

## **Inducción de focos $\gamma$ -H2AX en linfocitos humanos por efecto vecindad.**

**Tania Mandina<sup>1</sup>, Sandrine Roch-Lefèvre<sup>2</sup>, J. Francesc Barquinero<sup>3</sup>, Laurence Roy<sup>2</sup>,  
Philippe Voisin<sup>2</sup>, Omar García<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones, Calle 20 No. 4113, Playa, La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, BP 17, 92262. Fontenay-aux-Roses, France.

<sup>3</sup>Unitat d'Antropologia, Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

### **RESUMEN**

Los efectos biológicos que se producen en células no irradiadas a partir de la transmisión de señales desde células irradiadas es lo que se conoce como efecto vecindad (EV), a distancia o "bystander". Uno de los sistemas empleados para estudiar este efecto es la sangre debido a la presencia de numerosas células que viajan por todo el organismo que pueden ser portadoras de estas señales. En el presente trabajo se evaluó el EV en linfocitos humanos mediante focos  $\gamma$ -H2AX. Se irradiaron muestras de sangre humana de dos donantes con dosis de 0 y 0.2 Gy de radiación gamma, se incubaron a 37°C una hora y a continuación se generaron 3 variantes de análisis. 1) Células control no irradiadas con su plasma, (CC) 2) Células irradiadas con su plasma (CI). 3) Células no irradiadas con plasma de células irradiadas (CEV). Seguidamente se analizaron los focos  $\gamma$ -H2AX después de 1 y 18 horas de incubación a 37°C.

El número de focos/célula en las CEV y CC fue similar tras 1 hora a 37°C ( $0.32\pm 0.15$  vs  $0.38\pm 0.38$  respectivamente) mientras que a las 18 horas, el número de focos/célula se incrementó en las CEV hasta  $1.43\pm 0.77$ . En las CI el número de focos/célula fue de  $1.55\pm 0.28$  tras 1 hora a 37°C y disminuyó hasta  $0.67\pm 0.55$  tras 18 h de incubación.

Los resultados obtenidos en las condiciones experimentales usadas muestran que el plasma aislado 1 h después de la irradiación con 0.2 Gy incrementa el número de focos  $\gamma$ -H2AX en linfocitos humanos no irradiados y que este efecto puede detectarse 18 h después de la transferencia del plasma. El ensayo de focos  $\gamma$ -H2AX es de utilidad para profundizar en el conocimiento sobre el daño al ADN por efecto vecindad. Este conocimiento contribuirá a la protección de las personas y al mejoramiento del sistema actual de radioprotección.

### **1. INTRODUCCIÓN**

Los llamados efectos biológicos de las bajas dosis de radiaciones ionizantes como la respuesta adaptativa, la inestabilidad genómica y el efecto vecindad, a distancia o "bystander" se conocen como efectos no dirigidos o no blanco de las radiaciones ionizantes. La evidencia experimental sobre su coexistencia con los efectos sobre el ADN como blanco principal de las radiaciones y la incomprensión de los mecanismos de su acción ha conllevado a la existencia de incertidumbres en las estimaciones de los riesgos para la salud a bajas dosis [1]. De estos fenómenos uno de los más estudiados es el efecto vecindad que comprende la manifestación de un efecto biológico en células no irradiadas a partir de la transmisión de señales desde células irradiadas. Este efecto se ha evidenciado en trabajos experimentales en diversos sistemas biológicos y a través de varias revisiones [2-15]. Uno de los sistemas que se ha empleado para el estudio del efecto vecindad es la sangre [14, 15]. Se ha evidenciado que el medio extracelular de linfocitos aislados irradiados con dosis de 0.5 y 3 Gy de rayos X provoca, en linfocitos no tratados, una disminución significativa de la sobrevivencia celular,

---

<sup>1</sup>E-mail del Autor: tania@cphr.edu.cu

un aumento del estrés oxidativo intracelular, de la apoptosis, de la frecuencia de micronúcleos así como el acortamiento de los telómeros, no siendo así para dosis de 0.1 Gy con la que se observó solamente un incremento de especies reactivas del oxígeno [14]. En otro estudio se demostró que la transferencia de plasma de muestras irradiadas con 2-40 Gy de rayos gamma, a linfocitos aislados no irradiados, no produjo una respuesta apoptótica por encima de los valores controles [15]. Sin embargo los autores observaron que el plasma obtenido de sangre irradiada con 4 Gy indujo una disminución de la apoptosis de forma dosis-dependiente cuando se añadió a linfocitos irradiados con altas dosis; siendo mayor la reducción con dosis mayores a 6 Gy [15]. Estos resultados indican un efecto negativo pues la inhibición de la apoptosis en células con aberraciones cromosómicas se encuentra relacionada con el incremento del riesgo de cáncer. Las aberraciones cromosómicas se forman como resultado de los errores durante la reparación de los daños primarios en el ADN, fundamentalmente de las roturas dobles radioinducidas. Hasta el momento son pocos los trabajos que han evaluado las roturas dobles en el ADN producidas por efecto vecindad mediante el ensayo de focos  $\gamma$ -H2AX. Estos estudios se han realizado en fibroblastos [5-9]. En el presente trabajo se evaluó el efecto vecindad en linfocitos humanos mediante el biomarcador focos  $\gamma$ -H2AX que se emplea para la detección de roturas dobles en el ADN.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Donantes y muestreo**

Se extrajeron muestras de sangre periférica por punción venosa de dos donantes sanos que dieron su consentimiento para participar en nuestro estudio. Las muestras previamente heparinizadas fueron homogenizadas y divididas en partes iguales para la irradiación.

### **2.2. Irradiación**

Una parte de las muestras de sangre fue irradiada a temperatura ambiente (TA) con una fuente de  $^{137}\text{Cs}$  de rayos  $\gamma$ , con una dosis de 0.2 Gy a una tasa de dosis de 0.5 Gy/min, mientras que la parte no irradiada (0 Gy) se mantuvo como control.

### **2.3. Procesamiento de las muestras para el estudio del efecto vecindad**

Después de la irradiación, todas las muestras de sangre fueron incubadas a 37°C durante una hora. Las muestras para el estudio del EV fueron centrifugadas a 400 g durante 20 min a temperatura ambiente para la separación del plasma. Solo se extrajo el plasma sin signo de hemólisis. La extracción se realizó con cuidado evitando la contaminación con las células blancas y glóbulos rojos. El plasma aislado de las muestras irradiadas no fue filtrado y se añadió a las muestras de sangre no irradiadas inmediatamente después de su extracción. Las células no irradiadas con plasma de células irradiadas se identificaron como CEV, las células control no irradiadas con su plasma (CC) y las células irradiadas con su plasma (CI). Todas las muestras se incubaron a 37°C durante 1 y 18 h. Posteriormente se realizó el aislamiento de los linfocitos y se realizó el ensayo de focos  $\gamma$ -H2AX.

## **2.4. Ensayo de focos $\gamma$ -H2AX**

### **2.4.1. Aislamiento de los linfocitos**

El aislamiento de los linfocitos, el ensayo de focos  $\gamma$ -H2AX y el análisis de los focos se realizó según [16] con ligeras modificaciones. Para aislar los linfocitos se añadió 1 ml de Histopaque en el fondo de los tubos que se centrifugaron a 1000 g durante 5 min a temperatura ambiente. Los linfocitos de la interfase fueron aislados, lavados con PBS y fijados durante 10 min con paraformaldehído al 2% a 4°C y fueron resuspendidos en PBS. Las células fueron depositadas en portaobjetos mediante centrifugación y después fueron guardadas a -20°C hasta la inmunotinción.

### **2.4.2. Inmunotinción y análisis de los focos $\gamma$ -H2AX**

La permeabilización de las células se realizó a temperatura ambiente con 0.25 % Tritón X-100, 0.1 % glicina durante 5 min, en buffer fosfato salino libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (PBS), como paso intermedio de dos lavados con PBS de 5 min cada uno. A continuación se realizó el bloqueo con 2 % de albúmina de suero bovina (BSA), 0.1% Tween-20 en PBS, durante 30 min, a temperatura ambiente. Seguidamente las células se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal contra la histona fosforilada  $\gamma$ -H2AX (Upstate), dilución 1:500 y se dejaron a temperatura ambiente durante 45 min. Después de dos lavados con PBS se añadió el anticuerpo secundario marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (SIGMA), dilución 1:400 por 45 min a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS por 5 min las láminas fueron montadas con medio VECTASHIELD (Vector Laboratories), con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) para la tinción y contraste nuclear. Las células teñidas con DAPI y FITC fueron capturadas con un objetivo 63x en un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss, acoplado a una cámara a color digital, motorizado para capturas en los planos x, y, z. Las imágenes fueron capturadas de forma automática empleando el software METASYSTEM (Alemania). El análisis de las células y los focos fue realizado con el software HISTOLAB (Microvision, Francia). La cuantificación de los focos se realizó en la imagen resultante de la proyección de las secciones individuales capturadas a intervalos de 1- $\mu$ m. Aproximadamente 500 células por donante fueron analizadas en las variantes CC y CEV mientras que alrededor de 200 fueron analizadas en la variante CI.

### **2.4.3. Análisis estadístico**

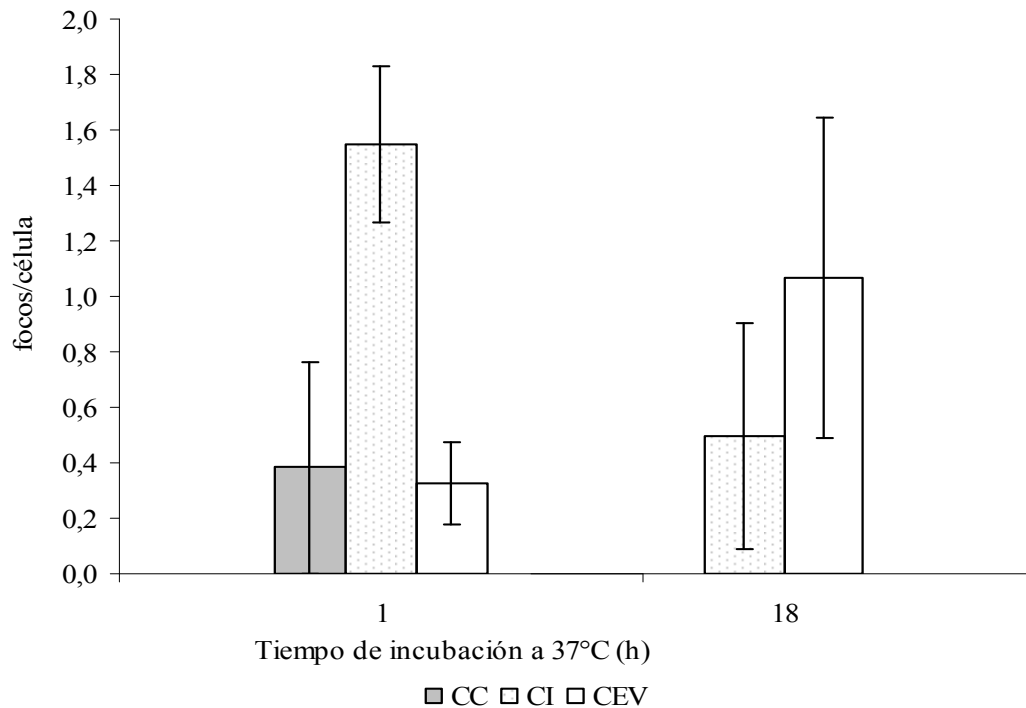
Los resultados analizados fueron el número de focos/célula para cada donante (número total de focos/total de células analizadas), el promedio y la desviación estándar.

## **3. RESULTADOS**

La evaluación del efecto vecindad se realizó mediante la transferencia de plasma de sangre irradiada, con una dosis de 0.2 Gy, a muestras de sangre no irradiadas sin su plasma.

El comportamiento del número promedio de focos/célula de dos donantes en las muestras CC, CI y CEV tras 1 h y 18 h de incubación a 37°C después de la transferencia de plasma se

muestra en la Fig. 1. El número de focos/célula en las CEV y CC fue similar tras 1 hora a 37°C ( $0.32\pm 0.15$  vs  $0.38\pm 0.38$  respectivamente) mientras que a las 18 horas, el número de focos/célula se incrementó en las CEV hasta  $1.43\pm 0.77$ . En las CI el número promedio de focos/célula fue de  $1.55\pm 0.28$  tras 1 hora a 37°C y disminuyó hasta  $0.67\pm 0.55$  tras 18 h de incubación a 37°C.



**Fig 1. Comportamiento del biomarcador focos  $\gamma$ -H2AX en linfocitos CC (barra en gris), CI (barras con puntos) y CEV (barras en blanco) que fueron incubados a 37°C durante 1 h y 18 h después de la transferencia del plasma. Los resultados representan el promedio de focos  $\gamma$ -H2AX de dos donantes.**

El incremento de los focos  $\gamma$ -H2AX por el efecto vecindad fue 3,7 veces el valor del control para 1 h. En cambio en las muestras irradiadas se observó una disminución en el número de focos promedio de alrededor de un 60 % respecto al valor observado a 1 h. El número de focos cuantificado a las 18 h en las células CEV fue superior al promedio obtenido en las CI.

#### 4. DISCUSIÓN

En estudios anteriores evaluamos el efecto en el ADN producido por la acción directa o indirecta de las radiaciones ionizantes sobre linfocitos humanos conocido como efecto blanco de las radiaciones [16, 17]. Los daños en el ADN fueron cuantificados mediante el ensayo de focos  $\gamma$ -H2AX permitiendo establecer relaciones dosis-respuesta para un determinado intervalo de dosis y para diferentes tiempos post-exposición [16, 17]. En el presente trabajo empleamos el biomarcador focos  $\gamma$ -H2AX para evaluar el efecto vecindad de la radiación ionizante en células que no han sido irradiadas, a partir de su interacción con factores o señales liberadas en el plasma de sangre irradiada.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran un incremento en el número de focos  $\gamma$ -H2AX en linfocitos humanos no irradiados debido al efecto vecindad. Su incubación con el plasma de sangre irradiada con 0.2 Gy de rayos gamma provocó la inducción de un número de focos de hasta 3,7 veces el valor del control. Este efecto fue observado 18 h después de la incubación de las células no irradiadas con el plasma aislado de las muestras irradiadas. Estos resultados son similares a los observados por Sokolov *et al.*, 2005, [5] quienes demostraron un aumento en el número de focos  $\gamma$ -H2AX en fibroblastos no irradiados 18 h después de la transferencia del medio extracelular de fibroblastos irradiados con una dosis de 0.2 Gy de rayos gamma. En este trabajo el estudio de la cinética de la liberación de las señales al medio para producir el efecto vecindad demostró que este proceso es dependiente de la dosis por lo que para 0.2 Gy el tiempo óptimo fue de 1 h después de la irradiación [5].

Se ha evidenciado que el medio extracelular de linfocitos aislados irradiados con dosis de 0.5 y 3 Gy de rayos X provoca, en linfocitos no tratados, una disminución significativa de la sobrevivencia celular, un aumento del estrés oxidativo intracelular, de la apoptosis, de la frecuencia de micronúcleos así como el acortamiento de los telómeros a diferencia de lo observado en células tratadas con medio de células irradiadas con 0.1 Gy en las que se evidenció solamente un incremento de especies reactivas del oxígeno [14].

En cultivos de linfoblastos humanos, WTK1, se estudió también la inducción de mutaciones en el locus de la timidina quinasa por efecto vecindad [13]. Al evaluar la cinética de la liberación de las señales “bystander” al medio extracelular, los autores demostraron que las células irradiadas con 2 Gy de rayos gamma liberaban al medio la señal para inducir el efecto vecindad, 30 minutos después de la irradiación [13]. El máximo de mutaciones se produjo con el medio recolectado entre 1 y 12 h después de la irradiación [13]. Los autores plantean que al menos una hora de incubación de las células no irradiadas con el medio de células irradiadas es suficiente para inducir el efecto vecindad máximo [13].

Entre los factores extracelulares relacionados con la inducción del efecto vecindad se encuentran las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno [6, 7], entre otros factores. El incremento del estrés oxidativo intracelular también parece estar relacionado con el efecto vecindad [9].

En otro estudio se demostró que la transferencia de plasma de muestras irradiadas con 4 Gy, a linfocitos aislados no irradiados, no produjo una respuesta apoptótica por encima de los valores controles [15]. Sin embargo los autores observaron que el plasma obtenido de sangre irradiada provoca una disminución de la apoptosis de forma dosis-dependiente cuando es añadido a linfocitos irradiados con altas dosis; siendo mayor la reducción en linfocitos irradiados con dosis mayores a 6 Gy [15]. Estos resultados indican un efecto negativo pues la inhibición de la apoptosis en células con aberraciones cromosómicas se encuentra relacionada con el incremento del riesgo de cáncer.

Nuestros resultados aunque preliminares proporcionan evidencia experimental sobre el incremento del daño en el ADN, en linfocitos humanos no irradiados, por efecto vecindad mediante la transferencia de plasma aislado de sangre irradiada con una dosis relativamente baja de radiación gamma. Sin embargo es necesario extender el estudio a un mayor número de donantes, ampliar el intervalo de dosis, profundizar sobre el conocimiento de la respuesta para diferentes tiempos de acondicionamiento del medio y de exposición de las células, determinar si existe algún tipo de subpoblación linfocitaria que sea más susceptible a este

fenómeno, establecer la interrelación entre el efecto vecindad y la radioadaptación en este sistema, así como evaluar la eficacia de las radiaciones de alta transferencia lineal de energía.

El conocimiento sobre el efecto vecindad y las mejoras en su comprensión puede contribuir a reducir las incertidumbres existentes en las estimaciones del riesgo a bajas dosis y aumentar la confianza en dichas estimaciones [1]. El estudio de este efecto puede ayudar a mejorar la eficacia terapéutica y reducir la incidencia de efectos adversos de la radioterapia [12].

El efecto vecindad y el efecto blanco de las radiaciones ionizantes están interrelacionados, ambos son desencadenados por la irradiación de las células sin embargo se manifiestan de forma diferente en cuanto a su respuesta, cinética y mecanismos. El efecto blanco ha sido mayormente estudiado y los resultados obtenidos se han empleado en el establecimiento de las bases del sistema de protección radiológica vigente. Sobre el efecto vecindad falta mucho por esclarecer aunque grandes avances sobre el tema se han realizado en las últimas décadas. Su mejor comprensión contribuirá a la protección de las personas y al mejoramiento del actual sistema de radioprotección.

## 5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en las condiciones experimentales usadas muestran que el plasma aislado 1 h después de la irradiación con 0.2 Gy incrementa el número de focos  $\gamma$ -H2AX en linfocitos humanos no irradiados y que este efecto puede detectarse 18 h después de la transferencia del plasma

### Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el marco de la beca OIEA, CUB10022, RLA 9/074. Agradecemos el apoyo del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), del European Nuclear Safety Training and Tutoring Institute (ENSTTI) del Instituto de Radioprotección y Seguridad Nuclear (IRSN, Francia), de la Agencia de Energía Nuclear de Tecnologías de Avanzada (AENTA, Cuba) y del Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones (CPHR, Cuba).

## 6. REFERENCIAS

1. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation “Biological mechanism of radiation actions at low doses” *UNSCEAR*, United Nations, New York (2012).
2. Mothersill, C. and Seymour, C., Radiation-induced bystander effects: past history and future directions, *Radiat. Res.*, **155**, 759–767 (2001).
3. Ward, J.F., The radiation-induced lesions which trigger the bystander effect, *Mut. Res.*, **499**, 151-154 (2002).
4. Bonner, W. M., Low-dose radiation: Thresholds, bystander effects, and adaptive responses, *PNAS*, **100**, 4973–4975, (2003).

5. Sokolov, M.V., Smilenov, L.B., Hall, E.J., Panyutin, I.G., Bonner, W.B., and Sedelnikova, O.A., Ionizing radiation induces DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts, *Oncogene*, **24**, 7257-7265 (2005).
6. Han, W., Wu, L., Chen, S., Bao, L., Zhang, L., Jiang, E., Zhao, Y., Xu, A., Hei, TK and Yu, Z., Constitutive nitric oxide acting as a possible intercellular signalling molecule in the initiation of radiation-induced DNA double strand breaks in non-irradiated bystander cells. *Oncogene*, 1-10 (2006).
7. Han, W., Wu, L., Hu, B., Zhang, L., Chen, S., Bao, L., Zhao, Y., Xu, A., and Yu, Z., The early and initiation processes of radiation-induced bystander effects involved in the induction of DNA double strand breaks in non-irradiated cultures, *British J. Rad.*, **80**, S7-S12 (2007).
8. Sedelnikova, O.A., Nakamura, A., Kovalchuk, O., Koturbash, I., Mitchell, S. A., Marino, S. A., Brenner, D. J. and Bonner, W.M., DNA Double-Strand Breaks Form in Bystander Cells after Microbeam Irradiation of Three-dimensional Human Tissue Models, *Cancer Res.*, **67**, 4295-4302 (2007).
9. Dickey, J.S., Baird, B.J., Redon, Ch.E., Sokolov, M.V., Sedelnikova, O.A., Bonner, W.M., Intercellular communication of cellular stress monitored by  $\gamma$ -H2AX induction, *Carcinogenesis*, **30**, 1686-1695 (2009).
10. Prise, K.M. and O'Sullivan, J.M., Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 351-360 (2009).
11. Prise, K.M., Schettino, G., Vojnovic, B., Belyakov, O. and Shao, Ch., Microbeam studies of the bystander response, *J. Radiat. Res.*, **50** (Suppl), A1-A6 (2009).
12. Saraví, F.D., Efectos de vecindad de la radiación ionizante y sus implicaciones en radioterapia y radioprotección. *Revista Médica Universitaria*, F.C.M. UN Cuyo, (2009).
13. Zhang, Y., Zhou, J., Baldwin, J., Held, K.D., Prise, K.M., Redmond, R.W., and Liber, H.L., Ionizing radiation-induced bystander mutagenesis and adaptation: Quantitative and temporal aspects, *Mut. Res.*, **671**, 20-25 (2009).
14. Belloni, P., Latini, P., Palitti, F., Radiation-induced bystander effect in healthy G<sub>0</sub> human lymphocytes: Biological and clinical significance, *Mut. Res.*, **713**, 32- 38 (2011).
15. Vinnikov, V., Lloyd, D., Finnon, P., Bystander apoptosis in human cells mediated by irradiated blood plasma, *Mut. Res.*, **731**, 107- 116 (2012).
16. Roch-Lefèvre, S., Mandina, T., Voisin, Pa., Gaëtan, G., González, J. E., Alves Valente, M., Bonnesoeur, P., García, O., Voisin, Ph. and Roy, L. Quantification of  $\gamma$ -H2AX foci in human lymphocytes: a method for biological dosimetry after ionizing radiation exposure. *Rad. Res.*, **174**, 185-194 (2010).
17. Mandina, T., Roch-Lefèvre, S., Voisin, Pa., González, J. E., Lamadrid, A.I., Romero I., García, O., Voisin, Ph. and Roy, L., Dose-response relationship of  $\gamma$ -H2AX foci induction of human lymphocytes after X-ray exposure, *Rad. Measurements*, **46**, 997-999 (2011).