell las roturas son secundarias, son el resultado de un fallo parcial del proceso de intercambio y no el resultado de la no reunión de roturas primarias preexistentes. Esta teoría puede caracterizarse por “no intercambio-no rotura” ya que para que se produzca la rotura primero ha de producirse el intercambio (Savage, 1998).

En la década de los ochenta surge la **teoría molecular** al tenerse en cuenta la complejidad de los cromosomas, la arquitectura intranuclear y los mecanismos moleculares implicados en su mantenimiento y reparación. Esta teoría, introducida por Chadwich y Leenhouts, sugiere que las ACs se originan a partir de una única DSB (Chadwich y Leenhouts, 1978, 1998). Inicialmente se propone que los extremos rotos pueden unirse con extremos no rotos, los telómeros. Sin embargo, a partir de los estudios realizados con la técnica de bandas o, posteriormente, con la técnica del pintado cromosómico, se observa que la mayoría de los intercambios implican en su formación a regiones intersticiales de los cromosomas. Una segunda alternativa, mucho más atractiva, se basa en el proceso de reparación por recombinación propuesto por Resnick (Resnick, 1976). Este modelo considera que a partir de una DSB se puede generar una segunda DSB como resultado del proceso de reparación por recombinación, de forma que, se inducen enzimáticamente segundas DSB en regiones no dañadas. El proceso depende de la asociación entre la región que presenta la rotura y una región homóloga no dañada, de forma que pueda formarse el heterodúplex. La homología no es necesaria que se produzca a nivel de todo el cromosoma, sólo es necesaria a nivel local. El uso de homologías parciales producirá la inducción de ACs. Esta última teoría se caracteriza por “una DSB-un intercambio” (Savage, 1998).

### 2.2. AGENTE INDUCTOR

Las ACs pueden inducirse por una extensa variedad de agentes físicos y químicos. Estos agentes son generalmente clasificados como S-independientes y S-dependientes. Los agentes

## **INTRODUCCIÓN**

---

S-dependientes se caracterizan por inducir aberraciones de tipo cromatídico y requieren del paso de la célula por la fase S para procesar la lesión y convertirla en una aberración visible (Kihlman, 1966, 1971; Evans, 1977). Por el contrario, los agentes S-independientes no necesitan que las células pasen por la fase S del ciclo celular para que se generen las ACs. En este caso, el tipo de aberración depende de la fase del ciclo celular en la que la célula ha sido tratada. Así, se producen aberraciones de tipo cromosómico cuando las células son tratadas antes de la replicación del DNA, mientras que se obtienen aberraciones de tipo cromatídico al tratar una vez replicado el DNA. Se considera que las diferencias entre los dos tipos de agentes clastogénicos son debidas al diferente tipo de lesiones inducidas (Bender, 1974).

### **2.2.1. AGENTES S-INDEPENDIENTES**

Los agentes S-independientes son aquellos que son capaces de inducir directamente roturas en la cadena de DNA, tales como las radiaciones ionizantes o los agentes radiomiméticos como la bleomicina. Estos agentes inducen ACs a partir de la reparación incorrecta o no reparación de las roturas.

#### **2.2.1.1. RADIACIÓN IONIZANTE**

Es apropiado considerar primero cómo las radiaciones pueden inducir ACs, no sólo porque es históricamente coherente, sino porque los estudios con radiación han contribuido a entender cómo las ACs pueden ser inducidas por agentes químicos.

Se entiende por radiaciones ionizantes las que son capaces de arrancar electrones de los átomos que forman los materiales por los que atraviesan. Todas las radiaciones, al atravesar un material, pierden energía que es absorbida por los átomos del medio. La energía transferida puede ser suficiente para provocar el desplazamiento de electrones situados en las órbitas de los átomos, quedando así ionizados o excitados, según que salgan del átomo o simplemente cambien de órbita dentro del mismo, respectivamente. Cada proceso de ionización requiere aproximadamente 33 eV, energía que es más que suficiente para romper el enlace entre dos átomos de carbono.

La acción química de la radiación puede ser directa o indirecta. La acción directa ocurre cuando la energía de la radiación se deposita en la misma molécula del material que se

## INTRODUCCIÓN

---

estudia, causando la ionización o excitación de la misma y, por lo tanto, alterando su función biológica. La acción indirecta se produce cuando la radiación interacciona con otros átomos o moléculas produciendo radicales libres. En este caso, son los radicales libres los que acaban interaccionando con la macromolécula diana. Un radical libre presenta un electrón desapareado en su orbital más externo siendo, por tanto, altamente reactivo.

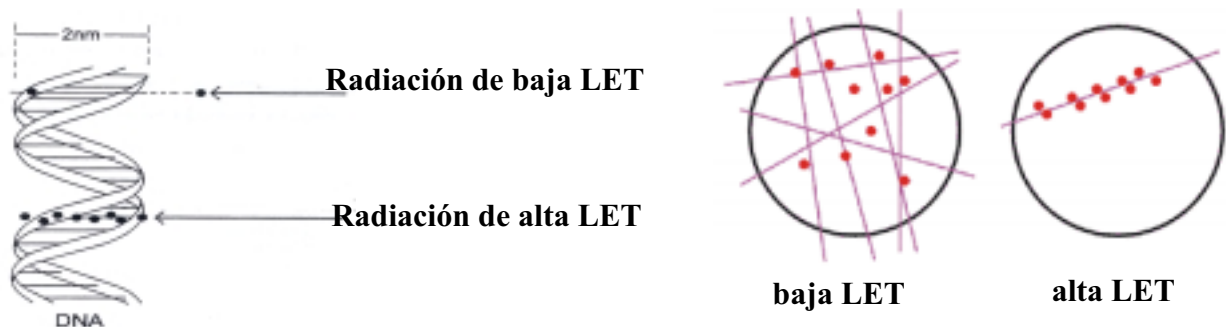
Muchos de los procesos de ionización ocurren en las moléculas de agua, principal constituyente de células y tejidos. El resultado es la producción de tres radicales libres y dos productos moleculares ( $\text{H}_2\text{O} \rightarrow e^-_{\text{aq}}, \text{OH}^*, \text{H}^*, \text{H}_2, \text{H}_2\text{O}_2$ ). Generalmente, los radicales libres reaccionan con las moléculas orgánicas substrayendo un átomo de hidrógeno o incorporándose en un sitio de insaturación. En presencia de oxígeno, éste reacciona rápidamente con los radicales libres primarios y con los radicales de las moléculas orgánicas, generando radicales peróxido. La acción de las radiaciones ionizantes sobre las proteínas, lípidos y carbohidratos no es crítica, ya que de estas macromoléculas hay muchas copias en la célula, de forma que sería necesaria una dosis de radiación muy alta para inactivarlas. En cambio, los efectos que produce sobre el DNA pueden ser muy nocivos debido a las copias limitadas y a que su integridad es vital para la supervivencia de la célula. Los radicales libres pueden reaccionar con el DNA tanto a nivel de bases como de azúcares.

Las lesiones inducidas por las radiaciones ionizantes han sido extensamente estudiadas (Téoule, 1987; Ward, 1988) y parece que tanto la acción directa como indirecta de la radiación producen idénticas bases intermedias reactivas que generan los mismos tipos de bases dañadas. Las alteraciones sobre los residuos de azúcar ocurren menos frecuentemente que sobre las bases, pero son biológicamente importantes y pueden producir roturas de cadena. Las radiaciones ionizantes también pueden originar roturas de simple cadena (SSB = *single strand breaks*), directamente por rotura de los enlaces fosfodiéster. También se originan roturas de doble cadena (DSB = *double strand breaks*), las cuales consisten en dos SSB opuestas, o casi opuestas, una en cada cadena de la hélice. Otras lesiones inducidas por la radiación ionizante son los enlaces cruzados entre proteínas y DNA (Oleinick *et al.*, 1987), los cuales pueden afectar el funcionamiento normal de la célula, alterando la replicación y la transcripción. Los enlaces cruzados pueden también producirse dentro de una misma molécula de DNA o entre dos moléculas diferentes.

## INTRODUCCIÓN

El efecto de las radiaciones va a depender de distintos factores tales como el tipo de radiación, la proporción de la dosis (gray/min), el periodo de exposición (dosis única, dosis fraccionada, exposición crónica), y el tipo de exposición (interna, externa)

La distribución de los eventos primarios, ionizaciones y excitaciones a lo largo de la trayectoria del haz, o de la partícula ionizante, varía en función del tipo de radiación. La media de separación de los eventos primarios decrece con el incremento de la carga y masa de la partícula. La LET (*linear energy transfer*) o transferencia lineal de energía permite comparar la deposición de energía de los diferentes tipos de radiación (revisión en Bender *et al.*, 1988). La LET define la energía media depositada por unidad de longitud de la trayectoria (keV/ $\mu$ m). En función de la LET las radiaciones ionizantes pueden clasificarse en radiaciones de baja LET y de alta LET. Las radiaciones de baja LET depositan relativamente pequeñas cantidades de energía por unidad de longitud, pero tienen suficiente energía cinética para atravesar considerables distancias en los tejidos. Los rayos-X y los rayos  $\gamma$  son ejemplos de radiaciones de baja LET. Este tipo de radiaciones tienen LETs de 3-3,5 KeV/ $\mu$ m o incluso menores. En contraste, las radiaciones de alta LET, como los neutrones, protones y partículas  $\alpha$ , emitidas en la desintegración radioactiva de ciertos radioisótopos, tienen LETs comprendidas entre 10 a cientos de keV / $\mu$ m. Las radiaciones de alta LETs depositan gran cantidad de energía por unidad lineal de trayectoria pero, en comparación a las radiaciones de baja LET, generan pocos haces de ionización por unidad de dosis y atraviesan distancias cortas (figura 3). La LET es un parámetro importante en la determinación de la curva dosis-respuesta, en la eficiencia relativa de los diferentes tipos de radiación y en la distribución del daño cromosómico en las células.



**Figura 3. Diferencias entre las radiaciones de baja y alta LET en la producción de ionizaciones a lo largo de la trayectoria del haz o partícula ionizante y su distribución en el interior de las células.**

## INTRODUCCIÓN

---

La curva dosis-respuesta, después de exposiciones agudas a radiaciones de baja LET, sigue una relación lineal para aberraciones que resultan únicamente de una rotura (deleciones terminales), y una relación lineal-cuadrática para las aberraciones de tipo intercambio. La relación lineal cuadrática viene determinada por la ecuación (Lea, 1946):

$$Y = c + \alpha D + \beta D^2$$

donde Y= producción de intercambios, D = dosis de radiación, c = frecuencia basal de intercambios,  $\alpha$  y  $\beta$  = constantes que derivan del ajuste a la curva. La ecuación puede interpretarse, en términos simples, considerando que para que se forme un intercambio, son necesarias dos roturas, una en cada cromosoma implicado, y que éstas pueden ser producidas por un único haz de ionización o por dos haces independientes. Para las radiaciones de baja LET, la probabilidad que las dos lesiones necesarias sean producidas por un único haz es muy baja. En este caso, muchos de los intercambios se producirán a partir de ionizaciones procedentes de dos haces independientes. Sin embargo, a dosis bajas (<0.5 Gy), la probabilidad que dos haces atraviesen una diana es aún inferior a la probabilidad que un único haz genere las dos lesiones necesarias, de manera que a dosis bajas los intercambios se forman, casi exclusivamente, como consecuencia de un único haz, produciéndose con frecuencias muy bajas. La proporción de intercambios (dicéntricos o translocaciones) inducidos por un único haz viene determinado en el término lineal  $\alpha D$  de la ecuación. A medida que aumenta la dosis, incrementa la contribución de dos haces en la inducción de intercambios. La proporción de intercambios inducidos por dos haces vienen determinados por el término cuadrático  $\beta D^2$  de la ecuación. Por lo tanto, la inducción de intercambios es la combinación de eventos resultantes de uno o dos haces, siendo el primer caso el que predomina a dosis bajas y el segundo a dosis altas.

En contraste, la curva dosis-respuesta para las radiaciones de alta LET sigue una función lineal para todos los tipos de ACs:  $Y = c + \alpha D$ . En este caso, la energía depositada por un único haz es suficiente para inducir dentro del núcleo múltiples alteraciones en el DNA, de forma que la mayoría de las aberraciones de tipo intercambio se producen a partir de las lesiones inducidas por haces simples. El componente  $\beta$  contribuye de forma no significativa en la inducción de ACs.

## INTRODUCCIÓN

---

En el caso de las radiaciones de baja LET, la frecuencia de ACs no sólo depende de la dosis, sino también de cómo ésta sea liberada. Una liberación lenta implica un descenso del componente  $\beta$  de la ecuación dosis-respuesta. El descenso se debe a que el daño inducido en el DNA por un primer haz puede ser reparado antes de que otra lesión, potencialmente interactuante con la primera, sea inducida por un segundo haz. Consecuentemente, disminuye la frecuencia de intercambios resultado de la interacción de dos haces independientes de radiación.

Las radiaciones de alta LET son más eficaces en la inducción de ACs por unidad de dosis que las radiaciones de baja LET. La efectividad de los diferentes tipos de radiación para inducir un particular efecto biológico se expresa por el término RBE (*relative biological effectiveness*). La RBE se define como la relación entre las dosis de una radiación de referencia (usualmente 250 kV de rayos-X) y la dosis de la radiación bajo estudio que produce el mismo efecto biológico. En general, el valor RBE aumenta con el incremento de la LET hasta un valor óptimo de 100 keV/ $\mu$ m, para decrecer después con valores más altos de la LET. A la densidad de 100 keV/ $\mu$ m, la separación media entre dos eventos de ionización coincide con el diámetro de la doble hélice de DNA ( $\approx 2$ nm). Las radiaciones con esta densidad de ionización inducen muy probablemente una DSB con el paso de una única partícula cargada. Las DSBs, como veremos más adelante, son las lesiones principalmente involucradas en la formación de las ACs, por lo tanto, la eficiencia biológica depende de la inducción de DSBs. Las radiaciones con menor LET pueden requerir dos haces para inducir una DBS y, por lo tanto, son menos eficientes. Por otra parte, radiaciones con LET por encima del valor óptimo depositan más energía de la necesaria, desperdiciándose energía; así, se requieren mayores cantidades de energía para inducir un efecto biológico similar. El valor absoluto de la RBE no es único, depende del nivel de daño biológico y, por lo tanto, de la dosis.

La distribución celular de las ACs también depende de la LET. Con las radiaciones de baja LET las ACs se distribuyen al azar entre las células, debido particularmente al gran número de haces. Todas las células tienen un riesgo igual y aleatorio de ser atravesadas. En tal situación, la proporción relativa de metafases con 0, 1, 2 o más ACs se ajusta a una distribución de Poisson. En contraste, cuando las células son expuestas a dosis similares de radiaciones de alta LET, sólo una pequeña proporción de la población celular es atravesada y

## INTRODUCCIÓN

---

las células que son atravesadas están probablemente recibiendo una mayor y más variable deposición de energía. Consecuentemente, las ACs no se distribuyen al azar entre las células. Hay más células con múltiples ACs y menos células con una sola AC, de las que se esperan según la distribución de Poisson.

### 2.1.1.1.1. Lesión inicial: rotura de doble cadena (DSB)

De los diferentes tipos de lesiones inducidas por la radiación ionizante se considera que la DSB es la lesión directamente implicada en la formación de las ACs. Diferentes observaciones sugieren este papel principal de las DSBs. Entre ellas se encuentra la relación existente entre la eficiencia en generar ACs y la capacidad de inducir DSBs de las radiaciones ionizantes. Las radiaciones de alta LET, más eficientes en inducir ACs que las radiaciones de baja LET, son también más eficientes en inducir DSBs (Bender *et al.*, 1974). Las radiaciones de baja LET inducen predominantemente SSBs y bases dañadas, en proporción similar, mientras que sólo inducen 1 DSB por cada 10-20 SSBs. Con las radiaciones de alta LET, la proporción de DSBs incrementa significativamente hasta casi igualar la inducción de SSBs. Los experimentos con dosis fraccionadas, que permiten estudiar la interacción de las lesiones, también aportan evidencias a favor del papel de las DSB en la formación de las ACs. Estos experimentos se basan en la premisa de que las roturas inducidas por la primera dosis permanecen abiertas para interactuar con las roturas inducidas por la segunda dosis. En este caso, la cinética con la que desaparece la posibilidad de interacción de las lesiones, para formar ACs, es similar a la cinética de reparación de las DSBs. Por otra parte, una evidencia directa se obtiene al incrementar la frecuencia de ACs en células irradiadas, después de realizar un post-tratamiento con endonucleasas de *Neurospora*, tratamiento que convierte las SSBs en DSBs (Natarajan *et al.*, 1980). La eficiente inducción de ACs por parte de las endonucleasas de restricción, tratamiento que únicamente induce DSBs, constituye otra prueba a favor de la implicación directa de las DSBs en la formación de las ACs (Bryant, 1984; Natarajan y Obe, 1984).

Por otra parte, se ha sugerido que las SSBs o bases dañadas también pueden contribuir a la formación de las ACs (Preston, 1980; Natarajan *et al.*, 1986). Se considera que estas pueden dar origen a DSBs durante el proceso de reparación por escisión, por la acción de nucleasas de cadena simple (ver Moore y Bender, 1993), o como consecuencia de dos bases dañadas o de una SSB y una base dañada situadas próximas y en cadenas opuestas de la doble hélice de

## INTRODUCCIÓN

---

DNA (Blount *et al.*, 1997). Sin embargo, en otros estudios se considera que las bases dañadas, aunque formen parte de sitios de daño múltiple, no están probablemente implicadas en la formación de las ACs (ver Pfeiffer *et al.*, 1996).

### 2.1.1.1.2. Conversión de otras lesiones en DSB

Para determinar si las DSB pueden formarse a partir de otras lesiones, durante algún paso del proceso de reparación, se han realizado estudios utilizando inhibidores de la reparación. La reparación de las lesiones inducidas en el DNA es un proceso complejo que generalmente requiere la participación de una DNA polimerasa. Diferentes estudios han analizado la frecuencia de ACs bajo la influencia de inhibidores de las DNA polimerasas. Inhibidores como la afidicolina, la 1- $\beta$ -arabinofuranosilcitosina (ara-C) y la N-etilmaleimida (NEM) inhiben eficazmente a las DNA polimerasas  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , y débilmente a la  $\beta$ . En contraste, inhibidores como el dideoxiTTP inhiben fuertemente a la polimerasa  $\beta$  y débilmente a las polimerasas  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  (Keeney y Linn, 1990).

Los estudios realizados con inhibidores de las DNA polimerasas muestran que la frecuencia de ACs aumenta tras su aplicación en células previamente lesionadas (Hiss y Preston, 1977; Preston y Gooch, 1981; Bender y Preston, 1982; Preston, 1982; Kishi, 1987). El incremento se considera que es debido a la inhibición de la reparación por escisión de las lesiones previamente inducidas. Se piensa que la inhibición de la DNA polimerasa bloquea el paso de síntesis de la reparación; de este modo, durante el periodo de inhibición se acumulan huecos, resultado de la reparación incompleta de las lesiones y, a partir de estos huecos, se obtienen DSBs bajo la acción de endonucleasas. En ausencia de inhibidores, es decir, en condiciones normales, se considera que las lesiones inducidas en el DNA pueden dar lugar a DSBs y por lo tanto ACs, como consecuencia de la competición entre la reparación de las lesiones por la polimerasa y la conversión de las lesiones a DSBs por acción de endonucleasas (Moore y Bender, 1993). De esta forma, a partir de otras lesiones se podrían obtener DSBs.

Diferentes estudios han analizado el efecto del ara-C sobre las lesiones inducidas por la radiación ionizante. En general, en estos estudios se ha detectado un incremento en la frecuencia de ACs; sin embargo, el efecto potenciador se ha interpretado de forma distinta. Los resultados obtenidos sugieren la implicación de diferentes lesiones. Así, Preston encontró



## INTRODUCCIÓN

---

que la frecuencia de ACs aumentaba al incrementar el tiempo de incubación del ara-C hasta 3 horas después de la irradiación con rayos-X (Preston, 1980). A partir de este resultado, se sugirió que la inhibición está actuando sobre las bases dañadas. Por otra parte, en células irradiadas en G<sub>2</sub> y tratadas con ara-C, 2 o 3 horas hasta la fijación, se obtiene un incremento en la frecuencia de deleciones pero no en la frecuencia de intercambios, sugiriendo que el ara-C puede inhibir la reparación de todo el daño que pueda ser convertido en intercambio y no sólo una parte del mismo (Preston, 1980). En otro estudio, Holmerg y Gumauskas obtuvieron que el mayor efecto del ara-C sobre las lesiones inducidas por los rayos X se produce durante los primeros 5-15 minutos de incubación con el compuesto, de forma que el incremento se debe a las roturas de vida corta (Holmerg y Gumauskas, 1986). Los resultados obtenidos por Natarajan y colaboradores son similares, observando que el efecto del ara-C alcanza un nivel de saturación a los 30-60 minutos después de la incubación con ara-C, y que el efecto potenciador casi desaparece si se permite la reparación durante 1 hora antes de añadir el ara-C (Natarajan *et al.*, 1986).

### 2.1.1.1.3. Reparación de las DSBs

Actualmente se acepta que los mecanismos involucrados en la reparación de las DSBs y en la recombinación genética son los principales responsables de la formación de las ACs. El principal soporte a esta hipótesis deriva probablemente del análisis de los llamados síndromes de inestabilidad cromosómica, los cuales se asocian a un incremento drástico de la frecuencia de ACs. Síndromes como el síndrome de Nijmegen, la anemia de Fanconi, el síndrome de Bloom, el síndrome de Werner y la ataxia telangiectasia se caracterizan por deficiencias en genes que codifican proteínas asociadas a los mecanismos de reparación de las DSBs. Estos defectos genéticos sugieren que la reparación de las DSBs juegan un papel crucial en la formación de las ACs.

Los mecanismos involucrados en la reparación de las DSBs pueden agruparse formalmente en dos grupos: mecanismos dependientes de homología (HRR= *homologous recombination repair*) y mecanismos independientes de homología (NHEJ= *non-homologous end joining*).

Muchos de los conocimientos actuales sobre la HRR proceden de varias décadas de investigación básica en fagos, bacterias, y levaduras, organismos en los que la HRR es muy eficiente. Por el contrario, durante cierto tiempo se ha considerado que en vertebrados la

## INTRODUCCIÓN

---

NHEJ es más eficiente que la HRR (Roth y Wilson, 1988). Sin embargo, recientemente se ha indicado que las células de mamífero son también eficientes en HRR (Thompson, 1996; Liang *et al.*, 1998). Los diferentes mecanismos de reparación de las DSBs se representan en la figura 4.

La HRR se caracteriza por requerir extensas regiones de homología (varios cientos de pb). El proceso de HRR puede ser conservativo o no conservativo. Los mecanismos de HRR conservativos (figura 4-A) se caracterizan por la reparación precisa de la DSB, al restituir la secuencia original de la rotura copiando la información de la cromátida o cromosoma homólogo. Se han descrito tres mecanismos de reparación conservativa: DSBR=*double-strand break repair*; SDSA= *synthesis-dependent strand annealing* y BIR= *break-induced replication*.

DSBR: Modelo propuesto por Resnick (1976) y más tarde elaborado por Szostak y colaboradores (1983). El proceso se inicia con el agrandamiento de la rotura y resección exonucleolítica 5'→3' generándose en el lugar de la DSB un hueco con extremos de cadena simple en 3'. A continuación, uno de los extremos 3' invade el cromosoma homólogo o la cromátida hermana a nivel de la región homóloga. Al invadir la región homóloga el extremo 3' desplaza a una de las cadenas del dúplex, de forma que la cadena desplazada forma un lazo D. Este lazo se irá agrandando a medida que se produzca la síntesis de reparación a partir del extremo 3' invasor. Así pues, el extremo 3' sirve de cebador en la síntesis de reparación semiconservativa. A medida que se produce la síntesis de reparación se va desplazado a la cadena del dúplex y, por lo tanto, se va agrandando el lazo D. Llega un momento que el lazo D abarca todo el hueco generado y acaba emparejándose con el otro extremo 3' de la rotura. A partir de este extremo se inicia la síntesis de reparación que convierte el lazo D en bicatenario. De este modo, las moléculas bicatenarias quedan conectadas por un tramo de DNA heterodúplex bordeado por dos estructuras ramificadas que constituyen las juntas recombinantes o juntas de Holliday (HJ). La resolución endonucleolítica de las juntas genera productos con y sin entrecruzamiento.

SDSA: Similar al modelo DSBR con la diferencia que las nuevas cadenas sintetizadas son desplazadas de la molécula molde (molécula receptora) a la molécula rota (molécula donadora). De esta forma, al desplazarse las dos cadenas sintetizadas hacia la molécula rota,

# INTRODUCCIÓN

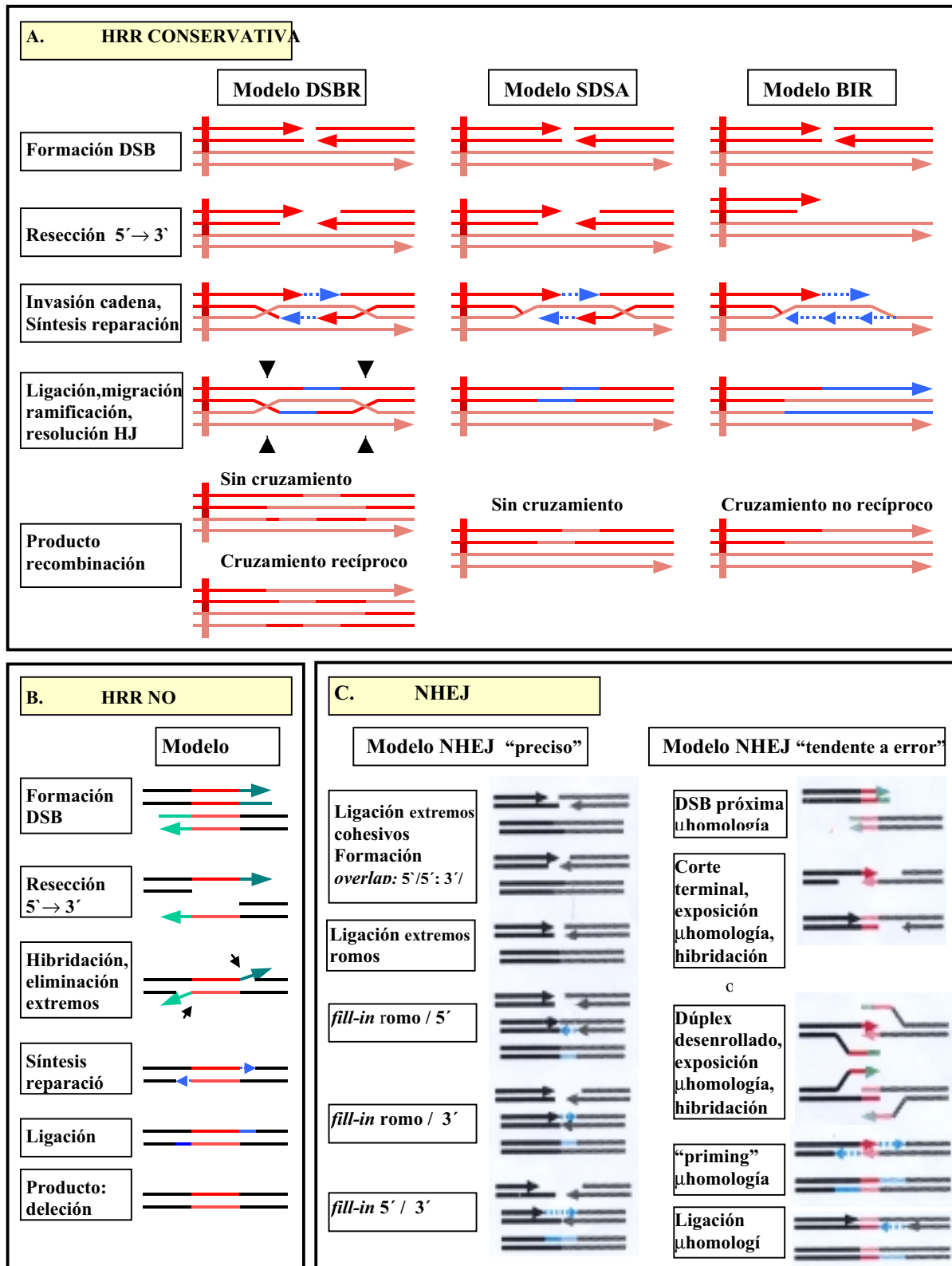


Figura 4. Mecanismo de reparación de las DSBs. A) Reparación por recombinación homóloga conservativa (HRR CONSERVATIVA): modelo DSBR, modelo SDSA y modelo BIR; B) Reparación por recombinación homóloga no conservativa (HRR NO CONSERVATIVA): modelo SSA; C) Mecanismo de reparación por recombinación no homóloga (NHEJ): modelo NHEJ "preciso" y modelo NHEJ "tendente a error"(adaptado de Pfeifer *et al.*, 2000)

## INTRODUCCIÓN

---

se produce la hibridación entre ellas. Por lo tanto, en este caso la síntesis de reparación es conservativa (revisión en Pâques y Haber, 1999).

BIR: Este modelo se caracteriza porque sólo uno de los extremos de la DSB invade al cromosoma homólogo o cromátida hermana. En este caso, la síntesis de reparación se realiza como si se tratara de una verdadera horquilla de replicación (Mosig, 1987; Kogoma 1996; Chen y Kolodner, 1999)

En contraste, la HRR no conservativa (figura 4-B) implica pérdida de material (Lin *et al.*, 1984). Se ha descrito sólo el modelo SSA (*single-strand annealing*), el cual describe la reparación de DSB cuando ésta ocurre entre dos regiones homólogas. En este caso, la reparación de los cromosomas rotos es muy eficiente e implica la pérdida de una de las regiones de homología y la región intermedia entre las dos regiones homólogas repetidas. El proceso se inicia con la resección extensiva 5' → 3' de cada extremo de la DSB hasta que las regiones de homología flanqueantes de la rotura están expuestas en los extremos de cadena simple en 3', de forma que es posible la hibridación entre las regiones homólogas. Después de la hibridación entre las regiones homólogas, se eliminan los extremos sobrantes. El proceso se completa con los pasos de síntesis y ligación. Este proceso permite la reparación de la DSB, pero con la pérdida de material (Carroll *et al.*, 1986; Mayron y Carroll 1991a,b).

Por otra parte, están los mecanismos independientes de homología, NHEJ, los cuales son capaces de unir directamente extremos de DSB (figura 4-C). La independencia de homología no quiere decir que la homología nunca esté implicada. De hecho, a menudo se requieren pequeñas regiones de homología de 1-10 pb. El mecanismo más simple de NHEJ consiste en la ligación de extremos compatibles. Sin embargo, la NHEJ es capaz de unir extremos no complementarios, independientemente de su secuencia y estructura. En tal caso, los extremos han de modificarse enzimáticamente lo que implica sustitución de bp, inserciones y/o deleciones (ver Pfeiffer, 1998). Existen al menos dos formas diferentes de NHEJ, uno dependiente de la proteína Ku, que une extremos de DNA de forma "precisa", y otro independiente de la proteína Ku, que se caracteriza por generar deleciones.

NHEJ "precisa": a pesar del término preciso, sólo se restituye la secuencia original correctamente cuando se dispone de dos extremos compatibles directamente ligables. Sin embargo, en el resto de casos, se tiende a conservar las secuencias del DNA no

## INTRODUCCIÓN

---

complementario que interactúa generándose dos tipos de productos (*fill-in* y *overlap*). El tipo de producto formado depende de la estructura de los extremos. Las uniones *fill-in* se originan durante la unión de extremos contiguos: como/5'-sobresaliente, como/3'-sobresaliente o 5'-sobresaliente/3'-sobresaliente, mientras que las uniones por *overlap* se forman entre extremos salientes de la misma polaridad (5'/5', 3'/3') (Pfeiffer y Vielmetter, 1988; Pfeiffer *et al.*, 1994 a,b). Así, en el modelo *fill-in*, se preservan las secuencias sobresalientes de cadena simple por síntesis de relleno en un proceso en el cual los extremos son transitoriamente unidos por interacciones no covalentes. En el modelo de *overlap*, los extremos sobresalientes forman pequeños solapamientos mal emparejados, gracias a la complementariedad fortuita de algunas bases, cuya estructura determina el patrón de las subsiguientes reacciones de reparación (Pfeiffer *et al.*, 1994 a,b). Los datos sugieren la intervención de un factor de alineación que mantenga los dos extremos alineados hasta obtenerse la estructura ligable (Thode *et al.*, 1990). Se considera que el heterodímero Ku70/80 constituyente de la quinasa dependiente de DNA (DNA-PK) actúa como factor de alineación. Este heterodímero es capaz de unirse a una extensa variedad de extremos de DNA, proponiéndose que actúa protegiendo los extremos del DNA de la degradación y aumentando la reparación por NHEJ precisa.

NHEJ "tendente a error": es independiente del heterodímero Ku 70/80, de hecho, este mecanismo sólo es detectable cuando este heterodímero no es funcional (Boulton y Jackson, 1996; Critchlow y Jackson, 1998). El proceso genera deleciones cuyos puntos de rotura están flanqueados por pequeñas regiones de homología. En este caso, las regiones de microhomología quedan expuestas en regiones de simple cadena por resección exonucleolítica y/o por desenrollamiento del dúplex. El proceso es similar al descrito para el modelo SSA, con la diferencia de que en este caso no se requieren extensas regiones de homología.

Los diferentes mecanismos de reparación de las DSBs en el DNA operan durante distintas fases del ciclo celular (Hendrickson, 1997). La HRR actúa predominantemente después de la replicación del DNA y en la fase G<sub>2</sub>, mientras que la NHEJ actúa principalmente durante la fase G<sub>1</sub> y antes de la replicación del DNA. Los mecanismos de reparación descritos, tanto los dependientes como los independientes de homología, tienen potencial para inducir ACs de tipo intercambio y pueden explicar el origen de las ACs de tipo cromosómico y cromatídico, dependiendo de la fase del ciclo celular en la que se ha inducido la DSB. Así, la HRR conservativa puede inducir ACs de tipo intercambio si la invasión al dúplex de DNA, en lugar

## INTRODUCCIÓN

---

de producirse a nivel de la secuencia homóloga en la cromátida hermana o cromosoma homólogo, se produce a nivel de una región repetida en otro cromosoma (Lehrman *et al.*, 1985; Vnencak-Jones *et al.*, 1988). Igualmente, la reparación por SSA y NHEJ puede inducir ACs de tipo intercambio. En este caso se requiere la presencia de dos DSBs (cuatro extremos) para poder producirse la interacción entre extremos procedentes de diferentes DSBs y no entre los extremos de la misma DSB (Haber y Leung, 1996; Thacker, 1999). Por otra parte, las deleciones (fragmentos acéntricos) pueden originarse por DSB no reparadas o reparadas incompletamente.

Cuando el término rotura en la teoría rotura y reunión, y lesión inestable en la teoría de intercambio, son reemplazados por el término molecular DSB, las tres teorías son compatibles con los mecanismos de reparación descritos. Por lo tanto, las ACs pueden originarse por diferentes tipos de reparación empezando con una o más DSBs dentro del dúplex de DNA (revisión en Pfeiffer *et al.*, 2000)

### 2.1.1.2. BLEOMICINA

La bleomicina es un antibiótico glicopeptídico producido por el hongo *Streptomyces verticillus* (Umezawa *et al.*, 1966), que se utiliza principalmente en quimioterapia para el tratamiento de tumores malignos (Hecht, 1986; Stubbe y Kozarich, 1987). Existen diferentes formas de bleomicina, cuya estructura química contiene varios aminoácidos y azúcares inusuales y grupos amino terminales que difieren entre las formas análogas; sin embargo, no se han encontrado grandes diferencias de actuación entre las diferentes variantes. Así, la formulación clínica normalmente utilizada (Bleoxane) es una mezcla de varios componentes (Hecht, 1986; Povirk y Austin, 1991)

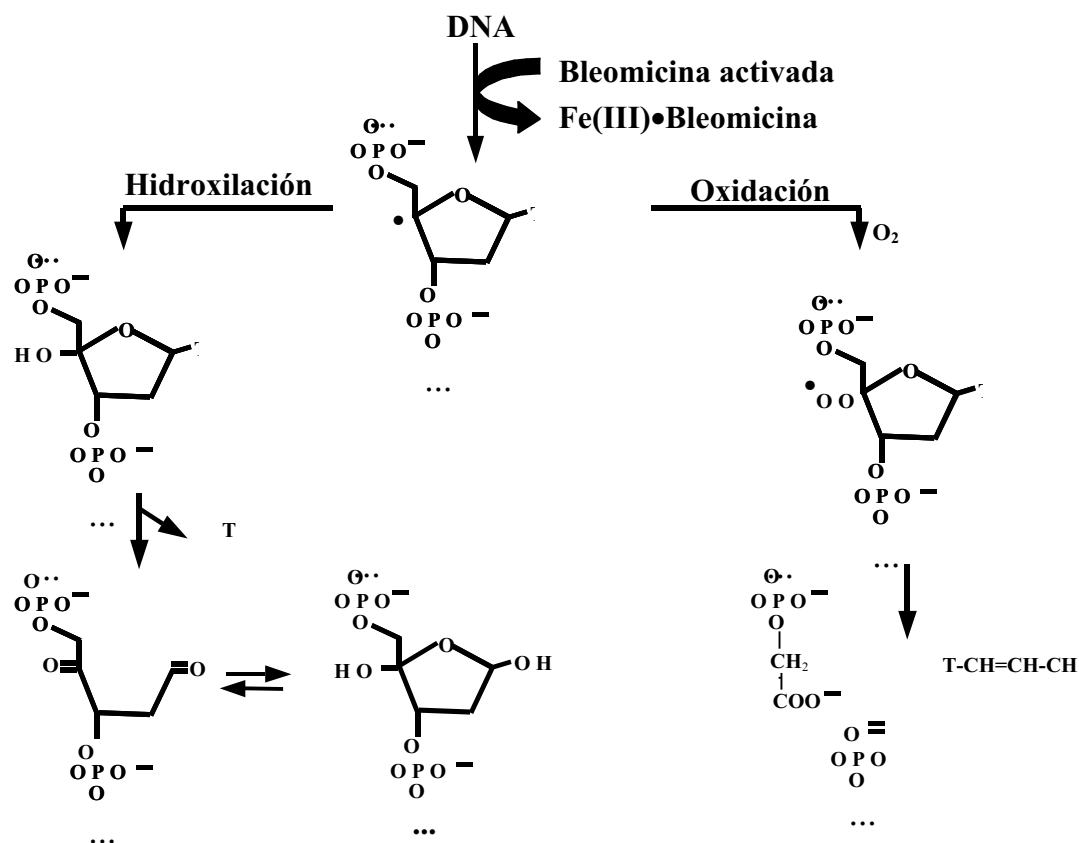
La bleomicina da resultados positivos en la gran mayoría de los ensayos que detectan genotoxicidad, incluyendo los ensayos de ACs (Dresp *et al.*, 1978) y de micronúcleos en cultivos de linfocitos humanos (Hoffmann *et al.*, 1993 a,b). En contraste, da resultados negativos en el ensayo de Ames y en el ensayo de intercambios entre cromátidas hermanas (Povirk y Austin, 1991). La bleomicina tiene un efecto similar al de las radiaciones ionizantes por lo que se la considera un compuesto radiomimético.

## INTRODUCCIÓN

---

Estudios de farmacocinética efectuados con la [<sup>3</sup>H]-bleomicina muestran que la bleomicina no se incorpora eficientemente en las células en cultivo (Roy y Howitz, 1984), resultado esperado teniendo en cuenta que se trata de un compuesto altamente hidrofílico. Así, a bajas concentraciones, tan sólo el 0,1 % de la [<sup>3</sup>H]-bleomicina del medio se asocia con las células HeLa durante los primeros 30 minutos de incubación. En células de Ehrlich, después de varias horas de tratamiento, la concentración de [<sup>3</sup>H]-bleomicina es inferior a la concentración del medio (Lyman *et al.*, 1986). Otros estudios sugieren igualmente que este fármaco se incorpora pobremente en células intactas. En general, el proceso por el cual la bleomicina entra en las células es bastante desconocido.

La activación de la bleomicina ha sido descrita detalladamente, formándose en el último paso de activación una especie altamente reactiva capaz de sustraer hidrógeno de los azúcares del DNA. El último intermediario que se puede detectar espectroscópicamente es el peróxido férrico de bleomicina (HOO-Fe(III)-Bleomicina), considerado la forma activa de la bleomicina (Burger *et al.*, 1981). La forma activa sustrae un hidrógeno predominantemente del carbono C-4' de la desoxirribosa del DNA, formándose un radical libre en el C-4' que puede seguir dos vías diferentes: la hidroxilación o la oxidación (figura 5) (Povirk y Austin, 1991). La hidroxilación del C-4' provoca la apertura del anillo del azúcar y la pérdida de la base, de modo que el DNA presenta un sitio apurínico/apirimidínico (AP) con un grupo cetona en C-4' y un grupo aldehído en C-1', siendo la fuente del hidroxilo el agua. Alternativamente, la adición de O<sub>2</sub> al C-4' forma un radical peróxido que genera una rotura de cadena con un extremo 5'-fosfato y un 3'-fosfoglicolato y pérdida de la base propenal. Bajo condiciones fisiológicas las dos lesiones se forman en la misma proporción, produciéndose predominantemente sobre las pirimidinas que forman parte de la secuencia G-C y G-T. Sin embargo, la susceptibilidad individual de los sitios G-Pirimidina depende de variaciones en la conformación del DNA, dependientes de secuencia. En cuanto a bases dañadas, se ha detectado la producción de 8-hidroxiguanina. Adicionalmente, la bleomicina induce DSBs y sitios AP próximos a roturas localizadas en la cadena opuesta. Esta proximidad entre lesiones se da con mayor frecuencia de la esperada por simple coincidencia. Estas lesiones bicadena constituyen en torno al 10 % de las lesiones inducidas por la bleomicina en el DNA (Povirk, 1996).



**Figura 5. Daño inducido por la bleomicina en el DNA. La sustracción de un hidrógeno del C-4' de la desoxirribosa genera un radical libre sobre el C-4' que puede seguir dos vías diferentes: la hidroxilación y la oxidación (adaptado de Povirk y Austin, 1991).**

La relación dosis–respuesta de tipo lineal detectada, incluso a altas dosis, en el ensayo de ACs ha llevado a sugerir que el efecto de la bleomicina puede ser más parecido al de las radiaciones de alta LET que al de las radiaciones de baja LET (Desp *et al.*, 1978). Por otra parte, la distribución del daño inducido por la bleomicina varía significativamente de una distribución de Poisson. La sobredispersión es presumiblemente causada por variaciones en la captación, diferencias en la actividad de la enzima bleomicín hidrolasa (enzima que puede inactivar a la bleomicina) y capacidad de reparación del DNA (Ozawa *et al.*, 1985).

La cinética de reparación ha sido estudiada en linfocitos en G<sub>0</sub> y en fibroblastos humanos con la técnica de la condensación prematura de cromosomas (PCC) (Sen y Hittelman, 1984). La reparación muestra un componente de reparación rápida, durante las dos primeras horas, con una reparación significativamente mayor durante los primeros 30 minutos. La proporción de reparación se enlentece a partir de las dos primeras horas. El daño inducido por la bleomicina se repara por la vía de hueco pequeño, dependiente de la DNA polimerasa β, y por



## INTRODUCCIÓN

---

la vía de hueco-grande, sensible a la afidicolina que implica, presumiblemente, a las DNA polimerasas  $\alpha$ ,  $\delta$  y/o  $\epsilon$  (DiGiuseppe y Dresler, 1989). En la reparación de las roturas de cadena inducidas por la bleomicina un primer paso necesario es la eliminación de los extremos 3' y 5' bloqueantes, generándose los extremos 3'- hidroxilo y 5'- fosfato, necesarios para la síntesis y ligación en el proceso de reparación (Chen *et al.*, 1991; Prasad *et al.*, 1994). Por otra parte, las DSB se reparan según los mecanismos descritos de HRR y NEHJ. En este caso, también es esencial la eliminación de los grupos bloqueantes presentes en los extremos 3' y 5'.

### 2.2.2. AGENTES S-DEPENDIENTES

Los agentes S-dependientes, como la luz ultravioleta o muchos mutágenos químicos, no inducen directamente DSBs sobre el DNA. En este caso, se considera que las ACs se forman a partir de la interacción de lesiones secundarias producidas durante la replicación del DNA dañado (Evans, 1977).

En 1973, Bender y colaboradores propusieron un modelo unificado sobre los mecanismos de formación de las ACs por parte de diferentes agentes (Bender *et al.*, 1973 a, b). Muchos de los aspectos de este modelo son válidos en la actualidad: 1) el cromosoma, antes de la replicación es monomérico, constituido por una doble hélice de DNA; 2) las ACs se generan sólo a partir de las lesiones inducidas en el DNA; 3) las lesiones primarias en el DNA son roturas de cadena o bases dañadas, las cuales se convierten en roturas de cadena en la replicación o durante la reparación; 4) Las roturas de cadena se transforman en los diferentes tipos de ACs por mecanismos de reparación enzimáticos, de replicación y por acción de DNAsas de cadena sencilla (ver Palitti, 1998)

La proporción de reparación de las lesiones inducidas en las células tiene efecto sobre la frecuencia y el tipo de aberraciones (Preston y Gooch, 1981; Preston, 1982). Si la proporción de reparación de las lesiones que generan ACs es rápida, para una misma cantidad inicial de daño, la probabilidad de tener dos lesiones coincidentes en el tiempo y espacio disponibles a interactuar es mayor que si la proporción de reparación es lenta y, por lo tanto, la eficiencia en producir aberraciones de tipo cromosómico es mayor. Los agentes S-dependientes presentan una proporción de reparación lenta, de manera que la probabilidad de que lesiones coincidentes puedan interactuar es baja. Consecuentemente, muchas de las lesiones estarán

## INTRODUCCIÓN

---

sin reparar al entrar la célula en fase S. A partir de estas lesiones se pueden generar aberraciones de tipo cromatídico durante o después de la replicación de las regiones dañadas.

El daño no reparado puede ser replicado, generándose una DSB directamente al replicarse una SSB o, en el caso de las bases dañadas, una SSB opuesta a la base. La escisión de la base, durante o después de la replicación, debería dar una DSB. Así, la replicación del DNA dañado puede generar DSBs en una de las cromátidas hermanas y, a partir de estas, formarse las aberraciones de tipo cromatídico. Por otra parte, los agentes S-dependientes pueden inducir aberraciones de tipo cromosómico cuando su reparación es inhibida en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular (Preston y Gooch, 1981; Kishi, 1987; Surrallés *et al.*, 1997). La inhibición de la reparación de las lesiones de vida corta permite la acumulación de SSBs que podrían convertirse en DSBs en G<sub>1</sub> y, por lo tanto, generar aberraciones de tipo cromosómico.

Por otra parte, la formación de las ACs por parte de los agentes S-dependientes podría iniciarse con una SSB o *gap* inducido directa o enzimáticamente en los sitios dañados. En este caso, las ACs se podrían formar a partir del proceso recombinacional descrito por Melselson-Radding en 1975. Este modelo, desarrollado para explicar la conversión génica meiótica en hongos, es similar al modelo DSBR con la diferencia de que el proceso de recombinación homóloga es iniciado por una SSB. El extremo 3' de la SSB inducida en una molécula se usa como cebador en la síntesis de desplazamiento. La cadena 5' desplazada se empareja con la secuencia complementaria en el cromosoma homólogo o cromátida hermana e induce una SSB, iniciándose un intercambio recíproco de cadenas creándose una molécula combinada con una única HJ. La resolución de la HJ produce productos con y sin cruzamiento. Este modelo puede explicar como las ACs son inducidas por agentes que no inducen directamente DSB (revisión Pfeiffer *et al.*, 2000).

### 2.3. CLASIFICACIÓN DE LAS ABERRACIONES ESTRUCTURALES DE TIPO CROMOSÓMICO

Las células examinadas en su primera división, después de la exposición a un determinado agente mutagénico, pueden expresar aberraciones estructurales de tipo cromatídico o cromosómico, en función de si el cambio estructural afecta a una o a ambas cromátidas

## INTRODUCCIÓN

---

hermanas del cromosoma. Encontramos un tipo u otro según la naturaleza del agente físico o químico utilizado y de la fase del ciclo celular en la cual se ha realizado la exposición.

En ambos tipos de aberraciones estructurales se incluyen intercambios y roturas (deleciones terminales). Según la clasificación de Savage (Savage, 1975), podemos subdividir los cambios estructurales en intercambios o intracambios en función de la localización de las lesiones y de la interacción entre las mismas. Los intercambios se forman cuando las lesiones que interaccionan se encuentran en diferentes cromosomas (homólogos o no homólogos), mientras que los intracambios se forman cuando las lesiones se encuentran en el mismo cromosoma. En el caso de los intracambios, éstos se pueden subdividir en interbrazo o intrabrazo según la posición de las lesiones en los brazos del cromosoma. Así, los intracambios interbrazos se generan cuando las lesiones que interaccionan se encuentran en brazos opuestos respecto al centrómero y los intracambios intrabrazo cuando las lesiones se encuentran en el mismo brazo del cromosoma.

La interacción entre las lesiones puede generar cambios estructurales de tipo asimétrico o simétrico, según si se generan o no fragmentos acéntricos como resultado de la interacción. Los intercambios asimétricos se caracterizan por generar en su formación uno o más fragmentos acéntricos, mientras que los intercambios simétricos no generan fragmentos acéntricos (excepto cuando el proceso de intercambio es incompleto). En todos los tipos de aberración el proceso de intercambio puede ser completo o incompleto. El proceso es completo cuando todas las partes del cromosoma o cromosomas que interactúan se unen en la nueva configuración no dejando extremos libres. En contraste, en los procesos incompletos no se unen todas las partes en la nueva configuración. En los intercambios asimétricos los procesos incompletos pueden designarse como distales o proximales en función de si son los extremos próximos o los distales al centrómero los que permanecen sin unirse en las nuevas configuraciones.

En la figura 6 se muestra un esquema de las aberraciones estructurales de tipo cromosómico, resultado de la interacción de dos roturas en uno o dos cromosomas. Los intercambios asimétricos cuando el proceso es completo generan un cromosoma **dicéntrico** acompañado del fragmento acéntrico, producto de la unión de los segmentos terminales de los dos cromosomas que se han unido. El intercambio puede ser también incompleto. Si el intercambio es de tipo incompleto distal, se forma el cromosoma dicéntrico pero los

## INTRODUCCIÓN

---

segmentos terminales de cada cromosoma no se unen, generándose por lo tanto dos fragmentos acéntricos. Por el contrario, si el intercambio es incompleto proximal, el resultado son dos cromosomas con uno de sus brazos de menor tamaño, al perderse el segmento terminal, y el fragmento acéntrico producto de la unión de los dos fragmentos terminales. Por lo que respecta a los intercambios simétricos, la forma completa implica la transferencia recíproca de la porción terminal de los cromosomas involucrados, formándose una translocación recíproca, mientras que las formas incompletas implican la presencia de un fragmento acéntrico al no producirse la transferencia recíproca entre los cromosomas involucrados, formándose por tanto las translocaciones incompletas o translocaciones no recíprocas.

En cuanto a los intracambios interbrazo, la forma asimétrica completa corresponde a un anillo céntrico acompañado del fragmento acéntrico correspondiente. Esta forma es análoga a un intercambio asimétrico en el que los dos brazos implicados, separados por el centrómero, pertenecen al mismo cromosoma. Análogamente, la forma incompleta distal se origina cuando no se fusionan los fragmentos acéntricos, de forma que el anillo céntrico se acompaña de dos fragmentos acéntricos. En la forma incompleta proximal no se fusionan los dos extremos del cromosoma, generando, por tanto, un cromosoma con sus dos brazos de menor tamaño y al fragmento acéntrico producto de la unión de los dos segmentos terminales. Por otra parte, la forma simétrica completa da lugar a inversiones pericentroméricas. Su formación implica la inversión de la región del cromosoma que contiene el centrómero antes de la reunión de los extremos generados. Las formas incompletas generan un fragmento acéntrico como resultado de la unión incompleta.

Las formas asimétricas de intracambios intrabrazo provocan la pérdida o delección de una región comprendida entre el centrómero y el extremo del brazo. En el proceso completo, los extremos de la región delecionada se unen generando un anillo acéntrico, mientras que la región terminal y la región con centrómero del cromosoma implicado se vuelven a unir dando, por tanto, un cromosoma con uno de sus brazos de menor tamaño. La mayoría de las delecciones intersticiales son de tamaño pequeño. El límite de resolución óptica dificulta la distinción de los anillos acéntricos, muchos aparecen como *dots* apareados. Los segmentos delecionados normalmente no permanecen asociados a su lugar de origen, de manera que la forma incompleta proximal aparece como una simple delección terminal. La forma incompleta distal es un anillo incompleto que se registrará como delección terminal si el tamaño es grande



## INTRODUCCIÓN

---

o como dobles *dots* si el tamaño es pequeño. Las formas simétricas completas de los intracambios intrabrazo corresponden a las inversiones paracentroméricas. El segmento intersticial entre las dos lesiones puede invertirse, de forma que el extremo proximal pasa a ser distal y viceversa. El cambio no afecta al tamaño del cromosoma. Las dos formas incompletas generalmente no se distinguen de simples deleciones terminales.

Los cambios estructurales pueden ser complejos. Cada brazo de un cromosoma puede participar en un intercambio o el mismo brazo puede tomar parte en más de un proceso. Los intercambios complejos se han definido como aquellos intercambios que derivan de tres o más roturas en dos o más cromosomas (ver Savage y Simpson, 1994a, b).

Por lo que respecta a las roturas o deleciones terminales, son fragmentos acéntricos resultado de la rotura completa de las regiones terminales de los cromosomas. En este caso, el fragmento acéntrico no está asociado con ningún proceso de intercambio. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los fragmentos acéntricos resultantes de los intercambios incompletos en muchas ocasiones no pueden distinguirse de las deleciones terminales.

Las aberraciones de tipo asimétrico como los dicéntricos, anillos y fragmentos son aberraciones inestables, las células que las contienen se pierden rápidamente de la población de células en división (Carrano, 1973; Bauchinger *et al.*, 1986; Braselmann *et al.*, 1986). La inestabilidad de las aberraciones asimétricas se asocia con problemas mecánicos durante el proceso de división celular. La falta de centrómero de los fragmentos cromosómicos impide su unión al huso mitótico durante el proceso de segregación, de forma que quedan excluidos de las células hijas. Por lo tanto, la presencia de fragmentos acéntricos implica la pérdida de material genético durante el proceso de división celular y la consiguiente muerte celular en el caso de que la pérdida del material afecte a genes esenciales para la supervivencia celular. La presencia de dicéntricos o anillos también puede provocar problemas durante el proceso de segregación en anafase. En el caso de los dicéntricos, el problema ocurre cuando los dos centrómeros del cromosoma se dirigen hacia polos opuesto de la célula. En tal situación, el proceso de división puede completarse, aunque con pérdida de material genético, o puede bloquearse dependiendo de si el cromosoma dicéntrico se rompe o de si forma un puente entre los dos polos de la célula, respectivamente. En ambos casos el resultado es la eventual muerte de la célula afectada. Teóricamente se espera que el 50 % de las aberraciones inestables se pierdan en cada división (Carrano, 1973). En contraste, las aberraciones simétricas como las

## INTRODUCCIÓN

---

translocaciones recíprocas, inserciones e inversiones, se consideran aberraciones estables ya que no generan problemas mecánicos durante los procesos de división celular como consecuencia de la presencia de un único centrómero en cada cromosoma resultante. Por lo tanto, se considera que este tipo de ACs puede ser transmitidas a las siguientes generaciones de células y, por lo tanto, persistir durante un periodo largo de tiempo (Carrano *et al.*, 1975, Kligerman *et al.*, 1990; Natarajan *et al.*, 1991; Awa *et al.*, 1992; Lucas *et al.*, 1992).

### 2.4. DETECCIÓN DE LAS ACs

#### 2.4.1. ANÁLISIS EN METAFASE

El análisis de ACs generalmente se realiza en metafase, cuando se pueden visualizar bien los cromosomas. La detección y cuantificación de las ACs en metafase puede realizarse con las técnicas citogenéticas tradicionales o con la técnica de hibridación *in situ*.

##### 2.4.1.1. TINCIÓN HOMOGÉNEA CON GIEMSA

Los primeros estudios de ACs se realizaron usando la tinción convencional con Giemsa. La tinción con Giemsa, originalmente desarrollada por Gustav Giemsa en 1900, tiñe homogéneamente los cromosomas. La tinción homogénea permite detectar fácilmente las aberraciones de tipo asimétrico. Esta tinción se usa rutinariamente en el estudio citogenético en humanos y mamíferos. De hecho, el análisis de dicéntricos en sangre periférica se ha utilizado como dosímetro biológico durante varias décadas. Sin embargo, las aberraciones asimétricas son inestables, de forma que la evaluación citogenética se tiene que realizar en un corto periodo después de la exposición, cuando las células se encuentran en su primera división.

Por otra parte, la técnica permite analizar la longitud de los brazos cromosómicos y, por tanto, identificar determinadas translocaciones (Littlefield y Joiner, 1978; Awa, 1983). En este caso, la detección de las ACs es mucho más tediosa en comparación con el análisis de las aberraciones inestables. Además, hay que tener en cuenta que sólo es posible detectar aquellas ACs que implican cambios obvios en el tamaño o morfología de los cromosomas, de forma que el cromosoma reorganizado difiere substancialmente del cariotipo normal.

## INTRODUCCIÓN

---

### 2.4.1.2. *TÉCNICA DE BANDAS*

Posteriormente se introdujeron las técnicas de bandas. En este caso, cada cromosoma presenta un patrón de bandas característico que permite identificarlo y detectar posibles reorganizaciones. Las técnicas de bandas más comúnmente utilizadas son la técnica de bandas Q, de bandas G y de bandas R. La primera técnica de bandas fue la de bandas Q en la cual, los cromosomas teñidos con dihidroclorido de quinacrina presentan, al observarlos al microscopio de fluorescencia, segmentos fluorescentes de varios grados de luminosidad a lo largo del cromosoma (Casperson *et al.*, 1970). En cambio, para obtener las bandas G, los cromosomas son sometidos a una digestión controlada con tripsina y después teñidos con Giemsa. El patrón de bandas G es equivalente al de bandas Q (Seabright, 1971). En el caso de las bandas R, los cromosomas se desnaturalizan por calor en un tampón salino de fosfato antes de teñirlos con Giemsa. Las bandas R representan el inverso de las bandas Q y G (Dutrillaux y Lejeune 1971). Diferentes tipos de aberraciones simétricas y asimétricas se pueden detectar con las técnicas de bandas. Sin embargo, el análisis con la técnica de bandas es lento, tedioso y requiere personal experto. Estas desventajas hacen que la técnica de bandas no haya sido utilizada ampliamente en estudios de genotoxicidad, al ser necesario el análisis de un gran número de metafases.

### 2.4.1.3. *HIBRIDACIÓN IN SITU*

Más recientemente se ha incorporado la técnica de hibridación *in situ*. Esta técnica permite detectar y localizar secuencias específicas de ácido nucleico sobre cromosomas, células fijadas y secciones de tejido. Para ello, se utilizan sondas consistentes en fragmentos marcados de DNA o RNA, de secuencia complementaria a la secuencia diana objeto de estudio. La técnica se basa en la desnaturalización del DNA y posterior renaturalización con sondas específicas marcadas. Bajo condiciones adecuadas, las sondas hibridan *in situ* con sus secuencias complementarias, permitiendo determinar su localización.

La hibridación *in situ* fue descrita originalmente por Gall y Pardue en 1969. La técnica inicial se caracterizaba por el marcaje radiactivo de las sondas y la posterior detección con emulsión fotográfica. Inicialmente la técnica se utilizó en el mapeo de genes, siendo su primera aplicación la detección de los genes RNA ribosomales en núcleos de *Xenopus laevis* (Gall y Padue, 1969). Un año después, Jones localizó el DNA satélite en las regiones



## INTRODUCCIÓN

---

pericentroméricas de los cromosomas de ratón (Jones, 1970). A partir de este momento, otros investigadores aplicaron la técnica para mapear otras secuencias repetitivas en el genoma de diferentes especies (Wimber y Steffensen, 1970; Burk *et al.*, 1985)

El marcaje con isótopos radiactivos impone limitaciones significativas en términos de tiempo y resolución. Los problemas asociados a este tipo de marcaje se solucionaron al desarrollarse métodos no isotópicos, más rápidos, simples y precisos. Los métodos de marcaje no isotópicos modifican química o enzimáticamente las sondas por incorporación de moléculas marcadoras, siendo el grupo marcador una molécula de conocida detección inmunoquímica (Langer *et al.*, 1981; Celeda *et al.*, 1992) o un enzima (Renz y Kurz, 1984), en cuyo caso la detección viene determinada por la propia reacción enzimática. Este marcaje es de tipo indirecto ya que las moléculas marcadoras no son visibles por si mismas, por lo que son necesarios pasos posteriores para su detección. Cuando la molécula marcadora no es una enzima, la detección se efectúa mediante anticuerpos o proteínas conjugadas a fluorocromos de alta afinidad por las moléculas marcadoras. La señal puede ampliarse aplicando la correcta secuencia de anticuerpos o proteínas, según sus propiedades inmunoquímicas. La incorporación del marcaje fluorescente ha dado paso a la hibridación *in situ* fluorescente (FISH). El marcaje fluorescente facilita el análisis microscópico, incrementa la sensibilidad, estabilidad y seguridad de la técnica, disminuye el tiempo de hibridación, permite marcajes múltiples y es de fácil aplicación.

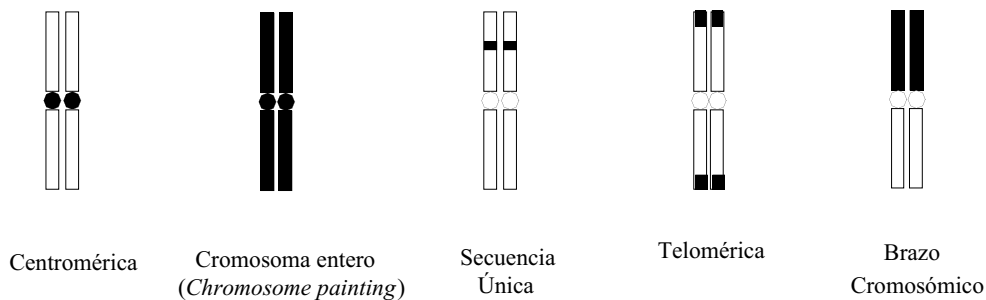
Posteriormente se han puesto a punto metodologías de marcaje directo. En este caso, los fluorocromos se unen covalentemente al DNA (Wiegant *et al.*, 1993), de modo que las sondas así marcadas no requieren pasos posteriores de detección. El resultado es un proceso más corto que proporciona mayor resolución e incrementa la señal en relación al fondo inespecífico.

Por lo que respecta a la síntesis de las sondas, las técnicas de clonaje junto con otras técnicas incorporadas posteriormente, permiten la producción de sondas de complejidad variable. Así, se han conseguido obtener, de forma relativamente fácil, distintos tipos de sondas que permiten detectar diferentes regiones del genoma (figura 7). En la actualidad se dispone de sondas centroméricas y teloméricas comunes a todos los cromosomas y específicas para cada uno de ellos, de sondas específicas de cromosomas individuales, de sondas específicas de genes o de bandas y de sondas de brazos cromosómicos particulares (Yung,

## INTRODUCCIÓN

---

1996). La disponibilidad de estos diferentes tipos de sonda ha permitido incrementar la aplicación de la FISH.



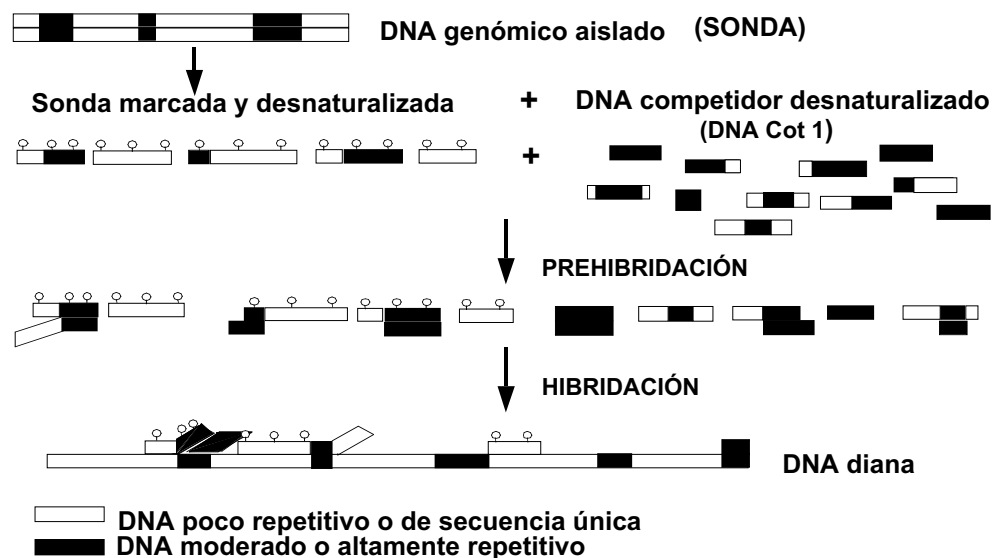
**Figura 7. Distintos tipos de sonda.**

### 2.4.1.3.1. El pintado cromosómico

La hibridación *in situ* fluorescente con sondas específicas de cromosomas (*chromosome painting*) fue introducida por Pinkel y colaboradores en 1986 (Pinkel *et al.*, 1986; 1988). El desarrollo de la técnica fue posible al superar la limitación impuesta por la presencia de elementos repetitivos en el genoma. Las secuencias repetitivas, tales como las SINEs (*small interspersed repetitive elements*, elementos-Alu) y las LINEs (*large interspersed repetitive elements*, elementos-L1) se encuentran mezcladas entre las secuencias únicas, de modo que, las sondas de los cromosomas particulares contienen, además de las secuencias únicas específicas, estas secuencias repetitivas de presencia ubicua en el genoma. Al realizar la hibridación *in situ* según el procedimiento estándar, se produce hibridación inespecífica ya que las sondas hibridan con los elementos repetitivos repartidos por el genoma, pintando todos los cromosomas y, por lo tanto, impidiendo la detección de las secuencias únicas específicas del cromosoma correspondiente. Este problema se solucionó prehibridando las sondas de los cromosomas con DNA genómico total no marcado o DNA Cot 1 en exceso (Pinkel *et al.*, 1988). La fracción DNA COT-1 constituye la mayor parte de los elementos repetitivos del genoma humano. Estos elementos, debido a su alta repetitividad, presentan una cinética de hibridación rápida, de forma que la prehibridación de la sonda con un exceso de DNA COT-1 no marcado implica la rápida unión de las secuencias repetitivas de la sonda con las secuencias repetitivas presentes en exceso en el DNA COT-1 y, por tanto, el bloqueo por competición de las secuencias repetitivas presentes en la sonda. El proceso se representa en la

## INTRODUCCIÓN

figura 8. Al bloquear las secuencias repetitivas se suprime la hibridación inespecífica permitiendo sólo la hibridación de las secuencias específicas del cromosoma correspondiente. El resultado es el cromosoma diana pintado completamente del color del fluorocromo utilizado en su detección.. El resto de cromosomas no marcados se visualizan de diferente color aplicando la contratinción adecuada. De este modo, las alteraciones de los cromosomas marcados se detectan fácilmente. La técnica permite detectar aberraciones asimétricas, simétricas e intercambios complejos. Para detectar los intercambios entre los brazos del propio cromosoma hibridado, es necesario que las sondas correspondientes a cada brazo estén marcadas con diferentes fluorocromos (Guan *et al.*, 1996), de este modo se pueden detectar las inversiones pericentroméricas.



**Figura 8 Bloqueo por competición de las secuencias repetitivas al prehibridar la sonda marcada con DNA Cot 1 (adaptado de Lichter y Cremer, 1992).**

Las ACs se visualizan por el patrón de color alterado que presentan los cromosomas implicados. Esta forma de detectar las ACs facilita el análisis cromosómico. El análisis es fácil, rápido, objetivo y no requiere un gran entrenamiento, de modo que esta técnica ofrece una serie de ventajas con respecto a las técnicas citogenéticas tradicionales. Con esta técnica se detectan con igual facilidad las aberraciones estructurales de tipo simétrico y asimétrico. Por otra parte, la rapidez y facilidad con la que se detectan las ACs permite analizar un número mayor de metafases, incrementando así la sensibilidad. Además, la resolución de la técnica permite detectar reorganizaciones que son demasiado pequeñas y difíciles de detectar

## INTRODUCCIÓN

---

por bandas, de modo que se pueden cuantificar frecuencias de ACs bajas y, por tanto, detectar niveles inferiores de exposición (Tucker *et al.*, 1993; 1994). La técnica FISH parece ser eficiente para detectar efectos de dosis iguales o mayores a 0,3-0,5 Gy, mientras que, por debajo de estas dosis la correlación entre la frecuencia de translocaciones y la dosis es difícil de establecer (Pressl *et al.*, 1999). En cuanto al tamaño detectable, se ha descrito un tamaño mínimo de  $11,1 \pm 0,8$  Mb para segmentos pintados y en  $14,6 \pm 0,6$  Mb para segmentos no pintados (Kodama *et al.*, 1997).

La mayor ventaja del pintado cromosómico, respecto a las técnicas tradicionales, radica en la posibilidad que ofrece de analizar de forma fácil y rápida la frecuencia de translocaciones, con las implicaciones que ello conlleva, teniendo en cuenta su supuesta estabilidad. Teóricamente, la relación entre translocaciones y dicéntricos inducidos por la radiación se esperaría que fuera 1:1 (Evans, 1962); relación que ha sido observada experimentalmente (Heddle 1965, Buckton, 1976). Sin embargo, los resultados obtenidos con FISH son contradictorios (ver Lucas *et al.*, 1996). La mayor frecuencia de translocaciones obtenidas en algunos estudios se ha relacionado con posibles errores a la hora de clasificar translocaciones por dicéntricos, debido a la dificultad de identificar los centrómeros sin el uso simultáneo de sonda pancentromérica, además de la posible presencia de una fracción significativa de células de segunda división. Sin embargo, aún resolviendo los problemas anteriores, y teniendo en cuenta que la frecuencia basal de translocaciones es mucho mayor que la de dicéntricos, los resultados siguen siendo contradictorios. La diferencia en los criterios de clasificación entre los distintos estudios dificulta su comparación pero, incluso en los que se siguen los mismos criterios, se obtienen resultados diferentes respecto la relación translocaciones:dicéntricos (Barquinero *et al.*, 1999). La frecuencia basal de translocaciones es mayor que la de dicéntricos, situándose en torno al 0,8 % y 0,13 % respectivamente (Lucas *et al.*, 1992b; Natarajan *et al.*, 1992; Bauchinger *et al.*, 1993; Nakano *et al.*, 1993; Tucker *et al.*, 1993). La frecuencia basal de translocaciones es variable, se han descrito frecuencias basales a nivel de translocaciones totales de 1,06 (Finnon *et al.*, 1995) a 0,22 (Fernández *et al.*, 1995) por 100 células. Además, la frecuencia de translocaciones es dependiente de la edad (Tucker *et al.*, 1994)

Por otra parte, esta técnica sólo permite detectar las aberraciones que afectan a los cromosomas pintados, de modo que sólo detecta una fracción de todas las aberraciones posibles. Dado que la frecuencia de aberraciones observadas es la que corresponde a la

## INTRODUCCIÓN

---

fracción del genoma pintado, Lucas y colaboradores han desarrollado una fórmula matemática que permite estimar la frecuencia genómica de aberraciones a partir de la frecuencia de aberraciones observadas en la fracción del genoma pintado (Lucas *et al.*, 1989; 1992a). La fórmula es válida para intercambios que implican sólo dos roturas y asume que las roturas se distribuyen al azar por todo el genoma y que no hay preferencia de intercambios entre pares de cromosomas en particular. En tal situación, la probabilidad de que un cromosoma esté implicado en un intercambio es proporcional a su contenido de DNA,  $C_i$ , expresado como una fracción del contenido total de DNA de la célula diploide. Por lo tanto, la probabilidad de un intercambio entre un cromosoma “i” y un cromosoma “j” es igual a  $T(D) C_i C_j$  y la frecuencia genómica, al sumatorio correspondiente:

$$F_G = T(D) [ \sum_{i=1}^{46} \sum_{j=1}^{46} C_i C_j (i \neq j) ] = T(D) [ 1 - \sum_{i=1}^{46} C_i^2 ] = 0.976 T(D)$$

donde  $T(D)$  es un coeficiente dependiente de la dosis y los valores  $C_i$  los obtenidos usando un analizador de imágenes a partir de 17 hombres y 17 mujeres (Mayall *et al.*, 1984). La fracción del genoma pintado por FISH viene determinada por  $f_p = \sum C_k$ , donde  $C_k$ s son los cromosomas pintados. Los intercambios que se detectan son los formados entre un cromosoma pintado y otro sin pintar o viceversa, de modo que la frecuencia de intercambios detectada por *painting*,  $F_p$ , es:

$$F_p = T(D) [ f_p (1 - f_p) + (1 - f_p) f_p ] = T(D) 2 f_p (1 - f_p) = 2.05 f_p (1 - f_p) F_G$$

Esta fórmula establece la relación entre la frecuencia observada de aberraciones, medida por FISH ( $F_p$ ), y la frecuencia genómica ( $F_G$ ), cuando se utiliza un único color además de la contratinción. Al principio, el pintado de los cromosomas era monocolor ya que la detección de las sondas de los diferentes cromosomas analizados se efectuaba con el mismo fluorocromo. En este caso, la eficiencia de detección incrementa hasta que la mitad del genoma está pintado, teniendo en cuenta que las aberraciones entre los cromosomas pintados del mismo color no se detectan (Lucas *et al.*, 1992a). La posterior utilización de diferentes fluorocromos para el pintado de distintos cromosomas permite detectar, también, las aberraciones que se producen entre los cromosomas hibridados, de modo que a medida que se incrementa el número de cromosomas pintados de diferente color, también se incrementa la fracción de aberraciones detectadas. En tal caso es necesario modificar la fórmula original de

## INTRODUCCIÓN

---

Lucas y colaboradores, de forma que se tenga en cuenta la detección de los intercambios entre los cromosomas hibridados (Lucas *et al.*, 1989). Actualmente es posible el pintado multicolor al marcar las sondas combinando o variando la proporción de los diferentes fluorocromos disponibles (Ried *et al.*, 1992). Así, se han conseguido pintar simultáneamente los 24 cromosomas por combinación de 5 fluorocromos (Schröck *et al.*, 1996; Speicher *et al.*, 1996).

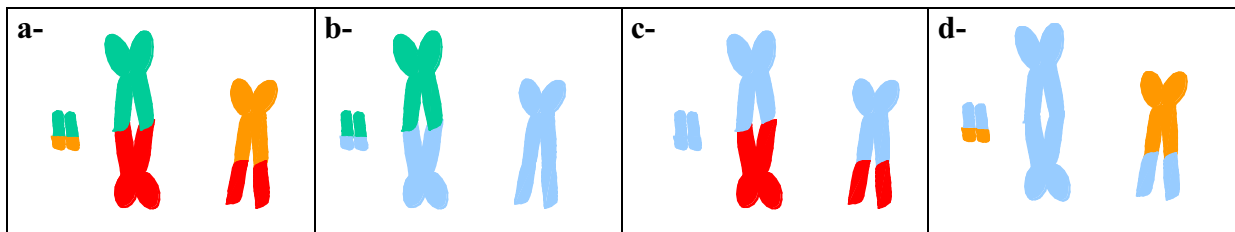
Para recuperar la pérdida de información que supone la detección de sólo una fracción de todas las ACs posibles, se suele incrementar el número de células analizadas, bajo la presunción que la frecuencia de aberraciones de los cromosomas es proporcional a su contenido en DNA. El número de metafases analizadas se ajusta con la frecuencia del genoma pintado, de modo que, multiplicando el número de metafases analizadas por el porcentaje de aberraciones detectadas con la fracción del genoma pintado, se obtiene el número de metafases equivalentes, que corresponde al número de metafases que se han de analizar con la técnica de bandas para obtener la misma información (Tucker *et al.*, 1993). La fracción de aberraciones que se detecta depende de la porción del genoma pintado y del número de colores utilizados (Lucas *et al.*, 1989).

La técnica del pintado cromosómico se ha contrastado con las técnicas citogenéticas tradicionales, comparando la frecuencia genómica de aberraciones detectada con cada una de las técnicas después de una exposición aguda con  $^{137}\text{Cs}$  *in vitro*, obteniéndose con las tres técnicas una frecuencia parecida cuando las dosis son  $\leq 2$  Gy (Tucker *et al.*, 1993). Las discrepancias a dosis mayores pueden ser debidas a la presencia de numerosas células con múltiples reorganizaciones, o de células con aberraciones demasiado complicadas para ser clasificadas. Aunque las técnicas citogenéticas tradicionales no excluyen la formación de los intercambios complejos, la importancia de estos intercambios no se ha reconocido hasta que con la técnica de FISH se ha demostrado que son bastante más frecuentes de lo que en un principio se creía, sobre todo cuando se exponen las células a dosis  $> 2$  Gy (Simpson y Savage, 1995).

Con la técnica desarrollada actualmente no se pueden detectar eficientemente todos los intercambios complejos en los que participan los cromosomas hibridados debido a que, normalmente, sólo se visualiza parte del intercambio complejo. Así, cuando más de dos cromosomas participan en un intercambio, la detección de tan sólo las partes correspondientes a los cromosomas hibridados puede originar patrones que oculten la verdadera naturaleza del

## INTRODUCCIÓN

intercambio (Savage y Simpson, 1994a, b). Este problema se plantea tanto pintando un sólo cromosoma como pintando varios cromosomas, puesto que en muchos de los intercambios complejos, tan sólo intervendrá uno de ellos. En función de cual de los tres o más cromosomas implicados se encuentre pintado, se obtendrá uno u otro patrón (figura 9).



**Figura 9. Intercambio complejo en el que intervienen tres cromosomas. En función de cual de los tres cromosomas está pintado, se originan diferentes patrones que pueden llegar a ocultar la verdadera naturaleza del intercambio. a) Patrón obtenido al hibridar los tres cromosomas (verde, rojo y amarillo); b, c, d) Patrones obtenidos al hibridar sólo uno de los tres cromosomas que intervienen en el intercambio.**

La complejidad de los intercambios detectados con la técnica del pintado cromosómico hace necesario el desarrollo de un nuevo sistema de nomenclatura. Con este objetivo se desarrollaron dos nuevos sistemas: el sistema S&S y el sistema PAINT.

La nomenclatura S&S introducida por Savage y Simpson (1994a,b) considera la aberración con todas sus partes como una entidad. La clasificación tiene en cuenta los aspectos mecánicos de la formación de las ACs. El sistema se basa en la libre interacción de los extremos libres inducidos en los cromosomas (teoría clásica de rotura y reunión).

Las ACs son convenientemente clasificadas en familias según el sistema CAB (*number of chromosomes/number of arm/number of breaks*). Se relacionan todas las señales observadas para una aberración determinada, considerándose el número de roturas y de cromosomas involucrados. Las familias CAB se definen por el número de cromosomas, el número de brazos y el número de roturas implicadas en la formación de la aberración. Dentro de las familias se distinguen subfamilias en los casos en que la localización de las roturas en los brazos pueda diferir.

## INTRODUCCIÓN

---

Para cada intercambio complejo hay tres CAB: CAB (inicial), CAB (real) y CAB (observado). El **CAB inicial** determina el número de roturas inmediatamente después de la radiación, antes de que tenga lugar la interacción entre los extremos libres inducidos. Las roturas iniciales pueden interactuar entre ellas restituyendo la configuración inicial o, ilegítimamente, dando lugar a las ACs. La **CAB real** determina el número de roturas implicadas en la restitución ilegítima y, por lo tanto, determina el número de roturas que intervienen en la formación de las ACs. Al producirse la restitución se produce la transferencia de las aberraciones a familias de menor número de roturas. El mismo intercambio puede producir diferentes patrones, dependiendo de cual de los cromosomas implicados esté pintado. A partir del patrón observado se deduce la **CAB observada**. Por tanto, la CAB observada determina el número de roturas implicadas en la ACs a partir del patrón de señales observable. Su valor y validez dependerán del método usado para determinar las ACs.

Para cada familia, se identifican patrones distintivos a los cuales se les da una designación alfanumérica. Cada combinación tiene su designación. Así, todas las aberraciones que implican un anillo céntrico completa o parcialmente pintado son incluidas en un grupo y secuencialmente numeradas con el prefijo CR. El resto de tipos se agrupan por el número de unidades señal, es decir por el número de elementos pintados físicamente separables. Dentro de los grupos, los miembros se ordenan alfabéticamente.

El sistema S&S se puede aplicar únicamente cuando se pinta un único cromosoma o, en caso de pintar diferentes cromosomas, si se utilizan cócteles multicolor. La identificación centromérica es vital para realizar la clasificación de forma precisa. Por otra parte, hay que tener en cuenta que se puede elegir el cromosoma que se va a pintar pero no la posición que ocupará en los intercambios complejos. No solo el mismo intercambio puede originar diferentes patrones, sino que el mismo patrón pintado puede aplicarse a diferentes intercambios.

No todos los patrones observados pueden ser clasificados con la nomenclatura S&S. El sistema original sólo acepta intercambios completos. Muchos de los patrones no clasificados corresponden a intercambios simples que aparentemente derivan de incompletos y/o intercambios terminales completos, que por su tamaño son indetectables, o intercambios incompletos no terminales. Para las formas más comunes, Simpson y Savage (1996)



## INTRODUCCIÓN

---

sugirieron seis categorías distintivas designadas con números romanos, I-VI. Para los fragmentos acéntricos monocolor no existe designación en la nomenclatura S&S.

El sistema PAINT (*Protocol for Aberration Identification and Nomenclature Terminology*) surge ante la necesidad de unificar criterios en la clasificación de aberraciones de tipo complejo. El sistema fue desarrollado por un grupo internacional de citogenéticos (Tucker *et al.*, 1995a, b). La clasificación propuesta es puramente descriptiva, sin entrar en consideraciones mecanísticas. El enfoque descriptivo representa una desviación radical respecto de los sistemas de clasificación tradicionales.

Cada cromosoma pintado anormal, o fragmento, se describe individualmente como si fuera la única aberración presente en la célula, sin establecer relaciones con los otros segmentos cromosómicos pintados. Cada cromosoma anormal se identifica con uno o más tipos de aberraciones designados en el sistema internacional de nomenclatura citogenética humana (ISCN, 1985). La designación inicial es seguida por un paréntesis que contiene letras que describen el orden en el que aparecen los segmentos pintados y no pintados. Las letras A, a, describen segmentos no pintados y las letras B, b describen segmentos pintados, designando las letras mayúsculas segmentos con centrómeros y las letras en minúscula segmentos sin centrómero. En caso de utilizar cócteles multicolor, los diferentes cromosomas son asignados adicionalmente con letras secuenciales del alfabeto.

La aplicación de los diferentes sistemas de nomenclatura (convencional, S&S y PAINT) puede depender del objetivo principal del estudio. Por otra parte, al comparar los tres sistemas, Knehr y colaboradores consideran que la mejor opción, de cara a su utilización práctica, se obtendría modificando el sistema PAINT de forma que se tuvieran en cuenta aspectos mecanísticos (Knehr *et al.*, 1998).

### 2.4.2. ANÁLISIS EN INTERFASE: CONDENSACIÓN PREMATURA DE LOS CROMOSOMAS

Los agentes clastogénicos inducen más roturas en el DNA de las que se observan en metafase como ACs. Desde el momento en que se producen las lesiones en el DNA hasta que se pueden observar las ACs en metafase, se pierde toda la información referente a la inducción inicial y dinámica de reparación de las lesiones inducidas. Además, las células más

## INTRODUCCIÓN

---

dañadas sufren retraso en su progresión hacia la mitosis de forma que las células que llegan a metafase son las células menos dañadas (Hittelman y Rao, 1974; Pincheira *et al.*, 1995; Salone *et al.*, 1997). Estas limitaciones del análisis en metafase se resuelven parcialmente con la técnica de condensación prematura de cromosomas (PCC) al permitir visualizar los cromosomas en interfase. El proceso de condensación prematura de la cromatina en interfase fue descrito por Johnson y Rao en 1970 al fusionar células mitóticas con células en interfase (Johnson y Rao, 1970). La fusión entre células mitóticas y células en interfase permite la difusión de factores de condensación de la célula mitótica a la interfásica provocando la condensación prematura de la cromatina interfásica. La morfología de las PCCs refleja el estado del ciclo celular en el cual se ha producido la fusión (Rao *et al.*, 1977). Así, si en el momento de la fusión las células interfásicas se encuentra en G<sub>0</sub> o G<sub>1</sub>, las PCCs se observan como cromosomas elongados constituidos por una única cromátida, entremezclados con los cromosomas metafásicos de las células inductoras. Si las células interfásicas se encuentran en G<sub>2</sub> se producen PCCs constituidas por dos cromátidas y si se encuentran en la fase S, las PCCs presentan una apariencia fragmentada con elementos simples (pre-replicativos) y dobles (post-replicativos). La inducción de PCCs puede también producirse químicamente utilizando inhibidores de determinadas fosfatasa como el ácido okadaico o la caliculina A (Gotoh y Asakawa, 1996; Coco-Martin y Begg, 1997; Kanda *et al.*, 1999). Sin embargo, es necesario un mayor entendimiento de sus mecanismos de acción antes de su utilización generalizada (Alsbeih y Raaphorst, 1999).

La técnica de PCC permite visualizar el nivel inicial de roturas y su dinámica de reparación sin la perturbación asociada a la progresión del ciclo celular o la influencia de la muerte celular en interfase. Por lo tanto, su aplicación ha permitido estudiar la cinética de formación de las ACs y su relación con la dinámica de reparación de las roturas inducidas inicialmente en el DNA en diferentes líneas celulares (Hittelman y Pollard, 1982; Cornforth y Bedford, 1983; Sen y Hittelman, 1984; Pantelias y Maillie, 1985; Darroudi y Natarajan, 1989; Vyas *et al.*, 1991). Sin embargo, la técnica de PCC no ha sido utilizada ampliamente a pesar de su potencial. Su uso limitado se debe, en parte, al difícil y tedioso conteo de las unidades de PCCs y a la difícil detección de los intercambios al no ser prácticamente visibles las regiones centroméricas con la técnica de tinción uniforme con Giemsa. La aplicación de la técnica de bandas C resuelve en parte el problema al permitir visualizar las regiones centroméricas. Sin embargo, es la incorporación de la técnica de FISH la que ofrece mayores ventajas (Evans *et al.*, 1991). La combinación de la técnica PCC con el pintado cromosómico permite detectar

## INTRODUCCIÓN

---

fácilmente el daño inicial, su reparación y la formación de los intercambios (Brown *et al.*, 1992; 1993; Darroudi *et al.*, 1998).

### 2.5. PERSISTENCIA DE LAS TRANSLOCACIONES Y DE LOS DICÉNTRICOS

La persistencia de las ACs es un requisito esencial en los estudios retrospectivos y en la evaluación de las exposiciones crónicas. Los linfocitos en la sangre periférica se encuentran en G<sub>0</sub>, de forma que la persistencia de las ACs depende del tiempo de vida de los linfocitos. Por otra parte, para mantener la población de linfocitos en circulación estos son reemplazados a partir de células de la médula ósea. Sin embargo, debido a los problemas mecánicos, las células precursoras con aberraciones inestables, como los dicéntricos, no sobrevivirán a las subsiguientes divisiones celulares requeridas para producir linfocitos maduros. En cambio, las células precursoras con aberraciones estables, como translocaciones, sí que podrán contribuir al reemplazamiento. Por lo tanto, las células con aberraciones estables pueden ser reemplazadas por otras células con aberraciones estables, de forma que la frecuencia de estas aberraciones se mantiene en la población celular; mientras que las aberraciones inestables acaban desapareciendo de la población celular con la pérdida de los linfocitos que las contienen, ya que los linfocitos que los reemplazan no contendrán este tipo de aberraciones. Por lo tanto, para evaluar retrospectivamente el efecto de una exposición accidental o terapéutica, es necesaria la evaluación de las aberraciones estables como las translocaciones.

A partir del declive de la frecuencia de dicéntricos se ha estimado la vida media de los linfocitos en circulación, obteniéndose un intervalo entre 0,4 a 10 años (ver Ramalho *et al.*, 1995; Bauchinger, 1998). Entre los estudios realizados, Buckton y colaboradores, estiman un tiempo de vida para los linfocitos de 4,3 años (1600 días), con la correspondiente vida media de 3 años, a partir del seguimiento citogenético durante más de 30 años de un grupo de pacientes expuestos terapéuticamente a rayos X (Buckton *et al.*, 1967). Resultados similares se obtienen en otros estudios (Dolphin *et al.*, 1973; Léonard *et al.*, 1988; Lucas *et al.*, 1992b). De hecho, en general se ha aceptado una vida media de 3 años para los linfocitos en sangre periférica. Sin embargo, este valor se ha estimado, a veces, en intervalos de tiempo que no incluyen el periodo inicial de seguimiento. Por otra parte, los estudios indican heterogeneidad en el tiempo de vida de los linfocitos T. Así, al subdividir los linfocitos T según el marcador de superficie CD45, encontramos los linfocitos CD45R0 o células con memoria, capaces de

## INTRODUCCIÓN

---

responder a los antígenos, y los linfocitos CD45RA, sin capacidad de respuesta. Las dos poblaciones de linfocitos difieren en la media del tiempo de vida; así, mientras los linfocitos CD45R0, que representan el 60 % de los linfocitos en circulación, tienen una vida corta de aproximadamente 1 año, los linfocitos CD45RA tienen una vida larga de unos 10 años (Michie *et al.*, 1992). Ignorando la subdivisión de los linfocitos T, se calcula una vida media de 729 días, siendo factible *in vivo* la reversión entre CD45R0 y CD45RA. Otros estudios indican igualmente una cinética de eliminación de los dicéntricos siguiendo una función exponencial de dos términos, diferenciando igualmente linfocitos de vida corta y linfocitos de vida larga (Bauchinger *et al.*, 1989; Ramalho *et al.*, 1995)

En muchas investigaciones se ha asumido la completa estabilidad de las translocaciones. Sin embargo, algunas evidencias sugieren que las translocaciones pueden no ser completamente persistentes (Mclean y Michie, 1995). De hecho, se ha observado un descenso en la frecuencia de translocaciones inducidas por la radiación ionizante al analizar la persistencia de éstas en ratones (Hande *et al.*, 1996; Natarajan *et al.*, 1996a, Spruill *et al.*, 1996), en ratas (Tucker *et al.*, 1997) o en linfocitos humanos expuestos *in vitro* (Boei *et al.*, 1996; Matsumoto *et al.*, 1998; Hoffmann *et al.*, 1999). En estos estudios la frecuencia de translocaciones disminuye con el tiempo, aunque de forma más lenta que la de los dicéntricos. El descenso de la frecuencia de translocaciones también ha sido detectado *in vivo* después de la exposición radiactiva debida al accidente sucedido en Goyania (Brasil) (Natarajan *et al.*, 1996 b; 1998). En cuanto al tipo de translocaciones, en algunos estudios se obtiene que las translocaciones no recíprocas son menos estables que las translocaciones recíprocas (Spruill *et al.*, 1996, Tucker *et al.*, 1997; 1998), mientras que en otros se ha descrito mayor persistencia de las translocaciones no recíprocas (Boei *et al.*, 1996; Natarajan *et al.*, 1996b). En todo caso, las translocaciones persistentes deberían estar equilibradas molecularmente y no deberían interrumpir ningún gen esencial, mientras que las translocaciones no persistentes deberían estar desequilibradas o provocar la discontinuidad de uno o más genes esenciales para la viabilidad celular. La pérdida de material durante el proceso de reparación de las DBSs podría dar lugar a translocaciones molecularmente desequilibradas (Lutze *et al.*, 1993). Por otra parte, en otros estudios *in vivo* se mantiene la frecuencia de translocaciones durante el periodo analizado después de la exposición accidental (Lucas *et al.*, 1992a, b; Salassidis *et al.*, 1995; Stephan y Pressl, 1997; Lindholm *et al.*, 1998).

## INTRODUCCIÓN

---

La persistencia de las translocaciones puede depender del tipo de exposición (Lindholm *et al.*, 1998) o de la dosis (Hande y Natarajan, 1998). Además de estos factores físicos, otros factores genéticos como la densidad génica o la estructura de la cromatina podrían también afectar la persistencia de las translocaciones. Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado el efecto de estos factores sobre la persistencia de las ACs. Por otra parte, en los estudios retrospectivos, la frecuencia de translocaciones puede incrementarse por expansión clonal (Lucas *et al.*, 1992a; Salassidis *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1998; Spruill *et al.*, 2000). Las translocaciones de origen clonal pueden ser irreconocibles a menos que presenten una apariencia característica o sean muy frecuentes. La identificación de daño clonal es importante a la hora de cuantificar la frecuencia de ACs, ya que cada clon se considerará como un único suceso mutacional (Johnson *et al.*, 1998).

### 2.6. DISTRIBUCIÓN DE LAS ABERRACIONES CROMOSÓMICAS

La suposición que las ACs se distribuyen al azar por todo el genoma ha sido ampliamente cuestionada. Se han realizado numerosos estudios con el objetivo de determinar si las ACs inducidas por la radiación ionizante se distribuyen entre los cromosomas de forma proporcional a su tamaño/contenido de DNA. De hecho, desde los primeros trabajos citogenéticos en plantas y *Drosophila* ya se observaron desviaciones con respecto a la distribución al azar de los puntos de rotura (Sax 1938; Kaufmann, 1946; Heddle, 1965). Posteriormente, distintos estudios con técnica de bandas G también indican desviaciones con respecto a la distribución al azar (Holmerg y Jonasson 1973; Buckton, 1976; Bauchinger y Gotz, 1979; Barrios *et al.*, 1989; Sachs *et al.*, 1993). Sin embargo, con las técnicas tradicionales sólo se detectan parte de las ACs. Con la técnica de pintado cromosómico se puede detectar un mayor espectro de ACs y, por tanto, su aplicación puede ser más útil en el estudio de la distribución de las roturas cromosómicas.

Con la técnica de pintado cromosómico, sin embargo, se obtienen resultados contradictorios sobre la implicación de los cromosomas en la formación de las ACs inducidas por la radiación. Así, en determinados estudios se encuentra que los valores observados de ACs en los cromosomas analizados no presentan desviaciones significativas respecto a los valores esperados en función de su contenido en DNA (Natarajan *et al.*, 1992, Tucker *et al.*, 1993; Matsuoka *et al.*, 1994), mientras que en otros estudios se encuentra que algunos cromosomas presentan una implicación no proporcional al contenido de DNA. Así, Knerh y

## INTRODUCCIÓN

---

colaboradores en un primer estudio, utilizando 5 combinaciones de 3 cromosomas, detectan una menor implicación del cromosoma 2 en la formación de translocaciones simétricas y una mayor implicación de los cromosomas 9, 10 y 12 por lo que respecta a dicéntricos (Knerh *et al.*, 1994). En un segundo trabajo, utilizando 12 cromosomas hibridados individualmente (1-4, 6-10, 12, 14 y X), obtienen una baja implicación de los cromosomas 2 y 3 y una alta implicación del cromosoma 9 por lo que respecta a translocaciones simétricas, así como un exceso de los cromosomas 9 y 10 en la formación de dicéntricos (Knerh *et al.*, 1996). En este caso, en general se obtiene que los cromosomas con mayor contenido en DNA (1-3, 6 y 7) están menos frecuentemente implicados en la formación de translocaciones simétricas y dicéntricos en relación a lo esperado de acuerdo con su contenido en DNA, mientras que los cromosomas pequeños están más frecuentemente implicados (Knerh *et al.*, 1996). Al completar el estudio anterior, incorporando al análisis el resto de cromosomas, se obtiene igualmente desviación respecto la proporcionalidad de DNA, ahora a consecuencia de la menor implicación de los cromosomas 2, 3 y 6 y la mayor implicación de los cromosomas 16, 17 y 20 en la formación de intercambios (Barquinero *et al.*, 1998). Por otra parte, se sigue manteniendo que los cromosomas más pequeños (15-22, con la excepción del cromosoma 19) están más frecuentemente involucrados en la formación de las ACs de lo esperado. Por el contrario, Pandita y colaboradores, al analizar los cromosomas 1, 2, 7, 16 y 17, detectaron que las roturas por unidad de DNA incrementan linealmente a medida que incrementa el contenido de DNA de los cromosomas (Pandita *et al.*, 1994). Sin embargo, no detectaron variaciones significativas en la frecuencia de intercambios por unidad de DNA al incrementar el contenido de DNA de los cromosomas.

Las diferencias entre los distintos estudios pueden ser debidas al uso de diferentes combinaciones de cromosomas y al número limitado de cromosomas analizados (Cigarrán *et al.*, 1998). De hecho, cuando se analizan todos los cromosomas individualmente, Cigarrán y colaboradores, con la excepción del cromosoma 20, obtienen un buen ajuste entre el contenido de DNA y el número de aberraciones tipo intercambio y el número de roturas. Por otra parte, se sigue observando una tendencia significativa de los cromosomas pequeños a estar más implicados que los cromosomas grandes en la formación de las ACs. Adicionalmente, se relaciona la superficie del territorio cromosómico con la participación de los cromosomas en la formación de los intercambios, asumiendo un modelo esférico. En este caso se obtiene un mejor ajuste, no observándose ninguna tendencia significativa de los cromosomas pequeños a estar más involucrados.

## INTRODUCCIÓN

---

En ocasiones, los resultados obtenidos respecto a cromosomas particulares son contradictorios. Este es el caso de los cromosomas 1 y 4, dos de los cromosomas más analizados. Boei y colaboradores al estudiar la implicación de los cromosoma 1 y 4 en la formación de ACs, detectaron que la frecuencia de dicéntricos en ambos cromosomas corresponde a la esperada, mientras que la frecuencia de translocaciones recíprocas es significativamente superior para el cromosoma 4 (Boei *et al.*, 1997). Stephan y Pressl también detectaron una mayor representación del cromosoma 4 pero, en este caso, tanto a nivel de translocaciones como de dicéntricos (Stephan y Pressl, 1997). En otros estudios se describe igualmente una mayor representación del cromosoma 4, aunque en ocasiones la desviación es pequeña (Hoffmann *et al.*, 1999). Sin embargo, en otros estudios no se han detectado diferencias significativas entre ambos cromosomas (Tucker *et al.*, 1993; Kovacs *et al.*, 1994; Matsuoka *et al.*, 1994; Luomahaara *et al.*, 1999). Las razones de esta heterogeneidad en los resultados no se conocen, aunque la variabilidad entre donantes puede ser uno de los factores que contribuyan a la misma (Wojcik y Streffer, 1998). Wojcik y Streffer evaluaron la frecuencia de aberraciones inducidas por la radiación ionizante en los cromosomas 1 y 2 en dos donantes y las compararon con las obtenidas al cabo de un cierto tiempo, al repetir el mismo experimento en las mismas condiciones y con los mismos donantes, con el fin de evaluar variaciones dependientes de donante así como la repetitividad de los resultados en el tiempo. Al evaluar los resultados no se detectaron diferencias entre los dos donantes, obteniéndose en ambos casos diferente sensibilidad de los cromosomas dependiente del tipo de aberración. Sin embargo, los resultados no fueron siempre reproducibles (Wojcik y Streffer, 1998).

### **2.6.1. RELACIÓN CON LA INDUCCIÓN, LA REPARACIÓN Y/O LA PERSISTENCIA DEL DAÑO**

En los apartados anteriores se ha indicado que las ACs se forman a partir de las lesiones inducidas en el DNA al no ser reparadas o ser mal reparadas. Por lo tanto, diferencias a nivel de inducción o procesamiento de las lesiones entre los cromosomas, explicarían las posibles diferencias en la distribución de las ACs observables en metafase. Por otra parte, una vez formadas las ACs, la diferente persistencia de las mismas en función de los cromosomas involucrados también podría explicar diferencias entre los cromosomas, sobre todo en los estudios retrospectivos. Por lo tanto, la distribución de las ACs en los diferentes cromosomas

## INTRODUCCIÓN

---

es el resultado no sólo de la inducción, sino también del procesamiento y/o persistencia del daño.

Por otra parte, queda patente la heterogeneidad de los cromosomas. Las diferencias entre los cromosomas no sólo se deben al tamaño, sino a otros factores como la densidad génica o la estructura de la cromatina, factores que pueden afectar a niveles superiores de organización, así como a procesos esenciales para la célula como la reparación. Por lo tanto, estos factores podrían afectar la inducción, procesamiento o persistencia del daño y, por lo tanto, a la distribución de las ACs.

### **2.6.1.1. EFECTO DE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA**

La inducción inicial de las lesiones en el DNA y su procesamiento por las enzimas de reparación pueden estar afectados por los diferentes niveles de organización de la cromatina. Así, se considera que el daño inducido por los agentes clastogénicos puede ser mayor en las regiones de cromatina transcripcionalmente activa, por su mayor accesibilidad, e inferior en las regiones de heterocromatina condensada, en comparación al resto del genoma. Por la misma razón, se considera que la reparación puede ser más eficiente en las regiones transcripcionalmente activas; sin embargo, los resultados no están del todo claros. Además, el comportamiento de las radiaciones ionizantes puede ser diferente al de los agentes químicos.

Teóricamente, en el caso de las radiaciones de baja LET, parece plausible asumir que los *clusters* de ionización se distribuyan al azar por todo el volumen intranuclear (Goodhead, 1989), de forma que se considera poco probable que la compactación de la cromatina afecte la inducción inicial de roturas. En cuanto a las radiaciones de alta LET, las roturas iniciales pueden distribuirse al azar a lo largo de la trayectoria del haz, pero no respecto al volumen nuclear. Por otra parte, se considera que la accesibilidad sí puede influir en la frecuencia y distribución de las roturas inducidas por parte de endonucleasas o de clastógenos químicos (ver Savage, 1993).

Los resultados obtenidos experimentalmente no siempre coinciden con lo teóricamente esperado. Así, determinados estudios muestran evidencias de la distribución no aleatoria de las DSBs inducidas por la radiación ionizante en los genomas de mamíferos mediante electroforesis de campo pulsado, aunque la mayor diferencia respecto a la distribución al azar



## INTRODUCCIÓN

---

se observa en el caso de las radiaciones de alta LET (Löbrich *et al.*, 1996; Newman *et al.*, 1997). Por otra parte, al comparar la inducción de las roturas de cadena entre regiones transcripcionalmente activas y regiones inactivas, los resultados son contradictorios. De hecho, en determinados estudios se ha descrito una respuesta similar entre genes transcripcionalmente activos e inactivos después del tratamiento con diferentes carcinógenos químicos o después de la exposición a rayos-X (Nose y Nikaido, 1984), mientras que en otros estudios se ha descrito que las regiones de cromatina transcripcionalmente activas son hipersensibles a la radiación gamma (Chiu *et al.*, 1982) y a distintos agentes químicos (Boffa *et al.*, 1992). En contraste, el tratamiento de las células con butirato de sodio, un inhibidor de la histona desacetilasa, que provoca una hiperacetilación de la cromatina y, por lo tanto, su descondensación, no conlleva un incremento en la frecuencia de las lesiones inducidas por la radiación ionizante (Sankaranarayanan *et al.*, 1985; Smith, 1986). Un resultado similar fue obtenido por Yasui y colaboradores al provocar la descondensación de la cromatina en células de ovario de hámster chino (CHO), eliminando del medio la isoleucina durante 24 horas (Yasui *et al.*, 1987). Sin embargo, en los estudios realizados con butirato de sodio se detecta un incremento en la frecuencia de ACs (Sankaranarayanan *et al.*, 1985; 1990; Smith, 1986). A partir de esta respuesta, se sugiere que el butirato de sodio puede inhibir la reparación de las DSBs. Sin embargo, no está claro si la inhibición viene determinada por alteraciones en la estructura de la cromatina o por inhibición de enzimas específicamente implicadas en la reparación de las DSBs. Por lo que respecta a las lesiones inducidas por la luz ultravioleta o los agentes químicos, en general tampoco se han detectado diferencias claras a nivel de inducción entre los genes transcripcionalmente activos e inactivos, sugiriéndose que el mayor nivel de inducción detectado en los genes transcripcionalmente activos pueda deberse a genes con alto nivel de transcripción (ver Pfeiffer *et al.*, 1996)

Aunque la distribución de las lesiones puede ser al azar por toda la cromatina, la formación de las ACs puede que no sea aleatoria, y la arquitectura nuclear podría jugar un papel importante. Las regiones activas e inactivas difieren en el grado de metilación del DNA, acetilación de histonas y posicionamiento respecto a la matriz nuclear. Por lo tanto, la diferente accesibilidad del DNA a las enzimas de reparación podría acelerar la reparación de las regiones más accesibles (ver Pfeiffer *et al.*, 1996). Existen bastantes evidencias de que la estructura de la cromatina o la actividad transcripcional pueden afectar el procesamiento de las lesiones inducidas por la radiación ultravioleta (UV) (Bohr *et al.*, 1985; Mullenders *et al.*, 1987), de los aductos químicos (Hanawalt, 1991), del daño inducido por los agentes

## INTRODUCCIÓN

---

alquilantes (Surrallés *et al.*, 1997) y de los enlaces cruzados y SSBs ocasionados por la radiación (Chiu *et al.*, 1982). Sin embargo, hay poca información acerca del papel de la estructura de la cromatina en el procesamiento de las DSBs.

En el caso de la reparación por escisión de nucleótidos (NER), existen varios niveles de reparación. Por una parte, la reparación de las lesiones inducidas en los genes inactivos es lenta e ineficaz, mientras que la reparación en los genes activos o potencialmente activos es mucho más rápida y eficiente (incluso en ausencia de transcripción) por la vía de reparación genómica global. Un tercer nivel lo constituye la reparación acelerada de las lesiones del DNA en las cadenas transcritas de los genes activos, mediante la reparación acoplada a la transcripción. En cuanto a la reparación de las lesiones inducidas por la radiación ionizante, los resultados tampoco son muy claros. Así, en células humanas deficientes en NER se ha descrito reparación preferencial de las lesiones inducidas por radiación ionizante en genes activos, sugiriendo que otra vía de reparación diferente a la NER está también ligada a la transcripción, siendo capaz de acelerar la reparación de ciertas lesiones del DNA (Leadon y Cooper, 1993). Por otra parte, la descondensación de la cromatina por eliminación de la isoleucina del medio no afecta la reparación de las roturas de cadena en el DNA (Yasui *et al.*, 1987). Este resultado apoya el obtenido en otros estudios recientes realizados en células CHO (Ljungman, 1999) o en células de cáncer de colon (May y Bohr, 2000), en los cuales no se ha detectado heterogeneidad ni en la formación ni en la reparación de las roturas de cadena inducidas por la radiación ionizante, al comparar la respuesta en el gen dihidrofolato reductasa (DHFR) respecto a un gen inactivo ligado al cromosoma X o al resto del genoma. En cambio, al comparar la reparación en el gen *c-myc* respecto al genoma entero, sí que se ha descrito heterogeneidad intragenómica en el tiempo medio de reparación de las DSBs, siendo la reparación más rápida en el *locus* *c-myc* (Sak y Stuschke, 1998).

El patrón bien definido de regiones heterocromáticas/eucromáticas en los cromosomas de hámster chino ha permitido evaluar el efecto de la estructura de la cromatina en la distribución de las ACs después de diferentes tratamientos. Así, el brazo largo del cromosoma X, el cromosoma Y entero, partes del cromosoma 9 y 10, y los brazos cortos de los cromosomas 5, 6 y 7 son heterocromáticos, mientras que los cromosomas 1, 2, 3, 4 y 8 pueden considerarse eucromáticos (Schmid y Leppert, 1969). En las células de las hembras, el brazo corto del cromosoma X inactivo está formado por heterocromatina facultativa, mientras que en el cromosoma X activo es eucromático. Al analizar la distribución de las ACs entre los

## INTRODUCCIÓN

---

cromosomas de hámster chino, se obtienen resultados diferentes en función de si se utilizan las técnicas tradicionales o la técnica del *chromosome painting*. Así, Folle y colaboradores obtienen, en células CHO, una mayor incidencia de puntos de rotura en las bandas G-claras (regiones de eucromatina transcripcionalmente activa) tanto después del tratamiento con endonucleasas en la fase G<sub>1</sub> y S del ciclo celular, como después de irradiar con rayos  $\gamma$  o neutrones en la fase S del ciclo celular (Folle *et al.*, 1998). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Slijepcevic y Natajaran al irradiar fibroblastos de hámster chino con rayos X en la fase G<sub>1</sub> (Slijepcevic y Natajaran, 1994a), o los obtenidos por otros autores en linfocitos humanos de sangre periférica expuestos *in vivo* o *in vitro* a radiación ionizante (Nakagome y Chiyo, 1976; Buckton, 1976; Barrios *et al.*, 1989). Por otra parte, también coinciden con los resultados obtenidos por Slijepcevic y Natarajan, al encontrar en fibroblastos de hámster chino irradiados en G<sub>2</sub> una mayor frecuencia de roturas cromatídicas en las regiones eucromáticas en comparación a las regiones heterocromáticas, detectándose también una reparación más eficiente de las lesiones en las regiones eucromáticas (Slijepcevic y Natarajan, 1994b). Sin embargo, los resultados obtenidos con la técnica *chromosome painting* en esplenocitos de hámster chino indican una mayor implicación de las regiones heterocromáticas al comparar la frecuencia de ACs entre los dos brazos del cromosoma X, sobre todo a consecuencia de la mayor implicación del brazo heterocromático en la formación de fragmentos cromosómicos (Grigorova *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1999). En estos estudios la frecuencia de ACs se analiza en metafase, perdiéndose la información referente al procesamiento de las lesiones inducidas inicialmente. Esta limitación se podría superar combinando la técnica PCC con FISH específica de brazo.

En humanos también encontramos regiones de heterocromatina constitutiva en las regiones pericentroméricas de los cromosomas 1, 9 y 16, así como en el brazo largo del cromosoma Y. En particular, la heterocromatina pericentromérica ha resultado ser especialmente sensible a la acción clastogénica de los agentes genotóxicos, tanto físicos como químicos (Brøgger, 1977; Sabatier *et al.*, 1989; Aurias, 1993). En el cromosoma 1, la heterocromatina situada en la banda 1q12, representa aproximadamente un 0,5 % del genoma humano total (Rupa *et al.*, 1997a) y no se conoce la existencia de genes en esta región. Una manera de detectar alteraciones en esta región es aplicando la FISH multicolor, desarrollado por Eastmond y colaboradores en 1994, con sondas en tándem que hibridan con la región 1q12 y el centrómero del cromosoma 1 (Eastmond *et al.*, 1994).

## INTRODUCCIÓN

---

En general, al recopilar los resultados obtenidos en diferentes estudios realizados en humanos utilizando tanto las técnicas de bandas como la técnica del pintado cromosómico se obtiene que las regiones heterocromáticas y/o los telómeros son las regiones que presentan mayor frecuencia de ACs (Johnson *et al.*, 1999). Se considera que las células con roturas en regiones inactivas, como las regiones heterocromáticas, pueden no ser seleccionadas en contra tan fuertemente como las células con roturas en regiones activas, resultando en una preponderancia de las reorganizaciones en las regiones heterocromáticas. Por otra parte, se ha descrito el efecto de posición (PEV=*Position-effect variegation*) asociado a la heterocromatina en *Drosophila* y en otras especies, incluidos los mamíferos. El PVE se caracteriza por la inactivación de los genes próximos a las regiones de heterocromatina, al producirse la heterocromatización de las regiones eucromáticas adyacentes (ver Klein y Costa, 1997; ver Sumner, 1998). Potencialmente, la extensión de la heterocromatina puede ocurrir a partir de cualquier yuxtaposición heterocromatina/eucromatina; de forma que la yuxtaposición de genes eucromáticos con regiones heterocromáticas, como consecuencia de su translocación, podría provocar el silenciamiento de los genes translocados. Este efecto ha sido descrito en ratón al translocar *loci* autosómicos al cromosoma X (Cattanach, 1974, 1975). En cambio, en células somáticas humanas no se ha detectado la extensión de la inactivación del material autosómico después de su translocación al cromosoma X inactivo (Surrallés y Natarajan, 1998). En un sentido u otro, la implicación o proximidad de las regiones heterocromáticas podría afectar la persistencia de las ACs. De hecho, resultados obtenidos recientemente en nuestro grupo indican indirectamente la posible inestabilidad de las alteraciones que implican a regiones heterocromáticas. Así pues, en pacientes de cáncer de tiroides e hipertiroidismo, no se detectó el efecto de la terapia con el radioisótopo  $I^{131}$  al analizar en células de mucosa bucal las roturas que implican a la banda 1q12 (Ramírez *et al.*, 1999), mientras que sí se detectó el efecto al analizar las alteraciones que afectan a la región comprendida entre el centrómero del cromosoma 17 y el *locus* del gen de la proteína p53 (17cen-p53) (Ramírez *et al.*, 2000). Estos resultados sugieren una gran inestabilidad de las ACs que implican a la banda heterocromática 1q12. Sin embargo, sería necesario un estudio longitudinal que permitiera comparar tanto la inducción como la persistencia de las ACs en ambas regiones. Además, las dos regiones representan aproximadamente el mismo porcentaje del genoma, de forma que nos permite comparar en humanos dos regiones de similar tamaño que difieren en la estructura de la cromatina.

## INTRODUCCIÓN

---

### 2.6.1.2. EFECTO DE LA DENSIDAD GÉNICA

La densidad génica es altamente heterogénea entre los cromosomas humanos (Craig y Bickmore, 1994; Deloukas *et al.*, 1998). Los cromosomas 1, 9, 15, 16, 17, 19, 20 y 22 son especialmente ricos en islas CpG, mientras que los cromosomas 4, 5, 8, 13 y 18 presentan escasas islas CpG (Craig y Bickmore, 1994). Posteriormente, la localización de los genes en los cromosomas humanos y su relación con la longitud relativa de los cromosomas ha permitido cuantificar la densidad génica por cromosoma (Warburton y Kinney, 1996). Recientemente, se ha publicado un mapa físico que integra 30.000 genes humanos obtenido a partir de la localización de sitios diana basados en secuencias de cDNA (STS= *cDNA-based sequences-target site*) (Deloukas *et al.*, 1998). De nuevo, la proporción de genes observados con relación a los esperados por cromosoma permite estimar la densidad génica de los cromosomas. En la tabla 2 se muestra la distribución cromosómica de los marcadores STS y la relación entre los valores observados y esperados para cada cromosoma. De todos los cromosomas, el que presenta mayor densidad génica es el cromosoma 19 y el de menor el 18, de forma que el cromosoma 18 y 19 constituyen dos cromosomas de tamaño similar que difieren substancialmente en densidad génica. En cuanto a los cromosomas de mayor tamaño, la mayor diferencia se da entre el cromosoma 1 y 4, siendo el cromosoma 1 uno de los cromosomas con mayor densidad génica (el 5º en la clasificación) y el cromosoma 4 uno de los de menor densidad génica (el 19º).

La densidad génica de los cromosomas puede ser un factor modulador de la distribución de las ACs en metafase. De hecho, Natarajan y colaboradores consideran que la mayor frecuencia de ACs detectada a nivel del cromosoma 4 puede estar relacionada con su baja densidad génica (Natarajan *et al.*, 1996a). En este contexto, se espera una menor frecuencia de ACs en los cromosomas de mayor densidad génica como consecuencia de la letalidad causada por el truncamiento de genes o regiones responsables de la correcta expresión de las regiones codificadoras. Por la misma razón, la densidad génica de los cromosomas podría afectar la persistencia de las translocaciones, debido a la mayor probabilidad de truncamiento de genes en los cromosomas con mayor densidad génica. Además, la densidad génica puede relacionarse con la reparación diferencial de los cromosomas (Surrallés *et al.*, 1997). Se ha descrito que los cromosomas con mayor densidad génica son más sensibles al cotratamiento con el metanosulfonato de etilo (EMS) y el inhibidor de la reparación ara-C, lo que indica que la reparación por escisión se produce preferencialmente en los cromosomas con alta densidad

## INTRODUCCIÓN

génica. Por otra parte, la densidad génica está relacionada con la estructura de la cromatina y la actividad transcripcional.

**Tabla 2. Distribución cromosómica de 30.000 genes basada en marcadores STS (Deloukas *et al.*, 1998).**

Cromosoma	Observado (Obs)	Esperado (Esp)	Proporción Obs / Esp	$\chi^2$
1	3114	2507	1,24	147,0 *
2	2257	2431	0,93	12,5
3	2015	2040	0,99	0,3
4	1478	1935	0,76	107,9 *
5	1529	1849	0,83	55,4 *
6	1893	1744	1,08	12,7
7	1594	1630	0,98	0,8
8	1206	1478	0,82	50,1 *
9	1248	1382	0,90	13,0
10	1371	1373	1,00	0,0
11	1755	1373	1,28	106,3 *
12	1585	1363	1,16	36,2
13	703	934	0,75	57,1 *
14	1047	886	1,18	29,3
15	1029	848	1,21	38,6
16	849	934	0,91	7,7
17	1263	877	1,44	169,9 *
18	523	810	0,65	101,7 *
19	1114	638	1,74	355,1 *
20	758	686	1,10	7,6
21	305	371	0,82	11,7
22	565	410	1,38	58,6 *
X	874	1563	0,56	303,7 *

\*Diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,001$

### 2.6.1.3. EFECTO DE LAS SECUENCIAS TELOMÉRICAS

Las secuencias teloméricas también han sido involucradas en la formación de las ACs. Los telómeros son estructuras especializadas que se encuentran en los extremos de todos los cromosomas, constituidos por proteínas y secuencias repetidas de DNA altamente conservadas durante la evolución (Moyzis *et al.*, 1988). Los telómeros juegan un papel esencial en el mantenimiento de la integridad cromosómica, impidiendo la fusión de los extremos cromosómicos, el ataque exonucleolítico y su degradación.

## INTRODUCCIÓN

---

A partir de estudios con pacientes con  $\alpha$ -talasemia se sugiere que la adición de secuencias teloméricas estabiliza las roturas cromosómicas (Wilkie *et al.*, 1990; Lamb *et al.*, 1993). Las secuencias teloméricas se añaden por la acción de la enzima telomerasa (Yu y Blackburn, 1993). Esta enzima puede sintetizar la cadena del DNA telomérico por transcripción inversa a partir de la subunidad de RNA de la enzima que actúa como molde. La actividad telomerasa contrarresta el progresivo acortamiento de los telómeros en células altamente proliferativas, tales como las líneas celulares inmortales o las células cancerígenas. Aunque la telomerasa se expresa también en células hematopoyéticas y en linfocitos, los niveles de telomerasa en estas células parece ser insuficiente para prevenir el gradual acortamiento de los telómeros con la edad (Hastie *et al.*, 1990; Harley, 1995; Rufer *et al.*, 1999). El acortamiento de los telómeros se ha correlacionado con un incremento en la frecuencia de dicéntricos en las células senescentes humanas (Counter *et al.*, 1992) y con fusiones cromosómicas y aneuploidía en ratones (Blasco *et al.*, 1997). La probabilidad de formación de ciertos tipos de ACs parece incrementar cuando la longitud telomérica está por debajo de una cierta longitud crítica (Counter *et al.*, 1992; Pandita *et al.*, 1995). Los dicéntricos pueden formarse por fusión directa de los extremos cuando los telómeros se han acortado suficiente. Por otra parte, se han detectado diferencias en la longitud telomérica de los distintos cromosomas (Martens *et al.*, 1998) y diferencias intercromosómicas en el ritmo de acortamiento telomérico con la edad (Surrallés *et al.*, 1999). Los cromosomas con telómeros más cortos podrían estar más involucrados en la formación de las ACs. De hecho, ratones con disfunción en los telómeros presentan mayor sensibilidad a la radiación ionizante (Wong *et al.*, 2000). La disfunción del telómero se asocia con un retraso en la cinética de reparación. Diferentes proteínas que intervienen en la reparación de las DSBs han sido localizadas en los telómeros en levaduras y en células de mamíferos. En levaduras, los telómeros parecen servir como reservorios de los componentes de la reparación NHEJ (Martin *et al.*, 1999; Mills *et al.*, 1999). Sin embargo, en ratón la disfunción del telómero no parece influir en el proceso de NHEJ. En este caso, los complejos de reparación, más que almacenarse en los telómeros, tienen implicaciones en la formación y función de la estructura telomérica (Zhu *et al.*, 2000). Otros trabajos no atribuyen a los telómeros ningún papel en la formación de los dicéntricos o en la asociación terminal entre cromosomas (Cornforth *et al.*, 1989; Saltman *et al.*, 1993). En algunas especies de vertebrados se han detectado secuencias teloméricas intersticiales en sus cromosomas. Asimismo, se ha sugerido que las secuencias teloméricas intersticiales son regiones propensas a romperse ya sea espontáneamente (Bertoni *et al.*, 1994) o después del tratamiento con agentes clastogénicos (Alvarez *et al.*, 1993; Bouffler *et al.*, 1993; Balajee *et al.*, 1994;

## INTRODUCCIÓN

---

Dominguez et al., 1996; Slijepcevic *et al.*, 1996). Por lo tanto, en organismos con regiones teloméricas intersticiales, la distribución de las ACs entre los cromosomas podría estar afectada por la presencia de estas regiones.

### 2.6.1.4. EFECTO DE PROXIMIDAD

Por otra parte, se considera que la formación de las ACs está influenciada por el efecto de proximidad. Este efecto implica la interacción preferencial de las DSBs que se generan próximas en el espacio y/o en el tiempo. El efecto de proximidad puede inferirse al analizar la producción de las ACs en función del tipo de AC, del tipo de radiación o de la dosis (revisión en Sachs *et al.*, 1997).

La frecuencia relativa de los diferentes tipos de ACs es una de las primeras evidencias a favor del efecto de proximidad. Es bien conocido que la proporción entre dicéntricos y anillos céntricos (D/R) es muy inferior a la esperada asumiendo ausencia de efectos espaciales y distribución al azar de los puntos de rotura. La relación D/R ha sido estimada en diferentes estudios; experimentalmente, en el caso de radiaciones ionizantes de baja LET, la relación D/R muestra consistentemente valores comprendidos en un intervalo entre 5-20, con un valor medio de 16 (Hlatky *et al.*, 1992). Estas proporciones son inferiores a la relación D/R teóricamente estimada en 86 para dosis bajas de radiación considerando una distribución al azar de las DSBs, ausencia de efectos espaciales y la diferente longitud de los brazos de los cromosomas (Savage y Papworth, 1982; Hlatky *et al.*, 1992). Por lo tanto, los resultados indican una clara desviación hacia la producción de anillos céntricos con respecto a la formación de dicéntricos. Estas discrepancias han sido normalmente interpretadas como evidencias de la organización de los cromosomas en territorios y de los efectos de proximidad. En este sentido, si los cromosomas se organizan en territorios, la proximidad entre los brazos cromosómicos de un cromosoma explicaría la desviación hacia la formación de intracambios respecto de la formación de intercambios. Las DSBs localizadas en brazos opuestos de un cromosoma están, en promedio, más próximas que las DSBs localizadas en cromosomas diferentes, de forma que el efecto de proximidad explicaría la desviación hacia la formación de intracambios. Esta mayor frecuencia de intracambios en relación a los intercambios se confirmó al analizar, en linfocitos humanos expuestos a 2,5 Gy de rayos X, la frecuencia de ACs utilizando FISH específica de brazo (Natarajan *et al.*, 1996c). En este estudio, se obtuvo una frecuencia de intracambios interbrazo 8,7 veces superior a la esperada



## INTRODUCCIÓN

---

teniendo en cuenta la frecuencia de intercambios observados. Por otra parte, el efecto de proximidad también se observa al comparar la frecuencia de intracambios intrabrazo respecto a la de intracambios interbrazo (Hahnfeldt *et al.*, 1995; Pandita *et al.*, 1995). En este sentido, en diferentes estudios se ha obtenido que la producción de deleciones intersticiales, muchas de las cuales pueden ser pequeños anillos acéntricos, es mayor a la que se debería esperar cuando se las compara con otras aberraciones intracromosómicas tales como los anillos céntricos. Por otra parte, la mayoría de las DSBs inducidas inicialmente por la radiación ionizante son restituidas. Este alto nivel de restitución puede también ser atribuido al efecto de proximidad (Wu *et al.*, 1996). A partir del análisis de los resultados obtenidos, se considera que la probabilidad de intercambio decrece a medida que aumenta la distancia entre las DSB en el momento de su formación, de forma que casi todos los intercambios ocurren entre DSBs inicialmente separadas por una distancia inferior a 1/3 del diámetro del núcleo (revisión en Sahs *et al.*, 1997).

Por otra parte, el efecto de proximidad se manifiesta en la mayor capacidad de las radiaciones de alta LET de generar ACs. En este sentido, se ha de considerar el efecto de proximidad de las DSBs inducidas a partir de un simple haz de radiación, en comparación a las distancias relativas entre las DSBs inducidas por diferentes haces de ionización, predominantes en el caso de las radiaciones de baja LET. Por lo tanto, la proporción de intercambios con respecto a los intracambios puede depender de la LET de la radiación. Un simple haz de radiación de alta LET puede proporcionar una desviación extra hacia la producción de intracambios interbrazo (anillos céntricos e inversiones pericentroméricas) en relación a los intercambios (dicéntricos y translocaciones). La proximidad de las roturas cromosómicas producidas por un haz de radiación de alta LET debería significar mayor número de DSBs dentro de un cromosoma dado, comparado con una situación donde las DSBs no estuviesen espacialmente correlacionadas y, por lo tanto, se localizasen al azar. Sin embargo, el efecto puede depender de la dosis de la radiación de alta LET. Cuando se aumenta la dosis de la radiación de alta LET, se producen múltiples haces de radiación dentro de un núcleo, de forma que la distribución espacial de las roturas cromosómicas empieza a parecerse a la obtenida con las radiaciones de baja LET. Consecuentemente, la dependencia de la LET en cuanto a la proporción intercambios/intracambios debería detectarse en experimentos con bajas dosis de radiación de alta LET, cuando el número medio de haces de radiación que atraviesan el núcleo es inferior a uno. Sin embargo, en algunos estudios no se ha detectado dependencia de la dosis, y la dependencia de la LET no es aparente en la

## **INTRODUCCIÓN**

---

proporción de los intercambios intercromosómicos con respecto a los intracambios (Bauchinger y Schmid, 1998). Por otra parte, sí que se ha detectado una clara dependencia de la LET en la proporción entre intracambios intrabrazo e intracambios interbrazo (deleciones intersticiales/anillos céntricos) y en la proporción de intracambios intrabrazo respecto de intercambios (deleciones intersticiales/dicéntricos) (Bauchinger y Schmid, 1998).

### 3. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta que la estructura de la cromatina y/o la actividad transcripcional puede afectar la inducción y/o el procesamiento de las lesiones inducidas por los agentes clastogénicos, así como, la importancia de la persistencia de las ACs en los estudios retrospectivos, en esta Tesis Doctoral se pretende investigar la relación entre la heterogeneidad intragenómica y la formación y persistencia de las ACs. Con este fin se plantearon dos objetivos generales:

- I. Evaluar tanto *in vivo* como *in vitro* el efecto de la densidad génica y longitud cromosómica sobre la distribución y persistencia de las ACs.
- II. Estudiar el efecto de la estructura de la cromatina en la inducción, procesamiento y persistencia del daño cromosómico.

Con estas directrices generales se han llevado a cabo los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar el efecto de la densidad génica y la longitud cromosómica sobre la distribución de las ACs después del tratamiento con un agente químico radiomimético (bleomicina), y después de la exposición a la radiación ionizante *in vitro*, a dosis altas, e *in vivo*, a dosis bajas.
2. Evaluar la heterogeneidad intercromosómica en la reparación de las lesiones inducidas en el DNA por agentes S-independientes.
3. Estudiar el efecto de la densidad génica y la longitud cromosómica sobre la persistencia de las ACs *in vitro*, después de la exposición a una dosis alta de radiación ionizante, e *in vivo*, después de la exposición terapéutica a dosis bajas de radiación.
4. Analizar el papel de la estructura de la cromatina y la arquitectura nuclear en la inducción inicial, reparación y/o persistencia de las ACs en los cromosomas sexuales de hámster chino.

## **INTRODUCCIÓN**

---

5. Evaluar el papel de la estructura de la cromatina en la inducción y persistencia de las ACs en humanos comparando la implicación de la banda heterocromática 1q12 y la región eucromática 17cen-p53.