

Mag-B  
S161  
e. 1

BIOTRANSFORMACION DE BENZO(A) PIRENO Y SU EFECTO SOBRE LA  
SINTESIS DEL DNA EN CELULAS ANIMALES

Tesis  
presentada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
- Magister en Ciencias Biológicas con Mención en  
Bioquímica

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas

por

INES SALAZAR BAUDET

Santiago de Chile  
Septiembre, 1981

Directores de Tesis : Lionel Gil H.  
Simón Litvak K.

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas  
Universidad de Chile  
Santiago

INFORME DE APROBACION  
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por la candidata

Inés Salazar Baudet

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de tesis para el grado de Magister en Ciencias con Mención en Bioquímica en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 7 de septiembre de 1981.

Directores de Tesis:

Lionel Gil H.

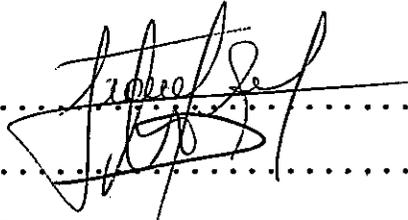
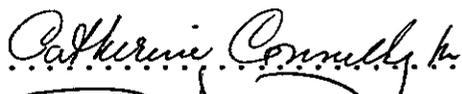
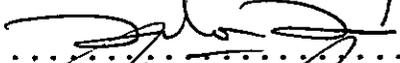
Simón Litvak K.

Comisión Informante de Tesis:

Catherine Connelly

Carlos Jerez

Marco Perretta

  
.....  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la dirección de los profesores Lionel Gil H. y Simón Litvak K, y financiada por los proyectos B-933081202 y B-535-813-5 del Servicio de Desarrollo Científico, Artístico y de Cooperación Internacional de la Universidad de Chile.

*A aquellos que dan un  
sentido a mi vida;  
Roberto,  
María Gabriela,  
y mis padres.*

Quisiera expresar mi reconocimiento y gratitud,

Al Dr. Lionel Gil por su permanente estímulo, paciencia, guía y amistad.

Al Dr. Simón Litvak por su inapreciable guía y enseñanzas y por el gran apoyo y ayuda que me ha brindado.

A la Dra. Laura Tarragó - Litvak cuya experiencia y apreciados consejos han sido una constante guía.

Al Dr. Jorge Allende y a todos sus colaboradores por la generosa y constante ayuda, facilidades y confianza que me brindaron durante todo el desarrollo de este trabajo.

A los Dres. Alicia Sandoval, Carlos Jerez, Antonio Morello y a todos sus colaboradores por las facilidades y ayuda prestadas.

Al Dr. Jorge Garrido por los estudios de microscopía electrónica.

A la Dra. Silvia Leiva por las microscopías en contraste de fase.

A la Sra. Blanca Julia Navarro por su generosa e inagotable paciencia durante la transcripción mecanográfica de este trabajo.

Al Sr. José Mondaca por la confección de los dibujos.

Y a mis compañeros de laboratorio: Jorge, Jaime, Paulina y Juan que siempre contribuyeron en alguna medida a la realización de este trabajo.

## INDICE DE MATERIAS

	Página
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
ABREVIATURAS UTILIZADAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiv
I INTRODUCCION	1
Hidrocarburos aromáticos policíclicos y su efecto biológico	1
Metabolismo de Benzo(a)pireno	3
B(a)P y su relación con la síntesis del DNA	6
Características de las DNA polimerasas	7
Propósitos de este trabajo	8
Principales resultados	9
II MATERIALES Y METODOS	11
Reactivos Utilizados	11
Tratamiento de los animales	11
Fraccionamiento subcelular del hígado	12
Solubilización de las DNA polimerasas de núcleos	15
Solubilización de la DNA polimerasa mito- condrial	16

	Página
Separación de las DNA polimerasas de núcleos por centrifugación en gradientes continuas de sacarosa	17
Determinación de la actividad B(a)P hidroxilasa	17
Determinación de la síntesis de DNA	19
Determinación de las actividades DNA polimerasas	20
Activación del DNA nativo	22
Preparación de PoliA-oligodT <sub>12</sub>	22
Determinación de proteínas	22
Determinación de DNA	22
III RESULTADOS	23
Efectos <u>in vivo</u> de B(a)P sobre los núcleos de hígado de ratas	23
Actividad aril hidrocarburo(B(a)P) hidroxilasa	23
Efectos <u>in vivo</u> de B(a)P sobre la síntesis de DNA nuclear	26
Efectos <u>in vitro</u> de B(a)P sobre la síntesis de DNA nuclear	30
Caracterización de las DNA polimerasas inhibidas por B(a)P	30

	Página
Efectos <u>in vivo</u> de B(a)P sobre la síntesis de DNA mitocondrial	37
Efectos de B(a)P <u>in vitro</u> sobre la síntesis de DNA mitocondrial	45
Efectos de B(a)P <u>in vitro</u> sobre la actividad DNA polimerasa $\gamma$	50
Efectos <u>in vivo</u> de B(a)P sobre las mitocondrias	50
IV DISCUSION	54
Efectos de B(a)P en núcleos	54
Efectos de B(a)P en mitocondrias	58
V BIBLIOGRAFIA	63

## LISTA DE TABLAS

	Página
TABLA I      Actividad aril hidrocarburo hidroxilasa (AHH), de núcleos y microsomas de hígado de ratas controles y tratadas con B(a)P	25
TABLA II     Efecto de inhibidores sobre las actividades DNA polimerasas solubilizadas de núcleos de hígado de ratas controles y tratadas con B(a)P	36
TABLA III    Efecto de inhibidores sobre la actividad DNA polimerasa solubilizada de mitocondrias de hígado de ratas controles y tratadas con B(a)P	44

## LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Preparaciones nucleares de hígado de ratas	24
FIGURA 2 Síntesis de DNA nuclear. Cinética	27
FIGURA 3 Síntesis de DNA a diferentes concentraciones de proteína nuclear	28
FIGURA 4 Actividad DNA polimerasa solubilizada de núcleos	29
FIGURA 5 Síntesis de DNA en núcleos en presencia y ausencia de NADPH	31
FIGURA 6 Efectos <u>in vitro</u> de B(a)P sobre la síntesis de DNA nuclear	32
FIGURA 7 Efectos de la preincubación con B(a)P sobre la síntesis de DNA nuclear	33
FIGURA 8 Actividades DNA polimerasas solubilizadas de núcleos y separadas por centrifugación en gradientes de sacarosa	35
FIGURA 9 Síntesis de DNA en mitocondrias. Cinética	38
FIGURA 10 Síntesis de DNA a diferentes concentraciones de proteína mitocondrial	39
FIGURA 11 Inhibición de la síntesis de DNA mitocondrial por ddTTP	40

	Página
FIGURA 12 Actividad DNA polimerasa solubilizada de mitocondrias	42
FIGURA 13 Actividad enzimática del sedimento mitocondrial obtenido después de solubilizar la DNA polimerasa	43
FIGURA 14 Efectos de Mn sobre la actividad DNA polimerasa mitocondrial	46
FIGURA 15 Efectos de KCl sobre la actividad DNA polimerasa mitocondrial	47
FIGURA 16 Síntesis de DNA mitocondrial en presencia y ausencia de NADPH	48
FIGURA 17 Efectos <u>in vitro</u> de B(a)P sobre la síntesis de DNA en mitocondrias controles	49
FIGURA 18 Efectos <u>in vitro</u> de B(a)P sobre la actividad DNA polimerasa solubilizada de mitocondrias controles	51
FIGURA 19 Preparación mitocondrial de hígado de ratas controles	52
FIGURA 20 Preparación mitocondrial de hígado de ratas tratadas con B(a)P	53

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

PAHs	:	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
B(a)P	:	Benzo(a)pireno (1,2 - benzopireno)
NADPH	:	$\beta$ -Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato forma reducida
AHH	:	Aril hidrocarburo hidroxilasa (EC 1.14.14.2)
NEM	:	N-etil maleimida
PCMB	:	p-cloromercuribenzoato
ddTTP	:	2', 3'-dideoxitimidina-5'-trifosfato
TTP	:	Timidina-5'-trifosfato
Tris	:	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
EDTA	:	Acido etilendiaminotetraacético
PMSF	:	Fenilmetilsulfonilfluoruro
SAB	:	Seroalbúmina de bovino
PPO	:	2,5-difeniloxazol
POPOP	:	1,4-bis (2-(5-feniloxazolil))benzeno
-ATP	:	Adenosina-5'-trifosfato
dATP	:	2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
dGTP	:	2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato
dCTP	:	2'-desoxicitidina-5'-trifosfato
TCA	:	Acido tricloroacético
DTT	:	Ditiotreitol

## RESUMEN

En este trabajo se presentan los resultados concernientes al estudio del efecto de benzo(a)pireno sobre la síntesis de DNA y sobre las actividades DNA polimerasas en núcleos y mitocondrias de hígado de ratas.

Cuando benzo(a)pireno fue administrado intraperitonealmente a las ratas 48 horas antes de sacrificarlas, encontramos que es tos núcleos tenían menor capacidad para sintetizar DNA que los núcleos purificados de hígado de ratas controles. Mas aún las DNA polimerasas solubilizadas de los núcleos de las ratas tratadas mostraron menor actividad que la enzima solubilizadas de los núcleos controles. Hemos caracterizado la DNA polimerasa más afectada por el tratamiento con benzo(a)pireno, por centrifugación en gradientes de sacarosa y ensayos enzimáticos específicos. Nuestros resultados indican que la DNA polimerasa  $\beta$  de reparación, es mucho mas resistente al cancerígeno que la DNA polimerasa  $\alpha$  de replicación.

Detectamos en núcleos purificados la enzima aril hidrocarburo hidroxilasa, cuya actividad es dependiente de NADPH y conduce a la activación de benzo(a)pireno. Esta enzima se encontró muy aumentada después del tratamiento in vivo con el cancerígeno. La estrecha relación entre esta actividad y la inhibición de la síntesis de DNA observada después de inyectar

benzo(a)pireno está indicada por los siguientes resultados: la síntesis de DNA en los núcleos de los animales inyectados con el cancerígeno fue inhibida por NADPH. Contrariamente a esto, la síntesis de DNA en los núcleos controles no fue inhibida por NADPH lo cual sugiere que cierta cantidad del cancerígeno no activado podría estar presente en los núcleos de los animales tratados con benzo(a)pireno; la activación del cancerígeno en presencia de NADPH conduciría al aumento de la inhibición ya observado. Esta idea es apoyada por nuestros resultados in vitro que indican que la inhibición de la síntesis de DNA producida por benzo(a)pireno está muy aumentada por NADPH. Como en los experimentos in vivo, las incubaciones nucleares in vitro condujeron a una inhibición preferencial de la DNA polimerasa  $\alpha$ ,

Cuando se estudió el efecto de benzo(a)pireno sobre la síntesis de DNA mitocondrial, encontramos que la capacidad de síntesis de las mitocondrias de animales inyectados estaba disminuida en comparación con los organelos controles. Sin embargo la actividad DNA polimerasa  $\gamma$  solubilizada de las mitocondrias de los animales inyectados con el cancerígeno fue mucho mayor que la actividad de las mitocondrias controles. Este aumento no se debió a una mayor solubilización de la enzima, o a la presencia de otras polimerasas además de la DNA polimerasa  $\gamma$  mitocondrial en dichos organelos, como se demostró a través de la caracterización de la actividad polimerasa en las ratas controles y tratadas con benzo(a)pireno. In vitro

el cancerígeno produjo una inhibición de la síntesis de DNA en las mitocondrias enteras, e inhibió la actividad DNA polimerasa y mitocondrial. Contrariamente a lo observado en núcleos, NADPH no afectó la síntesis de DNA en las mitocondrias de las ratas tratadas con benzo(a)pireno, ni en los organelos de los animales controles.

Algunos resultados preliminares de microscopías electrónicas indican importantes cambios estructurales observados en las mitocondrias de los animales tratados con el cancerígeno. Por lo tanto tendremos que resolver si el aumento de la actividad DNA polimerasa y en las mitocondrias, se debe a la inducción de la síntesis de esta enzima, ya que la polimerasa y en el organelo debe llevar a cabo la replicación y la reparación del genoma mitocondrial.

## ABSTRACT

Results concerning the study of the effect of benzo(a)pyrene on DNA synthesis and on DNA polymerase activity in nuclei and mitochondria of rat liver, are presented in this work.

When benzo(a)pyrene was administered intraperitoneally to rats 48 hours before sacrifice, we found that these nuclei had a lower ability to synthesize DNA, as compared with nuclei purified from livers of control animals. Moreover DNA polymerases solubilized from nuclei of treated rats showed a lower activity than the enzyme activity solubilized from control nuclei. We have characterized the DNA polymerases most affected by the treatment with benzo(a)pyrene by sucrose gradient centrifugation and specific enzyme assays. Our results indicate that the repair DNA polymerase  $\beta$  is more resistant to the drug than the replicative DNA polymerase  $\alpha$ .

We were able to detect in purified nuclei the enzyme aryl hydrocarbon hydroxylase. This activity is dependent of NADPH and leads to the activation of benzo(a)pyrene. This enzyme was found dramatically increased after in vivo treatment with the carcinogen. A close relationship between this activity and the observed inhibition of DNA synthesis after injection of benzo(a)pyrene is strongly suggested by the fact that DNA synthesis in nuclei from drug injected animals was severely affected by NADPH. On the contrary DNA synthesis

was not inhibited at all by NADPH in control nuclei, suggesting that some unmodified drug can still be present in the nuclei of benzo(a)pyrene treated rats. The activation of that drug in the presence of NADPH can lead to the observed increased inhibition. This idea is supported by our in vitro results indicating that the inhibition of DNA synthesis by benzo(a)pyrene is greatly increased by NADPH. As in the in vivo experiments the latter nuclear incubations in vitro lead also to a preferential inhibition of DNA polymerase  $\alpha$ .

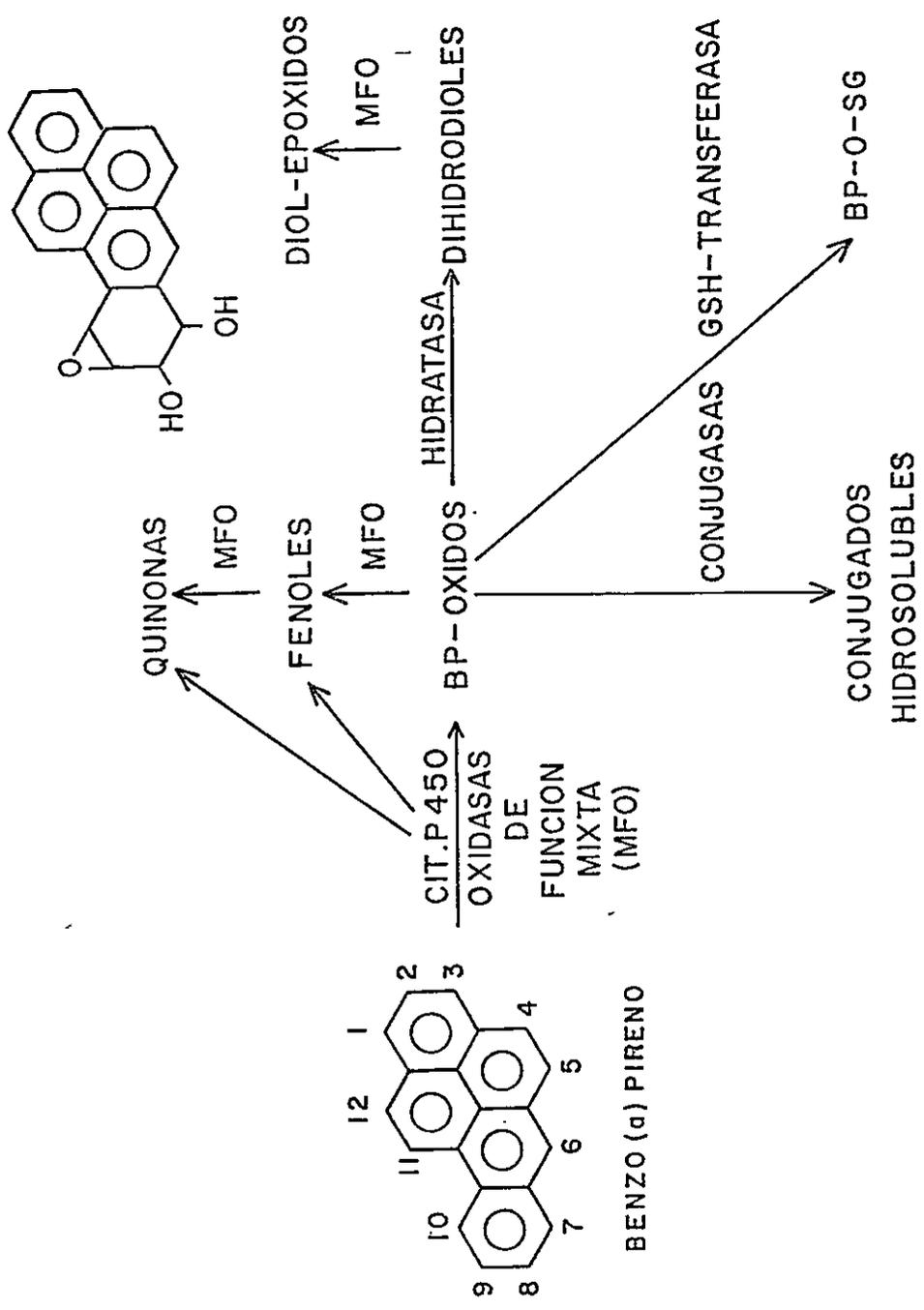
When the effect of benzo(a)pyrene on mitochondrial DNA synthesis was studied, we found that the synthetic capacity of mitochondria from drug injected animals was decreased as compared with control organelles. However the mitochondrial  $\gamma$  DNA polymerase activity solubilized from mitochondria of animals injected with the carcinogen was much higher than in control mitochondria. This increase is not due to a change in the solubilization of the enzyme or to a DNA polymerase other than the mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$ , as shown by a thorough characterization of the polymerase activity in control and benzo(a)pyrene treated rats. In vitro the carcinogen produced inhibition of DNA synthesis with whole mitochondria and inhibited the solubilized mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$  activity. Contrary to what was observed in nuclei, NADPH did not affect DNA synthesis in mitochondria from benzo(a)pyrene treated rats or in organelles from control animals. Some preliminary results

by electron microscopy indicate that important structural changes are observed in mitochondria of carcinogen treated animals. Thus, the question remain to be solved of whether the increase in DNA polymerase  $\gamma$  activity in treated mitochondria is due to the induction of enzyme synthesis since polymerase  $\gamma$  in the organelle must accomplish both the replication and repair of the mitochondrial genome.

## I.- INTRODUCCION

### HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS Y SU EFECTO BIOLÓGICO

En los últimos años se ha desarrollado un considerable interés hacia el estudio de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), contaminantes ambientales ampliamente distribuidos, en relación al destino metabólico de estos compuestos en los organismos vivos expuestos a la contaminación. Estudios de numerosos laboratorios han demostrado que estos contaminantes ambientales están implicados en una serie de alteraciones biológicas que incluyen citotoxicidad (1,2), mutagénesis (2,3), transformaciones celulares in vitro (4,5), e inducción de cáncer en animales de experimentación (6,7) y en humanos (8). Estos compuestos requieren de activación metabólica para producir el daño biológico y se ha establecido que existe una correlación directa entre la capacidad cancerogénica de los PAHs, y la unión covalente de sus metabolitos activos al DNA (9,10). Uno de estos PAHs, más extensamente estudiado, es el Benzo(a)pireno (B(a)P), contaminante ambiental ubicuo, que se produce en las combustiones incompletas de la materia orgánica, y que parece ser el más activo agente cancerogénico (11) al cual el hombre está expuesto. (Esquema 1).



Esquema 1. METABOLIZACION DE BENZO(A)PIRENO, H.V. Gelboin y col. en "Glutathion: Metabolism and Function" -ed. I.M. Arias y W.B. Jakoby. Raven Press, N.Y. 1976.

**METABOLISMO DE BENZO(A)PIRENO.** El B(a)P es metabolizado in vivo e in vitro por la aril hidrocarburo hidroxilasa (EC 1.14.14.2), una oxidasa de función mixta cuya actividad es dependiente de NADPH (12), y que forma parte de un complejo sistema metabólico presente en el retículo endoplásmico celular el que lleva a cabo la activación y eliminación (13,14) de los cancerígenos y de otros compuestos tóxicos para los organismos vivos (15).

La aril hidrocarburo hidroxilasa (AHH) que ha sido identificada en la mayoría de los tejidos de todas las especies de mamíferos (16), metaboliza, y es inducible por un amplio espectro de compuestos que incluyen pesticidas, drogas, PAHs (14,17) y algunos sustratos endógenos como los esteroides (13).

La biotransformación del B(a)P da como resultado alrededor de 40 metabolitos identificados como fenoles, epóxidos, quinonas, dihidrodioles, diol-epóxidos y conjugados hidrosolubles (18). La mayoría de estos productos es posteriormente eliminada. Sin embargo se ha demostrado que los diol-epóxidos producidos en esta secuencia metabólica no se eliminan de la célula ya que son los mayores agentes mutagénicos y cancerogénicos (3,5) que se encuentran unidos covalentemente a los ácidos nucleicos y proteínas celulares (19,20,21).

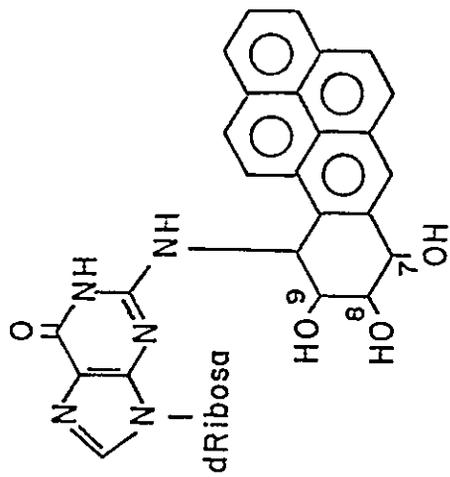
Los estudios dirigidos a investigar la estructura química de la unión covalente entre los ácidos nucleicos y las formas activas del B(a)P, han establecido la formación de un alto

porcentaje de aductos guanosina en el DNA y RNA, cuando tejidos humanos o de roedores, o células en cultivo (22,23) se exponen a B(a)P. Este tipo de aducto se produce también in vitro, cuando se modifica el DNA con epóxidos derivados del B(a)P (24). (Esquema 2).

La actividad AHH fue primero localizada en el retículo endoplásmico de células de mamíferos, y aislada en la fracción microsomal (15,25,26). Posteriormente varios grupos de investigadores demostraron la existencia de una actividad AHH en el núcleo celular (27,28), la que es también dependiente de NADPH y estimulada a altos niveles por inductores (29,30). En experimentos realizados incubando núcleos aislados de células animales, en presencia de B(a)P y de cofactores adecuados, se demostró también con este sistema la interacción covalente del B(a)P con el DNA, RNA y las proteínas nucleares histonas y no histonas (28,29,30).

Muy recientemente (1980) fue descrita además en mitocondrias de hígado de ratas, la presencia de un sistema parcialmente dependiente de NADPH, y capaz de activar cancerígenos in vitro (31).

Paralelamente a estos resultados, otros investigadores han sugerido que el blanco preferencial de acción de los derivados activos del B(a)P sería el DNA mitocondrial (32), puesto que al incubar células animales en presencia de B(a)P, se encontraron sus metabolitos unidos covalentemente al DNA nuclear y mitocondrial, siendo la cantidad de derivado activo



2'-desoxi-N<sup>2</sup>-(7,8,9,10 tetrahidro-7 $\beta$ , 8 $\alpha$ , 9 $\alpha$ , 9 $\alpha$ , trihidroxibenzo (a) piren-10-il) guanosina

Esquema 2. Aducto guanosina.

D. Grumberger e I. B. Weinstein, Progress in nucleic acid research and molecular biology vol. 23, p. 105 (1976)

unido por  $\mu\text{g}$  de DNA, mucho más alta en el genoma del organelo (32,33).

La causa por la cual el DNA mitocondrial resulta modificado en mayor grado que el DNA nuclear fue atribuida a la presencia en el núcleo de proteínas que interactúan con el DNA y que lo protegerían de la acción de estos compuestos tóxicos. El DNA mitocondrial en cambio no parece estar tan protegido, aunque se ha encontrado una proteína de tipo histona en mitocondrias de levaduras (34).

5 B(A)P Y SU RELACIÓN CON LA SÍNTESIS DEL DNA. En experimentos realizados in vivo (35,36,37) e in vitro (38,39) en bacterias y mamíferos, se ha establecido que la administración de B(a)P y otros PAHs produce una inhibición de la síntesis del DNA.

Este efecto ha sido atribuido hasta ahora a la modificación que sufre el DNA, sin embargo cantidades importantes de las sustancias activas se encuentran unidas a las proteínas nucleares (40).

Es esencial por lo tanto, considerar la posibilidad que la inhibición de la síntesis del DNA producida por los PAHs, podría también reflejar, al menos en parte, algunas alteraciones de los componentes proteicos del sistema responsable de la replicación fiel del material genético.

CARACTERÍSTICAS DE LAS DNA POLIMERASAS. El proceso de síntesis del DNA es llevado a cabo por un complejo sistema multienzimático, en el cual las DNA polimerasas tienen un papel crucial. En las células de mamíferos se han descrito tres tipos de DNA polimerasas (41,42), la DNA polimerasa  $\alpha$  que parece ser la enzima que replica el genoma nuclear, la DNA polimerasa  $\beta$  que es la enzima de reparación, y la DNA polimerasa  $\gamma$  que es la enzima que replica el DNA mitocondrial (43) aunque también se ha encontrado esta última enzima en el núcleo donde su función no ha sido aún establecida. La DNA polimerasa  $\alpha$  que constituye la principal actividad en las células en crecimiento, tiene un alto peso molecular (42), se inactiva a altas concentraciones salinas, su pH óptimo se encuentra entre 7 y 8, y es fuertemente inhibida por N-etil maleimida (NEM) y p-cloromercuribenzoato (PCMB). La DNA polimerasa  $\beta$  se encuentra en el núcleo celular donde parece estar fuertemente unida a la cromatina. Es una enzima de peso molecular entre 30.000 a 45.000 daltons (44,45), presenta un punto isoeléctrico alcalino y a diferencia de la polimerasa  $\alpha$ , no es inhibida por NEM ni PCMB, y es relativamente estable a alta fuerza iónica. La DNA polimerasa  $\gamma$  es una enzima de alto peso molecular como  $\alpha$ , se la encuentra en las mitocondrias y en el núcleo celular, su actividad se estimula en presencia de alta fuerza iónica y es inhibida sólo parcialmente por NEM (46). Como todas las polimerasas necesitan de un templado (matriz-

iniciador) para catalizar la síntesis del DNA, la propiedad de reconocer diferentes matrices ha sido muy utilizada para el estudio de estas enzimas.

In vitro, la DNA polimerasa  $\alpha$  reconoce mejor una matriz de polidesoxiribonucleotidos, en cambio la enzima  $\gamma$ , especialmente en presencia de Mn, reconoce preferencialmente una matriz de poliribonucleotidos como el poliA.

Otro de los criterios utilizados para el estudio de las DNA polimerasas, es el uso de ciertos inhibidores específicos como la afidicolina, un antibiótico que inhibe específicamente a la  $\alpha$  polimerasa (47) y que no tiene efecto sobre  $\beta$  ni  $\gamma$ ; el bromuro de etidio, una droga antitripanosómica, que se intercala entre las dos hebras del DNA y que inhibe específicamente a la  $\gamma$  polimerasa; y la dideoximitimidinatrifosfato (ddTTP) análogo del deoxinucleotidotrifosfato normal (TTP), la cual inhibe fuertemente a las polimerasas  $\beta$  (46) y  $\gamma$ , pero que no afecta a la  $\alpha$  polimerasa.

**PROPÓSITOS DE ESTE TRABAJO.** Este trabajo fue orientado al estudio de los efectos in vivo e in vitro de B(a)P sobre las DNA polimerasas implicadas en los procesos de replicación y reparación del DNA nuclear y mitocondrial, con el propósito de investigar la posibilidad que la modificación de dichas enzimas por la acción del cancerígeno fuese en parte responsable de las alteraciones observadas a nivel de la síntesis del DNA.

Con este objetivo se utilizaron núcleos y mitocondrias purificadas de hígado de ratas controles y tratadas con B(a)P. Los efectos in vivo del cancerígeno se midieron a través de estudios comparativos entre ambos grupos de animales para la síntesis del DNA nuclear y mitocondrial. Los niveles y propiedades de las DNA polimerasas solubilizadas de núcleos y de mitocondrias y los niveles nucleares de metabolización del cancerígeno se estudiaron en ambos grupos. Los efectos in vitro del cancerígeno se estudiaron en los núcleos y las mitocondrias de los animales controles.

PRINCIPALES RESULTADOS. Los datos experimentales del presente estudio indican que el tratamiento in vivo e in vitro con B(a)P inhibe la síntesis del DNA y las actividades DNA polimerasas en núcleos de hígado de ratas, siendo la enzima  $\alpha$  la más sensible al cancerígeno y  $\beta$  la más resistente. Esta inhibición parece estar mediada por la activación del B(a)P producida por la AHH nuclear.

En mitocondrias de hígado de ratas, el grado de inhibición de la síntesis del DNA producido por la administración del B(a)P es mayor in vivo que in vitro.

La actividad DNA polimerasa  $\gamma$  mitocondrial solubilizada de hígado de animales tratados con B(a)P, se encuentra muy aumentada en relación a la actividad solubilizada de mitocondrias controles.

B(a)P in vitro inhibe débilmente la actividad DNA polimerasa

γ mitocondrial solubilizada de hígado de animales contro -  
les.

## II.- MATERIALES Y METODOS

### REACTIVOS UTILIZADOS.

Los radioisótopos ( $H^3$ )-TTP y ( $H^3$ )timidina fueron adquiridos en New-England Nuclear Co., y ( $H^3$ )-B(a)P en The Radiochemical Center-Amersham.

Benzo(a)pireno, NADPH, DNA de timo de ternera, Desoxiribonucleasa I pancreática, Seroalbúmina de bovino, N-etil maleimida, Bromuro de etidio, Dideoxitimidina trifosfato, y los nucleótidos ATP, TTP, dATP, dGTP y dCTP fueron adquiridos en Sigma Chemical Co.

Poli A y Oligo dT<sub>12</sub> se adquirieron en Boehringer-France. Afidicolina fue gentilmente donada por los doctores B. Hesp y A.H. Todd de Imperial Chemical Industries England.

TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES. Se utilizaron 15 grupos de ratas (6 a 8 animales por grupo) de la cepa Wistar, hembras de 35 días con un peso promedio de 90 gr.

Los efectos de B(a)P sobre la síntesis de DNA y las actividades DNA polimerasas de núcleos se midieron en 7 de estos grupos de ratas y se utilizaron los otros 8 grupos de animales para el estudio de los efectos de B(a)P sobre la síntesis de DNA y la DNA polimerasa y mitocondrial.

Las series de experimentos realizadas en núcleos y en mitocondrias se repitieron en cada uno de los correspondientes grupos de animales.

Tres a cuatro animales de cada grupo fueron inyectados por vía intraperitoneal con una dosis de Benzo(a)pireno (40 mg de B(a)P/Kg de peso corporal) en 0,2 ml de aceite de maíz. (Tratados).

Los tres a cuatro animales restantes en cada grupo fueron inyectados con 0,2 ml de aceite de maíz, vía intraperitoneal (Controles).

Los animales controles y tratados se mantuvieron con alimento y agua ad libitum, y fueron sacrificados 48 horas después de haber sido inyectados.

**FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DEL HIGADO.** El fraccionamiento subcelular de los hígados de cada grupo de animales tratados se realizó en forma paralela al de su correspondiente grupo control, utilizando la misma metódica que se describe a continuación.

Los hígados fueron extraídos rápidamente, cortados en pequeños trozos con tijeras y lavados acuciosamente con Tampón A (sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM; Tris-HCl 10 mM pH 7,5; CaCl<sub>2</sub> 3

mM; PMSF 0,2 mM).

El tejido (aproximadamente 20 gr . de hígado control o tratado) se suspendió en 5 volúmenes de Tampón A y se homogeneizó en un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio con émbolo de teflón. El émbolo se encontraba unido a un motor eléctrico y la homogeneización se efectuó a 200 rpm. (Homogeneizado total).

Las diferentes fracciones subcelulares, núcleos, mitocondrias y microsomas (controles o tratados) fueron aisladas por centrifugación diferencial.

Todas las etapas se realizaron entre 0 - 4° C.

a) Microsomas: El homogeneizado total fue centrifugado durante 10 minutos a 3000 x g en una centrífuga Sorvall modelo RC2-B.

El sedimento (fracción nuclear), fue resuspendido en 100 ml de Tampón A y sometido al mismo tratamiento anterior.

Los líquidos sobrenadantes fueron mezclados y centrifugados durante 15 minutos a 10.000 x g. Se obtuvo un sedimento que contenía la fracción mitocondrial.

El líquido sobrenadante fue centrifugado durante 60 minutos a 105.000 x g en una ultracentrífuga Beckman modelo L3-50. El sedimento final contenía microsomas libres de mitocondrias y de núcleos.

Los microsomas fueron resuspendidos en Tris-HCl 100 mM

pH 7,5 que contenía 1 mM EDTA, a una concentración final de 2 mg de proteína por ml y congelados a - 80° C.

- b) Purificación de núcleos: El sedimento que contenía la fracción nuclear (3.000 x g x 10 min.) fue resuspendido en 50 ml de Tampón B (sacarosa 2,3 M; EDTA 1 mM; Tris-HCl 10 mM pH 7,5; CaCl<sub>2</sub> 3 mM; PMSF 0,2 mM) y centrifugado en un rotor SW 41 Ti durante 40 minutos a 142.000 x g en una ultracentrífuga Beckman Modelo L3-50.

Se eliminó el líquido sobrenadante, y el sedimento nuclear fue resuspendido en Tampón A. Se agregó Tritón X-100 a dicha suspensión hasta concentración final de 0,25 % v/v. El tratamiento con Tritón X-100 lleva a eliminar la contaminación citoplasmática.

La suspensión fue centrifugada 10 minutos a 1.000 x g. El sedimento fue resuspendido en 50 ml de Tampón B y centrifugado 40 minutos a 142.000 x g como se describió antes.

El sedimento final (núcleos purificados) fue resuspendido en Tampón A que contenía 30 % de glicerol y congelado - 80° C.

La pureza de los núcleos fue controlada por observación directa en un microscopio de contraste de fase.

- c) Purificación de mitocondrias: El sedimento que contenía la fracción mitocondrial (10.000 x g x 15 minutos) fue

resuspendido en sacarosa 10 % (p/v) en Tampón C (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 0,1 mM; PMSF 0,1 mM) y centrifugado en gradientes discontinuos de sacarosa 25 % y 42,5% (p/v) en Tampón C durante 45 minutos a 12.000 rpm en un rotor SW 25.1 de la ultracentrífuga Beckman Modelo L3-50. Las mitocondrias que se distribuían en la interfase de las capas 25 % y 42,5 % sacarosa, fueron extraídas y diluidas con un volumen igual de sacarosa 10 % (p/v) en Tampón C. La suspensión obtenida fue centrifugada durante 20 minutos a 12.000 x g.

El sedimento fue resuspendido en sacarosa 10 % (p/v) en Tampón C al cual se le agregó digitonina 0,2 mg/mg de proteína mitocondrial. La suspensión fue mantenida 10 minutos a 4° C, después de lo cual fue centrifugada durante 20 minutos a 10.000 x g.

El líquido sobrenadante fue eliminado y el sedimento se lavó 2 veces con sacarosa 10 % (p/v) en Tampón C.

El sedimento final, de mitocondrias purificadas se resuspendió en el mínimo volumen posible de sacarosa 10 % (p/v) en Tampón C y se guardó a - 80° C. La actividad de síntesis de DNA se mantiene constante durante varios meses en esas condiciones.

**SOLUBILIZACIÓN DE LAS DNA POLIMERASAS DE NÚCLEOS.** Se agregó a la suspensión de núcleos purificados, Tritón X-100 hasta obtener una concentración final de 0,5 % (v/v), y fosfato

de potasio pH 7,4 hasta 200 mM concentración final.

La suspensión fue agitada en un agitador Vortex a su máxima intensidad, y luego homogeneizada en un homogeneizador Potter-Elvehjem (vidrio - vidrio) para 0,4 ml de volumen total.

El homogeneizado fue congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , descongelado rápidamente y centrifugado durante 2 minutos en una centrífuga Microfuge Beckman.

El líquido sobrenadante fue dializado durante 2 horas contra un tampón Tris-HCl 20 mM pH 8,0 que contenía: 2-mercaptoetanol 5 mM, EDTA 1 mM, KCl 20 mM y glicerol 20 %, y congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**SOLUBILIZACIÓN DE LA DNA POLIMERASA MITOCONDRIAL.** Las mitocondrias purificadas fueron resuspendidas en KCl 200 mM que contenía Tritón-X 100 0,5 % (v/v).

La suspensión mitocondrial fue sonicada 6 veces a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 segundos con intervalos de 45 segundos en un desintegrador ultrasónico Braunsonic modelo 1510 con un vástago de titanio de 9,5 mm de diámetro aplicando una potencia de 50 Watts. La suspensión sonicada fue centrifugada durante 10 minutos, a  $10.000 \times g$ . Al líquido sobrenadante se agregó glicerol hasta concentración final 20 % (v/v), y se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

SEPARACIÓN DE LAS DNA POLIMERASAS SOLUBILIZADAS DE NUCLEOS POR CENTRIFUGACION EN GRADIENTES CONTINUAS DE SACAROSA. En tubos de 5 ml para el rotor SW 50 de la ultracentrífuga Beckman L3-50, o para el rotor AH 650 de la ultracentrífuga Sorvall OTD 65, se prepararon gradientes continuas entre 5 % y 20 % (p/v) de sacarosa en un Tampón Tris-HCl 20 mM pH 8,0 que contenía: 2-mercaptoetanol 5 mM, EDTA 1 mM, seroalbúmina de bovino 0,5 mg/ml y KCl 200 mM (48).

Sobre cada gradiente se aplicaron 0,2 ml de las correspondientes muestras (I: Núcleos control solubilizados, II: Núcleos Tratados solubilizados, III: Núcleos Control preincubados en presencia de B(a)P 1 mM y NADPH 1 mM antes de ser solubilizados), y se centrifugó a 224.000 x g (49.000 rpm) durante 16 horas a 4° C.

Se colectaron alrededor de 35 fracciones de cada gradiente por introducción de un capilar hasta el fondo del tubo y succión, y las actividades DNA polimerasas fueron determinadas cada 2 tubos. La linealidad de las gradientes fue controlada con un refractómetro a 25° C.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD B(A)P HIDROXILASA. Se midió la actividad B(a)P hidroxilasa determinando los metabolitos hidrosolubles totales producidos in vitro, siguiendo la metodología descrita por De Pierre (49) que utiliza  $(H^3)$ -B(a)P como sustrato.

En un volumen final de 1,0 ml la mezcla de incubación

contenía: Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NADPH 1 mM;  $MgCl_2$  5 mM;  $MnCl_2$  5  $\mu M$ ; EDTA 1 mM;  $(H^3)$ -B(a)P 80  $\mu M$ , (AE 24 Ci/mmol); SAB 30  $\mu g$ , y 25 - 100  $\mu g$  de proteína microsomal o nuclear. Se utilizaron dos tipos de blancos de reacción: a) un sistema en el cual se omitía la preparación enzimática (microsomal o nuclear), b) un sistema que incluía la preparación enzimática (microsomal o nuclear) previamente inactivada por calentamiento a 100° C durante 5 minutos.

La reacción se iniciaba con la adición del sustrato  $(H^3)$ -B(a)P, se incubaba a 37° C durante 30 minutos y se detenía agregando 1 ml de NaOH 0,5 N en etanol 80 %. Se agregaron a cada muestra 3 ml de hexano y se agitaron en Vortex a la máxima velocidad durante 3 minutos, con el objeto de extraer el sustrato no metabolizado de la mezcla de incubación. La extracción con hexano remueve el 99,5 % del sustrato remanente, y no más del 7 - 9 % de los productos totales (49).

Para determinar los productos totales presentes en la fase acuosa, se extrajo 1,0 ml de la fase inferior, se centrifugó durante 5 minutos en una centrífuga Eppendorf para sedimentar las proteínas, y se contó 0,1 ml del sobrenadante en 5 ml de mezcla de centelleo para muestras líquidas (PPO 1 gr, Naftaleno 60 grs, Metanol 100 ml, Dioxano 900 ml) en un contador de centelleo líquido Searle modelo Delta-300 con una eficiencia para tritio de 40 %.

DETERMINACIÓN DE LA SÍNTESIS DE DNA. Se determinó la síntesis de DNA a través de la medición del producto radioactivo formado por la incorporación de  $(H^3)$ -TMP en el DNA nuclear o mitocondrial.

- a) En núcleos enteros: En un volumen final de 0,1 ml la mezcla de incubación contenía: Tris-HCl 25 mM pH 8,5; 2-mercaptoetanol 10 mM; EDTA 1 mM; KCl 40 mM;  $MgCl_2$  10 mM; ATP 3 mM; dATP, dGTP, dCTP 50  $\mu$ M;  $(H^3)$ -TTP 2  $\mu$ M (AE 2000-5000 cpm/pmol); glicerol 20 % y suspensión nuclear (10 - 50  $\mu$ g de proteína).

La reacción se iniciaba con la adición de la suspensión nuclear, se incubaba a 37° C durante diferentes tiempos (0 - 60 minutos) y se detenía agregando 0,2 ml de solución fría (en hielo) de ácido tricloroacético (TCA) 2 % que contenía pirofosfato de sodio al 1 %.

Después de mantener las muestras 10 minutos en hielo, el precipitado se recogía sobre filtros de nitrocelulosa (Millipore o Sartorius; 0,45  $\mu$ m) y se lavaba con TCA 2% frío.

Los filtros secos se colocaban en 3 ml de mezcla de centelleo (PPO 4 %, POPOP 0,01 % en tolueno) y la radioactividad se determinaba en un contador de centelleo líquido Searle, modelo Delta-300.

- b) En mitocondrias enteras: La mezcla de incubación

contenía: Tris-HCl 50 mM pH 8,0; DTT 2 mM; dATP, dGTP, dCTP 50  $\mu$ M; KCl 80 mM; MnCl<sub>2</sub> 2 mM; ATP 1 mM; (H<sup>3</sup>)-TTP 2  $\mu$ Ci (AE 2000 - 5000 cpm/pmol); TTP 2  $\mu$ M, SAB 100  $\mu$ g y suspensión mitocondrial (20 - 100  $\mu$ g proteína), en 0,1 ml de volumen total.

En algunos experimentos, se omitió (H<sup>3</sup>)-TTP de la mezcla de incubación, y fué reemplazado por (H<sup>3</sup>)-Timidina (100  $\mu$ Ci) como precursor radiactivo del DNA, según la técnica descrita por Zimmerman y colaboradores (50).

La reacción se iniciaba con la adición de la suspensión mitocondrial. Las condiciones para la incubación y la determinación de la radioactividad fueron las mismas descritas para núcleos enteros.

**DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DNA POLIMERASAS.** Las actividades DNA polimerasas fueron determinadas por la medición de la cantidad de nucleótido marcado ((H<sup>3</sup>)-TMP) incorporado en un DNA activado (de timo de ternera) o en un polinucleótido sintético de doble hebra (poliA-oligo dT<sub>12</sub>).

- a) DNA polimerasa  $\alpha$  : En un volumen final de 0,05 ml, la mezcla de incubación contenía: Tris-HCl 50 mM pH 8,0; DTT 2 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; dATP, dGTP, dCTP 50  $\mu$ M; (H<sup>3</sup>)-TTP 1  $\mu$ M (AE 2000 - 5000 cpm/pmol); SAB 10  $\mu$ g; DNA activado (de timo de ternera) 4  $\mu$ g, y enzima solubilizada de núcleos (2 - 20  $\mu$ g de proteína). Este ensayo enzimático

si bien es óptimo para la DNA polimerasa  $\alpha$  también es positivo para  $\beta$  y  $\gamma$ .

b) DNA polimerasa  $\beta$  : La mezcla de incubación de 0,05 ml estaba compuesta por: Tris-HCl 50 mM pH 8,5;  $MgCl_2$  8 mM; KCl 100 mM; DTT 1 mM; dATP, dGTP, dCTP 50  $\mu$ M;  $(H^3)$ -TTP 2  $\mu$ M (AE 2000 - 5000 cpm/pmol); DNA activado (timo de ternera) 4  $\mu$ g; SAB 10  $\mu$ g y enzima solubilizada de núcleos (2 - 20  $\mu$ g proteína) y preincubada durante 30 minutos a 0° C en presencia de NEM 5 mM. Las condiciones para la incubación y la determinación de la radioactividad de a) y b) fueron las mismas descritas para la síntesis de DNA en núcleos enteros.

c) DNA polimerasa  $\gamma$  : Se utilizó una mezcla de incubación descrita por Knopf y col.(51) compuesta por: Tris-HCl 25 mM pH 8,3;  $KH_2PO_4$  50 mM pH 8,3;  $MnCl_2$  0,5 mM; KCl 100 mM; DTT 2 mM;  $(H^3)$ -TTP 2  $\mu$ M (AE 2000 - 5000 cpm/pmol); PoliA-oligo dT<sub>12</sub> 20  $\mu$ g/ml; SAB 10  $\mu$ g, y enzima solubilizada de mitocondrias (2 - 20  $\mu$ g de proteína), en un volumen final de 0,05 ml.

La reacción se inició con la adición de la enzima y se incubó a 30° C durante diferentes tiempos (0 - 60 minutos). Se detuvo la reacción agregando 0,1 ml de TCA 10% que contenía pirofosfato de sodio al 1 %.

Las muestras fueron centrifugadas 5 minutos en una

centrífuga Eppendorf. El precipitado fue disuelto en 0,4 ml de NaOH 0,2 N y reprecipitado con 0,4 ml de TCA 10 % frío. El precipitado final fue recogido en filtros de nitrocelulosa y lavado con TCA 2 % frío.

La radioactividad fue determinada en la forma antes descrita para la síntesis de DNA en núcleos enteros.

**ACTIVACIÓN DEL DNA NATIVO.** El DNA nativo de timo de ternera fue activado según la metódica de Aposhian y Kornberg, que utiliza desoxiribonucleasa pancreática I, para obtener regiones de simple hebra en el DNA (52).

**PREPARACIÓN DE POLIA-OLIGO DT<sub>12</sub>.** Una solución que contenía 2 OD<sub>260</sub>/ml de polinucleótido (matriz) y 0,4 OD<sub>260</sub>/ml de oligonucleótido (iniciador) en Tris-HCl 10 mM pH 7,5 fue calentada durante 15 minutos a 65 - 70° C para producir la asociación entre la matriz y el iniciador, y luego se dejó enfriar lentamente hasta temperatura ambiente.

**DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.** Las proteínas fueron determinadas por el método de Lowry, utilizando seroalbúmina de bovino como standard. (53).

**DETERMINACIÓN DE DNA.** Se determinó el contenido de DNA de núcleos y mitocondrias por el método de la difenilamina (54).

### III.- RESULTADOS

#### EFFECTOS IN VIVO DE B(A)P SOBRE LOS NÚCLEOS DE HÍGADO DE RATAS.

En la figura 1 se observan las preparaciones de núcleos de hígado de rata, que fueron fotografiadas en un microscopio de contraste de fase.

Los núcleos de hígado de animales controles (A) presentan una estructura normal, con nucleolos refringentes y cromatina bien distribuída, en cambio en los núcleos de hígado de ratas tratadas con B(a)P (B) no se aprecian estructuras definidas, y se observan numerosos gránulos densos que podrían corresponder a acumulaciones de cromatina sobre un fondo homogéneo y muy oscuro.

En lo que se refiere al tamaño, no se observaron diferencias apreciables entre ambas preparaciones nucleares.

ACTIVIDAD ARIL HIDROCARBURO (B(A)P) HIDROXILASA. Los resultados de la Tabla I muestran que en núcleos purificados de hígado de ratas existen niveles significativos de la actividad AHH, aunque menores en relación a los niveles de esta actividad observados en la fracción microsomal. El tratamiento de los animales con B(a)P produce un aumento de la actividad AHH, siendo el grado de este aumento mucho mayor en la fracción nuclear que en la fracción microsomal de hígado.



Figura 1. PREPARACIONES NUCLEARES DE HÍGADO DE RATAS. Fotografías en contraste de fase (800 aumentos) hechas en un microscopio Zeiss modelo 01.

A: preparación nuclear de hígado de ratas controles.

B: preparación nuclear de hígado de ratas tratadas con B(a)P

Estas fotografías fueron hechas en el Depto. de Biología de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Laboratorio Dra. Silvia Leiva).

Tabla I

Actividad aril hidrocarburo hidroxilasa (AHH), de núcleos y microsomas de hígado de ratas controles y tratadas con B(a)P.

	pmoles de benzo(a)pireno metabolizado x hora <sup>-1</sup> x mg de proteína <sup>-1</sup>	
	Controles	Tratados
Núcleos	345 ± 23 (5)	3248 ± 122 (5)
Microsomas	6793 ± 374 (7)	27346 ± 4200 (7)

El tratamiento de los animales y las preparaciones de núcleos purificados y de microsomas se realizaron como se describió en Materiales y Métodos.

Para la determinación de la actividad AHH se siguió la metodología de De Pierre (49) descrita en Materiales y Métodos, utilizando una concentración final de 40 µg de proteína microsomal, o 100 µg de proteína nuclear en el medio de incubación. Entre paréntesis se indica el número de grupos de animales (3 a 4 animales por grupo) utilizados para estas determinaciones.

## EFFECTOS IN VIVO DE B(a)P SOBRE LA SÍNTESIS DE DNA NUCLEAR.

Como se observa en las figuras 2 y 3, el nivel de la síntesis de DNA está disminuido en los núcleos de los animales tratados con B(a)P en relación al nivel observado en los núcleos de los animales controles, ya sea cuando la síntesis de DNA (incorporación de  $(H^3)$ -TMP en el DNA nuclear) se expresa como función del tiempo de incubación (Fig. 2), o como función de la concentración de proteína nuclear (Fig. 3). Cuando se ensayó la actividad DNA polimerasa solubilizada de los núcleos de animales controles y tratados con B(a)P, se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 4. La actividad solubilizada de los núcleos tratados es mucho menor que la de los núcleos controles. La actividad DNA polimerasa fue expresada como pmoles de  $(H^3)$ -TMP incorporados en el DNA nuclear, resultados similares se obtuvieron al expresar la síntesis del DNA y la actividad DNA polimerasa solubilizada de núcleos en función del contenido de DNA nuclear, ya que no se observaron diferencias significativas entre los animales controles y tratados en la cantidad de DNA nuclear por mg de proteína nuclear.

Con el objeto de estudiar si la actividad AHH nuclear estaba relacionada con la disminución de la capacidad de síntesis de DNA observada en los núcleos de los animales tratados con B(a)P, se incubó en condiciones óptimas para la síntesis de DNA, los núcleos de los animales controles y tratados, en presencia y ausencia de NADPH, cofactor indispensable para la

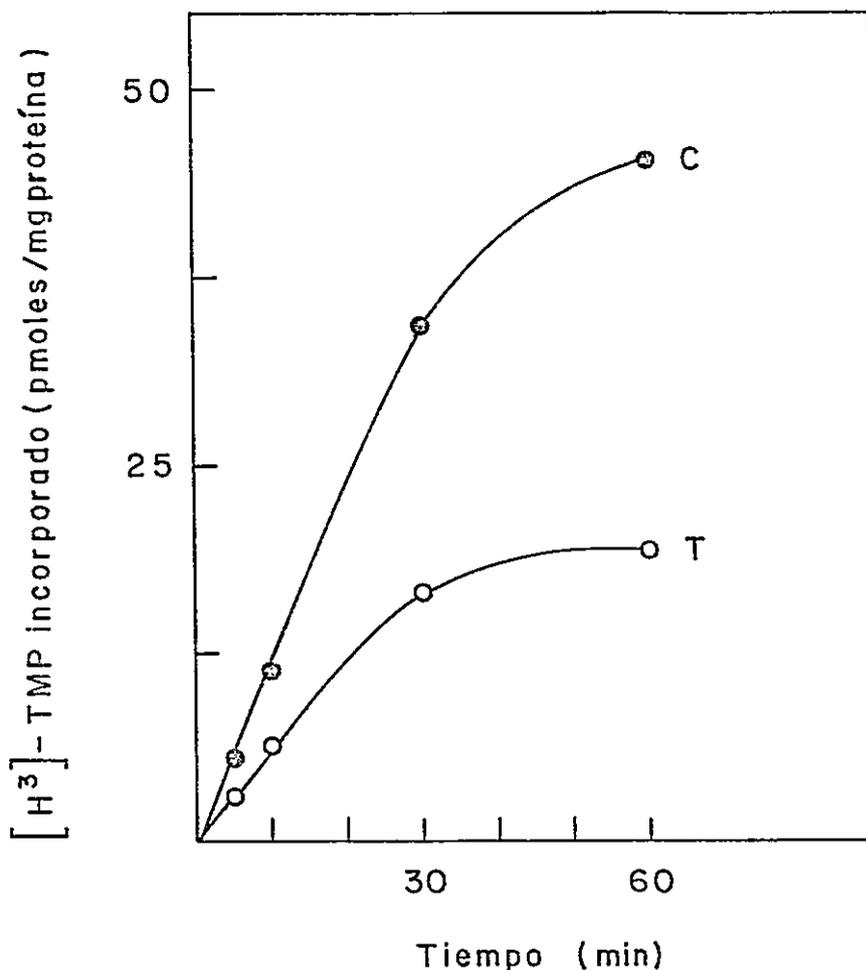


Figura 2. SÍNTESIS DE DNA NUCLEAR Cinética de incorporación de  $(H^3)$ -TMP en núcleos purificados de hígado de ratas controles (C) y tratadas con B(a)P (T). Se determinó la cantidad de DNA nuclear por el método de la difenilamina (54) obteniéndose los siguientes resultados:  
 Núcleos C : 0.48 mg de DNA/mg de proteína  
 Núcleos T : 0.51 mg de DNA/mg de proteína  
 Las condiciones para la determinación de la síntesis de DNA fueron descritas en Materiales y Métodos, 1 pmoI de  $(H^3)$ -TMP incorporado corresponde a 2000 cpm. Se obtuvieron tiempos ce-  
 rros de 280-300 cpm, que se restaron de los valores obtenidos para los diferentes tiempos de incubación.

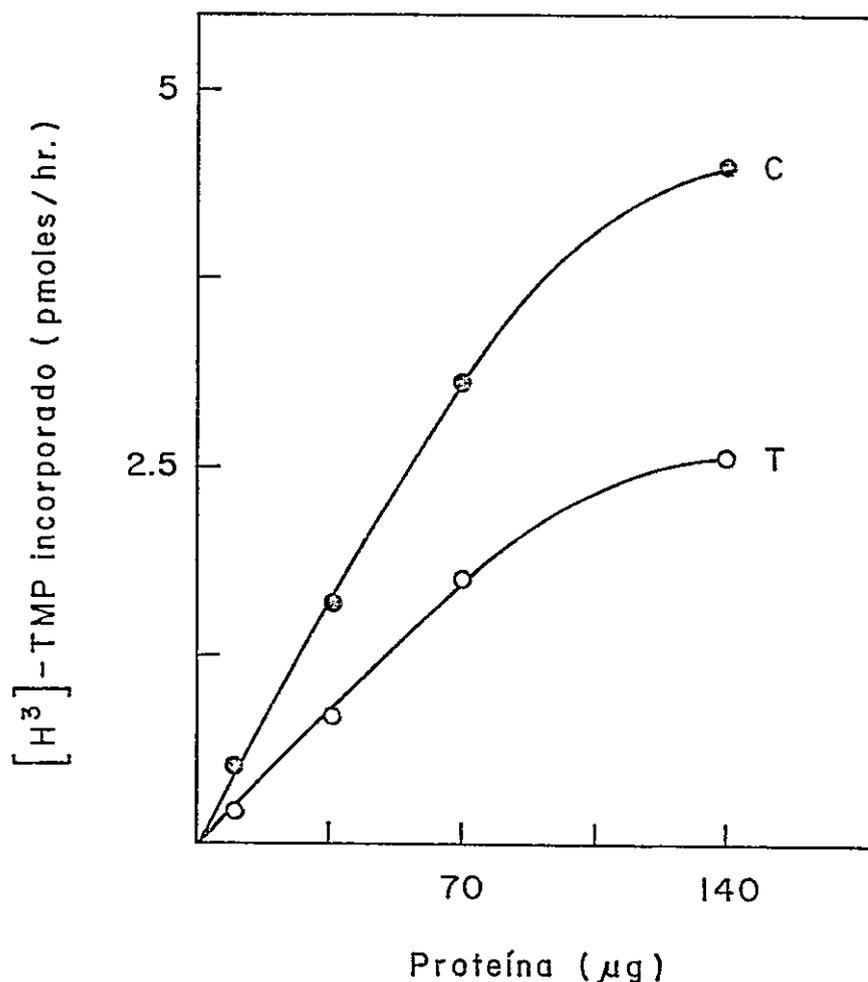


Figura 3. SÍNTESIS DE DNA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PROTEÍNA NUCLEAR. C: Núcleos purificados de hígado de ratas controles.

T: Núcleos purificados de hígado de ratas tratadas con B(a)P.

Las incubaciones se realizaron a 37° C durante 1 hora según se describe en Materiales y Métodos.

(1 pmol de (<sup>3</sup>H)-TMP incorporado = 2000 cpm).

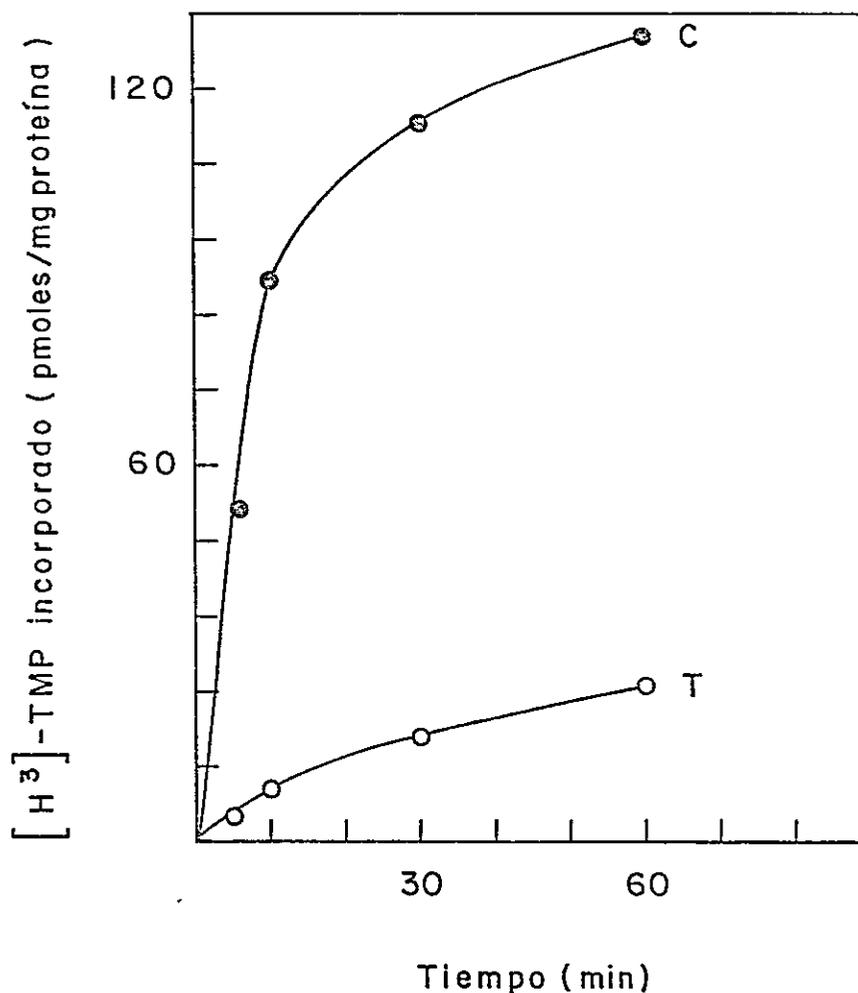


Figura 4. ACTIVIDAD DNA POLIMERASA SOLUBILIZADA DE NÚCLEOS. Cinética de incorporación de ( $H^3$ )-TMP en DNA activado de timo de ternera.

C : actividad DNA polimerasa solubilizada de núcleos de hígado de ratas controles.

T : actividad DNA polimerasa solubilizada de núcleos de hígado de ratas tratadas con B(a)P.

Se utilizaron las condiciones de incubación descritas en Materiales y Métodos para la determinación de la actividad DNA polimerasa  $\alpha$ .

actividad AHH.

Como se observa en la figura 5, la síntesis de DNA en los núcleos controles no es afectada por NADPH, mientras que en los núcleos tratados disminuye aun más la incorporación de  $(H^3)$ -TMP en el DNA en presencia de NADPH, lo cual sugiere que la actividad AHH nuclear presente en los núcleos purificados está involucrada en la inhibición de la síntesis de DNA producida por el tratamiento con el cancerígeno.

#### EFFECTOS IN VITRO DE B(A)P SOBRE LA SÍNTESIS DE DNA NUCLEAR.

El efecto in vitro de B(a)P sobre la síntesis de DNA se estudió en los núcleos de animales controles en presencia y ausencia de NADPH. Como se aprecia en la figura 6, el cancerígeno per se disminuye solamente en un 20 % la incorporación de  $(H^3)$ -TMP en el DNA nuclear, sin embargo en presencia de NADPH se observa un 60 % de inhibición de la síntesis de DNA nuclear.

Resultados similares se observaron en otro tipo de experimento que se muestra en la figura 7 donde se estudió la síntesis de DNA en los núcleos controles como función del tiempo de preincubación de los núcleos con B(a)P en presencia y ausencia de NADPH. La presencia simultánea de B(a)P y NADPH produjo los niveles más bajos de síntesis de DNA.

#### CARACTERIZACIÓN DE LAS DNA POLIMERASAS INHIBIDAS POR B(A)P.

Las actividades DNA polimerasas de núcleos controles y tratados

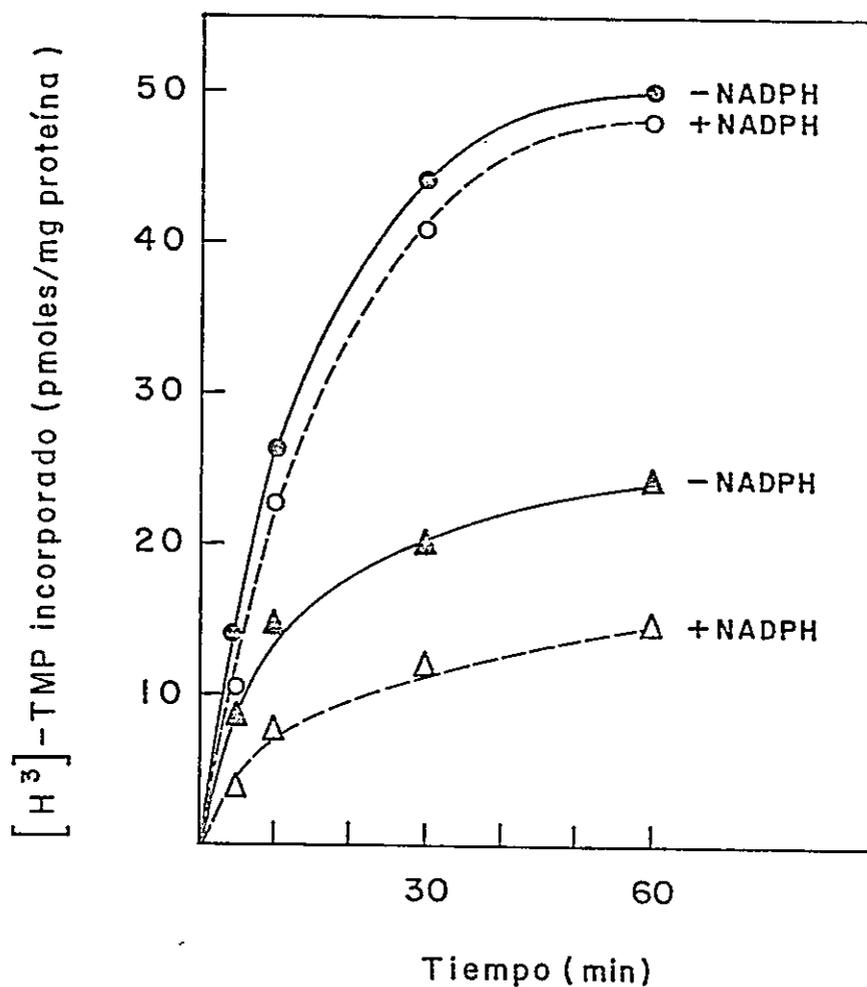


Figura 5. SÍNTESIS DE DNA EN NÚCLEOS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE NADPH. Cinética de incorporación de ( $H^3$ )-TMP en núcleos purificados de hígado de ratas controles incubados en ausencia de NADPH (●) y en presencia de NADPH (○), y en núcleos purificados de hígado de ratas tratadas con B(a)P incubados en ausencia de NADPH (▲) y en presencia de NADPH (△). La concentración final de NADPH fue 1 mM.

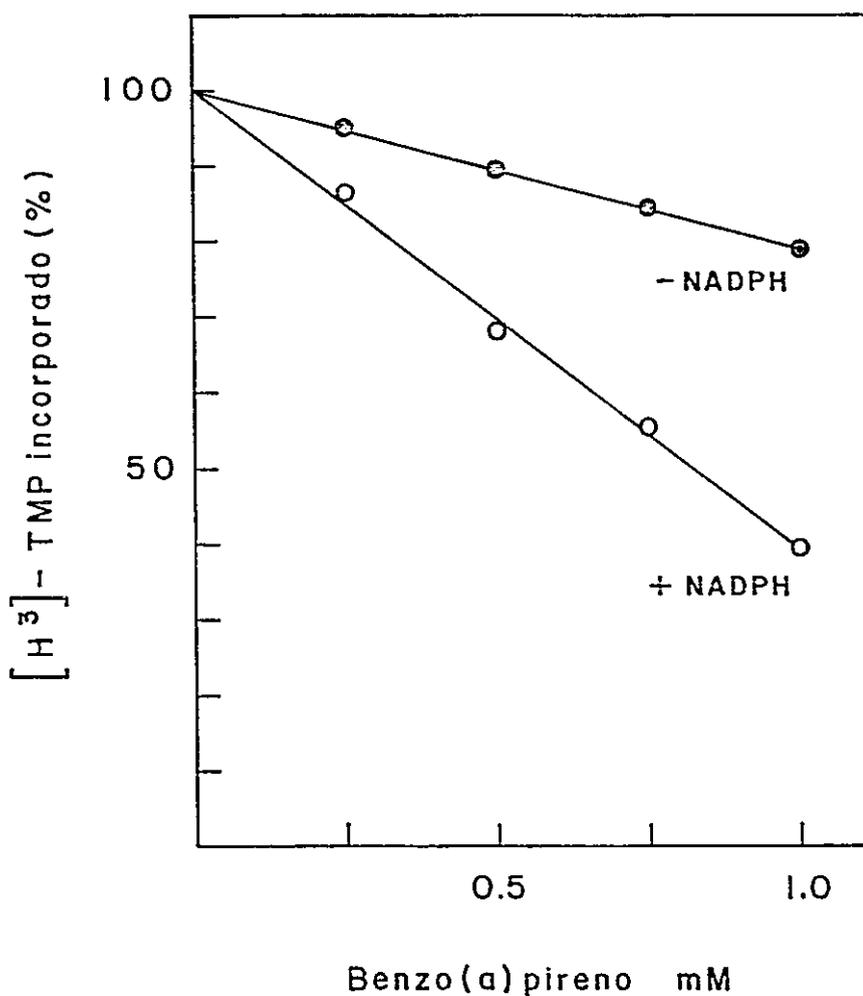


Figura 6. EFECTOS IN VITRO DE B(A)P SOBRE LA SINTESIS DE DNA NUCLEAR.

(●) Núcleos controles incubados en ausencia de NADPH.

(○) Núcleos controles incubados en presencia de NADPH 1 mM.

Las incubaciones se realizaron a 37° C durante 1 hora, como se describe en Materiales y Métodos para la síntesis de DNA en núcleos.

(100 % de actividad : 12000 cpm)

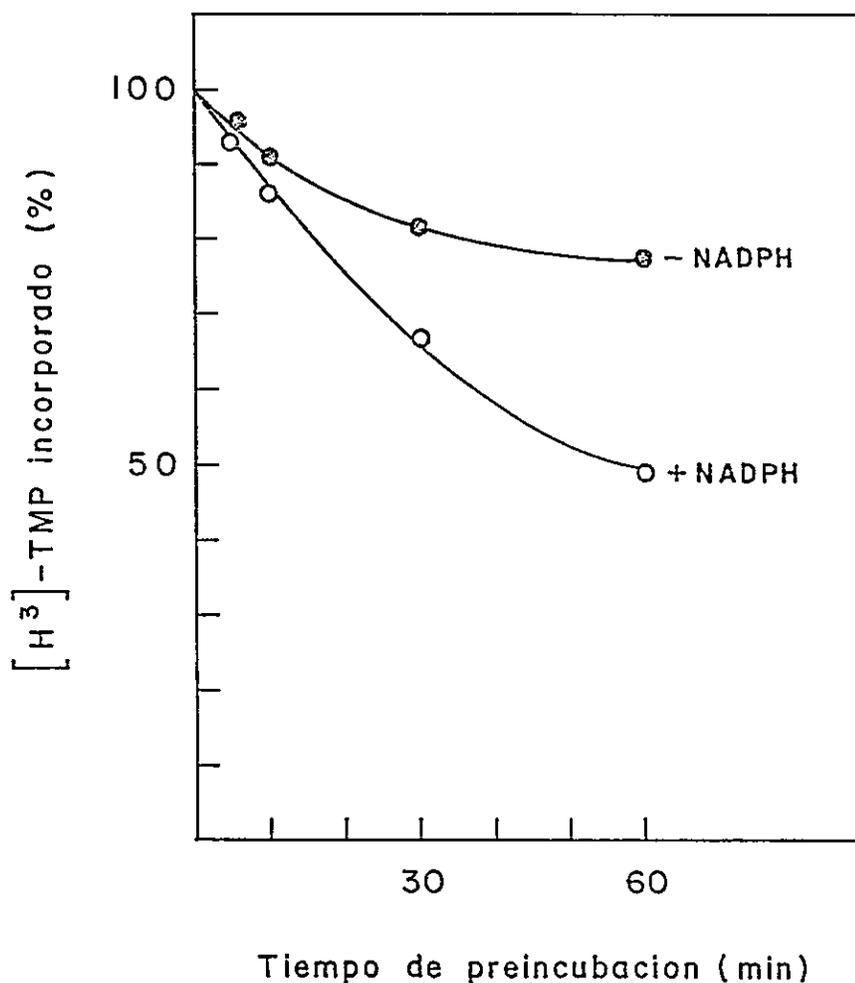


Figura 7. EFECTOS DE LA PREINCUBACIÓN CON B(A)P SOBRE LA SÍNTESIS DE DNA NUCLEAR. Los núcleos controles fueron preincubados a 37° C durante los tiempos indicados, en presencia de: (●) B(a)P 1 mM

(○) B(a)P 1 mM y NADPH 1 mM

La determinación de la síntesis de DNA se realizó como se describe en Materiales y Métodos (1 hora de incubación a 37° C). (100 % de actividad = 10500 cpm)

con B(a)P se solubilizaron como se describió en Materiales y Métodos y se separaron por centrifugación en gradientes de sacarosa 5 % al 20 %.

Las actividades enzimáticas se determinaron en las gradientes usando 2 tipos de ensayo, uno que es óptimo pero no específico para la DNA polimerasa  $\alpha$ , y otro en presencia de N-etilmaleimida 10 mM que es específico para la DNA polimerasa  $\beta$ . Ambos tipos de ensayo se describieron en Materiales y Métodos.

Como se puede observar en la figura 8 la DNA polimerasa  $\alpha$  es mucho más afectada por el tratamiento in vivo (8 C) e in vitro (8 B) con el cancerígeno que la DNA polimerasa  $\beta$ .

Aunque la DNA polimerasa  $\gamma$  está presente cuando se ensayan los núcleos enteros, su actividad parece ser mas inestable que la de las otras dos polimerasas, ya que no pudimos detectar esta actividad en las gradientes.

Otro de los criterios que utilizamos para determinar cual de las DNA polimerasas resultaba mas afectada por el tratamiento in vivo con B(a)P, fue el uso de inhibidores específicos para las diferentes DNA polimerasas. Como se indica en la Tabla II, afidicolina un inhibidor específico para la DNA polimerasa  $\alpha$ , inhibió mas fuertemente la síntesis de DNA en los núcleos de los animales controles, lo que sugiere que los niveles de esta enzima son menores en los núcleos de los animales tratados con B(a)P. Un efecto similar se obtuvo con Bromuro de etidio, inhibidor de la DNA polimerasa  $\gamma$ .

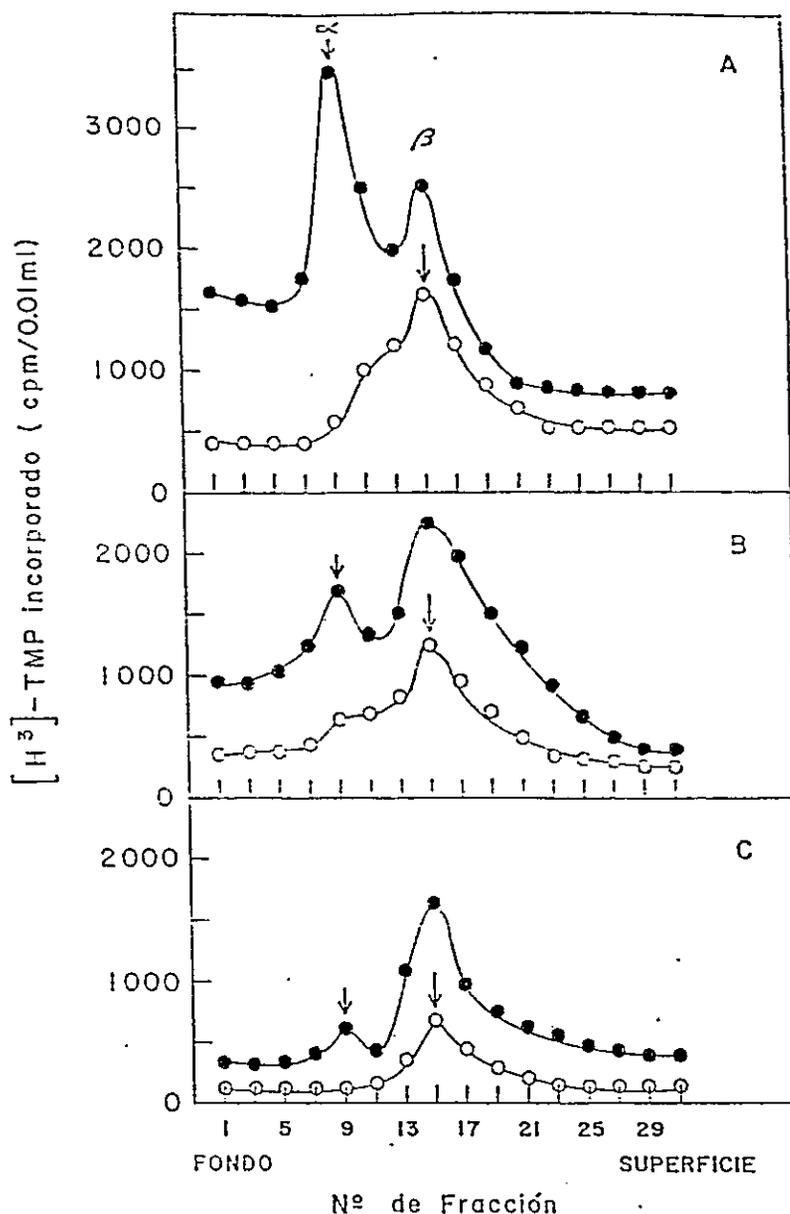


Figura 8. ACTIVIDADES DNA POLIMERASAS SOLUBILIZADAS DE NÚCLEOS Y SEPARADAS POR CENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE SACAROSA.  
 A : actividades solubilizadas de núcleos de hígado de ratas controles.  
 B : actividades solubilizadas de núcleos controles que fueron incubados con B(a)P 1 mM y NADPH 1 mM durante 1 hora a 37° C antes de solubilizar las polimerasas.  
 C : actividades solubilizadas de núcleos de hígado de ratas tratadas con B(a)P.  
 (●) ensayo para DNA polimerasa  $\alpha$   
 (○) ensayo específico para DNA polimerasa  $\beta$   
 Las condiciones para determinar las actividades  $\alpha$  y  $\beta$  fueron descritas en Materiales y Métodos.

Tabla II

Efecto de inhibidores sobre las actividades DNA polimerasas solubilizadas de núcleos de hígado de ratas controles y tratadas con B(a)P

Inhibidor	DNA polimerasa inhibida	cpm control	% inhibición	cpm tratadas	% inhibición
-	-	13860	0	7607	0
Afidicolina	$\alpha$	6735	54	5784	24
-	-	14120	0	8066	0
Bromuro de etidio	$\gamma$	8742	40	7168	11
-	-	13634	0	7660	0
N-etil maleimida	$\alpha, \gamma$	5998	66	6205	19
-	-	14000	0	8000	0
ddTTP	$\gamma, \beta$	4480	68	7440	7

Se utilizaron las siguientes concentraciones finales de inhibidores: Afidicolina 6  $\mu\text{g/ml}$ ; Bromuro de etidio 10  $\mu\text{M}$ ; N-etil maleimida 10 mM; ddTTP 20  $\mu\text{M}$  (ddTTP/TTP = 2)

Cuando se utilizó afidicolina la concentración final de dCTP fue disminuida a 10  $\mu\text{M}$ . Afidicolina fue disuelta en dimetil sulfóxido y este solvente no tuvo efecto sobre las actividades enzimáticas.

Cuando se utilizó N-etil maleimida se preincubaron las preparaciones enzimáticas durante 10 minutos a 4° C en presencia de dicho inhibidor.

Las incubaciones se realizaron a 37° C durante 1 hora como se describe en Materiales y Métodos para el ensayo  $\alpha$ .

Los núcleos de los animales tratados mostraron una alta resistencia a N-etilmaleimida lo cual indicaría la presencia mayoritaria de la DNA polimerasa  $\beta$  en estos núcleos ya que esta enzima es altamente resistente a este compuesto.

La dideoxitimidina trifosfato (ddTTP) produjo una gran inhibición de la síntesis de DNA en los núcleos de los animales controles. Este análogo es un potente inhibidor de las DNA polimerasa  $\beta$  y  $\gamma$ .

#### EFFECTOS IN VIVO DE B(A)P SOBRE LA SÍNTESIS DE DNA MITOCONDRIAL.

La síntesis de DNA mitocondrial fue determinada en las mitocondrias purificadas de hígado de animales controles y tratados con B(a)P. Como puede observarse en la figura 9 (diferentes tiempos de incubación) y en la figura 10 (diferentes concentraciones de proteína mitocondrial), el nivel de la síntesis de DNA es mucho mayor en las mitocondrias de los animales controles que en las mitocondrias de los animales tratados con B(a)P. Se obtuvieron los mismos resultados utilizando como precursor ( $H^3$ )-TTP o ( $H^3$ )-Timidina.

Como en la mitocondria existe sólo una forma predominante de polimerasa la DNA polimerasa  $\gamma$ , estudiamos el efecto de ddTTP, inhibidor específico de esta polimerasa, sobre la síntesis de DNA en mitocondrias controles y tratadas con B(a)P. Los resultados se muestran en la figura 11, donde se puede apreciar que ddTTP produjo una gran inhibición de la síntesis de DNA en las mitocondrias de los animales controles, mientras

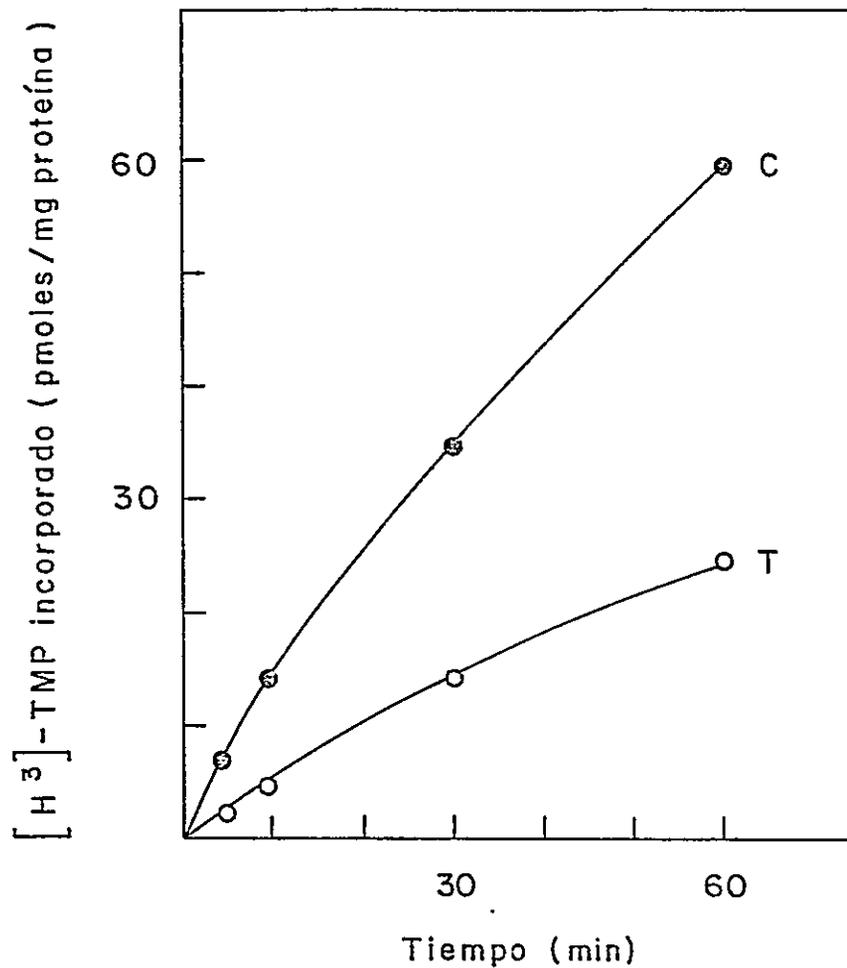


Figura 9. SÍNTESIS DE DNA EN MITOCONDRIAS. Cinética de incorporación de  $(H^3)$ -TMP en mitocondrias purificadas de hígado de ratas controles (C) y tratadas con B(a)P (T). El tratamiento de los animales con B(a)P no afectó la cantidad de DNA mitocondrial, así los pmoles de TMP incorporados por mg de proteína o por mg de DNA son equivalentes. 1 pmoles de  $(H^3)$ -TMP incorporado corresponde a 1800 cpm. Se obtuvieron tiempos ceros de 230 - 250 cpm que se restaron de los valores obtenidos en cada tiempo de incubación.

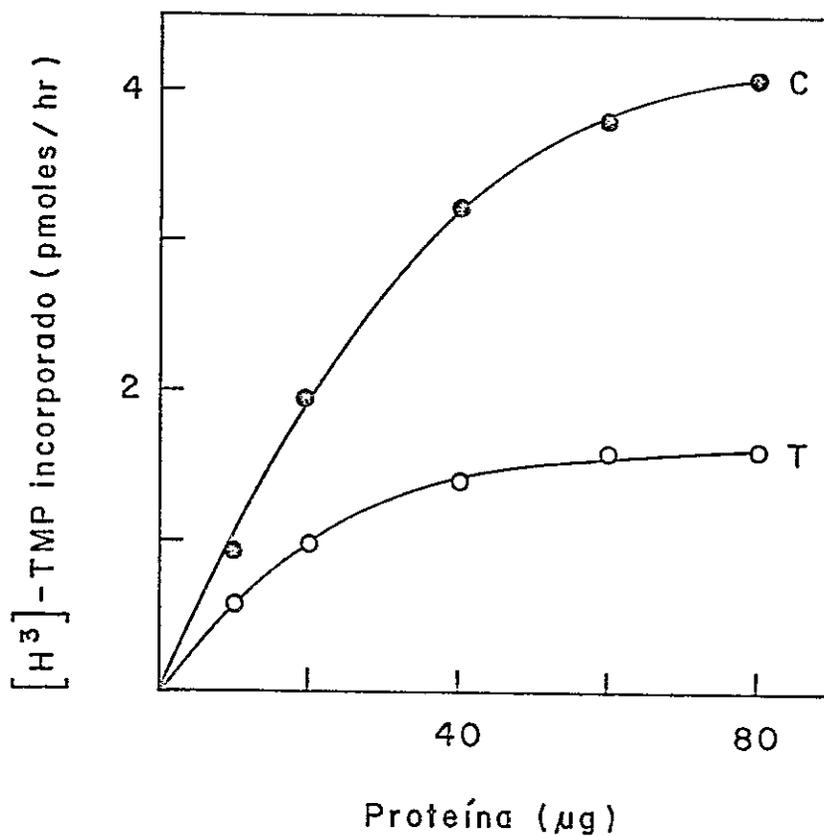


Figura 10. SÍNTESIS DE DNA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL.

C : Mitocondrias purificadas de hígado de ratas controles.

T : Mitocondrias purificadas de hígado de ratas tratadas con B(a)P.

Las condiciones de incubación fueron descritas en Materiales y Métodos.

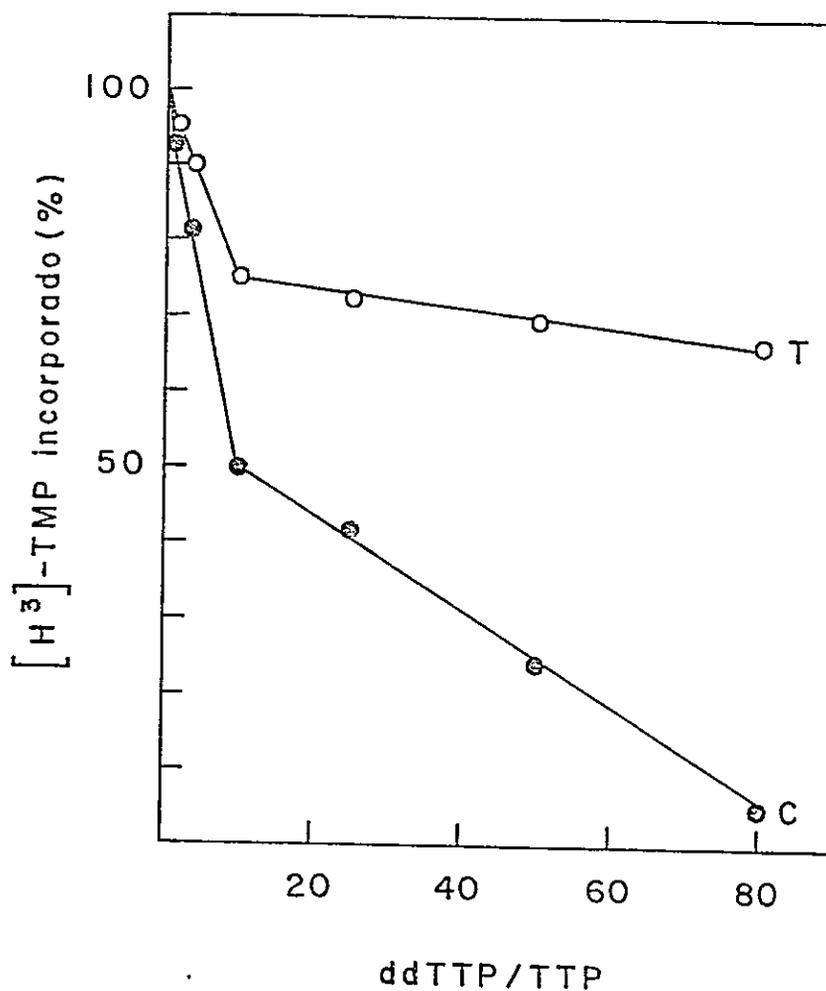


Figura 11. INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE DNA MITOCONDRIAL POR DDTP.

C : Mitochondrias purificadas de hígado de ratas controles  
 T : Mitochondrias purificadas de hígado de ratas tratadas con B(a)P

La incorporación de TMP correspondiente al 100 % de actividad fue de: C : 35 pmoles/30 minutos y T : 6 pmoles/30 minutos.

que esta inhibición fue mucho menor en los animales tratados con B(a)P.

Cuando se ensayó la actividad DNA polimerasa solubilizada de las mitocondrias encontramos que el nivel de la actividad polimerásica solubilizada de las mitocondrias de animales tratados con B(a)P fue mucho mayor que el de las mitocondrias de animales controles como puede apreciarse en la figura 12. Con el objeto de determinar si este aumento de la actividad polimerásica solubilizada de mitocondrias estaba relacionado con el proceso de solubilización descrito en Materiales y Métodos, analizamos la actividad polimerásica del sedimento mitocondrial obtenido después de la solubilización de la DNA polimerasa y encontramos que el sedimento proveniente de las mitocondrias de animales tratados con B(a)P también tenía mayor actividad polimerásica que el sedimento proveniente de las mitocondrias controles (Figura 13).

Para determinar si la mayor actividad polimerásica solubilizada de mitocondrias tratadas con B(a)P, era producida por la presencia de otras DNA polimerasas en las mitocondrias de los animales tratados con B(a)P, se estudió el efecto de diferentes inhibidores sobre las DNA polimerasas solubilizadas de mitocondrias controles y tratadas con B(a)P. Como puede observarse en la Tabla III los grados de inhibición producidos por ddTTP y por Bromuro de etidio son muy similares en ambos tipos de organelos. Afidicolina no tuvo efecto sobre la actividad DNA polimerasa de las mitocondrias controles ni sobre

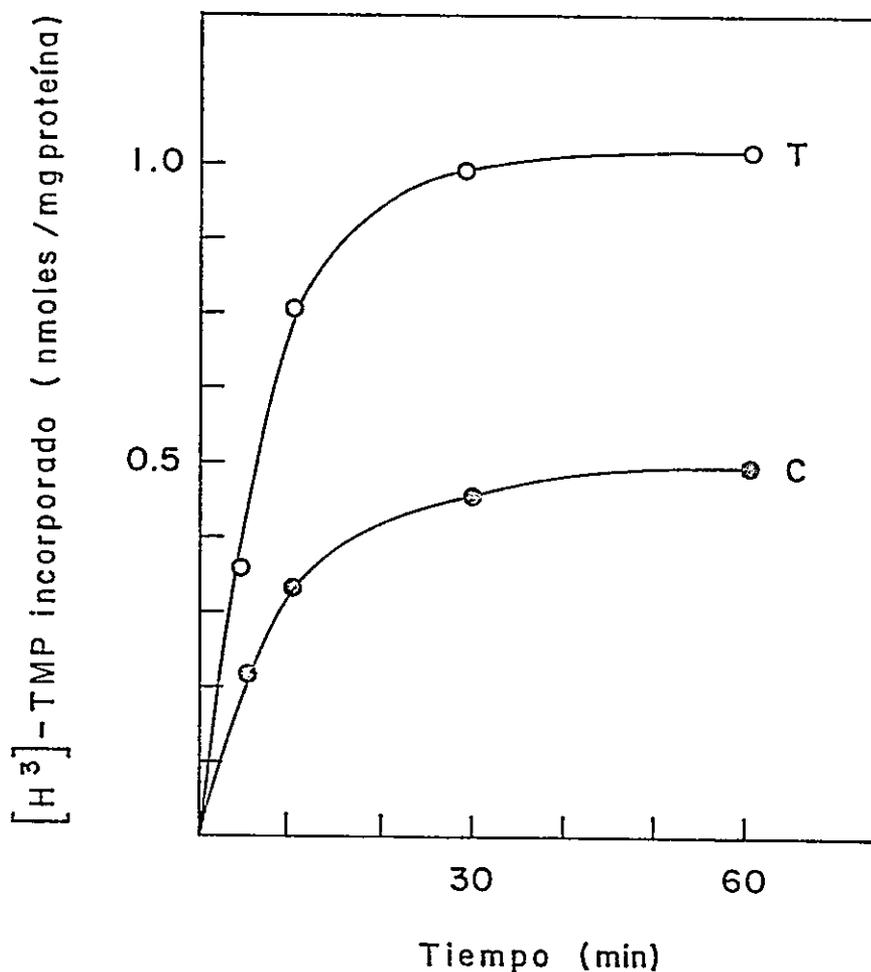


Figura 12. ACTIVIDAD DNA POLIMERASA SOLUBILIZADA DE MITOCONDRIAS.

C : actividad solubilizada de mitocondrias de hígado de ratas controles

T : actividad solubilizada de mitocondrias de hígado de ratas tratadas con B(a)P.

Las condiciones de la incubación a 30° C fueron descritas en Materiales y Métodos para la determinación de la actividad DNA polimerasa y utilizando poli A-oligo dT<sub>12</sub> como templado.

1 pmol de (H<sup>3</sup>)-TMP incorporado corresponde a 1800 cpm. Se obtuvieron tiempos ceros de 230 cpm, que se restaron de todos los valores obtenidos a los diferentes tiempos de incubación.

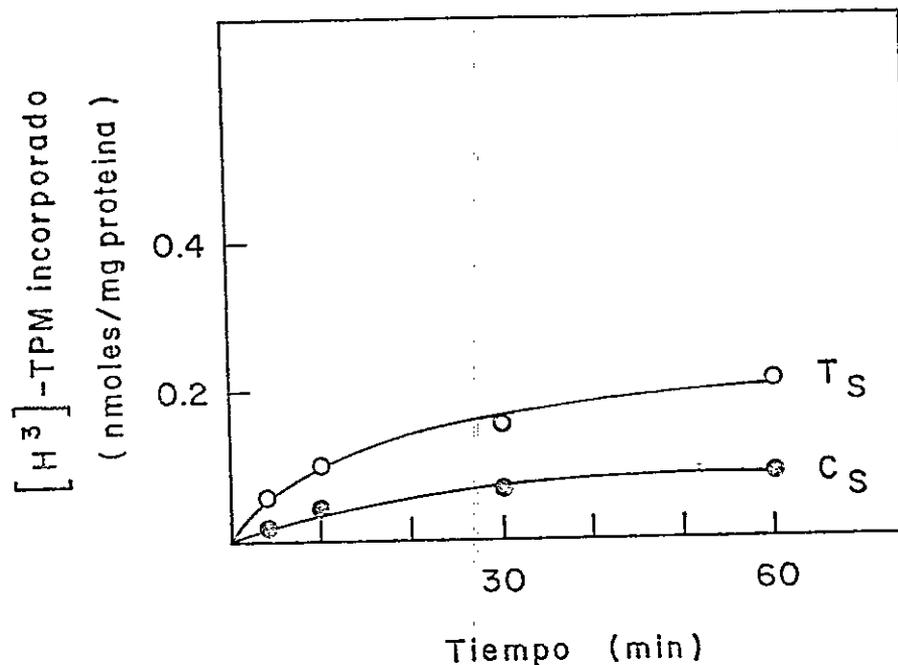


Figura 13. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SEDIMENTO MITOCONDRIAL OBTENIDO DESPUÉS DE SOLUBILIZAR LA DNA POLIMERASA.  
 $C_S$  : Sedimento obtenido al solubilizar la DNA polimerasa de mitocondrias de hígado de ratas controles.  
 $T_S$  : Sedimento obtenido al solubilizar la DNA polimerasa de mitocondrias de hígado de ratas tratadas con B(a)P  
Se ensayó la actividad enzimática utilizando las condiciones descritas en Materiales y Métodos para la DNA polimerasa y

Tabla III

Efecto de inhibidores sobre la actividad DNA polimerasa solubilizada de mitocondrias de hígado de ratas controles y tratadas con B(a)P

Inhibidor	Concentración uM	Relación ddTTP/TTP	% de Inhibición de la actividad DNA polimerasa	
			Control	Tratada
-	-	-	0	0
ddTTP	4	0.4	16	38
ddTTP	10	1	44	60
ddTTP	20	2	78	67
ddTTP	40	4	80	73
Afidicolina	2	-	4	12
Afidicolina	4	-	0	8
Bromuro de etidio	4	-	65	80
Bromuro de etidio	10	-	82	82

Los métodos para el tratamiento de los animales, purificación de las mitocondrias y solubilización y determinación de la actividad DNA polimerasa  $\gamma$  mitocondrial fueron descritos en Materiales y Métodos.

Cuando se utilizó afidicolina la concentración final de dCTP fue disminuida a 10  $\mu\text{M}$ .

La incorporación de  $(\text{H}^3)$ -TMP en ausencia de inhibidores (0 % inhibición) fue 25 pmoles/30 minutos con la enzima solubilizada de mitocondrias normales y 38 pmoles/30 minutos para la polimerasa solubilizada de mitocondrias de animales tratados.

las mitocondrias tratadas con B(a)P, lo cual indica que la actividad DNA polimerasa solubilizada de organelos de animales controles y de animales tratados con B(a)P no corresponde a la DNA polimerasa  $\alpha$ .

Además del efecto de los inhibidores mostrado en la Tabla III, estudiamos otras propiedades de las DNA polimerasas solubilizadas de ambos tipos de organelo.

En la figura 14 se observa que para ambas polimerasas la concentración óptima de manganeso es la misma, y en la figura 15 observamos que ambas polimerasas responden en forma similar al efecto estimulador de KCl. Estos experimentos se realizaron usando PoliA-oligodT<sub>12</sub> como templado ya que ambas polimerasas reconocieron preferencialmente esta matriz.

**EFFECTOS DE B(A)P IN VITRO SOBRE LA SÍNTESIS DE DNA MITOCONDRIAL.** Para determinar si la actividad capaz de activar cancerígenos in vitro descrita en las mitocondrias (31), estaba relacionada con el efecto in vivo de B(a)P, se determinó en condiciones óptimas la síntesis de DNA en mitocondrias de animales controles y tratados con B(a)P, en presencia y ausencia de NADPH en el medio de incubación. Como puede observarse en la figura 16, NADPH no tuvo efectos sobre la síntesis de DNA en ninguno de los dos tipos de organelo. El efecto in vitro de B(a)P sobre la síntesis de DNA mitocondrial se determinó en las mitocondrias provenientes de los animales controles. Los resultados de la figura 17 muestran que in vitro el

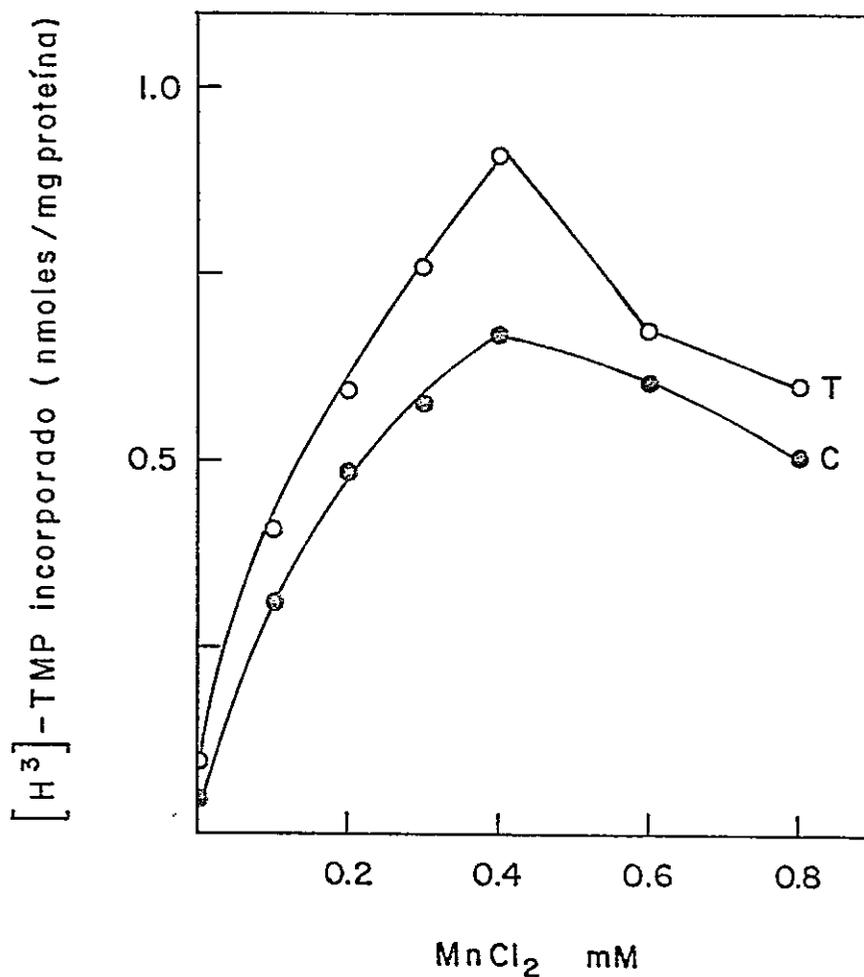


Figura 14. EFECTOS DE MN SOBRE LA ACTIVIDAD DNA POLIMERASA MITOCONDRIAL.

C : actividad solubilizada de mitocondrias de hígado de ratas controles

T : actividad solubilizada de mitocondrias de hígado de ratas tratadas con B(a)P

Se utilizó poliA-oligo dT<sub>12</sub> como templado según se describe en Materiales y Métodos para la determinación de la DNA polimerasa  $\gamma$

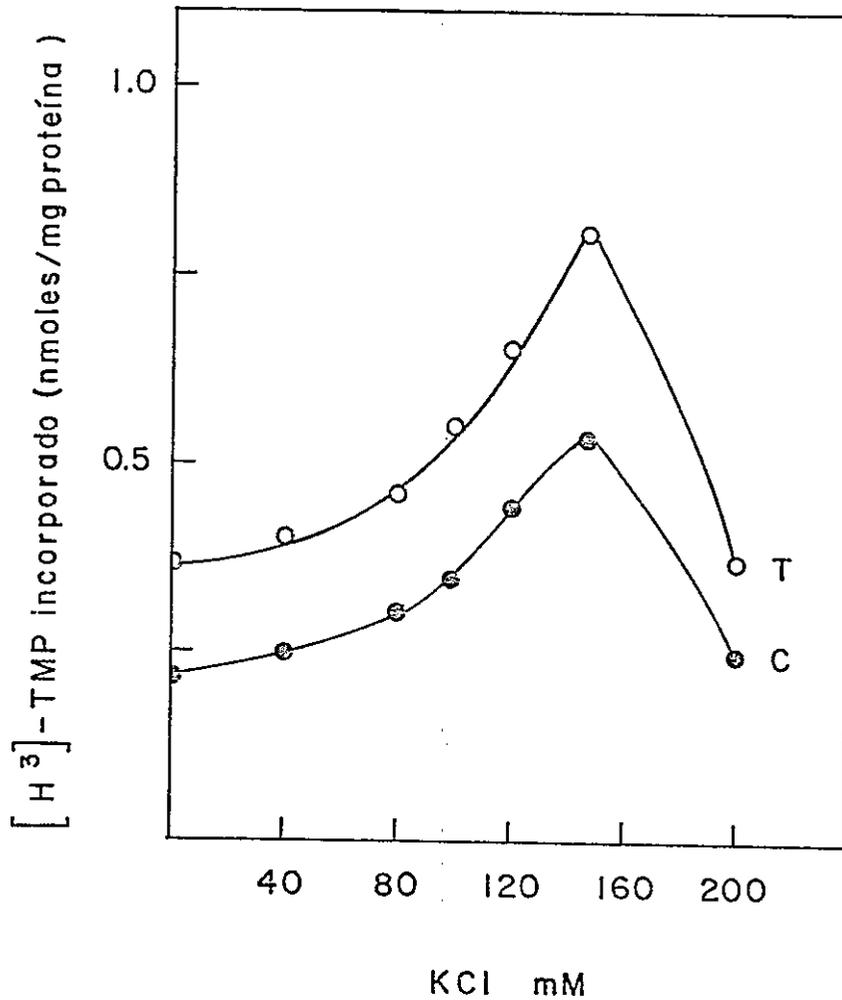


Figura 15. EFECTOS DE KCL SOBRE LA ACTIVIDAD DNA POLIMERASA MITOCONDRIAL.

C : actividad solubilizada de mitocondrias de hígado de ratas controles

T : actividad solubilizada de mitocondrias de hígado de ratas tratadas con B(a)P

Se utilizó poliA-oligo dT<sub>12</sub> como templado según se describe en Materiales y Métodos <sup>12</sup> para la determinación de la DNA polimerasa  $\gamma$

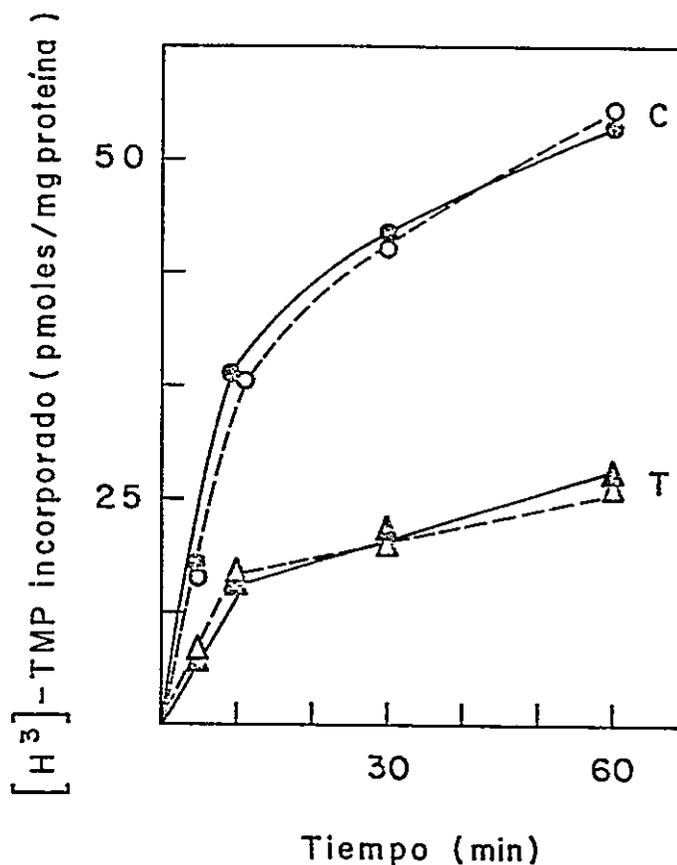


Figura 16. SÍNTESIS DE DNA MITOCONDRIAL EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE NADPH. Cinética de incorporación de  $(H^3)$ -TMP en: (●) Mitocondrias controles incubadas en presencia de NADPH 1 mM (○) Mitocondrias controles incubadas en ausencia de NADPH. (▲) Mitocondrias de hígado de ratas tratadas con B(a)P incubadas en presencia de NADPH 1 mM (△) Mitocondrias de hígado de ratas tratadas incubadas en ausencia de NADPH Las incubaciones se realizaron a 37° C como se describe en Materiales y Métodos para la síntesis del DNA mitocondrial.

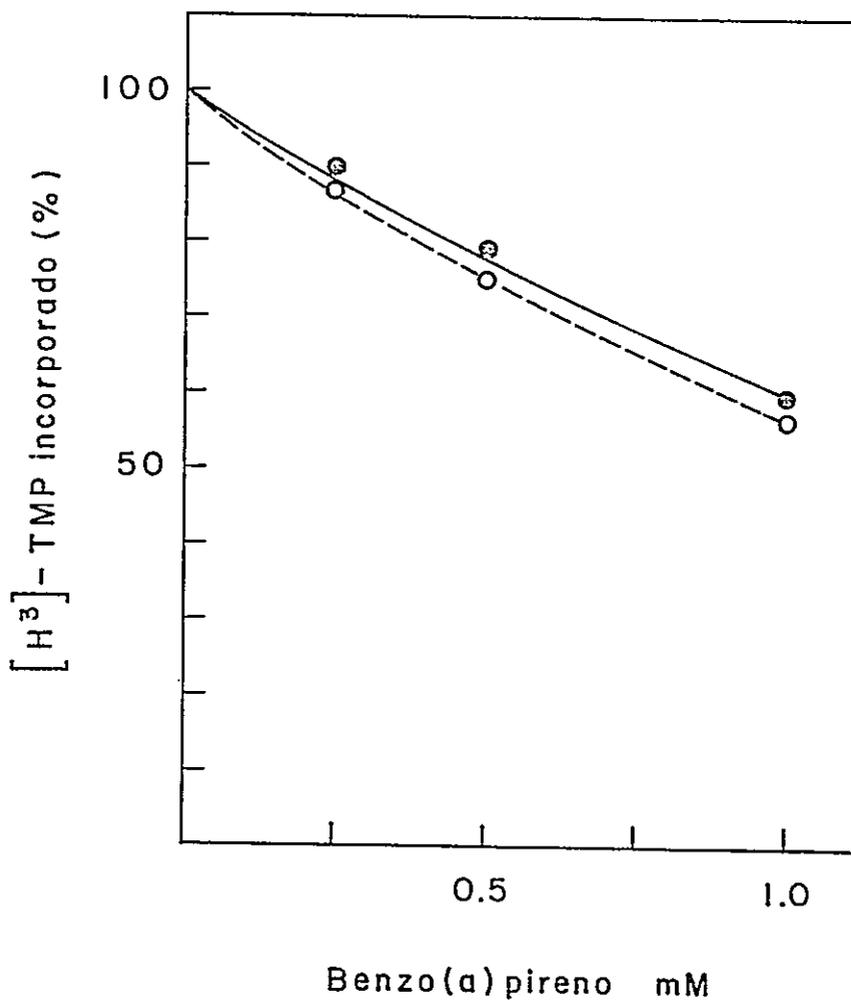


Figura 17. EFECTOS IN VITRO DE B(A)P SOBRE LA SÍNTESIS DE DNA EN MITOCONDRIAS CONTROLES.

- (●) Mitocondrias controles incubadas en ausencia de NADPH.
- (○) Mitocondrias controles incubadas en presencia de NADPH 1 mM

Las incubaciones se realizaron a 37° C durante 1 hora según se describe en Materiales y Métodos para la síntesis del DNA en mitocondrias.

B(a)P produce sólo un 40 % de inhibición de la síntesis de DNA, este grado de inhibición producido por B(a)P no es alterado por la presencia o ausencia de NADPH.

EFFECTOS DE B(A)P IN VITRO SOBRE LA ACTIVIDAD DNA POLIMERASA  $\gamma$ . Se estudió el efecto in vitro de B(a)P sobre la actividad DNA polimerasa solubilizada de mitocondrias de animales controles. Como se aprecia en la figura 18 B(a)P inhibe muy poco esta actividad DNA polimerasa solubilizada de mitocondrias, y NADPH no tiene ningún efecto sobre esta inhibición.

EFFECTOS IN VIVO DE B(A)P SOBRE LAS MITOCONDRIAS. En las fotografías de microscopía electrónica correspondientes a las preparaciones mitocondriales de hígado de ratas controles (figura 19), y de hígado de ratas tratadas con B(a)P (figura 20) se observan diferencias entre ambos tipos de organelos. Las mitocondrias de hígado de animales controles muestran un número de crestas mucho menor que las mitocondrias de hígado de animales tratados con B(a)P, las cuales aparecen mucho mejor estructuradas que los organelos controles. Las preparaciones observadas al microscopio electrónico no muestran contaminación con otros componentes celulares.

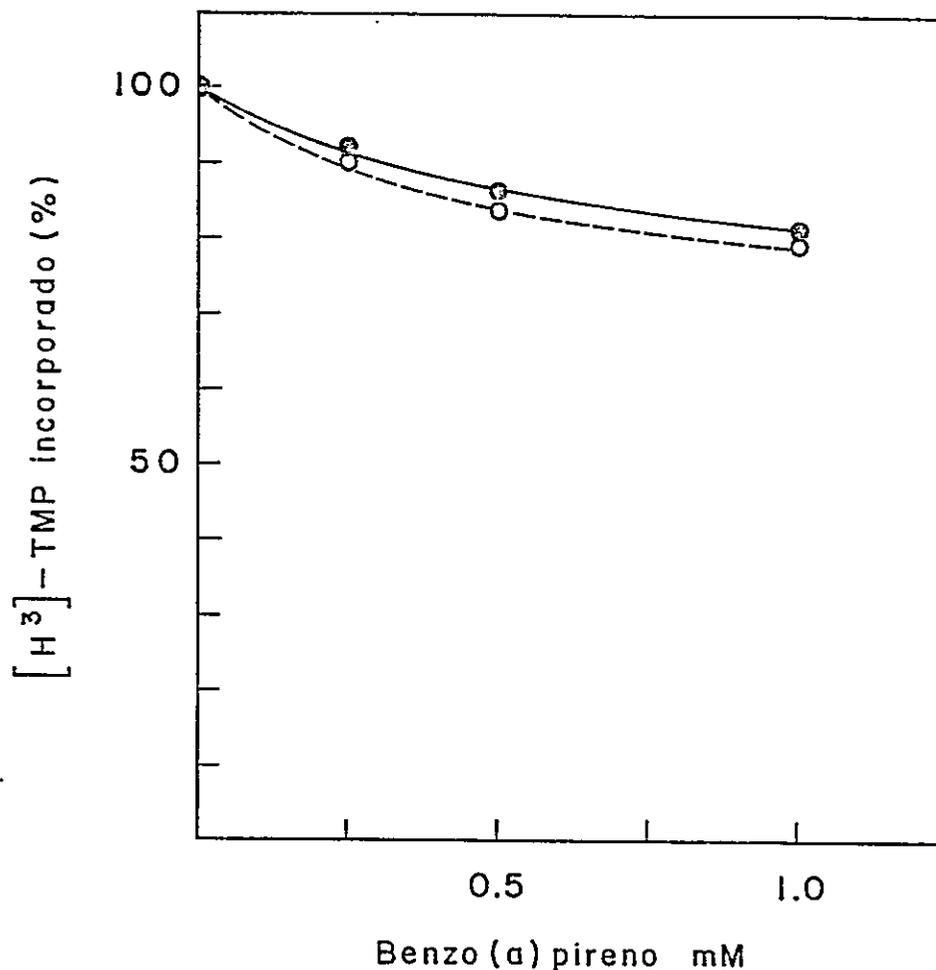


Figura 18. EFECTOS IN VITRO DE B(A)P SOBRE LA ACTIVIDAD DNA POLIMERASA SOLUBILIZADA DE MITOCONDRIAS CONTROLES. Las incubaciones se realizaron a 30° C durante 1 hora según se describe en Materiales y Métodos, utilizando poliA-oligodT<sub>12</sub> como templado.

- (●) incubación en ausencia de NADPH
- (○) incubación en presencia de NADPH 1 mM.

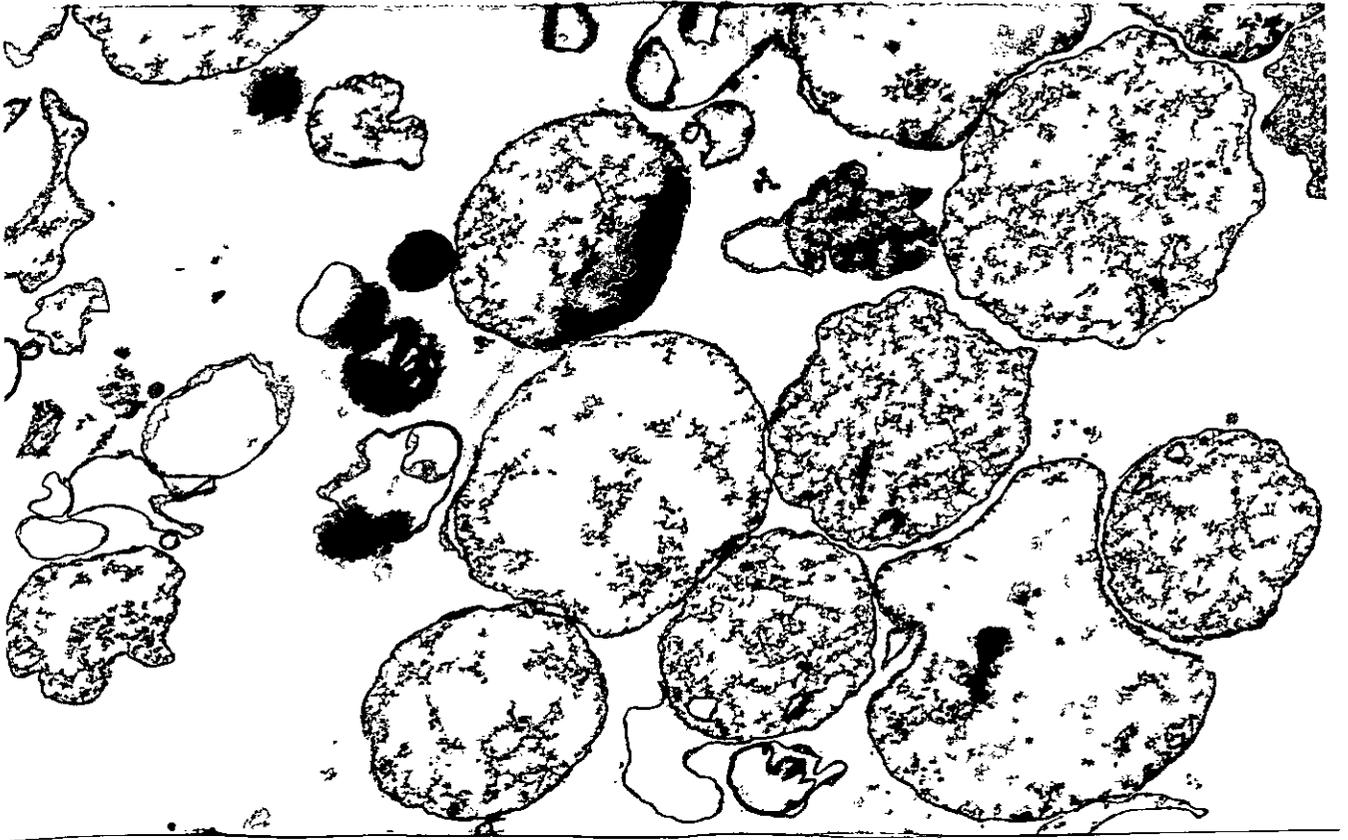


Figura 19. PREPARACIÓN MITOCONDRIAL DE HÍGADO DE RATAS CONTROLAS. Esta fotografía de microscopía electrónica fue hecha en el Laboratorio de Histología del Instituto de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica (Profesor Jorge Garrido).

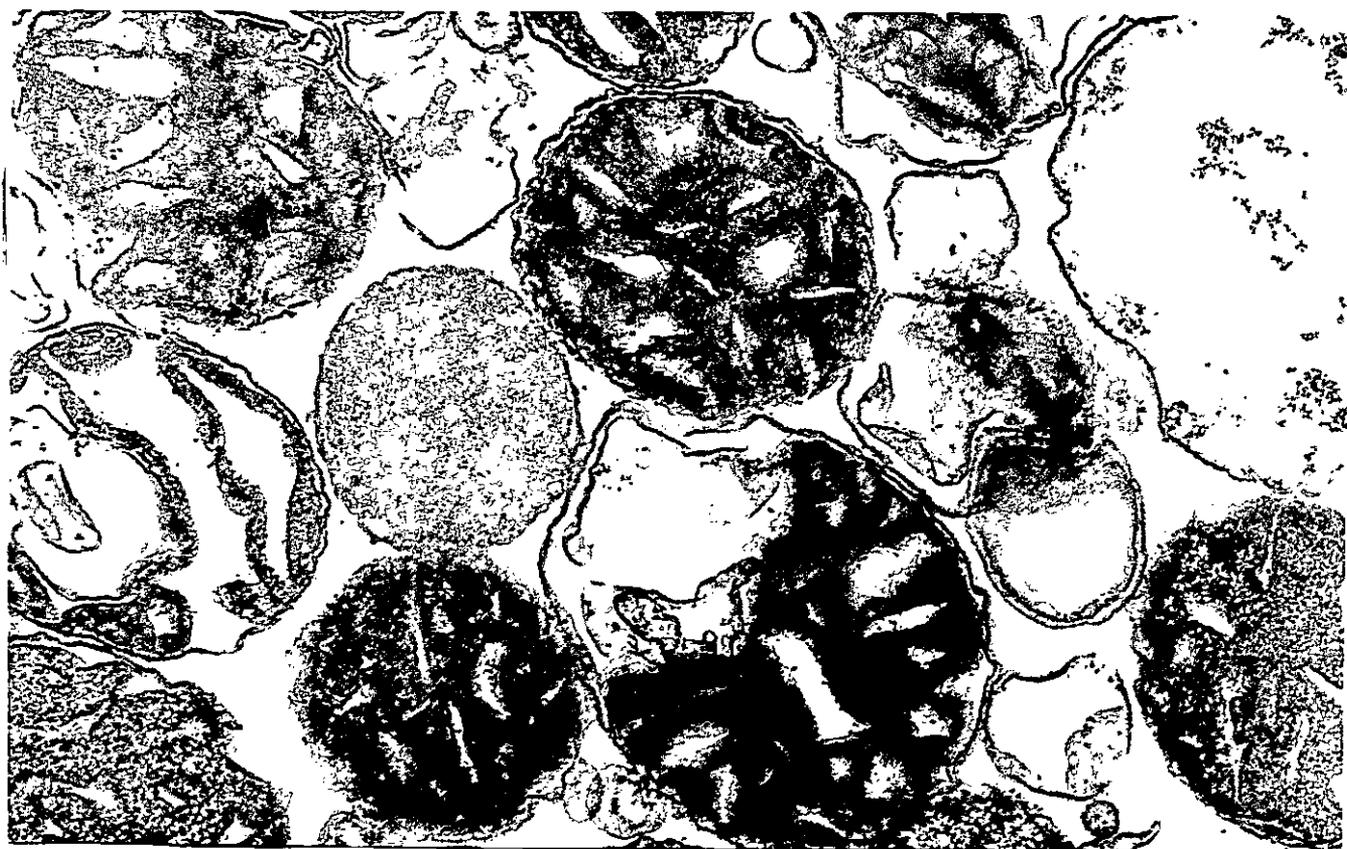


Figura 20. PREPARACIÓN MITOCONDRIAL DE HÍGADO DE RATAS TRATADAS CON B(A)P. Esta fotografía de microscopía electrónica fue hecha en el Laboratorio de Histología del Instituto de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica. (Profesor Jorge Garrido).

#### IV.- DISCUSION

La idea actualmente aceptada sobre las causas de las alteraciones celulares producidas por la administración in vivo de B(a)P atribuye dichas modificaciones a la unión covalente de las formas activas del cancerígeno al DNA (nuclear o mitocondrial). Menor atención se ha prestado al hecho que otras macromoléculas (20, 40) también se han encontrado unidas covalentemente a los biometabolitos del B(a)P. En el presente trabajo se describen los efectos de B(a)P in vivo e in vitro sobre la síntesis de DNA y las DNA polimerasas de núcleos y de mitocondrias de hígado de ratas.

EFFECTOS DE B(A)P EN NÚCLEOS. Nuestros resultados indican que la síntesis de DNA está claramente disminuida en núcleos de hígado de animales que han sido inyectados con B(a)P 48 horas antes de ser sacrificados. Esta disminución de la síntesis de DNA puede ser explicada, al menos parcialmente, por un efecto directo del cancerígeno sobre las DNA polimerasas nucleares, ya que la actividad solubilizada de los núcleos de animales controles es mucho mayor que la actividad solubilizada de los núcleos de animales tratados con B(a)P.

El hecho que la cantidad en proteínas de las DNA polimerasas sea muy baja en las células animales, dificulta la

demostración que la modificación de las enzimas por unión directa del cancerígeno, como se ha hecho con otras proteínas nucleares más abundantes (40), sea responsable de la disminución de estas actividades enzimáticas.

El efecto in vivo del B(a)P podría también atribuirse a alteraciones en la biosíntesis de las DNA polimerasas, producidas por los metabolitos activos del cancerígeno. Otra explicación podría ser que algunas actividades DNA polimerasas se encontrarían bloqueadas al entrar en contacto con las zonas del DNA modificadas por los biometabolitos del B(a)P.

Esto puede probarse estudiando el comportamiento in vitro de las polimerasas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  con DNA modificado con B(a)P.

Algunos resultados de este trabajo apoyan la idea que la actividad AHH presente en núcleos purificados, libres de contaminación citoplasmática, está involucrada en la inhibición de la síntesis de DNA producida por B(a)P.

El tratamiento in vivo de los animales con B(a)P produjo un notable aumento de la actividad AHH nuclear de hígado. Se observó una muy pronunciada inhibición de la síntesis de DNA en los núcleos de hígado de los animales tratados con B(a)P cuando estos se incubaron en presencia de NADPH, mientras que este cofactor de la actividad AHH no tuvo un efecto per se sobre la síntesis de DNA en los núcleos de hígado de animales controles. Estos resultados sugieren que en los núcleos provenientes de los animales inyectados con B(a)P puede existir

cierta cantidad remanente del cancerígeno sin activar y la presencia de NADPH en el medio de incubación podría conducir a la activación de este B(a)P remanente vía la AHH nuclear, lo cual se traduciría en una mayor disminución de la síntesis de DNA en los núcleos tratados por efecto de los metabolitos activos de B(a)P.

Además como se observa en los experimentos donde se incubaron núcleos controles con B(a)P solo, el cancerígeno produjo una pequeña inhibición de la síntesis de DNA en relación al grado de inhibición observado en presencia de B(a)P y NADPH, este resultado también sugiere que el B(a)P presente en el medio de incubación pudo ser activado en presencia de NADPH por la AHH nuclear, y es esta metabolización la que lleva a una menor incorporación del  $(H^3)$ -TMP en el DNA nuclear.

Se ha sugerido que la actividad AHH microsomal está involucrada solamente en los procesos de eliminación de los compuestos tóxicos, mientras que la actividad AHH nuclear está relacionada con los efectos de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en la expresión del genoma nuclear (55). Estos resultados parecen apoyar esa idea.

En los experimentos dirigidos a estudiar cual de las DNA polimerasas de núcleos resultaba afectada específicamente por B(a)P, se encontró que la DNA polimerasa  $\beta$  fue la actividad más resistente en los núcleos de hígado de animales tratados con B(a)P, el mismo resultado se obtuvo al incubar los núcleos de hígado de animales controles con el cancerígeno.

Se utilizaron diferentes criterios para obtener estos resultados, por una parte la separación de las actividades polimerásicas por centrifugación en gradientes de sacarosa así como el uso de inhibidores específicos, indicaron que las DNA polimerasas  $\alpha$  y  $\gamma$  fueron más afectadas que la DNA polimerasa  $\beta$  por el tratamiento in vivo e in vitro con B(a)P.

El resultado obtenido con ddTTP que inhibe a las polimerasas  $\beta$  y  $\gamma$  contradice los resultados obtenidos con afidicolina, bromuro de etidio y N-etilmaleimida, sin embargo, es posible que ddTTP pueda afectar en núcleos intactos a otras proteínas involucradas en la síntesis de DNA y así producir el alto grado de inhibición encontrado.

La DNA polimerasa  $\beta$  está involucrada en los procesos de reparación del DNA. El alto nivel de esta enzima encontrado después del tratamiento in vivo con B(a)P podría reflejar una alta resistencia al cancerígeno, o un aumento de la velocidad de síntesis de la enzima. Como se obtuvo el mismo resultado con el tratamiento in vitro con B(a)P, esto hace poco probable un efecto sobre la biosíntesis de la enzima y favorece la idea que la polimerasa  $\beta$  es menos afectada que  $\alpha$  y  $\gamma$  por una acción directa del cancerígeno. Una posible explicación a la alta resistencia de esta enzima al cancerígeno podría ser que su menor tamaño la hiciera un blanco menos susceptible a la acción de los metabolitos del B(a)P.

Las fotografías de las preparaciones nucleares hechas por

microscopía de contraste de fase indican que el tratamiento con el cancerígeno no provocó alteraciones en el tamaño de los núcleos ya que no se apreciaron diferencias significativas de tamaño entre ambas poblaciones nucleares. Si se observó en cambio, una notable diferencia en cuanto a la estructura nuclear. Gránulos densos, probablemente de material cromático, se observaron en los núcleos de ratas tratadas con B(a)P; en cambio el contenido nuclear aparece mucho más difuso y refringente en los núcleos normales. Algunos investigadores han indicado que la DNA polimerasa  $\beta$  parece estar fuertemente unida a la cromatina (45), esta observación podría tal vez explicar la mayor resistencia de esta polimerasa al cancerígeno, si los gránulos densos que se aprecian en la preparación de núcleos de hígado de ratas tratadas con B(a)P correspondieran a acumulaciones de cromatina donde esta enzima permaneciera de alguna manera más protegida de la acción de B(a)P. Se necesitan estudios más acabados, los que permitirán confirmar o no, estas especulaciones.

**EFFECTOS DE B(A)P EN MITOCONDRIAS.** Los resultados obtenidos en mitocondrias mostraron una menor incorporación de nucleótidos en el DNA de las mitocondrias de hígado de ratas tratadas con B(a)P. La menor capacidad de estos organelos para sintetizar DNA podría estar relacionada con el alto grado de modificación encontrado en el DNA mitocondrial de células animales que han sido expuestas a cancerígenos (32, 33).

Al solubilizar la DNA polimerasa mitocondrial se encontró que el nivel de esta actividad solubilizada de las mitocondrias de hígado de ratas tratadas con B(a)P era mucho mayor que en las mitocondrias controles. Se analizó el sedimento de membrana mitocondrial para verificar si este aumento de actividad era provocado por el proceso de solubilización de la polimerasa. Este análisis mostró que el sedimento obtenido después de solubilizar la enzima de las mitocondrias de hígado de ratas tratadas, tenía también mayor actividad DNA polimerasa que el sedimento obtenido de las mitocondrias controles. La mitocondria tiene una actividad DNA polimerasa mayoritaria; la DNA polimerasa  $\gamma$  que replica el DNA mitocondrial, esta enzima es fuertemente inhibida por ddTTP y bromuro de etidio (56), mientras que afidicolina que es un inhibidor específico de la DNA polimerasa  $\alpha$ , no afecta a la enzima mitocondrial. La síntesis de DNA en las mitocondrias controles fue fuertemente inhibida por ddTTP mientras que en las mitocondrias de hígado de animales tratados con B(a)P la extensión de esta inhibición fue mucho menor. Una posible explicación a estos resultados era que la mayor actividad DNA polimerasa encontrada en las mitocondrias de los animales tratados, correspondiera a la presencia de otras polimerasas, además de  $\gamma$ , en dichos organelos, o bien a una forma modificada de la polimerasa  $\gamma$ , más resistente a ddTTP. Para resolver este problema se estudió el efecto de diferentes inhibidores sobre las actividades DNA polimerasas solubilizadas de mitocondrias

controles y de mitocondrias de hígado de animales tratados con B(a)P. Los resultados mostraron efectos inhibitorios similares de ddTTP y bromuro de etidio sobre ambos tipos de organelo, mientras que afidicolina no afectó la DNA polimerasa mitocondrial de los animales controles ni la de los animales tratados. Esto indica que el alto nivel de actividad solubilizada de las mitocondrias de hígado de animales tratados con B(a)P corresponde a la DNA polimerasa  $\gamma$ , y no a la entrada de otras polimerasas en dichos organelos.

Otros resultados como la concentración óptima de manganeso, el efecto estimuladorio de KCl sobre la actividad DNA polimerasa y la utilización preferencial de poliA oligodT<sub>12</sub> como templado, indican propiedades similares en ambos tipos de polimerasas.

Asumiendo que la DNA polimerasa  $\gamma$  es la única enzima mitocondrial capaz de copiar templados de DNA, esta enzima debería ser responsable de la replicación y reparación del genoma mitocondrial.

Se ha demostrado que después de irradiar células animales, la actividad DNA polimerasa  $\beta$  es fuertemente estimulada, ésta y otras observaciones llevaron a algunos investigadores a asignar a esta enzima un rol en la reparación del DNA nuclear (57). Otros autores demostraron en mitocondrias de Tetrahymena pyriformis, una inducción de la DNA polimerasa mitocondrial por efectos de irradiación (58, 59).

Por los resultados obtenidos podría postularse que la DNA polimerasa  $\gamma$  aumenta en las mitocondrias de hígado de ratas tratadas con B(a)P, como una respuesta al alto grado de modificación que sufre el genoma mitocondrial bajo la acción del cancerígeno.

In vitro, B(a)P inhibió la síntesis de DNA mitocondrial, pero se observó un efecto inhibitorio muy pequeño sobre la actividad DNA polimerasa solubilizada de los organelos. Estos resultados podrían indicar que el mayor efecto inhibitorio del cancerígeno observado in vivo, podría reflejar la gran alteración del DNA mitocondrial mas que alteraciones de la DNA polimerasa  $\gamma$  por efecto del cancerígeno.

Los resultados de estudios preliminares de estas preparaciones mitocondriales, hechas en el microscopio electrónico por el Dr. Jorge Garrido del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad Católica, indican que la estructura de ambos tipos de mitocondrias es muy diferente. Las mitocondrias con controles parecieran organelos mucho más frágiles que las mitocondrias de hígado de ratas tratadas con B(a)P. Esto podría significar que el tratamiento con el cancerígeno podría producir alteraciones tales en la membrana mitocondrial que impidan la entrada de los precursores y de los inhibidores de la síntesis de DNA, así como la salida de la DNA polimerasa  $\gamma$ . Si así fuera, esto podría explicar la disminución de la síntesis de DNA, la resistencia al efecto inhibitorio de ddTTP y la mayor actividad polimerasa  $\gamma$ , encontrados en estos

organelos de hígado de ratas tratadas con B(a)P. Además estaría en acuerdo con las observaciones del efecto in vitro de B(a)P sobre las mitocondrias.

Estas interrogantes esperamos tendrán respuesta con nuevos estudios al microscopio electrónico y otros experimentos que se han iniciado con el objeto de dilucidar si los efectos observados en las mitocondrias de hígado de ratas tratadas con B(a)P, reflejan alteraciones de la membrana mitocondrial, o la inducción de la DNA polimerasa y por acción del cancerígeno.

## V.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Lubet, R.A., Brown, D.Q. y Kouri, R.E. (1973). The role of 3-OH benzo(a)pyrene in mediating benzo(a)pyrene induced toxicity and transformation in cell culture. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 6, 929-942.
- 2.- Wislocki, P.G., Wood, A.W., Chang, R.L., Levin, W., Yagi, H., Hernandez, O., Jerina, D.M. y Conney, A.H. (1976) Mutagenicity and cytotoxicity of benzo(a)pyrene arene oxides, phenols, quinones and dihydrodiols in bacterial and mammalian cells. Cancer Res. 36, 3350 - 3357.
- 3.- Wislocki, P.G., Wood, A.W., Chang, R.L., Levin, W., Yagi, H., Hernandez, O., Jerina, D.M. y Conney, A.H. (1976). High mutagenicity and toxicity of a diol-epoxide derived from benzo(a)pyrene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 1006-1012.
- 4.- Marquardt, H., Grover, P.L. y Sims, P. (1976) In vitro malignant transformation of mouse fibroblast by non-K-region dihydrodiols derived from 7,8-methylbenz(a)anthracene, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and benzo(a)pyrene. Cancer Res. 36, 2059-2064.
- 5.- Marquardt, H., Baker, S., Grover, P.L. y Sims, P. (1977) Malignant transformation and mutagenesis in mammalian cells induced by vicinal diol epoxides derived from

- benzo(a)pyrene. *Cancer Lett.* 3, 31-36.
- 6.- Levin, W., Wood, A.W., Yagi, H., Dansette, P.M., Jerina, D.M. y Conney, A.H. (1976). Carcinogenicity of benzo(a)pyrene 4,5-, 7,8-, and 9,10-oxides on mouse skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 243-247.
  - 7.- Levin, W., Wood, A.W., Wislocki, P.G., Kapitulnick, J., Yagi, H., Jerina, D.M. y Conney, A.H. (1977) Carcinogenicity of benzo-ring derivatives of benzo(a)pyrene on mouse skin. *Cancer Res.* 37, 3356-3361.
  - 8.- Haenszel, W., y Traueber, K.E. (1964) Lung cancer mortality as related to residence and smoking histories. II White females. *J. Natl. Cancer Inst.* 32, 803-838
  - 9.- Yang, S.K., Gelboin, H.V., Trump, B.F., Autrup, H. y Harris, C.C. (1977) Metabolic activation of benzo(a)pyrene and binding to DNA in cultured human bronchus. *Cancer Res.* 36, 4185-4189
  10. Hogan, M.E., Dattagupta, N. y Whitlock, J.P. (1981). Carcinogen-induced alteration of DNA structure. *J. Biol. Chem.* 256, 4504-4513.
  11. Tsang, W.S. y Griffin, G.W. (1979) In: *Metabolic activation of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons*, edited by Pergamon Press p. 1-9.
  12. Nebert, D.W. y Gelboin, H.V. (1968) Substrate inducible microsomal aryl hydrocarbon hydroxylase in mammalian cell culture. I Assay and properties of induced enzyme *J. Biol. Chem.* 243, 6242-6249

13. Conney, A.H. (1967) Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol. Rev.* 19, 317-366
14. Gelboin, H.V. (1967) Carcinogens, enzyme induction and gene action. *Adv. Cancer Res.* 10, 1-81.
15. Gelboin, H.V., Kinoshita, N. y Wiebel, F.J. (1972) Microsomal hydroxylases: induction and role in polycyclic hydrocarbons carcinogenesis and toxicity. *Federation Proc.* 31, 1298-1302.
16. Nebert, D.W. y Gelboin, H.V. (1969) The in vivo and in vitro induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in mammalian cells of different species, tissues, strains, and developmental and hormonal states. *Arch. Biochem. Biophys.* 134, 76-89.
17. Conney, A.H. y Burns, J.J. (1972) Metabolic interactions among environmental chemicals and drugs. *Science* 178, 576-586
18. Yang, S.K., Roller, P.P. y Gelboin, H.V. (1977) Enzymatic mechanism of benzo(a)pyrene conversion to diols and phenols and an improved high-pressure liquid chromatographic separation of benzo(a)pyrene derivatives. *Biochemistry* 16, 3680-3687.
19. Remsen, J., Jerina, D.M., Yagi, H. y Cerutti, P. (1977) In vitro reaction of radioactive 7 $\beta$ , 8 $\alpha$ -dihydroxy-9 $\alpha$ , 10 $\alpha$ -epoxy-9 $\beta$ , 10 $\beta$ -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene with DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 934-940

20. Pezzuto, J.M., Lea, M.A. y Yang, C.S. (1978) Binding of metabolically activated benzo(a)pyrene to DNA and histones of rat liver, lung and regenerating liver. *Life Sci.* 22, 105-110.
21. King, H.W.S., Osborne, M.R., Beland, F.A., Harvey, R.G. y Brookes, P. (1976) (-)-7 $\alpha$ , 8 $\beta$ -dihydroxy-9 $\beta$ ,10 $\beta$ -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene is an intermediate in the metabolism and binding to DNA of benzo(a)pyrene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 2679-2681
22. Brookes, P. y Lawley, P.D. (1964) Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin: relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to deoxyribonucleic acid. *Nature London* 202, 781-784
23. Rogan, E., Roth, E.R., Katomsky, P., Benderson, J. y Cavalieri, E. (1978). Binding of benzo(a)pyrene at the 1,3,6 positions to nucleic acids in vivo on mouse skin and in vitro with rat liver microsomes and nuclei. *Chem. Biol. Interact.* 22, 35-51.
24. Straub, K.M., Meehan, T., Burlingame, A.L. y Calvin, M. (1977) Identification of the major adducts formed by reaction of benzo(a)pyrene diol epoxide with DNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5285-5289.
25. Booth, J., Hewer, A., Keysell, G.R., y Sims, P. (1975) Enzymatic reduction of aromatic hydrocarbon epoxides by the microsomal fraction of rat liver. *Xenobiotica* 5, 197-203

26. Gelboin, H.V.A. (1969) A microsome-dependent binding of benzo(a)pyrene to DNA. *Cancer Res.* 29, 1272-1276
27. Alexandrov, K., Brookes, P., King, H.W., Osborne, M.R. y Thompson, M.H. (1976) Comparison of the metabolism of benzo(a)pyrene and binding to DNA caused by rat liver nuclei and microsomes. *Chem. Biol. Interact.* 13, 269-277
28. Bresnick, E., Vaught, J.B., Chuang, A.H.I., Stoming, T. A., Bockman, D. y Mukhtar, H. (1977) Nuclear aryl hydrocarbon hydroxylase and interactions of polycyclic hydrocarbons with nuclear components. *Arch. Biochem, Biophys.* 181, 257-269
29. Rogan, E.G., Mailander, P. y Cavalieri, E. (1976) Metabolic activation of aromatic hydrocarbons in purified rat liver nuclei: induction of enzyme activities and binding to DNA with and without monooxygenase catalyzed formation of active oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 457-461.
30. Alexandrov, K. y Thompson, M.H. (1977) Influence of inducers and inhibitors of mixed-function oxidases on benzo(a)pyrene binding to DNA of rat liver nuclei. *Cancer Res.* 37, 1443-1449.
31. Niranjana, B.G. y Avadhani, N.G. (1980) Activation of Aflatoxin B<sub>1</sub> by a monooxygenase system localized in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 255, 6575-6578.

32. Backer, J.M. y Weinstein, I.B. (1980) Mitochondrial DNA is a major cellular target for a dihydrodiol-epoxide derivative of benzo(a)pyrene. *Science* 209, 297-299
33. Allen, J.A. y Coombs, M.M. (1980) Covalent binding of polycyclic aromatic compounds to mitochondrial and nuclear DNA. *Nature* 287, 244-245
34. Caron, F., Jacq, C. y Rouviere-Yaniv, J. (1979) Histone-like protein extracted from yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4265-4269
35. Slaga, T.J., Bowden, G.T., Shapas, B.G. y Boutwell, R.K. (1974) Macromolecular synthesis following a single application of polycyclic hydrocarbons used as initiators of mouse skin tumorigenesis *Cancer Res.* 34, 771-777
36. Painter, R.B. (1978) Inhibition of DNA replicon initiation by 4-nitroquinoline 1-oxide, adriamycin and ethyleneimine. *Cancer Res.* 38, 4445-4449
37. Marquardt, H., Philips, S.F., y Bendich, A. (1972). DNA binding and inhibition of DNA synthesis after 7,12-dimethylbenz (a)anthracene administered during early prereplicative phase in regenerating rat liver. *Cancer. Res.* 32, 1810-1813
38. Hsu, W.T., Lin, E.J.S., Harvey, R.G. y Weiss, S.B. (1977) Mechanism of phage Phi X174 DNA inactivation by benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3335-3339

39. Meehan, T. y Straub, K. (1979) Double-stranded DNA stereoselectively binds benzo(a)pyrene diol-epoxides. *Nature* 277, 410-412
40. MacLeod, M.C., Kootstra, A., Mansfield, B.K., Slaga, T. J. y Selkirk, J.K. (1980) Specificity in interaction of benzo(a)pyrene with nuclear macromolecules: Implications of derivatives of two dihydrodiols in protein binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 6396-6400
41. Weissbach A. (1979) The functional roles of mammalian DNA polymerase. *Arch. Biochem, Biophys.* 198. 386-396.
42. De Pamphilis. M.L. y Wassarman, P.M. (1980) Replication of eukaryotic chromosomes: a close-up of the replication fork. *Ann. Rev. Biochem* 49, 627-666
43. Bolden, A., Pedrali, G. y Weissbach, A. (1977) DNA polymerase of mitochondria is a  $\gamma$ -polymerase *J. Biol. Chem.* 252, 3351-3356
44. Wang, T.S.F., Sedwick, W.D. y Korn, D. (1974) Purification and properties of the homogeneous enzyme from human KB cells. *J. Biol. Chem.* 249, 841-850
45. Stalker, D.M., Mosbaugh, D.W. y Meyer, R.R. (1976) Novikoff hepatoma deoxyribonucleic acid polymerase. Purification and properties of a homogeneous  $\beta$ polymerase. *Biochemistry* 15, 3114-3121
46. Edenberg, H.J., Anderson, S. y De Pamphilis, L. (1978) Involvement of DNA polymerase  $\alpha$  in Simian Virus 40 DNA replication. *J. Biol. Chem.* 253, 3273-3280.

47. Ikegami, S., Taguchi, T., y Ohashi, M. (1978) Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerasa  $\alpha$ . *Nature* 275, 458-459
48. Mosbaugh, D.W. y Meyer, R.R. (1980) Interaction of mammalian deoxyribonuclease V, a double strand 3'→5' and 5'→3' exonuclease, with deoxyribonucleic acid polymerase- $\beta$  from the Novikoff hepatoma. *J. Biol. Chem.* 255 10239-10247
49. De Pierre, J.W., Johannesen, K.A.M., Morón, M.S. y Seidegard, J. (1978) Assay of aryl hydrocarbon (Benzo(a)pyrene) monooxygenase. *Methods in Enzymology* 52, 412-416
50. Zimmermann, W., Chen, S.M., Golden, A. y Weissbach, A. (1980) Mitochondrial DNA replication does not involve DNA polymerasa  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 255, 11847-11852
51. Knopf, K.W., Yamada, M. y Weissbach A. (1976) HeLa cell DNA polymerasa  $\gamma$  : Further purification and properties of the enzyme *Biochemistry* 15, 4540-4548
52. Aposhian H.V., y Kornberg, A. (1962) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 237, 519-525
53. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
54. Burton, K. (1968) Determination of DNA concentration with diphenilamine. *Methods in Enzimol.* 12B, 163-166

55. Gelboin, H.V. (1980) Benzo(a)pyrene metabolism, activation, and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol. Rev.* 60, 1107-1166
56. Tarragó-Litvak, L., Viratelle, O., Darriet, D., Dalibaire, R., Graves, P.V. y Litvak, S. (1978) The inhibition of mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$  from animal cells, by intercalating drugs. *Nuclei Acids Res.* 5, 2197-2210
57. Hubscher, U., Kuenzle, C.C. y Spadari, S. (1979) Functional roles of DNA polymerases  $\beta$  and  $\gamma$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 2316-2330
58. Keiding, J. y Westergaard, O. (1971) Induction of DNA polymerase activity in irradiated tetrahymena cells. *Expt. Cell. Res.* 64, 317-322
59. Westergaard, O. y Lindberg, B. (1972) An induced mitochondrial DNA polymerase from Tetrahymena. *Eur. J. Biochem.* 28, 422-431