



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES IZTACALA

B0472/87
p. 3

EFFECTO DE LA CISTEAMINA SOBRE LA INDUCCION
DE INTERCAMBIOS ENTRE CROMATIDES
HERMANAS (ICH) POR RADIACION GAMMA

T E S I S

Que para obtener el Título de:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MARIA TERESA MENDIOLA CRUZ

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DESEO EXPRESAR MI PROFUNDO AGRADECIMIENTO
AL Dr. PEDRO MORALES RAMIREZ POR SU EXCE-
LENTE ASESORIA Y ESTIMULO PARA LA REALIZA-
CION DE ESTE TRABAJO.

TAMBIEN AGRADEZCO LA VALIOSA COLABORACION
DE MIS COMPAÑEROS REGINA RODRIGUEZ, TERE-
SITA VALLARINO, MANUEL JIMENEZ, ANGEL RE-
YES, FELIPE BELTRAN, PERFECTO AGUILAR Y
ENRIQUE FERNANDEZ.

AGRADEZCO A LAS AUTORIDADES DEL INSTITUTO
NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES LAS
FACILIDADES BRINDADAS PARA EL DESARROLLO
E IMPRESION DE ESTA TESIS.

AGRADEZCO AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA
Y TECNOLOGIA EL APOYO ECONOMICO BRINDADO
DURANTE LA REALIZACION DEL TRABAJO.

A MI ESCUELA

A MIS MAESTROS

ESPECIALMENTE A RAMON MORENO, ABEL FUENTES,
MARTHA SALCEDO, BERTHA HASHIMOTO Y CARLOS FERNANDEZ
POR SU VALIOSA ENSEÑANZA.

A MIGUEL ...

CON QUIEN ESPERO COMPARTIR
EL RESTO DE MI VIDA

CON TODO MI AMOR.

A MIS PADRES
A QUIENES TANTO LES DEBO
CON PROFUNDO CARIÑO Y GRATITUD.

A MIS HERMANOS
ROBERTO, OSCAR Y SERGIO
CON TODO MI CARIÑO.

A MIRIAM Y LORENA
AGRADECIENDO SINCERAMENTE SU APOYO INCONDICIONAL
Y SU AMISTAD INQUEBRANTABLE.

A TODOS MIS FAMILIARES Y AMIGOS.

CONTENIDO

	PAG.
<u>INTRODUCCION</u>	1
1. <u>DAÑO INDUCIDO POR RADIACION</u>	3
1.1 Daño Directo e Indirecto	3
1.2 Daño sobre los Organelos Celulares	5
1.3 Daño sobre el ADN	6
1.4 Daño sobre la Actividad Enzimática	8
1.5 Daño sobre el Metabolismo Celular	10
2. <u>MEDICION DEL DAÑO GENETICO</u>	11
2.1 Intercambio entre Cromátides Hermanas (ICH)	11
2.1.1 Antecedentes	11
2.1.2 Técnicas para detectar el ICH	13
2.1.3 Significado Biológico	18
2.1.4 ICH como Indicador de Daño	23
2.1.4.1 Ventajas y Desventajas del Método	23
2.1.4.2 Inducción de ICH por Agentes Químicos	24
2.1.4.3 Inducción de ICH por Radiaciones Ionizantes	26
2.2 Otros Indicadores de Daño	29
2.2.1 Índice Mitótico (IM)	29
2.2.2 Tiempo Generacional Promedio (TGP)	29
2.2.3 Rupturas Cromosómicas (RC)	30
3. <u>RADIOPROTECCION</u>	36
3.1 Tipos de Radioprotección	37

	PAG.	
3.1.1	Radioprotección Física	37
	3.1.1.1 Exposición Parcial	37
	3.1.1.2 Presencia de Oxígeno	38
	3.1.1.3 Disminución de Temperatura	38
3.1.2	Radioprotección Química	39
	3.1.2.1 Aminotioles	39
	3.1.2.2 Otros Compuestos con Azufre	39
	3.1.2.3 Agentes Farmacológicos	40
	3.1.2.4 Otros Agentes Radioprotec- tores	41
3.1.3	Radioprotección Biológica	42
	3.1.3.1 Parabiosis	42
	3.1.3.2 Bazo y Extracto de Bazo	43
	3.1.3.3 Transplante de Médula Osea	43
	3.1.3.4 Transfusión de Sangre Peri- férica	43
	3.1.3.5 Inyección de Células no He- matopoyéticas	43
3.2	Cisteamina	44
	3.2.1 Características Generales	44
	3.2.2 Evaluación de la Cisteamina como Ra- dioprotector	45
	3.2.3 Efectos de la Cisteamina en las Eta- pas del Ciclo Celular	47
	3.2.4 Mecanismos de Acción	48
	3.2.5 Toxicidad de la Cisteamina	53
3.3	Radioprotección con L-cisteina contra la In- ducción de ICH	56
4.	<u>DEFINICION DE OBJETIVOS</u>	57

	PAG.
5. <u>METODOLOGIA EXPERIMENTAL</u>	58
5.1 Bases para la Detección de ICH	58
5.2 Animales	61
5.3 Incorporación de BrdUrd	61
5.4 Cosecha y Obtención de Preparaciones Cromosómicas	61
5.5 Tinción Diferencial de las Cromátides Hermanas	63
5.6 Cisteamina	65
5.7 Irradiación	65
5.8 Análisis	65
5.8.1 ICH	65
5.8.2 Rupturas Cromosómicas	66
5.8.3 Índice Mitótico	66
5.8.4 Tiempo Generacional Promedio	66
5.9 Estadística	67
5.10 Protocolos y Grupos Experimentales	67
6. <u>RESULTADOS</u>	70
6.1 Efecto de la Cisteamina sobre la Inducción de Intercambios entre Cromátides Hermanas (ICH) por Radiación Gamma	70
6.2 Efecto de la Cisteamina sobre la Inducción de Rupturas Cromosómicas (RC) por Radiación Gamma	78
6.3 Efecto de la Cisteamina sobre la Modificación del Índice Mitótico (IM) Inducida por Radiación Gamma	80

	PAG.	
6.4	Efecto de la Cisteamina sobre la Modificación del Tiempo Generacional Promedio (TGP) Inducida por Radiación Gamma	83
6.5	Comparación del Efecto de la Cisteamina sobre la Inducción de ICH y RC, y sobre la Modificación del IM y TGP por Radiación Gamma	83
7.	<u>DISCUSION DE RESULTADOS</u>	86
7.1	Efecto de la Cisteamina sobre la Inducción de Intercambios entre Cromátides Hermanas (ICH) por Radiación Gamma	86
7.2	Efecto de la Cisteamina sobre la Inducción de Rupturas Cromosómicas (RC) por Radiación Gamma	88
7.3	Efecto de la Cisteamina sobre la Modificación de Índice Mitótico (IM) Inducida por Radiación Gamma	92
7.4	Efecto de la Cisteamina sobre la Modificación del Tiempo Generacional Promedio (TGP) Inducida por Radiación Gamma	94
7.5	Comparación del Efecto de la Cisteamina sobre la Inducción de ICH y RC, y sobre la Modificación del IM y TGP Inducida por Radiación Gamma	95
7.6	Efectos Colaterales de la Cisteamina	97
8.	<u>CONCLUSIONES</u>	99
9.	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	100

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucléico
AET	Aminoetil isotiourea dihidrobromuro
AMPC	Adenosin monofosfato cíclico
ARN	Acido ribonucléico
ATP	Adenosin trifosfato
BrdUrd	5-Bromo - 2'- desoxiuridina
⁶⁰ Co	Fuente de Cobalto 60
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRF	Factor de reducción de dosis
FPG	Fluorescencia plus Giemsa
Gy	Gray (Unidad de absorción equivalente a 100 rads)
³ HdT	Timidina tritiada
ICH	Intercambio entre Cromátides Hermanas
IM	Indice Mitótico
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenosa
LD ₅₀	Dosis letal al 50%
MEA	2- mercapto etilamina
MEG	2- mercapto etilguanidina
NP-SH	Grupos sulfhidrilos no unidos a proteínas
PAPP	Para - amino propiofenona
PBS	Buffer salino de fosfatos
R	Roentgen (Unidad de exposición a rayos X ó gamma)
rad	Unidad de absorción equivalente a 0.01 Gy (Energía absorbida por unidad de masa)
RC	Rupturas Cromosómicas
rpm	Revoluciones por minuto
s	Desviación estándar
SH	Grupo sulfhidrilo
SSC	Cloruro de Sodio - Citrato Trisódico
TGP	Tiempo Generacional Promedio
\bar{x}	Promedio
χ^2	Prueba estadística de Chi cuadrada

RESUMEN

Se analizó el efecto de la cisteamina sobre la inducción de - Intercambios entre Cromátides Hermanas (ICH) por radiación - gamma, así como el efecto sobre cambios radioinducidos en - otros eventos citogenéticos como Índice Mitótico (IM), Tiem- po Generacional Promedio (TGP) y Rupturas Cromosómicas (RC), - en células de médula ósea de ratón in vivo.

También se determinó la eficiencia de diferentes dosis de cis - teamina sobre los cambios radioinducidos en los parámetros - anteriores.

Se observó que la cisteamina tiene la capacidad de proteger a las células contra la inducción de ICH por rayos gamma en for - ma dosis-dependiente.

Por otro lado, no se observó que la cisteamina pudiera evitar los cambios radioinducidos sobre el IM, TGP y RC.

No se observó citotoxicidad ni genotoxicidad colateral provo- cada por la cisteamina per se sobre los parámetros analizados.

Los resultados sugieren que la inducción de ICH se da por la vía indirecta de producción de daño por radiación, ya que la cisteamina tiene la capacidad de evitar tal efecto por la cap - tación de radicales libres. El efecto de la radiación sobre el IM, TGP y RC sugestivamente se producen por la vía directa ya que no pueden ser evitados por la cisteamina.

INTRODUCCION

La radiación ionizante forma parte de la naturaleza y ha existido siempre como parte integral del Universo. Desde el origen de la vida hasta el presente, los organismos vivos han estado constantemente expuestos a la radiación. De hecho, la vida como la conocemos en la Tierra ha evolucionado en medio de la radiación y tal vez gracias a ella.

Las fuentes naturales de radiación están constituidas por los elementos radiactivos que existen en la naturaleza y por los rayos cósmicos que provienen del espacio exterior.

Actualmente, existen además otras fuentes de radiación producidas por el hombre tales como aparatos de rayos X, aceleradores de partículas, radioisótopos producidos artificialmente y reactores nucleares, utilizados para la investigación científica y para sus aplicaciones en la medicina, agricultura, industria, etc.

La radiación puede ser benéfica y tal vez sea uno de los factores más importantes que determinen la evolución y adaptación de los organismos al medio ambiente, pero también puede provocar consecuencias muy dañinas.

El amplio uso de la energía atómica en varias áreas del conocimiento humano como Física, Química y Biología, así como sus aplicaciones tanto en la industria como en la medicina ha provocado que el estudio del daño inducido por las radiaciones sobre los organismos adquiera gran importancia.

→ Tomando en cuenta que el ADN (ácido desoxirribonucleico) es la molécula portadora de la información genética de la cual depen

de la transmisión de las características genéticas de una célula a sus descendientes, y que además determina la estructura y regula la función celular, se considera que cualquier daño que sufra esta molécula será de gran importancia para todo el organismo ←

Varios autores han reportado la capacidad de la cisteamina para reducir algunos daños inducidos por radiación, a este efecto se le conoce como radioprotección química.

⇒ En el presente trabajo de investigación, se realiza un análisis del efecto que tiene la cisteamina sobre la inducción de Inter-cambios entre Cromátides Hermanas (ICH) por radiación gamma y sobre otros parámetros citogenéticos como Índice Mitótico (IM), Tiempo Generacional Promedio (TGP) y Rupturas Cromosómicas (RC) en células de la médula ósea de ratón in vivo. ←

1. DAÑO INDUCIDO POR RADIACION

1.1 Daño Directo e Indirecto

Los efectos de las radiaciones ionizantes sobre los organismos vivos pueden manifestarse a diferentes niveles de organización y son directamente dependientes de la dosis y del tiempo durante el cual se suministre dicha dosis.

Esta puede ser recibida en forma aguda durante unos cuantos minutos o en forma continua a lo largo de varios meses.

Cuando las células son irradiadas, el daño a nivel molecular puede ser provocado en forma directa o indirecta.

En el primer caso el daño se produce por la ionización directa de alguna molécula como una enzima o un ácido nucleico; esto provoca rearrreglos en la estructura y por lo tanto altera la función molecular.

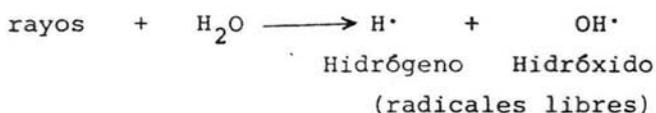
En el segundo caso, se provoca el daño a través de radicales libres producto del rompimiento de puentes químicos, cuando estos radicales libres reaccionan con otras moléculas orgánicas provocan alteraciones severas.

Existen varios tipos de radiaciones ionizantes como son los rayos X, rayos γ , rayos cósmicos, partículas α , partículas β , neutrones y protones. Estos pueden causar daño tanto por la vía directa como por la indirecta.

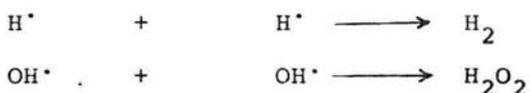
La ionización no es un proceso selectivo, los constituyentes más abundantes de un sistema complejo tendrán más probabilidad de ser ionizados. El elemento predominante de la materia viva es el agua por lo que ésta es la molécula en donde más probablemente las ionizaciones pueden ocurrir.

Los radicales libres son átomos o moléculas que tienen un electrón no apareado. Cuando la radiación ionizante interactúa con

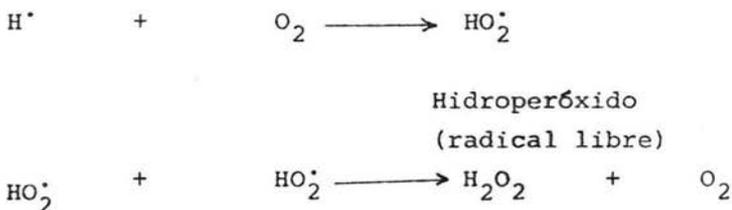
el agua, se forman dos tipos de radicales libres:



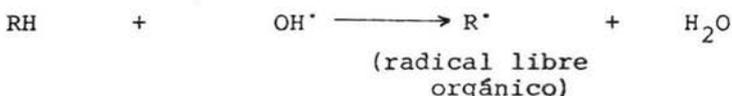
La recombinación de los radicales libres anteriores produce las siguientes moléculas:



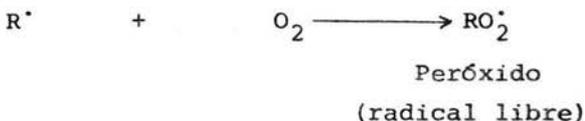
El exceso de oxígeno durante la irradiación de la célula permite la formación de radicales libres adicionales:



Cuando alguna molécula orgánica (RH) se combina con el radical libre hidróxido, se forma el radical orgánico (R[•]):



El radical libre orgánico (R[•]) se combina con el O₂ y se forma el radical libre peróxido (RO₂[•]):



En base a lo anterior, el exceso de O_2 permite la formación de dos radicales libres adicionales que son el Hidroperóxido (HO_2^{\cdot}) y el Peróxido (RO_2^{\cdot}). Esto cuenta para el incremento de daño por radiación en presencia de un exceso de oxígeno.

La mayoría de los radicales libres son de vida corta y fácilmente se combinan entre sí. El tiempo de vida de los radicales libres es generalmente menos de 10^{-10} segundos. Sin embargo, existen algunos radicales derivados de sustancias orgánicas complejas que son estables y no se combinan rápidamente. Debido a que los radicales libres contienen electrones no apareados son muy reactivos y pueden oxidar o reducir las moléculas biológicas dentro de la célula. Los radicales libres OH^{\cdot} y HO_2^{\cdot} son agentes oxidantes, mientras que el radical H^{\cdot} es un agente reductor.

Los daños por radiación son producidos tanto por la vía de la ionización como por la vía de la producción de radicales libres. Las condiciones experimentales determinan la contribución de cada vía al total del daño producido. No existe una técnica de ensayo que permita cuantificar el daño producido por ionización y el daño producido por radicales libres; sin embargo, se pueden diseñar experimentos que ayuden a estimar si el daño producido en las moléculas es debido principalmente a su ionización o a su interacción con radicales libres. Aquellos efectos de la radiación que pueden ser modificados por el tratamiento pre-exposición con algún agente radioprotector deben ser producidos principalmente por la acción indirecta. El daño producido por la vía directa no es modificable (1).

1.2 Daño sobre los Organelos Celulares

Los procesos metabólicos celulares están coordinados por el núcleo y por los organelos celulares.

Si una célula es irradiada, los organelos celulares se pueden ver afectados tanto en su morfología como en su fisiología, de tal forma, los primeros cambios citoplasmáticos apreciables son vacuolización, protuberancias, desintegración de mitocondria y retículo endoplásmico, así como cambios en el aparato de Golgi y reducción en el número de polisomas. Estos cambios traen consigo serias alteraciones en la célula lo que puede provocar su muerte.

El daño provocado por radiación sobre los organelos celulares depende de algunos factores como dosis total, razón de dosis, forma de administración de dosis (sencilla o fraccionada), tipo de radiación, radiosensibilidad celular y condiciones medio ambientales.

1.3. Daño sobre el ADN

En general, el núcleo celular es considerado como la parte más radiosensible de la célula. En éste se encuentra la cromatina en forma dispersa cuando la célula no está en división, y en forma de cromosomas cuando la célula va a dividirse.

Los cromosomas están conformados por moléculas de ADN que contienen la información que controla el comportamiento, crecimiento y diferenciación celular por lo que cualquier daño en ésta puede afectar a todo el organismo.

La radiación sobre el ADN produce varios tipos de daño como rompimientos de los puentes de hidrógeno, rompimiento de cadenas (dobles y sencillas), enlaces cruzados, alteración en el esqueleto azúcar-fosfato, daño en las bases nitrogenadas. Esto puede traer como consecuencia la inhabilidad del ADN para actuar como templado en la síntesis de nuevas cadenas de ADN o en la transcripción.

El ADN de cadena sencilla es más efectivo como templado que el de cadena doble; sin embargo, cuando el ADN es irradiado in vi-

tro, la cadena sencilla es más radiosensible que la doble (2) .

Varias propiedades del ADN muestran alteraciones después de un tiempo de la irradiación (750 - 1000R) algunos cambios en estas propiedades como sedimentación y capacidad para servir como templado pueden ser la causa de la muerte celular.

En virus con ADN de doble cadena se considera que una ruptura doble es letal, mientras que en las células de mamífero se requieren múltiples rompimientos sencillos y dobles para producir la muerte celular, ya que además de que la molécula es mucho más larga existe una estrecha relación del ADN con histonas y otras proteínas cromosómicas (3) .

Por otro lado, la mayoría de las células de mamífero son más radiosensibles en la etapa de interfase del ciclo celular, específicamente en síntesis (S). Dependiendo de la dosis se podrá observar o no daño cromosómico en células mitóticas. Se ha sugerido que los rayos X inducen muerte celular como resultado del daño en la estructura de la cromatina.

También se ha observado que en células HeLa y en células de ovario de hamster Chino la síntesis de ADN se reduce al 50% cuando las células son irradiadas con rayos X (500 -750 R) en la fase S (3) .

El mecanismo exacto por el que se deprime la síntesis del ADN por radiación no se conoce completamente; sin embargo, se propone que dicha alteración se debe a que la actividad de la ADN polimerasa decrece, o bien a que el tamaño del "pool" de los precusores del ADN se altere ya sea por cambios en la permeabilidad de la membrana, o por alteraciones de otros factores bioquímicos necesarios para la síntesis de nucleótidos y nucleósidos.

Las proteínas son producidas por la traducción del ácido ribonucléico mensajero (ARNm) que a su vez es producto de la transcripción del ADN. Las enzimas llevan a cabo las reacciones metabólici

cas, por lo tanto, cualquier cambio en la secuencia de las bases del ADN se expresará como error en la secuencia de aminoácidos de la proteína y ésta no podrá llevar a cabo su función o la realizará en forma deficiente. Sin embargo existe el sistema de reparación celular que puede corregir los daños en el ADN. Este sistema puede operar de manera "fiel" o "infiel", en el primer caso, se repara el daño y se sigue conservando la misma secuencia de nucleótidos dando origen a una cadena normal, y en el segundo caso, se repara el daño pero hay una alteración en la secuencia de nucleótidos; este evento se define como mutación, - que es heredable y parece ser a largo plazo la consecuencia principal del daño provocado por radiación sobre el ADN (fig. 1).

Las mutaciones, aberraciones cromosómicas, retardo mitótico, inhibición mitótica permanente, alteración meiótica, muerte en interfase y muerte celular instantánea son las principales consecuencias de la radiación sobre el ADN (3). Como el ADN es el principal componente de información transmitida a través de sucesivas generaciones celulares, el daño en éste trae consigo serias consecuencias sobre todo si el daño es permanente ya que afectará el comportamiento futuro de la célula.

1.4 Daño sobre la Actividad Enzimática

También se ha reportado que la radiación X sobre células de mamífero incrementa la actividad de algunas enzimas, mientras que reduce la actividad de otras. Las enzimas son más radiosensibles durante el período de su síntesis y se vuelven altamente radioresistentes después de haber completado dicho período.

Estos efectos de la radiación pueden manifestarse de diferentes maneras dependiendo del tipo celular que se trate, por ejemplo en células de neuroblastoma irradiadas con rayos X, se observa un incremento en la actividad de algunas enzimas involucradas en

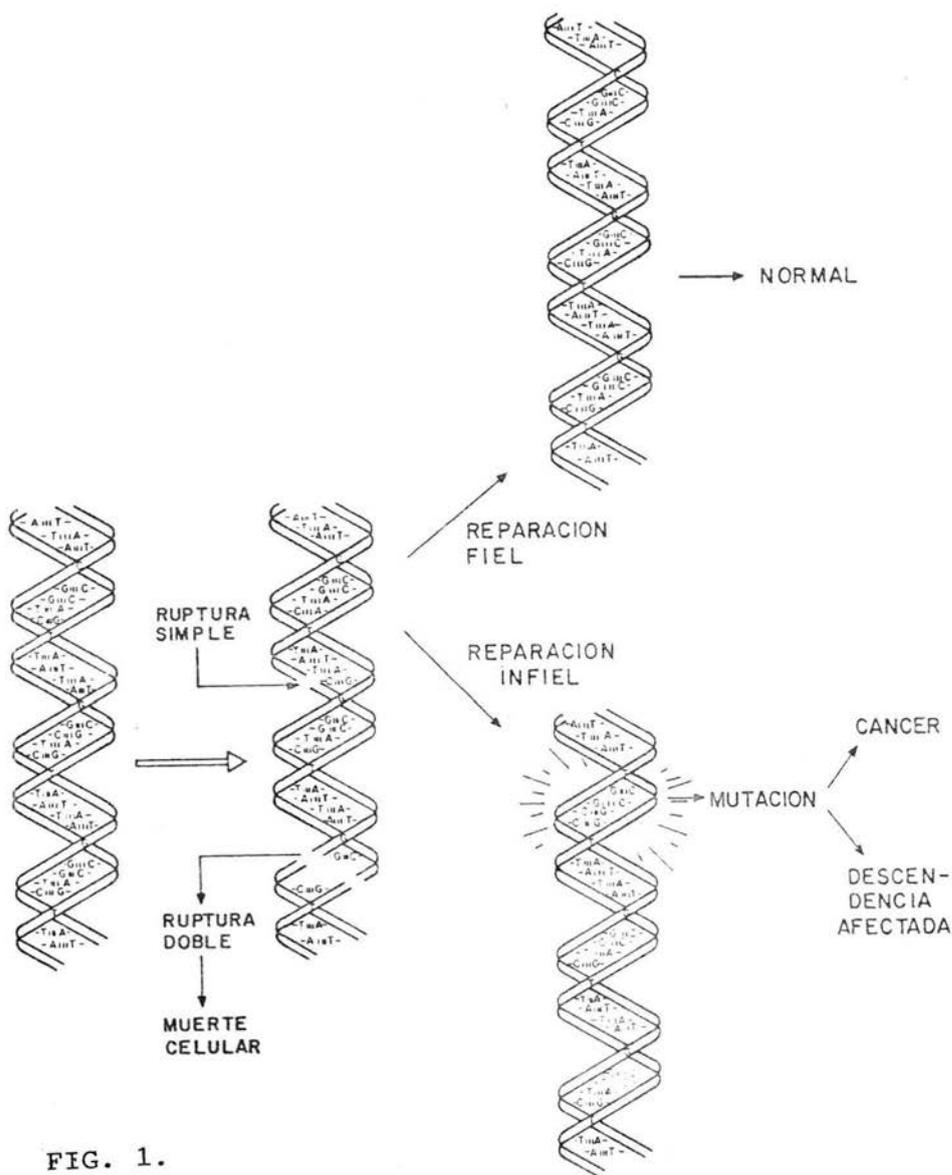


FIG. 1.

DAÑO SOBRE LA MOLECULA DE ADN INDUCIDO POR RADIACION.

(108).

la ruta metabólica de la catecolamina; así como también se incrementa la actividad de algunas enzimas lisosomales como la ARNasa en células de cáncer uterino irradiadas (3). No obstante se ha reportado que la radiación X inhibe la actividad de algunas enzimas del hígado como la triptofano pirrolasa, y la actividad de varias enzimas del tejido intersticial como la deshidrogenasa del ácido succínico (3).

La síntesis de muchas enzimas como la timidina cinasa y la ADN polimerasa que son importantes en la síntesis del ADN, así como la monoamina oxidasa que es una enzima mitocondrial que juega un papel importante en la deaminación de las aminas biogénicas, son de vital importancia para las células, por lo tanto, cualquier alteración en la síntesis enzimática puede provocar daños celulares severos (3).

1.5 Daño sobre el Metabolismo Celular

También se han observado los efectos de la radiación a nivel del metabolismo celular. Por ejemplo, la glicólisis se incrementa marcadamente en timocitos después de ser irradiados, mientras que en las células cerebrales la velocidad de este proceso metabólico decrece a dosis de radiación equivalentes a 9000 R (3). El contenido de glucógeno en el cerebro de rata se incrementa notablemente después de la exposición a 1500 R (3). Por otro lado, la eficiencia de la fosforilación oxidativa decrece principalmente en los tejidos linfoides después de la irradiación.

Es importante hacer notar que los parámetros bioquímicos mencionados requieren estricto control ya que sus niveles parecen variar con la edad, sexo, raza y tiempo de ensayo. En general se puede decir que la intensa investigación sobre los efectos de la radiación ionizante a nivel molecular ha incrementado el conocimiento sobre el mecanismo de producción del daño radioinducido. (3).

2 MEDICION DEL DAÑO GENETICO

Existen varias formas para medir el daño genético causado por radiación. La posible utilización de sistemas tanto in vitro como in vivo ha permitido la realización de numerosos estudios al respecto. Se han determinado varios parámetros que se toman en cuenta para evaluar el daño radioinducido a nivel celular.

Tales parámetros incluyen rompimientos de cadena sencilla o doble en el ADN, % de muerte celular, % de supervivencia celular, % de síntesis de ADN, frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales (fragmentos, anillos, dicéntricos y translocaciones recíprocas) y numéricas (poliploidias y aneuploidias), índice mitótico, frecuencia de micronúcleos, tiempo generacional promedio e intercambios entre cromátides hermanas.

2.1 Intercambio entre Cromátides Hermanas (ICH)

El ICH representa el intercambio de doble banda entre las moléculas de ADN de las cromátides hermanas de un mismo cromosoma. Tales intercambios que son detectados en preparaciones de cromosomas en metafase involucran rompimientos y reuniones del ADN, pero las bases moleculares de la formación de ICH no se conocen a fondo.

2.1.1 Antecedentes

El primer trabajo que sugirió la existencia de ICH fué el reportado por McClintock en 1938 (4) quien observó que los cromosomas en anillo de células de maíz se separaban normalmente durante la división celular, pero que eventualmente, daban lugar a la formación de cromosomas dicéntricos del doble del tamaño original. Sin embargo, la falta de conocimiento sobre la estructura de la cromatina no permitió sugerir algún modelo de la formación de estos anillos dicéntricos y el fenómeno de ICH estuvo sujeto a la especulación por varios años (fig. 2).

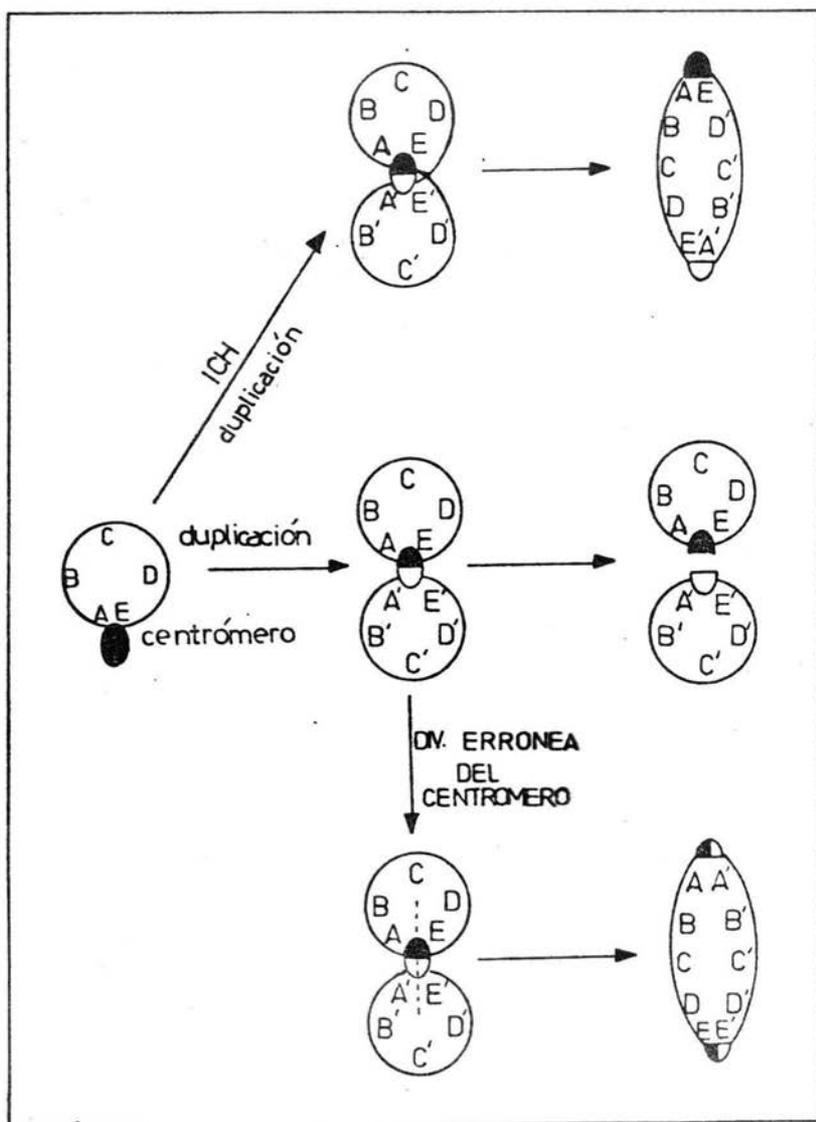


FIG. 2. CROMOSOMAS EN ANILLO, McCLINTOCK (1938).

Posteriormente, Taylor en 1957 (5) obtuvo la primera evidencia directa del ICH con la ayuda de técnicas autorradiográficas y células de Bellevaria romana. Permitiendo la duplicación de los cromosomas por un ciclo en presencia de timidina tritiada (^3HdT) seguido por un ciclo en un medio no radiactivo, observó que los cromosomas presentaban una cromátide marcada y otra sin marcar. Siguiendo la distribución del ácido desoxirribonucleico (ADN) marcado a través de sucesivas divisiones celulares en ausencia de ^3HdT , Taylor observó que la cadena original de ADN es conservada durante la duplicación y que se distribuye de una manera precisa en cada división celular. Con esto se demostró la duplicación semiconservativa del ADN y la presencia de una sola molécula de ADN de doble banda por cromátide (fig. 3).

También observó que frecuentemente se presentaban alteraciones en el marcaje de los cromosomas en segunda división, ya que algunos fragmentos de la cromátide marcada se intercambiaban con fragmentos de la cromátide hermana no marcada. Este hecho constituyó la primera demostración inequívoca del fenómeno de ICH.

2.1.2 Técnicas para Detectar el ICH

La utilización del método autorradiográfico convencional no constituyó un sistema muy adecuado para detectar ICH debido a la resolución limitada del mismo y al requerimiento del uso del tritio que induce ICH per se.

Latt en 1973 (6) desarrolló un nuevo método para detectar ICH's con mayor resolución que no requería el uso de timidina tritiada. Esta técnica se basa en la incorporación del análogo de base 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdUrd) durante dos ciclos replicativos o al menos durante el primero de ellos. Posteriormente se tiñen los cromosomas con un colorante fluorescente bibenzimida 33258 - Hoechst y debido a que los átomos de bromo del análogo reducen la fluorescencia del colorante, al analizar las preparaciones en el microscopio de fluorescencia la cromátide que se encuen-

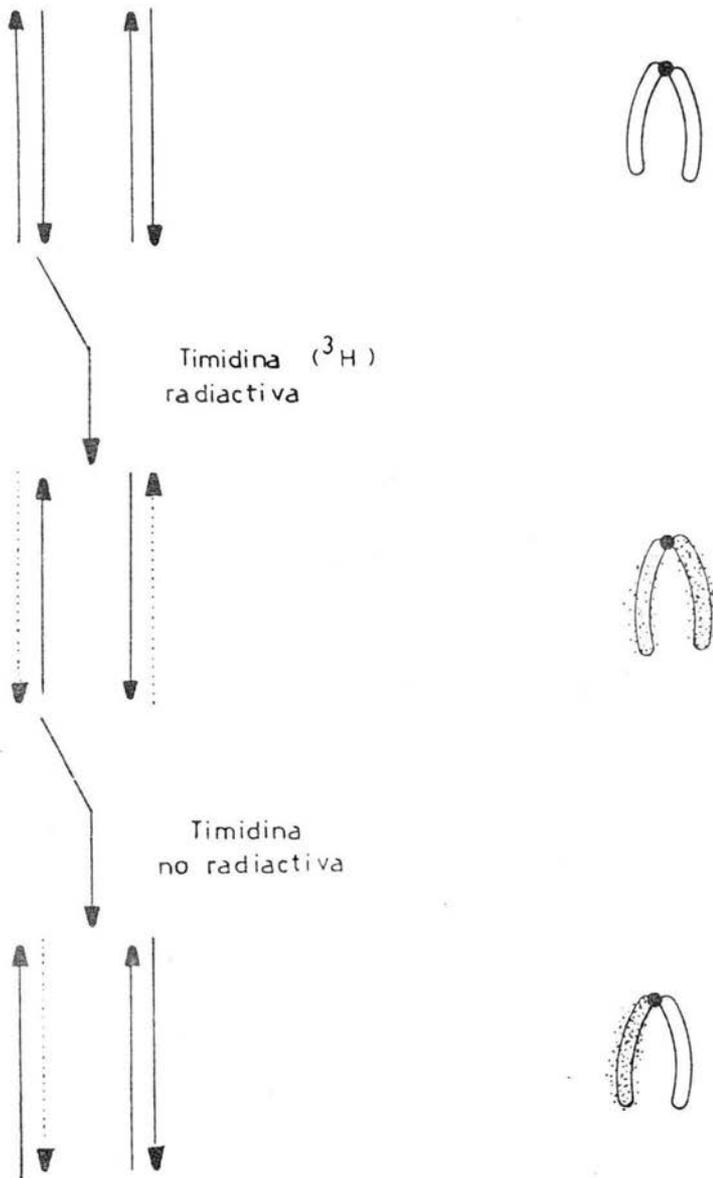


FIG. 3. EXPERIMENTO DE TAYLOR, (1957).

tra bifilarmente sustituida por BrdUrd se observa opaca mientras que la cromátide unifilarmente sustituida se observa brillante. También se pueden utilizar otros colorantes fluorescentes como la quinacrina, naranja de acridina, proflavina, etc. Esta alternativa constituyó una técnica de alta resolución ya que es posible detectar con claridad intercambios de segmentos tan pequeños como lo permita la resolución del microscopio óptico. Sin embargo, este método tiene la desventaja de que la fluorescencia de las cromátides teñidas se desvanece rápidamente.

Posteriormente Perry y Wolff en 1974 (7) desarrollaron el método llamado Fluorescencia Plus Giemsa (FPG) el cuál consiste en dejar las células durante dos ciclos de replicación en presencia de BrdUrd y después teñirlas con Giemsa. Las cromátides bifilarmente sustituidas con BrdUrd se tiñen más débilmente que las unificilares (figs. 4 y 5).

Esta técnica permite la tinción diferencial entre ambas cromátides así como la detección inequívoca de ICH y la obtención de preparaciones permanentes que faciliten la observación.

Esta técnica requiere del uso de luz solar, luz ultravioleta o luz de mercurio por diferentes períodos después de la tinción con 33258 Hoechst. La exposición a la luz produce una reacción de fotólisis en el ADN doblemente sustituido por BrdUrd y esto reduce la tinción con Giemsa, mientras que en la cromátide unifilarmente sustituida el Giemsa tiñe normalmente permitiendo una tinción intensa. De esta manera se obtiene una clara diferenciación de las cromátides hermanas y preparaciones permanentes (8).

Existen varias formas para administrar la BrdUrd in vivo, como la aplicación de inyecciones intraperitoneales múltiples de solución de BrdUrd, infusiones subcutáneas, intravenosas, o por implantación subcutánea de una tableta de BrdUrd (9).

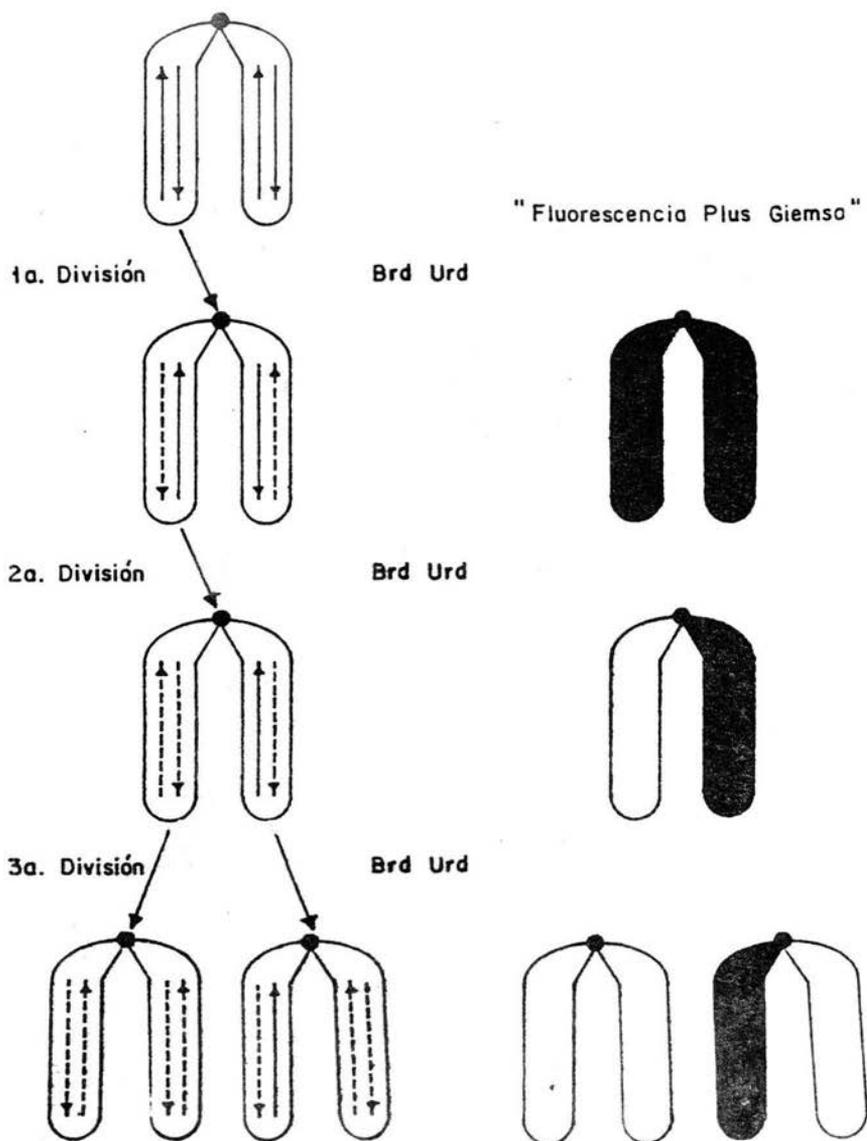


FIG. 4. DIFERENCIACION DE LAS CROMATIDAS HERMANAS POR MEDIO DE LA TECNICA "FLUORESCENCIA PLUS GIEMSA".



A



B



C

FIG. 5. METAFASES DE PRIMERA (A), SEGUNDA (B) Y TERCERA (C) DIVISION.

Otro método alternativo para la administración de la BrdUrd es la inyección intraperitoneal de BrdUrd adsorbida a carbón activado, este método además de ser sencillo ha permitido obtener una clara diferenciación entre las cromátides hermanas tanto en espermatogonia como en células de la glándula salival y de la médula ósea (10).

2.1.3 Significado Biológico

El desarrollo de la técnica de diferenciación de las cromátides hermanas ha facilitado la investigación acerca del fenómeno de ICH, aunque su significado biológico no se ha podido establecer.

Se ha demostrado que la inducción de ICH por rayos U.V. en células de hamster Chino puede ser provocada en cualquier etapa del ciclo celular siempre y cuando se produzca una lesión persistente que se mantenga hasta la etapa de síntesis. Esto sugiere que es durante la síntesis cuando se lleva a cabo el intercambio de doble banda (11).

Kato en 1980 (12) estudiando la relación entre la duplicación del ADN y el ICH observó que la frecuencia de ICH inducida por la luz azul fluorescente parece incrementar como se incrementa el número de puntos de síntesis del ADN. Esta relación constituye una evidencia de que el sitio de intercambio está confinado a la horquilla de replicación.

Schvartzman y Gutierrez en 1980 (13) observaron que la mayor frecuencia de ICH inducida en meristemas de Allium cepa se detecta cuando el daño por luz visible se induce en la fase de síntesis (S). La efectividad de este tratamiento para inducir ICH decrece conforme la célula pasa de S a G₂.

Estos resultados sugieren por un lado que la luz visible solo induce ICH si la radiación coincide con la etapa de síntesis (S), y por otro lado que el incremento de ICH es menor mientras

mayor sea el período entre la inducción de daño y la etapa de síntesis ya que la célula tendrá más tiempo para reparar dicho daño.

→ También se ha demostrado que los ICH ocurren en forma espontánea en células no expuestas al menos en forma intencional a algún agente exógeno inductor de ICH.

Kato en 1974 (14) observó que en células pseudopoliploides de hamster Chino tratadas con concentraciones entre 0 - 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ de BrdUrd la frecuencia de ICH es constante, sugiriendo que este es el valor espontáneo de este evento. Por arriba de esta concentración la frecuencia de ICH se incrementa en forma proporcional.

Tice en 1976 (15) reportó que no hay diferencia significativa en la frecuencia de ICH entre las células de rata Wistar tratadas con la mínima dosis de BrdUrd que permite la detección de ICH (1.9 $\mu\text{g}/\text{g}$ de peso corporal) y las células tratadas con una dosis mayor (7.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ de peso corporal). El valor constante en la frecuencia de ICH en células tratadas con BrdUrd entre 1.9 - 7.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ de peso corporal indica que el valor promedio de ICH espontáneo in vivo es de 1.5 ICH/célula.

Así mismo, se observó que por arriba de este rango de concentración la frecuencia de ICH incrementa hasta el nivel de saturación.

→ Ambos trabajos sugieren que los ICH ocurren espontáneamente, pero que por arriba de determinadas dosis de BrdUrd la frecuencia de ICH aumenta en forma dependiente.

También se ha observado que el nivel basal de ICH varía dependiendo de los agentes externos utilizados para la detección del mismo como la timidina tritiada o la BrdUrd, o las condiciones del medio de cultivo, de la sensibilidad celular y la realización in vivo o in vitro del experimento (9).

Morales - Ramírez et. al. en 1984 (10) detectaron diferentes valores basales de ICH en distintos tejidos de ratones Balb-C, obteniéndose el valor más bajo en células de espermatogonia - (1.7 ICH/célula), para células de médula ósea se obtuvo un valor de 3.5 ICH/célula, y para células de la glándula salival se obtuvo el valor más alto de 5.6 ICH/célula. Tal vez en las células de glándula salival el valor de ICH es mayor debido al uso del isoproterenol para inducir la división celular, o tal vez se acumulan lesiones en el material genético que se manifiestan hasta la división.

Davidson en 1980 (16) observó que incrementando la concentración de BrdUrd en el medio, la frecuencia de ICH también aumenta aunque la incorporación de BrdUrd en el ADN se mantenga constante a un 60%. Esto sugiere que el factor que determina la inducción de ICH por BrdUrd es la concentración en el medio y que el grado de sustitución juega un papel menos importante. Tal vez la perturbación provocada en el metabolismo de los nucleótidos sea la clave para la inducción de ICH por altas concentraciones de BrdUrd.

Recientemente, Morales - Ramírez et. al. en 1987 (17) adaptando el método de la diferenciación en tres tonos para las células de médula ósea de ratón in vivo observaron que la frecuencia de ICH en células de 1^a, 2^a y 3^a división en presencia de BrdUrd aumenta en cada ciclo de división. Tomando en cuenta que la incorporación acumulativa de BrdUrd es cada vez mayor para cada ciclo se infirió que la BrdUrd influye de manera proporcional sobre la inducción de ICH. De estos datos se estimó que la frecuencia espontánea de ICH es de 0.15 ICH/célula/ciclo celular, la cual es mucho más baja que la reportada en trabajos anteriores. Así mismo, reportaron que la frecuencia de células sin ICH en la 1^a división fué entre 65 y 75% después de tratar los ratones con 0.25 mg BrdUrd/g de peso corporal.

La frecuencia basal y la inducción de ICH también se ha estudiado entre algunas enfermedades hereditarias caracterizadas por la inestabilidad de sus cromosomas y la predisposición para el desarrollo de neoplasias (18).

El síndrome de Bloom es uno de los casos más estudiados, las características clínicas de este síndrome son el retardo en crecimiento, sensibilidad al sol que se manifiesta como erupción en la piel, alteración en el sistema inmune y predisposición al cáncer. A nivel cromosómico se detecta un incremento en el número de rompimientos cromosómicos y rearreglos en comparación con las células normales.

La frecuencia basal de ICH detectada para este síndrome es de 89.0 ICH/célula, lo cual representa un incremento de más de 12 veces el valor control.

Sin embargo, en células de personas que presentan algún otro síndrome autosómico recesivo con inestabilidad cromosómica y predisposición al cáncer, así como la Anemia de Fanconi y Ataxia Telangiectasia o síndrome de Louis-Bar, la frecuencia basal de ICH es igual a la de las células normales (19).

Varios agentes tanto físicos como químicos han demostrado tener la capacidad de inducir ICH. Dentro de los agentes químicos se encuentra la Mitomicina C, Etilmetano sulfonato, Metilmetano sulfonato (20); Hidroxiurea, aphidilcolin (21); Porfiromicina (22); etc. Dentro de los agentes físicos se encuentra el calor (23), ultrasonido (24), luz ultravioleta (11), luz visible (13), luz azul fluorescente (12), y radiaciones ionizantes (9, 25, 26, 27, 28, 29) (fig. 6).

Se han propuesto varios modelos para explicar el mecanismo involucrado en la formación de ICH.

Uno de los modelos fué propuesto por Painter en 1980 (30) en el que se sugiere que las lesiones inducidas en el ADN producen un

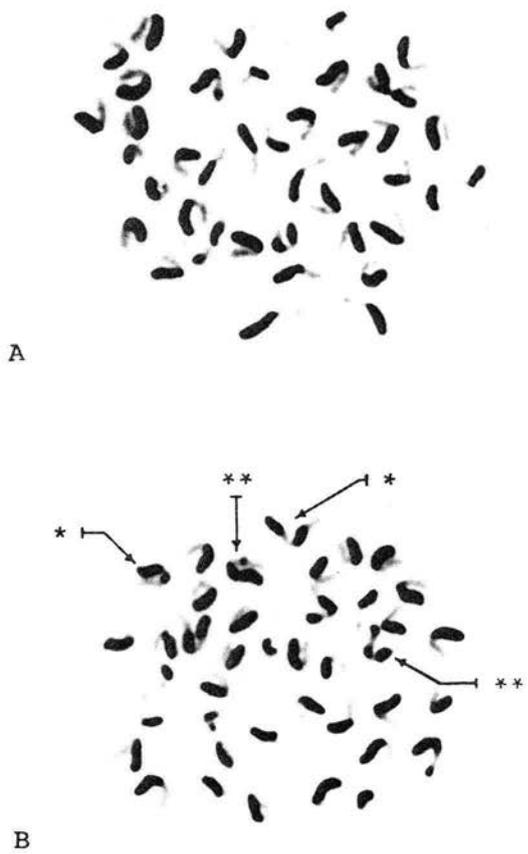


FIG. 6 (A): METAFASE DE UN GRUPO CONTROL
 (CON BAJA FRECUENCIA DE ICH)
 (B): METAFASE DE UN GRUPO IRRADIADO
 (CON ALTA FRECUENCIA DE ICH,
 * SENCILLOS Y ** DOBLES).

retardo en la duplicación, esto trae como consecuencia que los duplicones terminen a diferentes tiempos la síntesis y al llegar al nivel del "cluster" (agrupamiento de duplicones) se produzca una ruptura de la banda parental, posteriormente cuando el duplicón retrasado termine su duplicación se da una reasociación aleatoria entre bandas parentales e hijas permitiendo el intercambio de doble banda.

Ishii y Bender en 1980 (31) proponen otro modelo tomando en cuenta que algunos inhibidores específicos de la síntesis del ADN incrementan la frecuencia de ICH tanto basal como inducidos por luz ultravioleta. Se postula que cada banda parental ocasionalmente se rompe en la horquilla de replicación y que algunas veces los extremos libres se unen con las nuevas bandas hijas recién sintetizadas que tienen la misma polaridad, de tal forma que surge el intercambio de doble banda.

A este mecanismo se le conoce como modelo de la desviación replicativa y se ha considerado que constituye un modelo interesante ya que explica la reparación postreplicativa que permite la progresión de la síntesis de ADN a pesar de la presencia de lesiones además de que explica la generación de ICH.

2.1.4 ICH como Indicador de Daño

El análisis de ICH se ha usado como un método alternativo para detectar mutágenos físicos y químicos.

2.1.4.1 Ventajas y Desventajas del Método (32)

El método presenta las siguientes ventajas:

1. Excelente para detectar agentes alquilantes como el Etilmetano sulfonato y la Mitomicina C que producen aductos en el ADN.

2. Es un método más sensible que el de aberraciones cromosómicas.
3. Hay sistemas que permiten detectar tanto compuestos de acción directa como compuestos que requieren activación metabólica.
4. Es un método fácil y rápido.
5. Permite el estudio de células de mamífero de diferentes tejidos incluyendo células germinales tanto in vitro como in vivo.
6. También pueden hacerse estudios en plantas y otros animales no mamíferos para monitorear agentes genotóxicos.
7. Puede ser usados para monitorear poblaciones humanas.
8. El resultado positivo de inducción de ICH generalmente indica que el agente es mutágeno, la prueba da pocos falsos positivos.

Sin embargo, también existen las siguientes desventajas:

1. Poco sensible a compuestos como la bleomicina que induce rompimientos de doble banda.
2. No se sabe el mecanismo de formación de ICH.
3. El papel que juega la BrdUrd en el nivel basal de inducción de ICH.

2.1.4.2 Inducción de ICH por Agentes Químicos

Se ha acumulado mucha información acerca de la inducción de ICH por mutágenos químicos, aunque el modo de acción varía de un a

gente a otro.

Latt en 1974 (33) demostró que la Mitomicina C que es un agente alquilante capaz de producir enlaces cruzados en el ADN, tiene la capacidad de inducir ICH en linfocitos humanos expuestos por 3 días a dosis tan bajas como 0.003 $\mu\text{g/ml}$ de Mitomicina C. Así mismo, detectó que la Mitomicina C tiene mayor capacidad para inducir ICH que para inducir aberraciones cromosómicas.

En base a lo anterior se sugiere que la inducción de ICH por Mitomicina C opera en células de mamífero para remover los enlaces cruzados producidos por ésta, y que tal vez por esta razón los ICH sean una característica del proceso de reparación celular del ADN.

Por otro lado, Perry y Evans en 1975 (20) observaron el efecto de varios agentes químicos sobre la inducción de ICH. En este estudio se detectó que los agentes alquilantes en particular los bifuncionales (Mitomicina C y Mostaza nitrogenada) son potentes inductores de ICH. Otros agentes alquilantes monofuncionales como la Mostaza de quinacrina también inducen ICH así como aberraciones cromosómicas; otros dos agentes intercalantes como la Adriamicina y el fluorocromo 33258 Hoechst mostraron efectividad para inducir ICH, la Adriamicina también induce efectivamente aberraciones cromosómicas. De los agentes sulfonatos el Metilmetano sulfonato resultó ser un inductor más potente tanto de ICH como de aberraciones cromosómicas que el Etilmetano sulfonato. Otro mutágeno carcinógeno probado fué el 4-nitroquinoline 1-oxide que también mostró eficiencia para inducir ICH.

Solo 2 de los 13 químicos probados en este estudio no indujeron ICH; la Hidrazida maleica ampliamente usada como herbicida y que es un eficiente inductor de aberraciones cromosómicas en plantas, y el agente antineoplástico Ciclofosfamida ya que éste requiere de la activación metabólica para convertirse en un agente alquilante bifuncional activo capaz de inducir daño.

De estos resultados se concluyó que determinando la frecuencia

de ICH es posible detectar la exposición celular a determinados mutágenos a dosis más bajas que las necesarias para detectar aberraciones cromosómicas.

En un estudio realizado por Carrano et. al. en 1979 (22) se comprobó que tanto la Mitomicina C como la Porfiromicina pueden inducir ICH en células de hamster Chino siendo la segunda más efectiva que la primera. Sin embargo, la Decarbamoil Mitomicina C que es un derivado monofuncional de la Mitomicina C pero que en lugar de formar enlaces cruzados forma monoadductos, tiene mayor capacidad que la Mitomicina C y la Porfiromicina para inducir lesiones en el ADN que se manifiesten como ICH.

Estos resultados indican que la formación de enlaces cruzados en el ADN no es la lesión más efectiva responsable de la inducción de ICH.

Haciendo estudios sobre la inducción de ICH por inhibidores de la síntesis de ADN, Ishii y Bender en 1980 (31) reportaron que la Hidroxiurea (inhibidor de la ribonucleótido reductasa), la 1-D arabinofuronasil citosina y la aphidilcolina (inhibidores de la polimerasa α), incrementan la frecuencia basal de ICH.

Se sugiere que la inhibición de la síntesis de ADN puede ser una de las causas de inducción de ICH.

2.1.4.3 Inducción de ICH por Radiaciones Ionizantes

Existen varios trabajos relacionados con la inducción de ICH por radiaciones ionizantes en donde se reportan datos contradictorios ya que en algunos de ellos se considera que los ICH constituyen una prueba sensible de exposición a las radiaciones ionizantes (25,26,27,28,29) y en otros se considera que no es un sistema sensible para detectar daños por radiación (20,34,35).

Perry y Evans en 1975 (20) demostraron que los cromosomas expuestos a rayos X en G_1 sí se detecta un incremento en la frecuen-

cia en ICH.

Sin embargo, ellos resaltan que la inducción de ICH es mínima comparada con la inducción de aberraciones cromosómicas; al comparar la dosis que duplica la incidencia basal de cada evento, la cuál resultó ser mucho mayor para los ICH's, por lo que concluyen que la lesión inducida por rayos X que produce ICH es relativamente ineficiente comparada con los eventos que producen aberraciones, o bien que la mayoría de las lesiones son reparadas antes de llegar a la etapa de síntesis.

Por otro lado, Littlefield et. al. en 1979 (35) irradiando linfocitos humanos en G_0 con una dosis de 150 - 300 R de rayos gamma no detectan diferencias significativas respecto al control en cuanto a la frecuencia de ICH. Ellos suponen que la inducción de ICH por radiaciones ionizantes reportada en células con su ADN sustituido por BrdUrd se debe precisamente al efecto aditivo de la BrdUrd. También sugieren que posiblemente la nula inducción de ICH en células irradiadas en G_0 se deba a la reparación del daño entre G_0 y S.

Así mismo, Stenstrand en 1985 (34) reportó que no detecta inducción de ICH por 1.5 Gy de radiación gamma en linfocitos humanos, además de que no hay diferencias significativas entre los valores de ICH en células irradiadas de sujetos fumadores y no fumadores.

Se ha estudiado la inducción de ICH y aberraciones cromosómicas por rayos X en fibroblastos de embrión de ratón mantenidos en fase estacionaria de crecimiento por varios periodos (0 - 24 horas) para permitir la reparación. En este estudio se observó que tanto las aberraciones cromosómicas como los rompimientos de banda sencilla decrecen conforme pasa más tiempo después de la irradiación; este evento coincide a

su vez con la elevación de la supervivencia celular. En contraste, se observó una elevación en la frecuencia de ICH durante las cuatro primeras horas postexposición y posteriormente la frecuencia disminuye hasta los valores control. Los cambios en la frecuencia de ICH durante los períodos de recuperación no son paralelos a los detectados para rompimientos de banda sencilla y aberraciones cromosómicas (28,36). Los resultados anteriores sugieren que la inducción de ICH y aberraciones cromosómicas opera de diferente manera.

Comparando la cinética de producción de ICH y aberraciones cromosómicas inducidos por rayos X sugieren que los mecanismos de formación de ambos eventos son independientes. Tal vez la producción de ICH sucede cuando el daño se induce en el ADN un poco antes de la replicación, y la producción de aberraciones cuando el daño se induce principalmente después de la replicación (27).

Se ha observado que la presencia de oxígeno incrementa más la frecuencia de aberraciones cromosómicas que la frecuencia de ICH inducidas por radiación gamma (37). Comparando estos resultados con datos previamente reportados en los que se observa que el oxígeno aumenta más la producción de daños en las bases del ADN, se concluyó que los ICH son producidos por daños en las bases más que por rompimientos de cadena sencilla, mientras que ambos tipos de daño producen aberraciones directa o indirectamente.

Abramovsky en 1979 (29) reportó una considerable inducción de ICH en linfocitos humanos por radiación gamma (25 - 200 Rads) tanto en G_1 como en G_2 siendo mayor en la primera etapa.

Los estudios realizados por Morales - Ramírez et. al (25,26) han demostrado que la radiación gamma puede inducir ICH tanto en células con su ADN sustituido con ErdUrd como en células sin el ADN

sustituido, aunque se observó que la BrdUrd sensibiliza al ADN respecto a la inducción de ICH por radiación gamma. También se ha observado que a dosis bajas como 0.36 Gy se inducen ICH's en frecuencia neta mucho más alta que los rompimientos cromosómicos. Además se detectó la misma frecuencia de ICH en células con o sin rompimientos, lo que sugiere que ambos eventos son independientes.

También se ha concluido que la lesión inducida por rayos gamma que produce ICH antes de la incorporación de BrdUrd es estable y no fácilmente reparada persistiendo al menos por 8 ciclos celulares después de la irradiación en células de médula ósea de ratón in vivo (9).

La inducción de ICH por radiaciones ionizantes depende de varios factores experimentales como son dosis de radiación, tiempo de radiación, dosis de BrdUrd, tipo celular, etapa del ciclo celular en que se encuentre la célula al momento de irradiar, de las condiciones in vitro o in vivo, etc.

2.2 Otros Indicadores de Daño

Existen además otros parámetros que se pueden usar para monitorear el daño celular inducido por radiación; entre éstos se encuentra el Índice Mitótico, el Tiempo Generacional Promedio y las Rupturas Cromosómicas.

2.2.1 Índice Mitótico (IM)

El IM indica la proporción de células que se encuentran en división. Si algún agente provoca disminución del IM, significa que de alguna manera está afectando a las células.

2.2.2 Tiempo Generacional Promedio (TGP)

El TGP indica el promedio del tiempo que tardan las células en

dividirse. Mediante la tinción diferencial de las cromátides hermanas, se pueden distinguir las células que han pasado por uno, dos o tres ciclos de división (ver figs. 4 y 5). De acuerdo a una ecuación desarrollada por Ivett y Tice en 1982 es posible establecer la duración promedio del ciclo celular de la siguiente forma:

$$TGP = \frac{T}{(\% 1^a \text{ div.} \times 1) (\% 2^a \text{ div.} \times 2) (\% 3^a \text{ div.} \times 3)}$$

En donde:

TGP = Tiempo Generacional Promedio

T = Tiempo de administración de la BrdUrd

% 1^a div. = Porcentaje de células en primera división

% 2^a div. = Porcentaje de células en segunda división

% 3^a div. = Porcentaje de células en tercera división

Este parámetro permite detectar si el agente en cuestión produce retardo mitótico como consecuencia del daño cromosómico causado.

2.2.3 Rupturas Cromosómicas (RC)

Es bien sabido desde hace tiempo que las alteraciones en la estructura cromosómica (aberraciones estructurales) y las alteraciones en el número cromosómico (aberraciones numéricas) surgen espontáneamente en células somáticas y germinales de plantas y animales, y sus frecuencias se incrementan cuando las células son expuestas a ciertos agentes mutágenos (38) (figs. 7, 8 y 9).

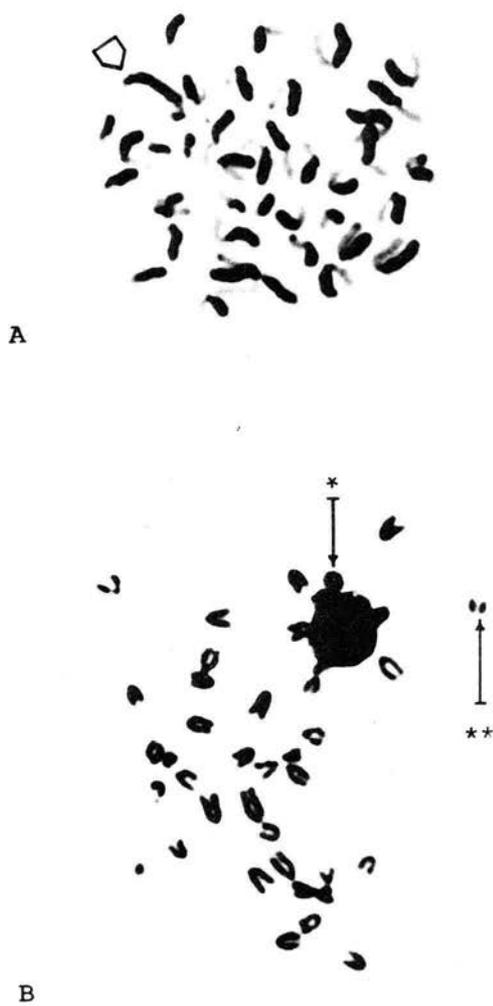


FIG. 7. METAFASES CON ABERRACIONES ESTRUCTURALES
(A): DICENTRICO Y (B): * ANILLO, ** FRAGMENTOS



A



B

FIG. 8. METAFASES CON ABERRACIONES NUMERICAS
(A): POLIPLOIDIA Y (B): ENDORREDUPLICACION.



FIG. 9. METAFASE CON ABERRACIONES ESTRUCTURALES (* DICENTRICO Y ** FRAGMENTOS), y NUMERICA (POLIPLOIDIA).

En un experimento de radiación realizado por Müller et. al. en 1954 (39) se descubrieron varios tipos de rearrreglos cromosómicos por medio de pruebas citogenéticas. Este evento fué precedido por la evidencia citológica de la producción de rupturas cromosómicas y rearrreglos en células de plantas irradiadas.

Desde entonces, se ha acumulado una formidable cantidad de datos tanto de estudios genéticos como citogenéticos sobre la inducción de aberraciones cromosómicas por radiación ionizante y otros mutágenos en diversos organismos eucarióticos (109).

Se sabe que gran parte de las lesiones producidas por radiación ionizante se debe a las rupturas de cadena sencilla y doble del esqueleto fosfodiéster. Sin embargo, se ha demostrado que la mayoría de ambos tipos de lesiones pueden ser reparados durante la primera división mitótica después de la irradiación (40).

Las rupturas cromosómicas son inducidas en células irradiadas durante la etapa de síntesis (S) del ADN o en la etapa posterior a la síntesis (G_2).

Las rupturas cromosómicas detectables en células somáticas incluyen formaciones como deleciones terminales o fragmentos, anillos o acéntricos y dicéntricos (41) (fig. 10).

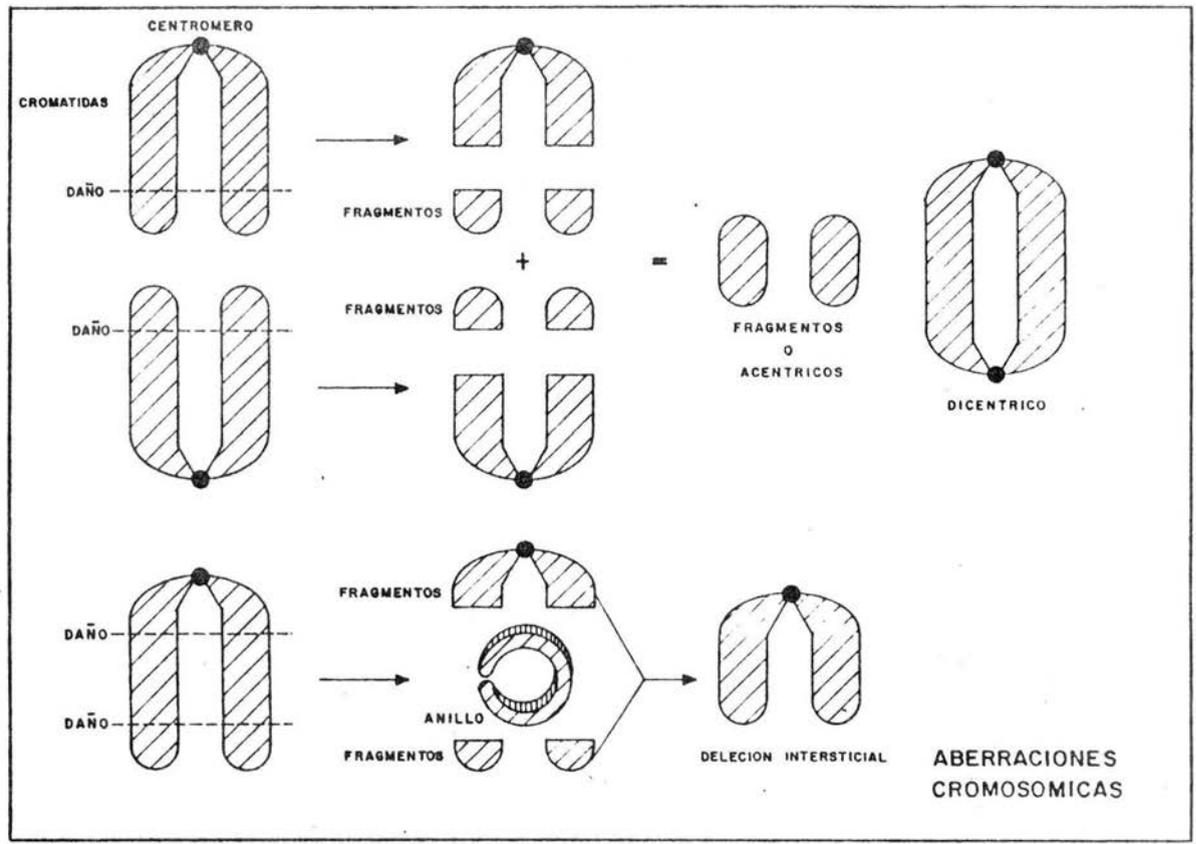


FIG. 10. PRODUCCION DE RUPTURAS Y ABERRACIONES CROMOSOMICAS.

3. RADIOPROTECCION

El incremento en la utilización de las radiaciones ionizantes en las últimas décadas ha promovido el interés por estudiar el efecto de las radiaciones y las posibles formas de protección contra los daños inducidos por éstas.

Se considera como radioprotector a cualquier sustancia o procedimiento que protege a las células contra el daño inducido por radiación cuando se administra antes de la exposición. Los radioprotectores no reducen el daño si son administrados después de la irradiación. La eficiencia de los radioprotectores in vitro difiere marcadamente de los radioprotectores in vivo ya que por ejemplo, algunos radioprotectores que son muy efectivos in vitro no tienen efecto apreciable in vivo y viceversa.

Existen dos propósitos principales en el estudio de la modificación del daño por agentes radioprotectores: (1) Proteger al tejido normal preferencialmente durante terapias de irradiación de tejidos malignos (radioterapia), y (2) Obtener más información sobre el mecanismo de daño radioinducido (3).

Aunque se han hecho varios trabajos en relación con el primer propósito (42,43), no se han obtenido resultados determinantes ya que los experimentos realizados con animales permiten inferir que las dosis requeridas para proteger en humanos resultarían tóxicas y aparentemente los agentes protegen por igual a los tejidos normales y malignos. Sin embargo, se han reportado algunos trabajos en donde se usa la acción combinada de radiosensibilizadores y radioprotectores para sensibilizar a las células tumorales y eliminarlas con radiación, y para evitar que las células normales de los tejidos sanos se dañen durante la radioterapia (44).

No obstante, los estudios que involucran agentes radioprotectores han incrementado nuestro conocimiento sobre el mecanismo de daño inducido por radiación.

Uno de los criterios de evaluación de la radioprotección es el "Factor de Reducción de Dosis" (DRF), éste indica cuantas veces se debe elevar la dosis de radiación en presencia del radioprotector para obtener el mismo efecto de la dosis sin radioprotector. El DRF es igual a la dosis que produce el efecto en presencia del compuesto sobre la dosis que produce el mismo efecto en ausencia del compuesto; por lo tanto mientras mayor sea el valor del DRF mayor es la radioprotección (1).

3.1 Tipos de Radioprotección (1)

En décadas recientes, se ha estudiado ampliamente tanto in vitro como in vivo la modificación del efecto de radiación por varios agentes radioprotectores tanto físicos, como químicos y biológicos.

3.1.1 Radioprotección Física

Dentro de la radioprotección física existen varios agentes a considerar como son la exposición parcial, la ausencia de oxígeno y la disminución de temperatura.

3.1.1.1 Exposición Parcial

La exposición parcial del cuerpo en el rango de dosis LD_{50} (dosis que induce la muerte en el 50% de la población) reduce significativamente el daño inducido por radiación. La protección del área rica en médula ósea es relativamente más efectiva que la de otras áreas ya que las células de médula no dañadas suministran nuevas células a la porción dañada del cuerpo por lo que la depresión en médula no es tan seria como para provocar la muerte. El valor de LD_{50} para ratas no blindadas es de 600R; en cambio para las ratas expuestas a radiación con blindaje de plomo a nivel de abdomen y tórax es de 900R, y para las que tienen blindaje solo a nivel de cabeza es de 700R. Cubriendo exteriormente el bazo con placas de

Falta página

N° 38

vado de 650 a 1760R cuando los ratones son irradiados mientras se mantienen en una temperatura entre 0 y 0.5°C, cabe señalar que a esta temperatura los ratones sólo pueden sobrevivir por 30 minutos.

La anoxia debe ser el factor más importante en la protección aportada por bajas temperaturas, ya que la adición de oxígeno reduce la tasa de sobrevivencia considerablemente.

3.1.2 Radioprotección Química

Los agentes radioprotectores químicos se han dividido en 4 grupos principales: Aminotioles, otros compuestos con azufre, agentes farmacológicos y otros agentes radioprotectores.

3.1.2.1 Aminotioles

El grupo de los compuestos aminotioles (con grupos NH_2 y SH) incluyen la cisteína, 2-mercapto etilamina (cisteamina), cistamina, aminoetil isotiourea dihidrobromuro (AET) y 2-mercapto etilguanidina (MEG).

Las aminas sulfhidrilas son fuertes agentes reductores a temperatura y pH fisiológicos. Este grupo ha sido ampliamente estudiado por su alta capacidad radioprotectora.

3.1.2.2 Otros Compuestos con Azufre

Varios cientos de compuestos que contienen azufre han sido probados, pero solo algunos de ellos muestran acción protectora significativa. Algunos de los compuestos efectivos que contienen azufre son: tiourea, tiouracil, ditiocarbamato, ditioamidas, tiazolinas, sulfoxidos y sulfones. El Dimetilsulfóxido tiene un valor de $\text{DRF}=1.33$ para la misma muestra de ratones en la que el valor de DRF para el AET es de 1.45.

3.1.2.3 Agentes Farmacológicos

- a) Drogas y alcohol: Drogas comunmente usadas como anestésicos no son efectivas en radioprotección. Sin embargo, el alcohol etílico administrado intraperitonealmente (IP) en altas cantidades confiere protección contra la radiación X en ratones. La depresión respiratoria debido a la ingestión de alcohol es marcada lo cual produce hipoxia en los tejidos, éste debe ser el mecanismo más importante para la radioprotección observada.
- b) Analgésicos: La morfina y la heroína a una concentración de 60 mg/kg incrementan la LD_{50} en ratones de 609 a 830R. El salicilato de sodio incrementa la supervivencia a 700R de 0 a 50%.
- c) Tranquilizadores: La inyección de reserpina 12 hrs. antes de la exposición a radiación eleva la LD_{50} en ratones machos de 605 a 825R, y en ratones hembras de 635 a 727R.
- d) Drogas colinérgicas: La acetilcolina, metacolina y carbaminoilcolina son de cierto valor radioprotector en ratones.
- e) Epinefrina y metoxamina: La epinefrina evita en un 95% la muerte de ratones provocada por radiación. La metoxamina incrementa el valor de LD_{50} de 825 a 1100R en ratas.
- f) Dopamina: La dopamina, cuando se administra antes de la exposición de cuerpo completo protege un 80% de los ratones irradiados a una dosis de 700R que produce el 100% de letalidad.
- g) Histamina: El valor de DRF para histamina en ratones CBA es de 1.5, mientras que en cepas C57BL es de 1.1. La histamina reduce la tensión de oxígeno de 77 a 93% en el bazo de ratones; esta reducción debe ser el principal meca-

nismo de protección conferido por la histamina.

- h) Serotonina: La serotonina (25 mg/kg intravenosa, ó 95 mg/kg intraperitoneal) es tan efectiva como la cisteamina en ratón.
- i) Hormonas: El valor DRF para hormonas tales como las adrenales y tiroideas es de 1.1. El estrógeno y la colchicina también tienen cierto valor radioprotector.

En general, las hembras son más resistentes que los machos, sin embargo la resistencia a la radiación en ratones castrados puede ser incrementada por la administración de testosterona.

La ACTH incrementa la supervivencia de ratones irradiados con 600R de 17 a 56%.

3.1.2.4 Otros Agentes Radioprotectores

- a) Cianuro: El cianuro de sodio tiene un cierto valor radioprotector en ratones.
- b) Derivados de ácidos nucleicos: Derivados tales como el uracilo, 5-hidroxi-4-metiluracilo, 5-amino-4-metiluracilo y 5-amino-4-metilcitosina tienen cierto valor radioprotector. Incrementan la supervivencia en la LD₅₀ de 20 a 40%. El trifosfato de adenosina (ATP) eleva el valor de LD₅₀ un 30%. El AMP muestra un valor de DRF = 1.55.
- c) Fluoroacetato de sodio: Una inyección intraperitoneal de fluoroacetato de sodio 3 horas antes de la irradiación X incrementa la LD₅₀ de 648 a 998 R.
- d) Para-aminopropiofenona (PAPP): La inyección de PAPP 15 minutos antes de la radiación X produce un valor de DRF=

1.7 en las células de la médula ósea, 1.4 en las células del sistema gastrointestinal y 1.28 en las células del sistema nervioso central. El mecanismo de protección principalmente es vía hipoxia tisular.

- e) Melitin: Polipéptido básico de peso molecular 2850 u.m.a. Una inyección subcutánea 24 horas antes de la radiación X produce 100% de supervivencia en el valor de LD₅₀.
- f) Endotoxinas: La radiación deprime la hematopoyesis mientras que las endotoxinas estimulan a la médula ósea. Cuando se inyecta la vacuna contra la tifoidea y paratifoidea con 1.5×10^9 bacterias muertas 24 horas antes de irradiar ratones se observa un 100% de protección.
- g) Imidazol: Se ha observado que este incrementa la supervivencia en ratones de 14 a 80% cuando se administra 5 minutos antes de la irradiación.
- h) 3'5' AMP cíclico: Los agentes estimuladores del AMPc administrados antes de la radiación X protegen células de mamífero en cultivo (45). También protegen al folículo piloso normal y células del epitelio intestinal de ratón contra el daño por radiación.

3.1.3 Radioprotección Biológica

Dentro de los agentes biológicos se han considerado los siguientes:

3.1.3.1 Parabiosis

En este procedimiento dos animales, generalmente ratas, se unen lado con lado mediante la costura de incisiones en la piel. Como resultado, se establece una circulación cruzada a través de los capilares de la piel entre los dos animales. Se considera como un par parabiótico aquel en el que uno de los animales es

irradiado mientras el otro es blindado con plomo durante la irradiación. El miembro no irradiado provee al miembro irradiado suficientes elementos sanguíneos por lo que no hay deficiencias hematopoyéticas y el animal sobrevive a la dosis letal.

3.1.3.2 Bazo y Extracto de Bazo

La implantación del bazo en la cavidad peritoneal de ratones irradiados eleva la supervivencia de éstos.

También la inyección de células de bazo después de la exposición de cuerpo completo en ratones provee una protección considerable, sin embargo, el efecto protector de las células del bazo decrece con la edad del donador. La ruta intravenosa es más efectiva que la intraperitoneal en este caso.

3.1.3.3 Transplante de Médula Osea

La inyección intravenosa de médula ósea isóloga (5×10^6) inmediatamente después de la exposición evita la muerte en el 75% de los ratones expuestos a 900 R. La administración intravenosa provee la mejor protección, la administración intraperitoneal requiere 70 veces más células que la intravenosa para obtener un grado semejante de protección.

3.1.3.4 Transfusión de Sangre Periférica

La transfusión de sangre periférica eleva la supervivencia de perros expuestos a LD_{50} . Cuando se dan de 5 a 11 transfusiones de leucocitos, el 85% de los perros sobrevive.

3.1.3.5 Inyección de Células no Hematopoyéticas

Una suspensión de células de embrión incrementa la supervivencia de ratones irradiados con 1025 R de 0 a 30%. La inyec-

ción de suspensión celular de hígado fetal también ha sido efectiva para tal efecto.

3.2 Cisteamina

De los tres tipos de agentes radioprotectores analizados, los agentes químicos son los que se han estudiado con mayor profundidad tal vez debido a la gran variedad de sustancias químicas que existen.

Dentro de los numerosos compuestos químicos que se han probado por su capacidad para proteger contra la radiación ionizante destaca el grupo de los aminotioles como la cisteamina, cistamina y aminoetil isotiourea (AET) por ser de los agentes con mayor poder radioprotector.

Desde el descubrimiento de la actividad radioprotectora de la cisteina por Patt et. al. en 1949 (46) y de la cisteamina por Bacq et. al. en 1951 (47), se han llevado a cabo numerosas investigaciones en la búsqueda de los compuestos tioles más potentes y menos tóxicos. Sin embargo, estos compuestos que son derivados monoalquilados del Sulfuro de Hidrógeno (-SH), pueden producir efectos farmacológicos tóxicos y la interpretación de estos datos a nivel celular es difícil.

Además, la falta de conocimiento sobre el modo de acción de estos compuestos complica un poco más la búsqueda de agentes radioprotectores de buena capacidad y baja toxicidad.

3.2.1 Características Generales

La cisteamina (2-mercapto etilamina) es uno de los compuestos aminotioles más ampliamente estudiado. Este compuesto contiene en su molécula un grupo amino y un grupo sulfhidrilo, también se designa con las iniciales MEA; su peso molecular es de 77.15 d y tiene un 31.14% de Carbono, 9.15% de Hidrógeno, 18.16% de Nitró-

geno y 41.56% de Azufre. Su estado físico es sólido en forma de cristales, tiene olor sulfuroso y es altamente soluble en agua. Se ha comprobado que este compuesto protege contra los efectos de la radiación tanto in vivo como in vitro.

3.2.2 Evaluación de la Cisteamina como Radioprotector

Varios estudios han reportado la capacidad de la cisteamina para proteger células de mamífero en cultivo y en animales vivos contra la radiación, en estos estudios se trabaja con diferentes tipos de células y varios criterios de evaluación del daño radioinducido son utilizados.

Uno de los criterios más usados durante los primeros años de estudio de los compuestos radioprotectores fué analizar el efecto sobre la fertilidad de los organismos o sobre la viabilidad de su descendencia.

La inyección intraperitoneal de cisteamina protege a ratones hembra contra la esterilidad radioinducida (48). Así mismo, provee protección al feto de rata expuesto en útero por irradiación de la madre (1).

La cisteamina per se no afecta la fertilidad del ratón ni la viabilidad de los productos. Cuando el padre es inyectado con cisteamina previamente a la irradiación, se reduce un 75% la tasa de muerte postimplantación con respecto al grupo no tratado.

Además, el número de embriones vivos, número de implantaciones totales, implantaciones por hembra y número de hembras preñadas, es casi igual en el grupo con cisteamina e irradiado al del grupo control sin irradiar (49).

A nivel celular existen varios parámetros que se toman en cuenta para evaluar el daño y la protección por agentes químicos.

El tratamiento con cisteamina o con AET en ratones machos no irra-

diados no induce translocaciones recíprocas en espermatozoides, sin embargo es capaz de reducir el incremento en la frecuencia de translocaciones recíprocas inducidas por radiación en estas células si se da un tratamiento previo a la irradiación con estas sustancias (50).

Se ha reportado que la cisteína y la cisteamina son más efectivas que los compuestos alcoholes (etanol y metanol) para proteger contra la inducción de anillos y dicéntricos por radiación gamma en linfocitos humanos (51).

Se ha reportado que en células de riñón humano cultivadas in vitro el % de supervivencia celular es mayor cuando las células son irradiadas con rayos X en presencia de cisteamina que en condiciones de anoxia (52). Igualmente en célula HeLa S₃ la cisteamina es más efectiva que la 2 - mercapto etilguanidina (MEG) en concentración equimolecular para elevar el % de supervivencia celular (53).

En células de hamster Chino la cisteamina tiene un efecto protector contra la producción de mutaciones y lesiones letales o muerte celular causadas por radiación (54, 55). Se ha observado en células endoteliales de corteza cerebral de rata que la cantidad de rompimientos de cadena sencilla y doble inducidas por radiación se reducen notablemente en presencia de cisteamina (56). Además, el número de rompimientos en la cadena de ADN es ligeramente mayor in vitro que in vivo, tal vez debido a que in vivo pasa más tiempo entre la irradiación y la extracción del tejido lo cual puede permitir la reparación del ADN. Esta misma ligera diferencia fué detectada por Okada y Ono en 1974 (57) en timocitos y hepatocitos humanos.

Así mismo, la cisteamina reduce el número de lesiones inducidas por radiación en cadenas parentales del ADN que producen gaps en las cadenas hijas (54).

Otros autores han reportado que en células cultivadas de mamífero

ro la cisteamina protege en forma más eficiente contra los rompimientos de cadena sencilla que doble (58,59) .

Tanto la cisteina como la cisteamina evitan la inactivación biológica y producción de rompimientos de cadena sencilla del ϕ 174 inducidos por rayos gamma. Ambos parámetros son dependientes de temperatura y pH (60) .

3.2.3 Efectos de la Cisteamina en las Etapas del Ciclo Celular

También ha resultado interesante estudiar la sensibilidad de las células durante las diferentes etapas del ciclo celular y evaluar el efecto del radioprotector en cada una de ellas .

La cisteamina tiene un efecto protector diferencial en células sincronizadas irradiadas con rayos X; protegiendo más efectivamente a las células normalmente más sensibles a la irradiación. En la sublínea celular V79-S171, se observa mayor protección en la etapa G_2 (sensible), menor protección en las etapas G_1 y S (medio sensibles) y aún menor en la etapa $S_{tardía}$ (poco sensible) (61) .

El retardo mitótico inducido por cierta dosis de radiación es reducido cuando las células son irradiadas en presencia de cisteamina, esto depende de la dosis de radiación y de la concentración del radioprotector. En este evento no se observan diferencias significativas entre las diferentes etapas del ciclo celular (62) .

En relación a las aberraciones cromosómicas en las cuales se ha observado que aumentan conforme se incrementa la dosis, el tratamiento con cisteamina tiene mayor efecto sobre la frecuencia de lesiones cromatídicas inducidas en G_2 que en G_1 y $S_{tardía}$ (62) .

En el caso de las células espermáticas se ha observado que los efectos de varios radioprotectores son mayores en estados tempranos de espermatogénesis (63, 64, 65) .

En general se puede decir que la eficiencia de un radioprotector depende de la dosis de radiación, del protector mismo y de la etapa del ciclo celular en la que se encuentra la célula.

3.2.4 Mecanismos de Acción

Se han realizado numerosos experimentos que tratan de explicar el mecanismo de acción de los radioprotectores, sin embargo no se ha podido establecer hasta la fecha un mecanismo que satisfaga todas las interrogantes y esto continúa siendo un tema de discusión.

Los mecanismos de radioprotección son complejos y generalmente se involucra más de uno de ellos. Se han propuesto diferentes hipótesis sobre el mecanismo de acción de los compuestos sulfhidrilo (1, 3).

Muchos compuestos radioprotectores (-SH) protegen las células de mamífero "atrapando" o inactivando a los radicales libres que son producidos por la radiación ionizante.

La cisteamina y el AET han mostrado conferir protección a las células de mamífero irradiadas tanto in vivo como in vitro, se ha sugerido que ambos compuestos -SH actúan por un mecanismo de competencia "atrapando" radicales libres (50).

Tanto los compuestos -SH como los compuestos -OH actúan como removedores de radicales libres, siendo los primeros más efectivos que los segundos (66).

Este evento debe ser interpretado como el reflejo de alguna ligera diferencia en el mecanismo de protección entre ambos compuestos (51).

La protección adicional aportada por los compuestos -SH a la molécula "blanco" (SH o SS) que se encuentra en el máximo nivel de protección puede deberse a la presencia de un mecanismo de restitución molecular. Dicho mecanismo consiste en que los

grupos -SH del radioprotector forman puentes disulfuro con las moléculas "blanco" para evitar que el daño incida sobre éstas (51)•

Se ha observado que la cisteamina influye directamente sobre el nivel de grupos sulfhidrilos no unidos a proteínas (NP-SH) intracelulares, y que conforme este nivel se eleva es mayor la radioprotección conferida; esto sugiere que el mecanismo de radioprotección por cisteamina depende de la concentración de NP-SH de la célula protegida (67)•

El incremento en el nivel de NP-SH a su vez se relaciona en parte con un incremento en la liberación de tioles intercelulares, el glutatión es el tiol que se libera en mayor proporción medido por cromatografía; el 37% del incremento de NP-SH se debe al incremento de glutatión. El tratamiento con cisteamina provoca la liberación de glutatión unido a proteínas por un mecanismo de intercambio. De esta forma, se propone entonces que los amino tioles radioprotectores pueden actuar induciendo la liberación interna de algunas sustancias radioprotectoras celulares (68)•

El glutatión posiblemente protege "atrapando" a los radicales libres y eliminando al Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) por medio del sistema de la glutatión - peroxidasa de tal forma que los efectos tóxicos disminuyen. La alta incorporación de glutatión en las proteínas pudiera considerarse como reserva de un agente protector fisiológico, que puede ser movilizado bajo ciertas condiciones, tal movilización puede ser una de las principales funciones de los radioprotectores -SH (69)•

También se ha reportado que la inyección intraperitoneal de cisteamina eleva los niveles de 3'5' AMPc intercelular lo suficiente como para iniciar reacciones de protección (45). Existen otras sustancias como la 1-metil-3 isobutilxantina que inhibe la acción de la AMP fosfodiesterasa (enzima que degrada al AMPc) y esto provoca un aumento en la supervivencia de las células irra

diadas. Se sugiere que el AMPc contribuye con los procesos de reparación postradiación (70).

La inyección intraperitoneal de 3'5'AMPc protege a la glándula parótida contra los daños radioinducidos determinados por pérdida de peso de la glándula, pero no se sabe cuál es el mecanismo exacto por el que se obtiene dicho efecto (71).

Por otro lado, algunos agentes radioprotectores remueven el oxígeno molecular del medio y de esta manera producen condiciones de hipoxia durante la exposición. Es bien sabido que las condiciones de hipoxia reducen el daño inducido por radiación.

Las condiciones de hipoxia (8% de oxígeno) junto con la administración de alguno de los 3 compuestos -SH (cisteamina, cisteína o cistamina) incrementan la supervivencia de ratones irradiados (1100 R) de 0 a 20% aproximadamente (70).

La combinación de hipoxia con cualquier compuesto tiol incrementa la supervivencia a un 65% aproximadamente del grupo irradiado. Tanto la cisteamina como la anoxia tienen efecto radioprotector sobre las células de riñón humano, siendo más efectiva la primera condición que la segunda. Se propone que ambos factores reducen la sensibilidad de las moléculas con grupos SH y SS que son unos de los "blancos" de las radiaciones, o bien que la molécula reactiva producida por la radiación es neutralizada por alguno de los dos factores (52).

La hipoxia producida por la oxidación de la cisteamina también debe jugar un papel importante en la radioprotección (72).

Otro posible mecanismo de acción es la formación de puentes disulfuro; los compuestos -SH forman mezclas de puentes disulfuro con la proteínas tisulares que contienen grupos -SH (3). Estos puentes protegen al átomo de azufre de la enzima contra la acción indirecta de la radiación, sin embargo los puentes disulfuro formados tienen una vida media corta ya que son reducidos

por la glutatión - reductasa, de tal manera que se hace posible la reconstitución del grupo -SH funcional de la enzima después de la exposición (68). Esta hipótesis implica que las proteínas celulares son el "blanco" más radiosensible para la supervivencia celular. Aunque, tomando en cuenta que el ADN es la molécula de información transmitida a través de sucesivas generaciones celulares, y que es el material responsable de la fisiología y morfología celular se considera que esta molécula es el "blanco" celular más radiosensible (3). Tal vez la formación de puentes S-S sea uno de los pasos involucrados en la protección por compuestos SH.

Otro modelo que se ha propuesto para explicar la protección por compuestos sulfhidrilo es el modelo de "donación de Hidrógeno" (73), este modelo sugiere que los radicales ("blanco") son reparados por transferencia de hidrógeno del grupo sulfhidrilo del protector al radical "blanco".

Adams y McNaughton en 1968 (73) demostraron que tal reparación puede ocurrir en sistemas químicos. Ellos encontraron que la cisteamina puede donar átomos de hidrógeno a los radicales orgánicos simples.

La cisteamina tiene la capacidad de reducir la inactivación biológica y la producción de rompimientos de cadena sencilla del ADN de ϕ T 174 inducidos por rayos X. Esta protección puede ser explicada por una reacción de reparación a través del H^{+1} transferido a la porción de azúcares dañados en el ADN, e. g. a los radicales 4' y 1' del carbón que pueden provocar rompimientos inmediatos o potenciales respectivamente (60).

Por otro lado, se sabe que el ADN está mejor protegido contra las radiaciones ionizantes cuando se encuentra rodeado por nucleohistonas que cuando está descubierto, y tomando en cuenta que la cisteamina es capaz de ocupar los espacios vacíos del complejo ADN-histonas, se ha asumido que se da una interacción electrostática

entre los sitios fosfato del ADN y el grupo NH_2 de la cisteamina lo cual forma una barrera contra las radiaciones y esto explicaría en parte la acción radioprotectora de este compuesto aminotiol (74).

También se ha sugerido (3) que uno de los mecanismos de protección por compuestos -SH es la producción de shocks fisiológicos reversibles. Una evidencia de esto es la hinchazón de las mitocondrias después de tratar a las células con cisteamina. Esta alteración estructural persiste durante el tiempo que la droga es efectiva para proteger la célula contra el daño radioinducido.

Así mismo, se han considerado los cambios en el metabolismo celular producidos por los compuestos -SH como posible mecanismo de acción (3).

Los compuestos -SH inhiben reversiblemente la síntesis de ADN y por lo tanto retardan la replicación. Esto podría dar tiempo para que la molécula de ADN repare el daño radioinducido (3). Si la síntesis del ADN continúa a su velocidad normal los segmentos dañados por la radiación provocarán rupturas no reparables y esto podría conducir a la muerte celular.

Se ha observado que la cisteamina reduce la síntesis de ADN y la actividad metabólica celular; esto podría disminuir el daño, ya que el ADN es más sensible a la radiación ionizante en la etapa de síntesis ya que no hay tiempo para la reparación (75). Esta reducción en el metabolismo celular tal vez se deba a que la cisteamina active a algún represor molecular que interrumpe la actividad de templados del ADN necesarios para la síntesis.

Los datos disponibles parecen indicar que el mecanismo de protección es complejo y que más de un mecanismo debe estar involucrado en la acción de un compuesto dado.

3.2.5 Toxicidad de la Cisteamina

Se ha tenido cierta evidencia de que algunos compuestos -SH pueden resultar tóxicos para el organismo tanto a nivel celular como tisular.

Para probar la eficiencia de algún compuesto radioprotector es necesario considerar los siguientes factores: dosis requerida, toxicidad en el animal de experimentación, ruta de administración y tiempo de pre-exposición.

Se ha observado que la cisteamina puede inhibir el crecimiento celular in vitro en células L de ratón cuando está presente en el medio por arriba de ciertos límites (2×10^{-4} M), y dependiendo del tiempo de exposición (60 minutos) (76). Sin embargo, diferentes tipos celulares pudieran responder diferencialmente a los efectos tóxicos y protectores de los compuestos sulfhidrilo.

Vergroesen et. al. en 1967 (77) asumen que la toxicidad de los compuestos -SH es causada por los productos de su oxidación ya que a pH mayor de 6.5 se incrementa la oxidación de los compuestos tioles lo que eleva su toxicidad. La adición de un agente reductor como el Cianuro de Potasio (KCN), o las condiciones anóxicas evitan la oxidación de los compuestos tioles y la toxicidad disminuye. Por lo tanto, la supervivencia celular bajo un tratamiento depende en gran parte de las condiciones del medio como son pH, concentración de oxígeno, etc.

En 1969 Nasjleti y Spencer (78) reportaron que el tratamiento con cisteamina en linfocitos humanos induce algunas aberraciones cromosómicas como rompimientos cromatídicos y constricciones cromosómicas del tipo "erosión"; sin embargo no se observaron otros daños cromosómicos estructurales como translocaciones, dicéntricos y anillos que son de mayor importancia.

Además, se observa un efecto aditivo o tal vez sinérgico en células tratadas con cisteamina + radiación medido por la producción

de aberraciones; sin embargo esto queda sujeto a comprobación con animales de experimentación (78).

Speit et. al. en 1980 (79) encontraron que la cisteamina puede llegar a inducir ICH en la línea celular V79 de hamster Chino, además de producir poliploidias.

Así mismo, se observó que la cisteamina actúa sinérgicamente con la BrdUrd para inducir tanto ICH como aberraciones cromosómicas (rompimientos cromatídicos, rompimientos múltiples y pulverización cromosómica). Este efecto pudiera deberse a una interacción con la BrdUrd incorporada al ADN, lo cual depende del grado de sustitución y no del grado de incorporación celular (80).

Es evidente que existen datos contradictorios respecto a la influencia de los compuestos sulfhidrilo sobre la frecuencia de ICH. Se ha llegado a pensar que tanto la inducción de ICH (79) como la reducción de la alta frecuencia del mismo inducida por algún agente mutágeno (81, 82), están relacionadas con la acción del H_2O_2 y los radicales libres. Por un lado, el H_2O_2 puede ser formado en el proceso de oxidación del compuesto -SH, y por otro lado los compuestos -SH pueden prevenir la acción de los radicales libres gracias a su capacidad reductora.

McRae y Stich en 1979 (83) asumen que la formación de H_2O_2 podría ser la razón de inducción de ICH por compuestos tioles, ya que el H_2O_2 induce ICH en células de hamster Chino y células V79. Además, la adición de catalasa puede inhibir la inducción de ICH en ambas líneas celulares tanto inducidas por H_2O_2 como por cisteamina.

Estos datos podrían indicar que la formación de H_2O_2 puede ser un factor importante en la inducción de ICH por cisteamina in vitro.

No obstante, Speit y Vogel en 1982 (84) no detectaron inducción de ICH con cisteamina, con cisteína ni con H_2O_2 en linfocitos hu

manos cultivados in vitro.

La diferencia observada entre linfocitos humanos y células de hamster Chino puede deberse a que la actividad de la catalasa no es equivalente entre ellas, por lo general en líneas celulares permanentes esta actividad se ve disminuida. Además, en sangre hay una mayor capacidad para degradar al H_2O_2 en donde la glutatión - peroxidasa juega un papel importante. Por lo tanto las diferencias en cuanto a la actividad enzimática celular para degradar al H_2O_2 parecen ser importantes en la inducción de ICH por compuestos sulfhidrilo.

En oposición a esto, se encontró que la vitamina C induce ICH en células V79 y en linfocitos pero la catalasa reduce esta inducción. Debido a que el H_2O_2 no induce ICH en linfocitos, la inducción de ICH por vitamina C en linfocitos no se puede basar solo en la acción del H_2O_2 . Tal vez esta inducción se deba en su mayoría a la producción de radicales libres por la oxidación del ascorbato ya que la cisteamina reduce esta inducción por que inhibe la acción dañina de los radicales libres. Como esta inducción no es total, se sugiere que además de los radicales libres otras interacciones se involucran en la inducción de ICH por vitamina C (81).

Como se puede observar, no existe una concordancia entre los resultados obtenidos respecto a la capacidad de diversas sustancias para inducir ICH incluso usando diferentes líneas celulares de hamster Chino. En general, las reacciones de los compuestos sulfhidrilo dependen de los potenciales de oxidación - reducción del grupo -SH y del agente oxidante, de la concentración del compuesto, del pH, de la temperatura, de la presencia de trazas metálicas y de las condiciones generales del cultivo.

Sin embargo, varios autores han reportado que la cisteamina no tiene ningún efecto tóxico, ya que no se ha observado inducción de muerte celular (67), retardo mitótico (45), translocaciones

recíprocas (50), aberraciones cromosómicas (62), ICH (84) y esterilización (49); bajo diferentes condiciones en varios sistemas de experimentación.

3.3 Radioprotección con L-cisteína contra la Inducción de ICH

Abramovsky et. al. en 1978 (29) reportaron que además de no haber encontrado inducción de ICH por L-cisteína, ésta tiene un efecto protector contra los ICH inducidos por rayos X (25 - 200-Rads) en linfocitos humanos, y que también incrementa la viabilidad celular especialmente a dosis por arriba de 100 Rads (100 Rads = 1.0 Gy).

Además observaron que en las células en G_1 la inducción de ICH por radiación es mayor que en las células en G_2 dado que éstas últimas ya pasaron por la etapa de síntesis de ADN que es cuando ocurren los ICH's.

Por otro lado, las células en G_2 son más sensibles que las células en G_1 en cuanto a viabilidad celular, ya que las células en G_1 pudieran tener más tiempo para recuperarse del daño reparando las lesiones radioinducidas en el ADN antes de entrar en mitosis.

Se postula que mientras el daño inducido en G_1 se refleja mejor por el incremento en la frecuencia de ICH, el daño en G_2 se detecta por disminución de la supervivencia celular.

Se ha propuesto que la L-cisteína actúa uniéndose reversiblemente a aquellas porciones del ADN que no se encuentran cubiertas por histonas, de tal forma se evita la alteración química y se reduce la velocidad de replicación del ADN permitiendo que el proceso de reparación corrija el daño antes de la replicación.

4. DEFINICION DE OBJETIVOS

Tomando en cuenta el daño celular que producen las radiaciones ionizantes, resulta interesante investigar la capacidad que tienen algunas sustancias para proteger a las células contra los daños inducidos en el ADN y que se manifiestan sobre algunos eventos citogenéticos.

Existe una amplia variedad de parámetros que pueden tomarse en cuenta para evaluar el daño radioinducido. En este sistema experimental se analizaron cuatro parámetros fundamentalmente, estos parámetros son: Intercambio entre Cromátides Hermanas (ICH), Índice Mitótico (IM), Tiempo Generacional Promedio (TGP) y Rupturas Cromosómicas (RC).

También se consideró necesario establecer la relación dosis - respuesta (cisteamina - protección) para conocer cuál es la dosis mínima del compuesto que protege con mayor eficiencia.

Por lo tanto, los objetivos que se pretenden alcanzar con esta investigación en células de médula ósea de ratón in vivo fueron los siguientes:

1. Conocer cuál es el efecto de la cisteamina sobre la inducción de Intercambios entre Cromátides Hermanas (ICH) por radiación gamma.
2. Conocer cuál es el efecto de la cisteamina sobre los cambios radioinducidos en otros eventos citogenéticos como Índice Mitótico (IM), Tiempo Generacional Promedio (TGP) y Rupturas Cromosómicas (RC).
3. Obtener la relación dosis - respuesta para conocer la dosis mínima del compuesto capaz de proteger 100%.

5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

5.1 Bases para la Detección de ICH

Para poder detectar los ICH's en cualquier célula es necesario que las cromátides hermanas de un mismo cromosoma se tiñan en forma diferencial (figs. 11 y 12).

Para la tinción diferencial de las cromátides hermanas se puede seguir el método de "Fluorescencia Plus Giemsa" (FPG) el cual se basa en la incorporación de BrdUrd al menos por un ciclo celular.

Siguiendo la replicación semiconservativa del ADN en presencia de BrdUrd, en la 1^a división celular se encontrarán ambas cromátides unifilarmente sustituidas con BrdUrd y en la 2^a división celular se encontrará una cromátide unifilarmente sustituida y la otra bifilarmente sustituida.

Posteriormente, para diferenciar entre la cromátide unifilar y la bifilar se tiñen los cromosomas con el colorante fluorescente bibenzimida 33258 Hoechst después de lo cual se les da un tratamiento con luz negra fluorescente por diferentes períodos. Finalmente son teñidos con el colorante Giemsa por 30 - 45 minutos.

Considerando que la reacción de fotólisis que se da en el ADN sustituido con BrdUrd disminuye la capacidad para captar al colorante Giemsa, la cromátide que se encuentra bifilarmente sustituida se observa clara mientras que la unifilar se observa oscura.

De esta forma se obtienen preparaciones permanentes que facilitan la detección de ICH en el microscopio óptico (8).

Para administrar la BrdUrd en esta tesis se utilizó la inyección intraperitoneal de BrdUrd adsorbida a carbón activado de acuerdo al método desarrollado por Morales - Ramírez P; - (1980) (85).

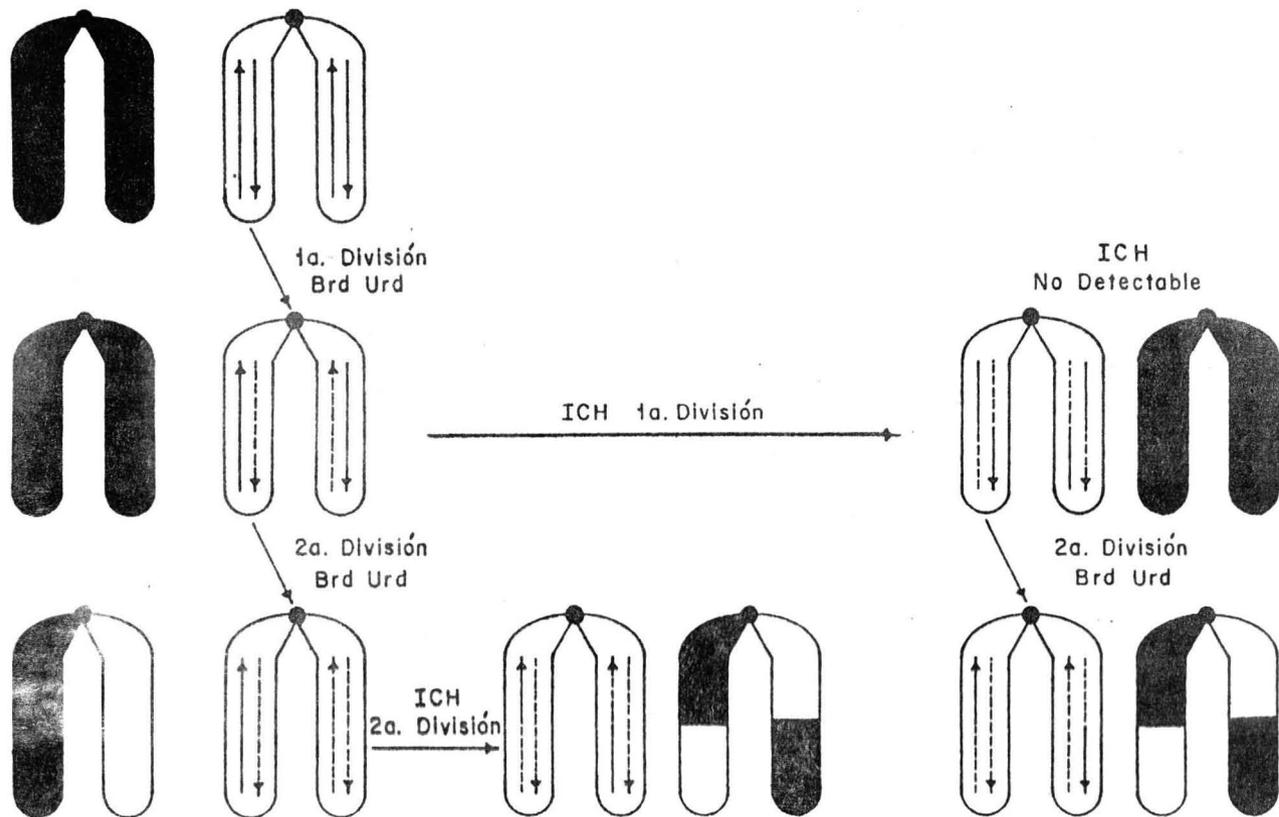


FIG. 11. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA PRODUCCION DE ICH'S INDUCIDOS EN CELULAS DE 1^a Y 2^a DIVISION.

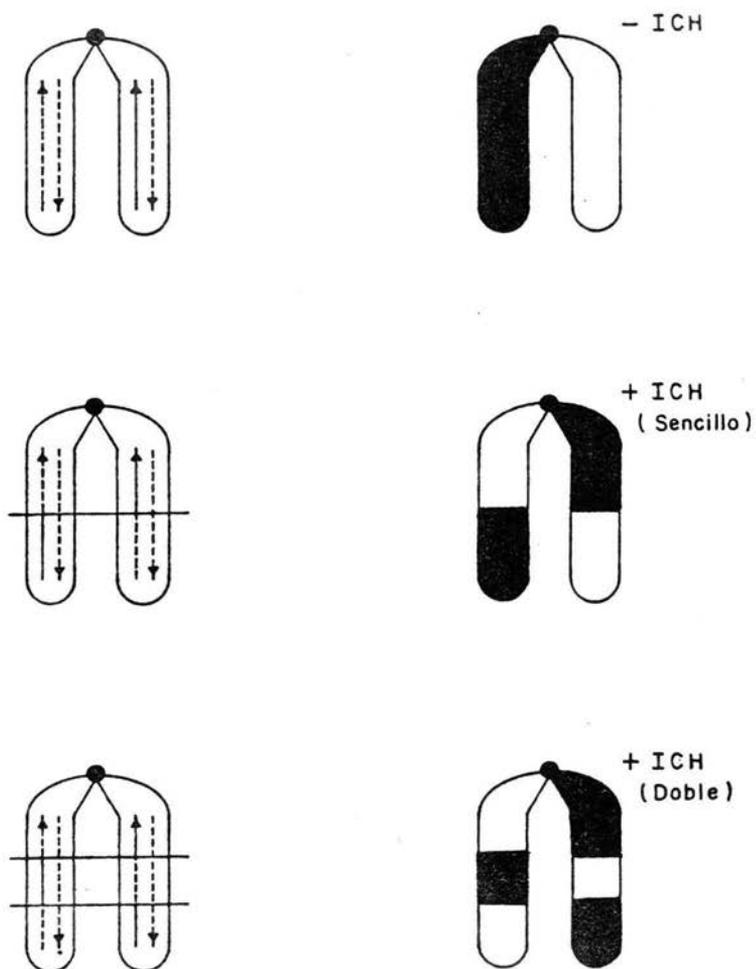


FIG. 12. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA PRODUCCION DE ICH'S INDUCIDOS EN CELULAS DE 2^a DIVISION.

5.2 Animales

Los animales de experimentación utilizados en este trabajo fueron ratones de la cepa Balb-C de 30 a 35 g de peso, y de 2 a 3 meses de edad.

Los animales fueron proporcionados por el bioterio del laboratorio de Radiobiología del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares en donde se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura y circulación de aire, alimentados con comprimidos Purina y agua.

5.3 Incorporación de BrdUrd

Se suministró una suspensión acuosa de BrdUrd (sigma Chemical) adsorbida a carbón activado (Merck) a una dosis de 1.5 mg/g de peso corporal por vía intraperitoneal (fig. 13).

La adsorción de BrdUrd al carbón activado se lleva a cabo mediante la agitación en la oscuridad de una solución acuosa de BrdUrd (20 mg/ml) con 100 mg de carbón activado por ml de solución de BrdUrd, durante una hora. La adsorción se realiza bajo condiciones estériles, el carbón se esteriliza y se deseca al mechero antes de preparar la suspensión. La solución acuosa de BrdUrd se esteriliza previamente pasándola a través de un filtro Millipore de 0.2 micrómetros.

5.4 Cosecha y Obtención de Preparaciones de Cromosomas

Después de 22 horas de la inyección intraperitoneal de la suspensión de BrdUrd adsorbida a carbón activado a los ratones, se les suministró intraperitonealmente una solución acuosa de colchicina (Sigma) a una dosis de 15 μ g/g de peso corporal y dos horas más tarde los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Se extrajeron ambos fémures de cada ratón y se cortaron por los extremos para extraer las células de la médula ósea con una inyección de PBS (2 ml/hueso), el contenido se

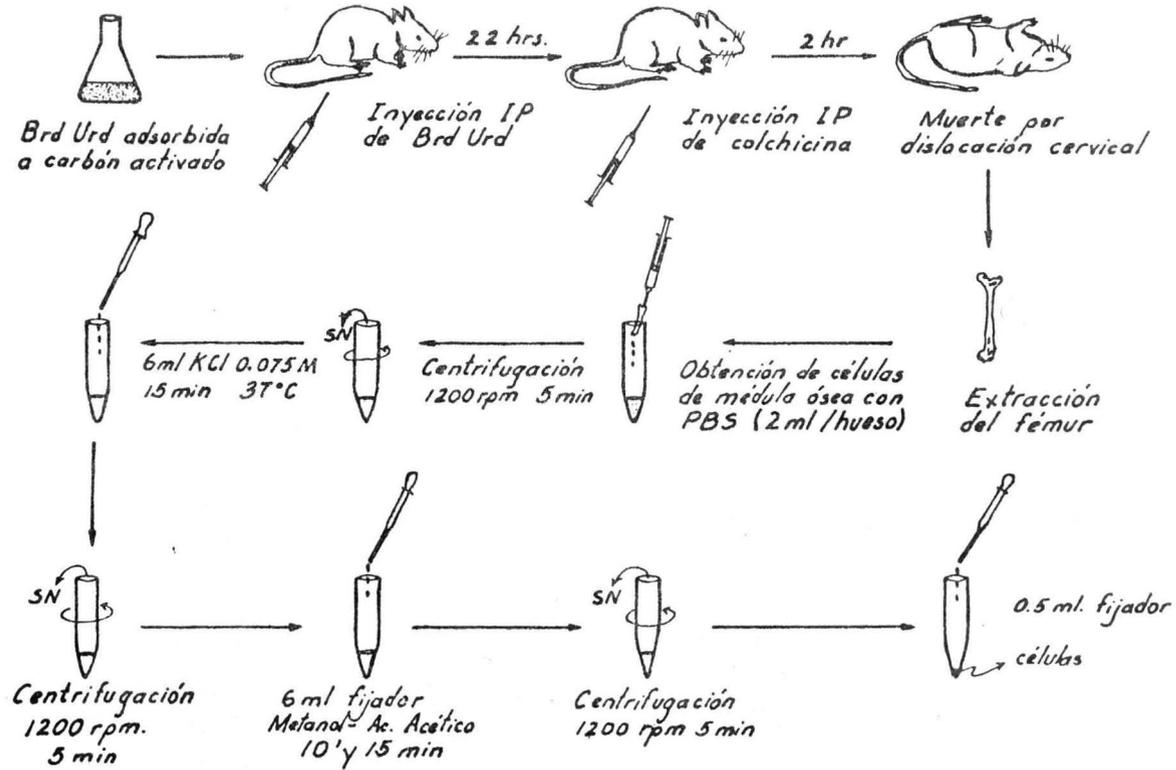


FIG. 13. INCORPORACION DE BrdUrd Y COSECHA DE CELULAS.

recuperó en un tubo de centrifuga. La suspensión celular se re_suspendió y se centrifugó a 1200 rpm durante cinco minutos. El precipitado se resuspendió en 0.5 ml del mismo sobrenadante, se agregaron 6 ml de solución hipotónica de Cloruro de Potasio (KCl 0.075 M) y se resuspendió de nuevo, se incubaron en la estufa a 37°C por 15 minutos, después de la incubación se centrifugó a 1200 rpm durante cinco minutos, se tiró la solución hipotónica, las células se resuspendieron en 6 ml de fijador Carnoy (ácido-acético:metanol, 1:3) y se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente. El fijador se cambió tres veces por centrifugación, después del último cambio las células fueron resuspendidas en 0.5 ml de fijador.

La suspensión celular en fijador se goteó sobre portaobjetos lim_pios y fríos, de preferencia se colocan sobre una placa de hielo. Finalmente estas preparaciones se dejan secar al aire por 24 horas en la oscuridad.

Si los cromosomas quedaban muy encimados se procedía a resuspen_der el botón celular en fijador (ácido acético:metanol, 5:2) y se flameaban en el mechero.

5.5 Tinción Diferencial de las Cromátides Hermanas

Se usó una modificación de la técnica de tinción diferencial basa_da en el Método de Wolff y Perry (1974) usando bibenzimida 33258-Hoechst (8) (fig. 14).

Se colocaron 6 gotas de una solución 33258 Hoechst 10^{-4} M en agua destilada sobre las laminillas por diferenciar, se les colocó un cubreobjetos y se mantuvieron en la oscuridad durante 10 minutos. Después se colocaron en una caja de petri que contenía aproxima_damente 1 ml de buffer amortiguador de Fosfato de Sodio (1.16M) - Citrato de Sodio (0.04M) a pH 7.0 de tal manera que las laminillas quedaran siempre húmedas pero no totalmente sumergidas.

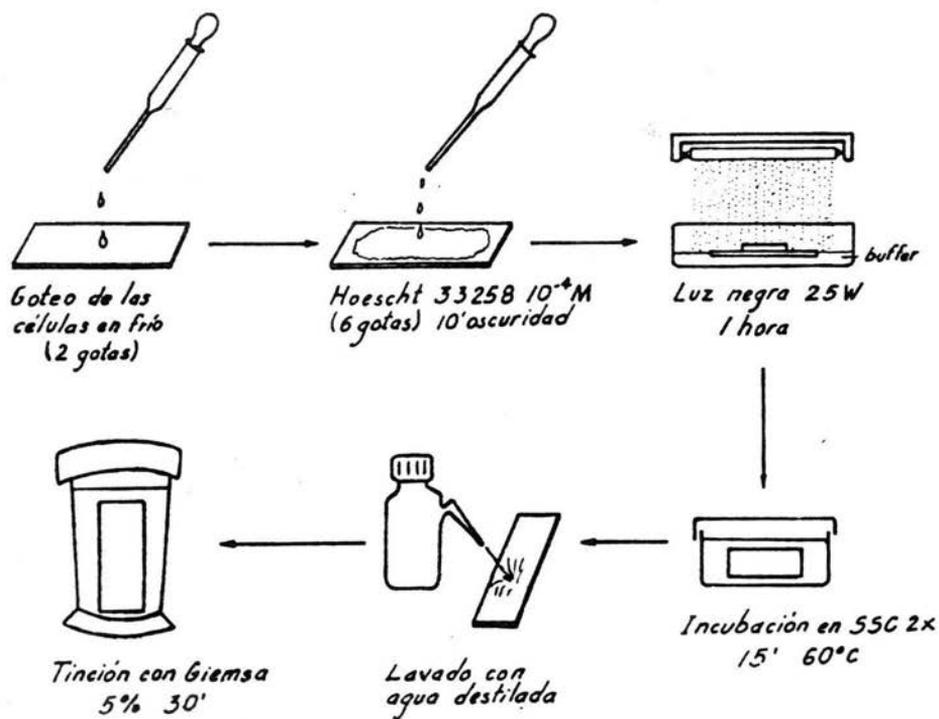


FIG. 14. OBTENCIÓN DE PREPARACIONES DE CROMOSOMAS Y TINCIÓN DIFERENCIAL DE LAS CROMATIDES HERMANAS.

Se colocaron las laminillas bajo una lámpara de luz negra General Electric de 25 watts a un centímetro de distancia durante 60 - 90 minutos.

Después de la exposición a la luz, se quitaron los cubreobjetos y las laminillas se incubaron en SSC 2 X (Cloruro de Sodio 0.3 M - Citrato Trisódico 0.03 M) a 60 °C en baño maría durante 15 minutos.

Finalmente se lavaron con agua destilada caliente y fría y se tiñieron con Giemsa al 5% en amortiguador de fosfatos (0.01M) pH 6.8 durante 30 minutos.

5.6 Cisteamina

Se inyectó intraperitonealmente una solución acuosa de cisteamina a dosis de 150, 15 y 3 µg/g de peso corporal dependiendo del grupo experimental, por lo menos 30 minutos antes de la irradiación.

5.7 Irradiación

La irradiación de los animales se efectuó en una fuente Vick - Rad ⁶⁰Co. Esta fuente representa una razón de dosis de 5.2 Gy/minuto aproximadamente. La irradiación se realizó en forma individual colocando a cada ratón en un envase de plástico cerrado con una tela de alambre. La dosis estimada fué de 1.0 Gy aproximadamente.

5.8 Análisis

5.8.1 ICH

Los intercambios entre cromátides hermanas se analizaron en 30 células en metafase que tuvieran sus cromátides claramente diferenciadas y con su número cromosómico completo (40 cromoso-

mas), las células con 39 cromosomas solo se consideraron en caso necesario.

Cuando había duda sobre el análisis de alguna metafase se realizaban conteos por más de un observador. Los ICH's dudosos no fueron tomados en cuenta.

Se tomaron algunas fotografías de las mejores metafases. Las microfotografías fueron tomadas en el fotomicroscopio Zeiss usando película "High Contrast" de Kodak.

5.8.2 Rupturas Cromosómicas

Las rupturas cromosómicas fueron analizadas en las mismas células en las que se hizo el conteo de ICH. En caso de duda se solicitó la opinión de otro observador.

Se consideró que la presencia de un dicéntrico y/o dos fragmentos representaban dos rupturas al igual que la presencia de un anillo y/o dos fragmentos, mientras que en el caso de un solo fragmento cromosómico se consideraba como una ruptura.

5.8.3 Índice Mitótico

Se analizaron 1000 células por ratón y se consideraron en división únicamente a las células en metafase.

5.8.4 Tiempo Generacional Promedio

Para el cálculo de este índice se analizaron 300 células. De éstas se sacó el % de las células en 1^a, 2^a y 3^a división; los datos obtenidos se manejaron por medio de la fórmula desarrollada por Ivett y Tice (1982) para el cálculo del TGP, (ver página 30).

5.9 Estadística

Los datos se expresaron como el promedio obtenido (\bar{x}) más ó menos la desviación estandar (s).

Para el análisis de significatividad se usó la prueba de t "student".

Para la distribución teórica de la frecuencia de ICH se usó la fórmula de ajuste de Poisson, y para comparar la distribución teórica con la real se usó la prueba de Chi cuadrada (χ^2).

Para las pruebas de t de "student" y χ^2 se usaron programas incorporados en la calculadora Texas Instruments 59.

5.10 Protocolos y Grupos Experimentales

Los protocolos que se siguieron de acuerdo a los grupos experimentales fueron los siguientes:

Para el grupo control se permite la incorporación de BrdUrd por 22 horas después de ser administrada intraperitonealmente. Transcurrido este tiempo, se aplica una inyección intraperitoneal de colchicina y 2 horas más tarde se sacrifican los animales por dislocación cervical y se obtienen las células.

En el grupo irradiado, la irradiación se lleva a cabo 30 minutos antes de la inyección de BrdUrd.

Para probar el efecto de la cisteamina sobre los daños radioinducidos, ésta debe ser inyectada intraperitonealmente por lo menos 30 minutos antes de la irradiación.

Finalmente para probar el efecto de la cisteamina per se, ésta se inyecta 1 hora antes de la administración de la BrdUrd.

Para determinar el efecto de las radiaciones sobre la frecuencia de ICH y rupturas cromosómicas, así como sobre el índice mitótico y tiempo generacional promedio, y el efecto de la cisteamina

mina sobre los cambios radioinducidos en estos parámetros se manejaron 4 grupos experimentales con un mínimo de 6 ratones por grupo. Para comparar los resultados obtenidos se incluyó un grupo tratado únicamente con la dosis más alta de cisteamina.

Los grupos manejados fueron los siguientes:

Grupo Control: Ratones sin irradiar y sin cisteamina.

Grupo Irradiado: Ratones irradiados 30 minutos antes de la incorporación de la BrdUrd.

Grupo Cisteamina-Irradiado: Ratones inyectados con diferentes dosis de cisteamina (150, 15 y 3 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal) 30 minutos antes de la irradiación.

Grupo Cisteamina: Ratones inyectados con cisteamina - (150 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal) 40 - 60 minutos antes de la incorporación de BrdUrd (fig. 15).

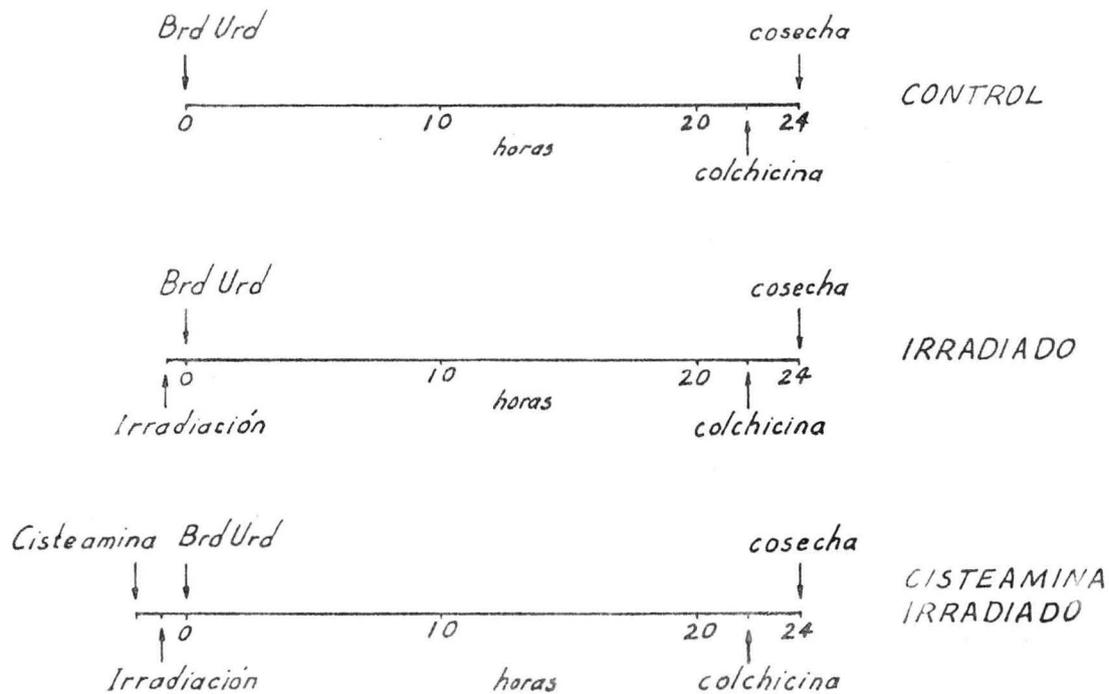


FIG. 15. PROTOCOLOS Y GRUPOS EXPERIMENTALES.

6. RESULTADOS

6.1 Efecto de la Cisteamina sobre la Inducción de Intercambios Entre Cromátides Hermanas (ICH) por Radiación Gamma

En la tabla I y figura 16 se observa que la radiación gamma a una dosis de 1.0 Gy tiene la capacidad de inducir ICH antes de la incorporación de BrdUrd. El valor del grupo control es de 2.5 ICH/célula, mientras que en el grupo irradiado se observa un valor de 5.4 ICH/célula, esta diferencia resultó ser altamente significativa ($p < 0.0001$, t "student").

También se puede observar que la inyección de cisteamina antes de la irradiación disminuye significativamente la inducción de ICH por radiación gamma. Este efecto radioprotector depende de la dosis que se utilice. Con la dosis mayor de cisteamina equivalente a 150 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal se protege 100% la inducción de ICH's, es decir que prácticamente no hay diferencia respecto a la frecuencia de ICH de los grupos controles no irradiados (2.4 vs 2.5 ICH/célula).

Cuando los animales son tratados con una dosis de 15 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal se obtiene un 90% de radioprotección, sin embargo este valor es significativo respecto al valor del grupo control (2.8 vs. 2.5 ICH/célula).

Finalmente, el menor % de radioprotección se obtuvo en el grupo tratado con una dosis de cisteamina equivalente a 3 $\mu\text{g/g}$ ya que solo el 45% de los ICH's inducidos por radiación son disminuidos. La diferencia entre la frecuencia de ICH entre este grupo y el control sí es significativa (4.1 vs 2.5, $p < 0.0001$).

El grupo control y el tratado solo con cisteamina (150 $\mu\text{g/g}$ de peso) muestran el mismo valor en la frecuencia de ICH, es decir que la cisteamina no modifica la frecuencia basal de ICH.

En la figura 17 se muestra la frecuencia acumulativa respecto al

TABLA I

EFFECTO DE LA CISTEAMINA SOBRE LA INDUCCION DE INTERCAMBIOS ENTRE CROMATIDES HERMANAS (ICH) POR RADIACION GAMMA.

CISTEAMINA ($\mu\text{g/g}$)	RAYOS GAMMA (Gy)	ICH/CEL ⁺⁺ $\bar{x} \pm s$ (rango)	n ⁺
-	-	2.5 ± 0.2 (2.0 - 3.0)	19
-	1.0	5.4 ± 0.4 ** (4.8 - 6.3)	12
3	1.0	4.1 ± 0.3 ** (3.7 - 4.5)	6
15	1.0	2.8 ± 0.3 NS (2.4 - 3.2)	6
150	1.0	2.4 ± 0.3 NS (2.1 - 2.8)	6
150	-	2.5 ± 0.3 NS (2.0 - 2.9)	6

* $p < 0.005$, ** $p < 0.0001$, NS No Significativo.
Respecto al control, prueba t de "student".

+ Número de ratones analizados.

++ 30 células analizadas por ratón.

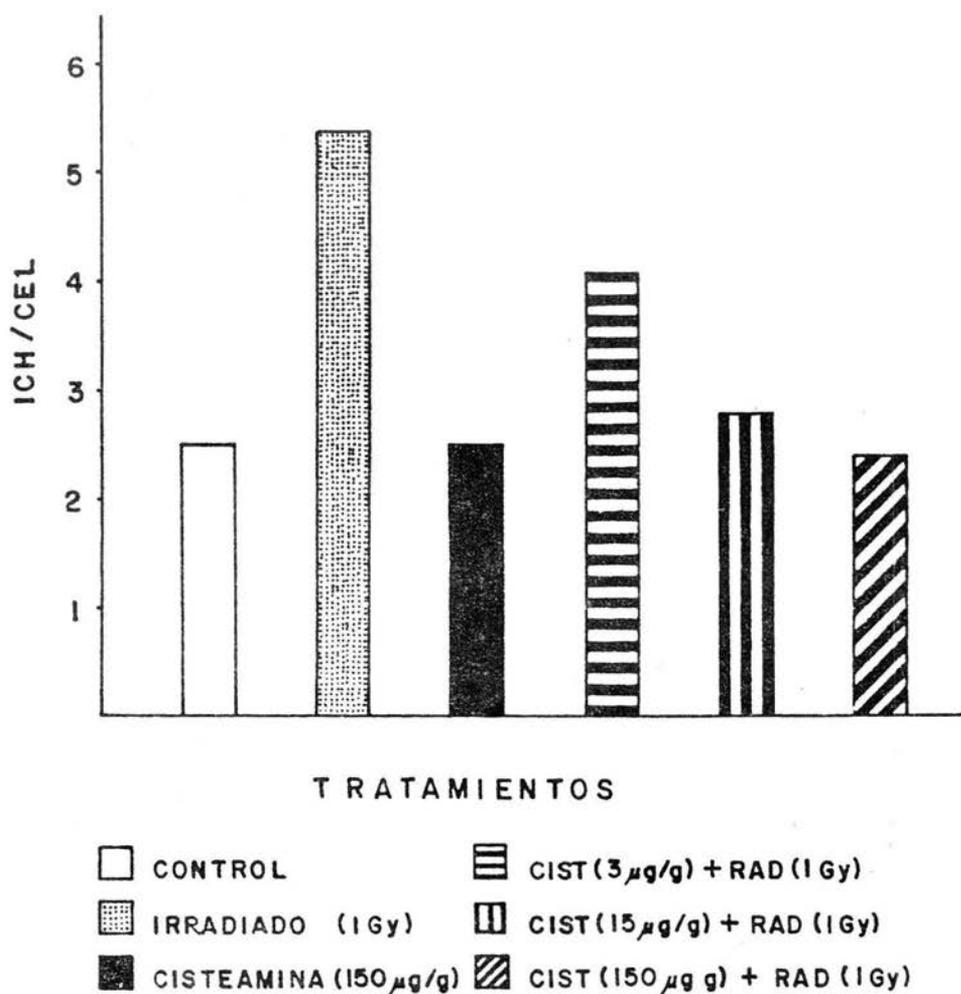
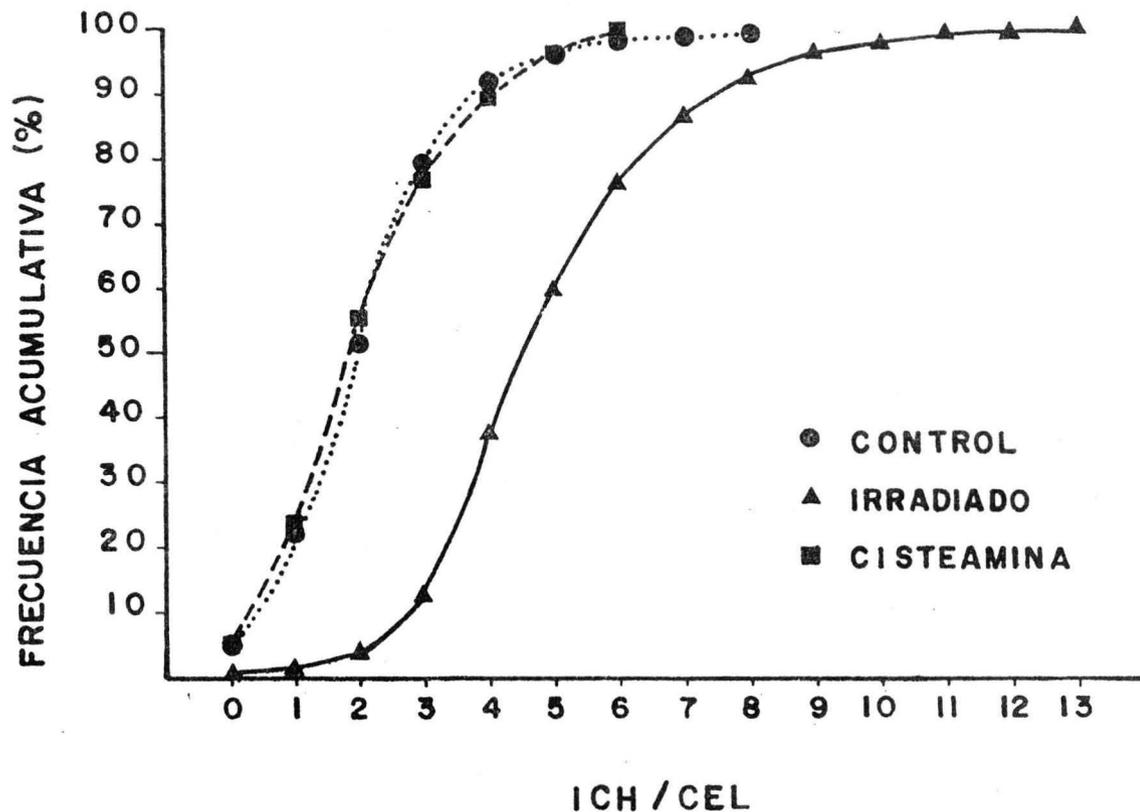


FIG. 16. RELACION ENTRE EL TRATAMIENTO APLICADO Y LA FRECUENCIA DE ICH/CELULA.



FRECUENCIA ACUMULADA vs NUMERO DE ICH/CELULA.

FIG. 17. EFECTO DE LA RADIACION Y DE LA CISTEAMINA PER SE SOBRE EL NUMERO DE ICH/CELULA.

número de ICH/célula, en ésta se puede hacer un análisis más cuantitativo del efecto de la radiación y de la cisteamina per se sobre la inducción de ICH en las poblaciones celulares.

En esta figura se aprecia claramente que la curva del grupo control y del tratado con cisteamina se comportan prácticamente de la misma manera, en contraste la curva del grupo irradiado se desplaza hacia frecuencias más altas de ICH.

De esta forma se puede observar que en el 50% de la población celular del grupo control y cisteamina la frecuencia de ICH corresponde a 2.0 ICH/célula, mientras que en el irradiado corresponde a 4.5 ICH/célula. Esto significa que la radiación gamma aumenta la frecuencia de ICH a un poco más del doble del valor control.

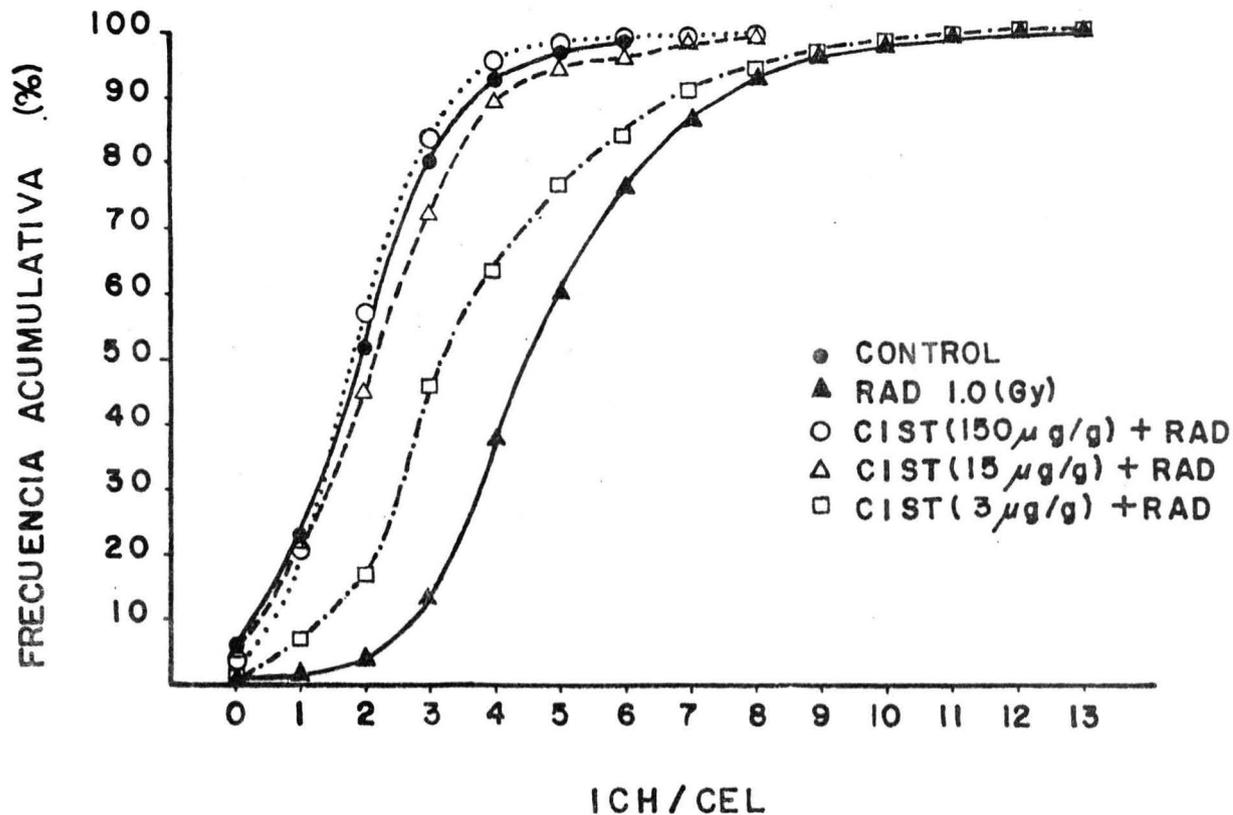
Por otro lado, en la figura 18 se compara de la misma manera el efecto que tienen las diferentes dosis de cisteamina sobre la inducción de ICH por radiación gamma en las poblaciones celulares de la médula ósea de ratón in vivo.

En esta figura se puede apreciar la diferencia gradual en la eficiencia de la cisteamina para proteger a las células contra el daño radioinducido capaz de generar ICH.

La curva del grupo tratado con 150 µg/g de cisteamina + radiación sigue el mismo comportamiento del grupo control, es decir que también el 50% de la población tiene 2.0 ICH/célula.

Con el tratamiento con 15 µg/g de cisteamina + radiación la curva muestra un comportamiento semejante al del control aunque ligeramente desplazada hacia valores más altos de ICH. De esta forma se aprecia que el 50% de la población celular tiene una frecuencia de ICH equivalente a 2.3 ICH/célula. Así mismo, se observa que el % de células con más de 3 ICH es del 30% en este grupo, mientras que en los controles no tratados equivale al 20%, esta diferencia no alcanza a ser significativa.

La curva del grupo tratado con 3 µg/g de cisteamina + radiación



FRECUENCIA ACUMULATIVA vs. NUMERO DE ICH/CELULA.

FIG. 18. EFECTO DE LA CISTEAMINA A DIFERENTES DOSIS SOBRE LA INDUCCION DE ICH POR RADIACION.

muestra un desplazamiento más notable hacia frecuencias más altas de ICH. En ésta se aprecia que el 50% de la población tiene 3.3 ICH/célula y que el % de células con más de 3 ICH representa el 55% de la población total, esta diferencia sí resulta significativa respecto al control. Además, el % de células con 2 ICH o menos para este grupo es de solo un 15%, mientras que en el control es de 50%. Una observación adicional es que en el control no hubieron células con más de 6 ICH's, en cambio en los animales irradiados y tratados con 3 $\mu\text{g/g}$ de cisteamina, un 20% de las células tiene 6 ICH o más encontrándose células hasta con 13 ICH.

No obstante, aún con la dosis de 3 $\mu\text{g/g}$ de cisteamina hay un cierto grado de protección puesto que persiste una diferencia respecto a los animales irradiados. Esta diferencia se pone de manifiesto más claramente en las células con frecuencias de ICH menores de 5. Así mientras que en los animales irradiados la frecuencia de células con 3 ICH o menos es de solo el 10%, en los animales tratados con 3 $\mu\text{g/g}$ de cisteamina antes de la irradiación este valor corresponde a un 45%.

En realidad no existe diferencia significativa entre el valor de ICH obtenido con las dosis de 15 y 150 $\mu\text{g/g}$ de cisteamina + radiación a pesar de que la primera es 10 veces menor que la segunda. Esto significa que la dosis de 15 $\mu\text{g/g}$ está muy cercana a la mínima dosis que protege con 100% de eficiencia. Sin embargo, con la dosis de 3 $\mu\text{g/g}$ de cisteamina que es 50 veces menor que la de 150 $\mu\text{g/g}$ se observa menos del 50% de radioprotección.

Por otro lado, en la figura 19 se puede observar que la distribución de frecuencias de ICH/célula de las poblaciones celulares de médula ósea se comporta como tipo Poisson y no existe diferencia significativa entre el valor teórico esperado y el valor real observado (prueba de Chi cuadrada, χ^2).

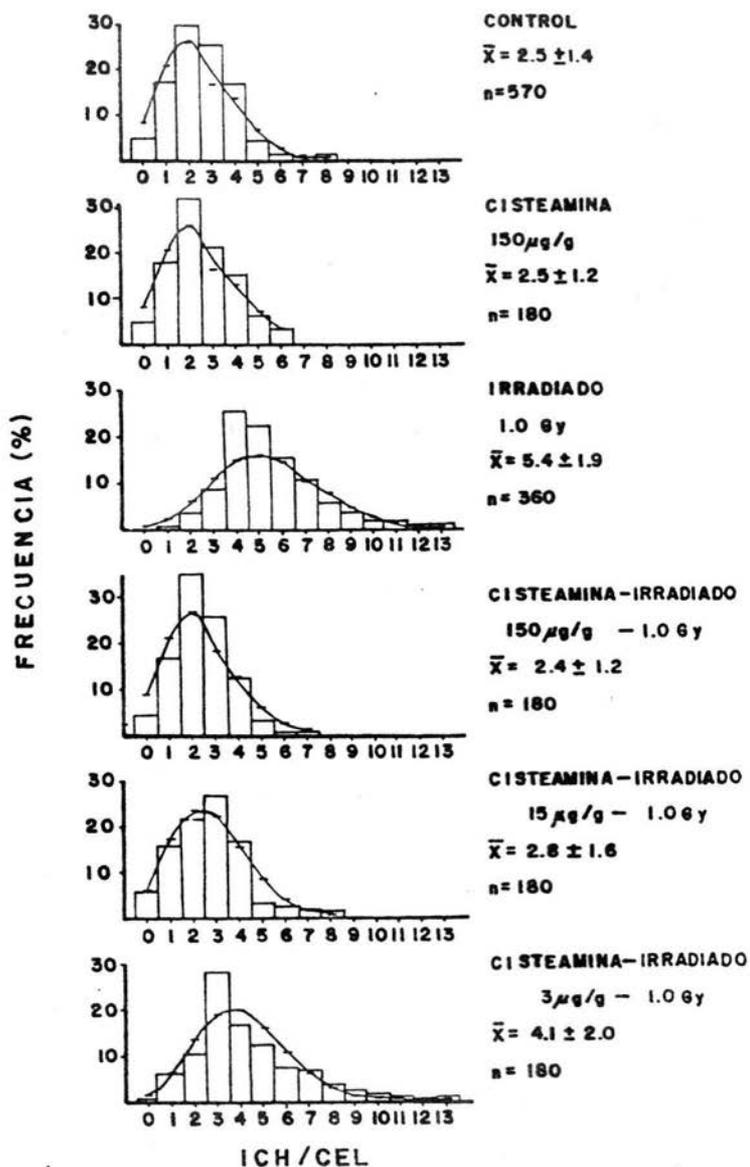


FIG. 19. DISTRIBUCION DE FRECUENCIA DE ICH/CELULA DE LAS POBLACIONES CELULARES DE MEDULA OSEA BAJO DIFERENTES CONDICIONES. (La línea continúa representa la distribución teórica de Poisson).

Tanto el grupo control como el cisteamina per se y el cisteamina - irradiado (150 $\mu\text{g/g}$ de cisteamina), tienen una curva de distribución muy semejante en donde el valor de ICH de mayor frecuencia es de 2.0 ICH/célula.

En el grupo tratado con cisteamina (15 $\mu\text{g/g}$ de peso) + radiación se observa un ligero desplazamiento de la curva hacia frecuencias más altas y el valor de ICH de mayor frecuencia es de 2.5 ICH/célula.

Finalmente, con una dosis de 3 $\mu\text{g/g}$ de cisteamina la radioprotección es mucho menor, se observa un marcado desplazamiento de la curva hacia la derecha (frecuencias más altas), el máximo valor observado es de 13 ICH/célula y el de mayor frecuencia es de 4 ICH/célula.

De lo anterior se desprende que hay una clara inducción de ICH por exposición a radiación gamma y que la cisteamina puede reducir tal inducción en forma dosis - dependiente, obteniéndose la máxima reducción con una dosis de 150 $\mu\text{g/g}$ de cisteamina.

6.2 Efecto de la Cisteamina sobre la Inducción de Rupturas Cromosómicas (RC) por Radiación Gamma

En la tabla II se puede apreciar claramente que hay inducción de Rupturas Cromosómicas por radiación gamma (1.0 Gy). En el grupo control no se observa ninguna ruptura, mientras que en el grupo irradiado se obtiene una frecuencia de 0.23 RC/célula.

A diferencia de lo que sucede con los ICH's, la frecuencia de RC inducidas por la radiación no se ve disminuida por el tratamiento con la cisteamina a ninguna dosis ya que los valores observados son de 0.21, 0.24 y 0.23 RC/célula para las dosis de 150, 15 y 3 $\mu\text{g/g}$ de cisteamina respectivamente.

TABLA II

EFFECTO DE LA CISTEAMINA SOBRE LA INDUCCION DE RUPTURAS CROMOSOMICAS (RC) POR RADIACION GAMMA

CISTEAMINA ($\mu\text{g/g}$)	RAYOS GAMMA (Gy)	RC/CEL ⁺⁺ $\bar{x} \pm s$ (rango)	n ⁺
-	-	-	19
-	1.0	0.23 ± 0.07 (0.13 - 0.40)	12
3	1.0	0.21 ± 0.01 (0.12 - 0.43)	6
15	1.0	0.24 ± 0.07 (0.13 - 0.33)	6
150	1.0	0.23 ± 0.06 (0.16 - 0.33)	6
150	-	-	6

+ Número de ratones analizados.

++ 30 células analizadas por ratón.

En esta misma tabla se puede observar que no hay efecto de la cisteamina per se en la inducción de RC en esta células.

Con respecto a las RC inducidas en 1^a y 2^a división se esperaba que hubiera una menor frecuencia en las células de 2^a división que de 1^a debido al sistema de reparación del ADN, sin embargo no se observaron diferencias significativas entre ambas poblaciones celulares, tanto en el grupo irradiado como en el grupo cisteamina irradiado (150 µg/g) (tabla III). Esto puede deberse a que el tamaño de la muestra no es suficiente para tener un valor 100% representativo.

En resumen, podemos decir que la dosis de radiación utilizada induce rupturas cromosómicas y esta inducción no puede ser evitada por la cisteamina.

6.3 Efecto de la Cisteamina sobre la Modificación del Índice Mitótico (IM) Inducida por Radiación Gamma

En cuanto al Índice Mitótico (IM) se puede apreciar en la tabla IV una disminución altamente significativa en el grupo sometido a irradiación comparado con el grupo control. El valor promedio de este parámetro para el grupo control es de 77 ± 7 metafases/ 10^3 células, mientras que para el grupo irradiado es de 57 ± 6 metafases/ 10^3 células ($p < 0.0001$, t "student"), esto implica una reducción del 26% sobre este índice del grupo irradiado.

Por otro lado, se observa que la cisteamina no tiene la capacidad de proteger a la médula ósea contra la disminución del Índice Mitótico con ninguna de las dosis utilizadas.

La cisteamina per se no afecta al valor del IM, es decir que no altera la división celular.

Lo anterior sugiere que las radiaciones inducen muerte celular y que este evento no puede ser evitado ni disminuido por efec-

TABLA III

EFEECTO DE LA CISTEAMINA SOBRE LA INDUCCIÓN DE RUPTURAS CROMOSÓMICAS EN CELULAS DE 1^a Y 2^a DIVISION POR RADIACION GAMMA.

CISTEAMINA (μ g/g)	RAYOS GAMMA (Gy)	RC/CEL 1 ^a DIV ⁺⁺ $\bar{x} \pm s$ (rango)	RC/CEL 2 ^a DIV ⁺⁺ $\bar{x} \pm s$ (rango)	n ⁺
-	-	No detectadas	No detectadas	6
-	1.0	0.24 \pm 0.08 (0.16 - 0.36)	0.23 \pm 0.07 (0.13 - 0.40)	6
150	1.0	0.2 \pm 0.12 (0.03 - 0.26)	0.23 \pm 0.06 (0.16 - 0.33)	6

+ Número de ratones analizados.

++ 30 células analizadas por ratón.

TABLA IV

EFFECTO DE LA CISTEAMINA SOBRE LA MODIFICACION DEL INDICE MITOTICO (IM) INDUCIDA POR RADIACION GAMMA.

CISTEAMINA ($\mu\text{g/g}$)	RAYOS GAMMA (Gy)	INDICE MITOTICO ⁺⁺ $\bar{x} \pm s$ (rango)	n ⁺
-	-	77 ± 7 (62 - 88)	19
-	1.0	57 ± 6 ** (43 - 67)	12
3	1.0	62 ± 6 ** (55 - 71)	6
15	1.0	62 ± 1 ** (60 - 63)	6
150	1.0	58 ± 3 ** (54 - 63)	6
150	-	74 ± 4 NS (69 - 80)	6

* $p < 0.005$, ** $p < 0.0001$, NS No Significativo.
Respecto al control, prueba t de "student".

+ Número de ratones analizados.

++ Número de metafases en 1000 células analizadas.

to de la cisteamina, ya que la diferencia entre los valores del IM para los tres grupos cisteamina-irradiado respecto al control es altamente significativa.

6.4 Efecto de la Cisteamina sobre la Modificación del Tiempo Generacional Promedio (TGP) Inducida por Radiación Gamma

El efecto de la radiación gama sobre el Tiempo Generacional Promedio (TGP) puede observarse en la tabla V.

El valor promedio obtenido para el grupo control es de 12.3 horas, mientras que para el grupo irradiado se observa una disminución de 1 hora lo cual resulta ser altamente significativo (12.3 vs 11.3 horas, $p < 0.0001$, t "student").

Además, en ninguno de los grupos tratados con cisteamina a diferentes concentraciones + radiación se detecta algún efecto sobre el TGP, ni siquiera con la dosis mayor de cisteamina.

Esto significa que la radiación induce una disminución en el tiempo promedio del proceso de división celular y que la cisteamina no tiene ningún efecto sobre dicho cambio.

Finalmente se comprobó que la cisteamina por sí sola no induce cambios en el TGP con ninguna de las dosis utilizadas.

6.5 Comparación del Efecto de la Cisteamina sobre la Inducción de ICH y RC, y sobre la Modificación del IM y TGP por Radiación Gamma

La inducción de ICH después de la irradiación resultó ser altamente significativa respecto al control. Sin embargo, esta inducción pudo ser reducida con el tratamiento con cisteamina antes de irradiar. La dosis más efectiva para proteger contra ICH fué la de 150 $\mu\text{g/g}$ (100% de protección), aunque la dosis de 15 $\mu\text{g/g}$ de cisteamina resultó tener todavía un 90% de efectividad y la de 3 $\mu\text{g/g}$ solo un 45%.

TABLA V

EFFECTO DE LA CISTEAMINA SOBRE LA MODIFICACION DEL TIEMPO GENERACIONAL PROMEDIO (TGP) INDUCIDA POR RADIACION GAMMA.

CISTEAMINA ($\mu\text{g/g}$)	RAYOS GAMMA (Gy)	$\bar{x} \pm s$ ⁺⁺ TGP (hrs)	n ⁺
-	-	12.3 ± 0.4 (11.3 - 13.3)	19
-	1.0	11.3 ± 0.4 ** (10.9 - 12.0)	12
3	1.0	11.6 ± 0.4 * (10.8 - 12.0)	6
15	1.0	11.2 ± 0.4 ** (10.9 - 11.7)	6
150	1.0	11.6 ± 0.5 * (11.2 - 12.3)	6
150	-	12.4 ± 0.3 NS (12.1 - 12.9)	6

* $p < 0.005$, ** $p < 0.0001$, NS No Significativo.

Respecto al control, prueba t de "student".

+ Número de ratones analizados.

++ 300 células analizadas, (ver página 30).

Por otro lado, se observó también una inducción de RC respecto a los grupos testigo (0.23 vs 0.00 , $p < 0.0001$, t "sudent"), pero en este caso la cisteamina no fué capaz de evitar tal inducción con ninguna de las dosis probadas.

Comparando la inducción de ICH con la de RC, se observa que la frecuencia de ICH/célula es de un orden de magnitud mayor que la de RC/célula bajo las mismas condiciones y en las mismas células. Comparando el efecto de la cisteamina sobre dicha inducción se observa que mientras que la cisteamina protege la inducción de ICH en forma dosis-dependiente, ésta no tiene efecto alguno sobre la inducción de RC por radiación gamma.

Estos resultados indican que tanto la inducción de ICH como de RC son producidas por efecto de la radiación, sin embargo el daño que las produce debe ser de diferente naturaleza.

Con respecto al IM, éste resultó significativamente menor respecto al grupo testigo tanto en el grupo irradiado, como en los grupos que recibieron tratamiento con cisteamina antes de ser irradiados. Esto significa que la cisteamina no tiene efecto sobre la depresión radioinducida en el IM.

Tomando en cuenta que la inducción de ICH es reducida por la cisteamina y que ésta no es efectiva para evitar la disminución del IM, es evidente que ambos eventos son producidos por distintos mecanismos.

Otro parámetro que resultó afectado por la radiación es el TGP. Sobre éste se observa una disminución en el grupo irradiado que resulta ser significativa respecto al control. Sin embargo esta aceleración de la división celular no es evitada por la cisteamina.

Dado que el efecto de la radiación sobre el ICH es evitado por la cisteamina, a diferencia de lo que sucede con el TGP, se puede proponer que no hay una correlación entre la variación del TGP y la frecuencia de ICH.

7. DISCUSION DE RESULTADOS

7.1 Efecto de la Cisteamina sobre la Inducción de Intercambios Entre Cromátides Hermanas (ICH) por Radiación Gamma

Algunos trabajos han reportado que la radiación ionizante produce una inducción considerable de ICH a dosis de radiación que van desde 0.15 Gy hasta 3.0 Gy (8,29,86)·

Los resultados obtenidos en este trabajo (87) concuerdan claramente con el hecho de que la radiación gamma incrementa la frecuencia de ICH, ya que la frecuencia de ICH en el grupo irradiado representa un poco más del doble del valor control.

En ambos grupos la distribución de frecuencias de ICH se ajusta a la distribución de tipo Poisson con la diferencia de que en el grupo irradiado la curva se desplaza hacia frecuencias mayores hasta de 13 ICH/célula.

Respecto al efecto de la cisteamina sobre tal inducción se observa que ésta tiene la capacidad de reducir 100% los ICH's radioinducidos. Este efecto depende de la dosis de cisteamina que se utilice, siendo la más efectiva la de 150 µg/g de peso corporal.

Schmit, et. al. en 1983 (88) realizando experimentos con líneas celulares de fibroblastos humanos normales observaron inducción de ICH por radiación gamma a 0.12, 0.24 y 0.36 Gy (⁶⁰Co), y por otro lado detectaron que tal efecto es virtualmente eliminado cuando el cultivo es irradiado 30 minutos después de la incubación con 5mM de cisteamina y catalasa.

Abramovsky et. al. en 1978 (29) reportaron inducción de ICH por rayos X en linfocitos humanos, además sus datos indican que la L-cisteina es efectiva en reducir la frecuencia de ICH/célula después de la exposición a rayos X en la fase G₁ de la segunda división mitótica. Sin embargo la frecuencia de ICH/célula sigue siendo alta respecto a la observada en ausencia de influencia mutagénica

ca ($p < 0.05$). Por otro lado, en el grupo irradiado se obtiene un incremento en la frecuencia de ICH correspondiente a 3 veces el valor control en ausencia de L-cisteina y solo una frecuencia del doble se registra con la adición del antimutágeno.

Aunque el radioprotector utilizado en los experimentos de Abramovsky es diferente a la cisteamina, ambos son compuestos con grupos -SH y deben actuar de una manera semejante.

A pesar de que los trabajos mencionados anteriormente son realizados in vitro, nuestros resultados obtenidos in vivo concuerdan con éstos en el sentido de que es probable la protección química contra la inducción de ICH por radiación.

Hasta la fecha no se ha podido establecer con claridad cuál es el mecanismo mediante el que opera la radioprotección observada con los compuestos -SH. Sin embargo, varios trabajos apoyan la hipótesis de que los compuestos sulfhidrilo confieren protección a las células contra los daños radioinducidos mediante un mecanismo de competencia "atrapando" a los radicales libres y evitando así su efecto nocivo (50, 51, 52).

La inducción de ICH por sustancias formadoras de radicales libres como la hidroxilamina, hidrazina e isoniazida, así como la inhibición de tal inducción por la cisteina sugieren que la propiedad reductora de este antimutágeno inhibe la actividad de los radicales y super-óxidos. El hecho de que la cisteina reduzca los ICH inducidos por las sustancias mencionadas permite inferir que los radicales libres y peróxidos están involucrados directamente en la inducción de ICH (52).

Por otro lado, se ha observado que la protección conferida por algún compuesto -SH depende de varios factores como son temperatura, pH, pK y concentración del compuesto. Por lo tanto la acción radioprotectora de estas sustancias depende de la concentración

del grupo tiol que se encuentre presente dentro de la célula

(77) *

Otros autores sugieren que la actividad radioprotectora de los compuestos -SH se debe a que estimulan la liberación interna de otras sustancias radioprotectoras como el 3'5' AMP cíclico (45, 70, 71) y el glutatión (68, 69), éste último debe actuar estabilizando radicales libres y eliminando al peróxido de hidrógeno por la vía de la glutatión peroxidasa. La alta incorporación de glutatión en las proteínas se podría considerar como reserva de un agente natural fisiológico protector que puede ser movilizado bajo ciertas condiciones. Dicha movilización tal vez sea una de las principales funciones de los compuestos tioles.

Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la hipótesis de que dada la capacidad radioprotectora de la cisteamina, ésta puede inactivar a los radicales libres formados por la vía indirecta de la radiación, evitando de esta manera la formación de aductos, enlaces cruzados y en general lesiones en el ADN que traen como consecuencia la producción de ICH's.

7.2 Efecto de la Cisteamina sobre la Inducción de Rupturas Cromosómicas (RC) por Radiación Gamma

Se han hecho muchos experimentos para **comprobar** la producción de alteraciones cromosómicas por la exposición a radiaciones ionizantes (50, 51, 62, 89, 90, 91) *

Estos efectos inducidos por radiación son dosis - dependientes, y se ha observado que la etapa G_2 es más radiosensible que la etapa G_1 en cuanto a aberraciones, ya que en G_1 existe un período más prolongado para reparar el daño provocado por la exposición a rayos X antes de entrar en mitosis (29) *

Varios autores han reportado que la inducción de aberraciones cromosómicas por radiación ionizante puede ser disminuida por acción de sustancias -SH como la cisteamina, aunque dicha disminución no sea de un 100%.

Warren y Siclair en 1969 (61) reportaron que la protección conferida por cisteamina en células de hamster Chino irradiadas con rayos X es mayor en la etapa del ciclo celular más sensible a la radiación, es decir G_2 , y menor en las etapas menos sensibles, o sea G_1 y S.

En oposición a los resultados obtenidos en este trabajo, Sasaki y Matsubara en 1977 (51) encontraron que las aberraciones cromósicas inducidas por radiación gamma en linfocitos humanos puede ser disminuida por la acción de compuestos -SH como la cisteina, y la cisteamina. También observaron una disminución con compuestos alcoholes como metanol, isopropanol, t-butanol, etilenglicol y glicerol.

El nivel de protección fué diferente entre ambos tipos de compuestos ya que la frecuencia de aberraciones obtenida con el grupo pretratado con compuestos alcoholes fué del 21% de las células irradiadas solo con PBS, y del 5% para el grupo pretratado con compuestos sulfhidrilo. A su vez, de los compuestos -SH la cisteamina resultó ser más efectiva que la L-cisteina para proteger contra los ICH's radioinducidos.

La curva dosis - respuesta para tal efecto demostró un comportamiento dosis - dependiente para todos los compuestos utilizados en el experimento anterior, sin embargo existe un punto de concentración del compuesto por arriba del cuál la protección ya no aumenta.

De acuerdo a la relación obtenida entre la concentración del compuesto que se necesita para la protección media máxima ($S - 1/2 \text{ máx}$), y la velocidad de reacción ($K(M^{-1}S^{-1})$), Sasaki y -

Matsubara en 1977 (51) observaron que solo se ajusta una relación lineal para el caso de los radicales OH^- , más no se observó correlación entre la habilidad protectora y la velocidad de reacción para radicales H^+ ni para e^- . Por esta razón concluyeron que la mayoría de los radicales responsables del daño indirecto producido por rayos gamma son los radicales OH^- .

Debido a que el valor de la fracción protegible en la máxima protección observada (P máx) obtenido para el grupo de alcoholes fué de 0.586, aproximadamente el 60% del daño puede deberse a la acción indirecta, y el 40% a la directa. En el caso de los compuestos -SH se obtuvo un valor de P máx = 0.797 por lo que el 20% del daño es producido por la vía directa.

Se asume entonces que la fracción protegible por compuestos removedores de radicales está relacionada con la acción indirecta de la radiación ya que el daño es producido en la molécula "blanco" por reacción de los radicales libres con ésta y la protección conferida por el compuesto químico suministrado se debe a la neutralización de dichos radicales (51).

Por otro lado, Littlefield et. al. en 1987 (89) observaron que 2/3 de la frecuencia de aberraciones en linfocitos humanos inducidas por la exposición a 0.5 - 5.0 Gy de rayos X puede ser disminuida por un tratamiento con Dimetil sulfóxido (DMSO) que es un removedor selectivo de radicales OH^- , siempre y cuando se aplique antes de la irradiación.

Mac Laren et. al. en 1987 (90) haciendo experimentos con linfocitos de personas que padecen el síndrome de Down (LSD) y con linfocitos de personas normales (LNH), observaron que usando etanol y manitol como removedores de radicales libres, se disminuye la frecuencia de aberraciones inducida por rayos X en LNH más no en LSD.

Los resultados obtenidos en esta tesis coinciden con los trabajos mencionados anteriormente respecto a la inducción de aberra

ciones cromosómicas por radiación ionizante, sin embargo no se detectó efecto alguno de la cisteamina sobre tal inducción.

La diferencia observada entre los resultados de este trabajo y los datos antes mencionados, podría ser explicada en base a la dosis de radiación utilizada en cada caso la cual resulta ser mucho mayor en los experimentos de Sasaki *et. al.* en 1977 (51) - (3.0 Gy), esta dosis podría estar causando aberraciones cromosómicas tanto por la vía indirecta como por la directa (70 y 30% respectivamente) mientras que con las dosis utilizadas en este experimento (1 Gy) solo se producen aberraciones por la vía indirecta por lo que éstas no pueden ser disminuidas por la cisteamina.

Sin embargo, los datos reportados por Littlefiel *et. al.* (1987) demuestran que el DMSO reduce el 70% de las aberraciones inducidas en linfocitos irradiados con dosis desde 0.5 Gy hasta 5.0 Gy. Estos resultados se contraponen con nuestra hipótesis explicativa propuesta ya que se observa que con dosis desde 0.5- Gy ya hay producción de aberraciones vía radicales libres.

No obstante, los datos obtenidos por Kligerman *et. al.* (1987) demuestran que los linfocitos humanos de sangre periférica son 1.75 veces más sensibles a la inducción de aberraciones cromosómicas por rayos gamma que los linfocitos de sangre periférica de ratón (91). Por lo tanto, es importante resaltar que el tipo celular es determinante para la respuesta que se obtenga debido a diferencias en sensibilidad y capacidad de reparación fundamentalmente.

Tal vez las células de la médula ósea de ratón son menos sensibles a la radiación, o tal vez tengan mejor capacidad de reparación que los linfocitos humanos. También podría explicarse en base a que en las células de ratón no se produjeran aberraciones por lesiones causadas en el ADN mediante radicales libres.

Cabe mencionar también que es muy importante considerar el tipo de sistema que se utilice en cada experimento, ya que mien

tras nuestros experimentos fueron realizados in vivo, los demás se llevaron a cabo en vitro.

Esta diferencia trae consigo varias implicaciones ya que en un cultivo celular irradiado in vitro se pueden producir más radicales libres debido al medio acuoso en el que se encuentran las células, esto causaría una mayor producción de aberraciones por la vía indirecta.

Por otro lado los experimentos in vivo involucran una serie de factores fisiológicos propios del organismo sobre los que no pueden haber modificaciones, por ejemplo la estimulación de algún órgano que produzca metabolitos secundarios que puedan interaccionar con las células en cuestión, o bien la producción de hormonas o enzimas que interfieran con la respuesta.

Otra diferencia importante es la distribución del radioprotector en el sistema, ya que mientras en los experimentos in vitro se administra el compuesto directamente a las células experimentales, en los experimentos in vivo no se sabe con exactitud que tanto por ciento del compuesto alcanza a las células en cuestión. Este evento también depende de la permeabilidad celular.

Finalmente, se consideró que el número de células que se tomaron en cuenta para analizar rupturas cromosómicas no es el adecuado, ya que debido a la frecuencia tan baja de este evento, resulta conveniente analizar un número mayor de células para determinar con mejor precisión el grado con que la cisteamina protege a las células contra la inducción de rupturas cromosómicas por radiación gamma.

7.3 Efecto de la Cisteamina sobre la Modificación del Índice Mitótico (IM) Inducida por Radiación Gamma

A pesar de que el Índice Mitótico no mide específicamente la

capacidad reproductora celular, sí puede constituir un índice confiable de la radiosensibilidad celular.

Los resultados de este trabajo obtenidos para dicho parámetro indican que en el grupo irradiado hay una reducción del 29% del valor control el cual resulta ser altamente significativo ($p < 0.0001$). Esta diferencia sugiere que hay una disminución en el número de células en división probablemente debido a la muerte celular provocada por la radiación.

Pitra et. al. en 1977 (54), al igual que Vergroesen et. al. en 1962 (52) encontraron que la cisteamina es capaz de proteger a las células de mamífero (Hamster Chino y humano respectivamente) contra la muerte celular inducida por rayos X.

Sin embargo, Eker y Phil en 1964 (76) reportaron que no existe efecto alguno de la cisteamina ni de la cisteína para evitar el daño celular radioinducido que provoca la muerte.

Los compuestos-SH estudiados en los experimentos antes mencionados no mostraron efectividad para evitar los efectos de la radiación sobre la proliferación celular en células L de ratón. Estos resultados están de acuerdo con los datos obtenidos por otros autores que han estudiado células de mamífero in vitro (92). Nuestros resultados son más comparables con los obtenidos por Eker y Phil ya que la proliferación celular está más relacionada con el índice mitótico que la tasa de supervivencia celular analizada por Pitra y Vergroesen.

Tomando en cuenta lo anterior, se puede observar que los resultados de esta tesis coinciden con el reporte de que no hay efecto de la cisteamina sobre la reacción de la proliferación celular inducida por radiación (76).

A pesar de que los tres parámetros están muy relacionados, cada uno de ellos indica diferentes aspectos celulares y no se

puede establecer una comparación directa entre ellos; además hay que considerar que las condiciones experimentales son muy diferentes ya que los trabajos reportados son realizados in vitro con cultivos de líneas celulares específicas y la exposición a radiación es de dosis mayores (2.4 Gy - 5.0 Gy) lo cuál influye directamente sobre la sensibilidad celular.

Los resultados de esta tesis sugieren que los efectos de la radiación sobre el índice mitótico son producidos por la vía directa ya que la cisteamina no es capaz de conferir protección en este sentido.

7.4 Efecto de la Cisteamina sobre la Modificación del Tiempo Generacional Promedio (TGP) Inducida por Radiación Gamma

El Tiempo Generacional Promedio también está de alguna manera relacionado con los parámetros anteriores ya que indica cada cuanto tiempo se divide la célula aproximadamente.

Yu y Sinclair en 1970 (62), haciendo estudios en poblaciones sincronizadas de células V79-S171 de hamster Chino, observaron que las células irradiadas en S sufren un retardo mitótico mayor que las células irradiadas en G₁ o en G₂. También observaron que para obtener el mismo efecto en células pretratadas con cisteamina se necesita una dosis de radiación 2.4 veces mayor que la del grupo irradiado.

La máxima protección contra el retardo mitótico se obtuvo en células irradiadas en S_{tardía}, S_{temprana} y G₁; mientras que en células irradiadas en G₂ se observa una protección mucho menor. Sin embargo, este parámetro indica el tiempo en el cuál se alcanza el pico máximo del número de mitosis, a diferencia del tiempo generacional promedio que indica cuanto tiempo tardan las células en dividirse.

En contraste, nuestros resultados muestran que la radiación pro-

duce una disminución en el TGP de 1 hora respecto al control. Por otro lado, se observó que la cisteamina no tiene efecto sobre esta reducción en el tiempo de división.

Se puede decir que la radiación está disminuyendo el tiempo de división promedio de las células existentes por lo que el número de células en 3^a división aumenta considerablemente en relación al número de células de 1^a y 2^a división en los animales irradiados.

El significado biológico de este evento ha sido previamente propuesto por Morales - Ramírez et. al. en 1984 (9) ya que observaron una reducción en el TGP en los ciclos de división posteriores a la irradiación con dosis más bajas de rayos gamma que las utilizadas en el presente trabajo. La hipótesis que se propuso fué que siendo éste un sistema in vivo las radiaciones causan una importante mortandad celular, esto trae como consecuencia que el organismo trate de recompensar esta diferencia induciendo la proliferación de células precursoras que normalmente no están en división, pero que debido a la situación de emergencia se dividen más rápidamente operando como un mecanismo homeostático.

El hecho de que la cisteamina no tenga efecto sobre el TGP sugiere que dicho efecto producido por la radiación es mediante vía directa.

7.5 Comparación del Efecto de la Cisteamina sobre la Inducción de ICH y RC, y sobre la Modificación del IM y TGP Inducida por Radiación Gamma

Respecto a la comparación del efecto de la radiación gamma y la cisteamina sobre los cuatro parámetros, es evidente que cada uno de los índices sufre modificaciones por efectos de la radiación, ya que por un lado se observó inducción de ICH y a

berraciones cromosómicas en células de médula ósea de ratón in vivo, mientras que por otro lado se obtuvo una disminución considerable en el IM así como una aceleración en el TGP.

Analizando el efecto de la cisteamina sobre los eventos anteriores se observó claramente que el único parámetro modificable por este compuesto fué la inducción de ICH, ésta pudo ser disminuída 100% con la inyección intraperitoneal de cisteamina 30 minutos antes de irradiarse. Sin embargo, no se observó modificación alguna sobre los efectos de la radiación en los demás parámetros.

El hecho de que la cisteamina es capaz de evitar la inducción de ICH por radiación gamma, a diferencia de lo que sucede con las rupturas cromosómicas sugiere que ambos fenómenos ocurren de manera independiente.

Además, dado que tampoco se apreció efecto de tal compuesto sobre la modificación del IM y TGP por la radiación, se puede proponer que no hay correlación entre la modificación del IM y TGP con la variación en la frecuencia de ICH.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los reportados por Morales - Ramírez en 1984 ⁽⁹⁾ en células de médula ósea de ratón in vivo en donde observó que tanto los ICH como las rupturas cromosómicas constituyen una respuesta clara de la exposición a las radiaciones ionizantes.

Al comparar la inducción de ICH con la de rupturas cromosómicas, Morales - Ramírez en 1984 ⁽⁹⁾ observó que la frecuencia de ICH/célula resultó ser hasta de dos órdenes de magnitud mayor que la de rupturas cromosómicas/célula comparadas bajo las mismas condiciones siendo similar dicha respuesta para los dos periodos postirradiación considerados (12 y 18 horas).

Además, para establecer la existencia de alguna correlación en

tre la inducción de ICH/célula y de aberraciones, comparó la frecuencia de ICH/célula en células con y sin rupturas. En dicha comparación observó que las células con o sin rupturas presentan prácticamente la misma frecuencia de ICH lo cuál sugiere que no hay relación directa entre ambos eventos.

Por otro lado, dado que en esos experimentos la frecuencia de ICH fué igual en ambos períodos postirradiación, a diferencia del TGP que es mayor en el segundo período, y del IM que resultó ser significativamente menor en ambos períodos respecto a sus controles, se sugirió que no hay correlación entre la variación del TGP e IM con la frecuencia de ICH.

En general, se puede decir que la inducción de ICH por radiación gamma se da por la vía indirecta, mientras que la modificación en los otros tres parámetros es por la vía directa por lo que la cisteamina no tiene efecto sobre éstos.

7.6 Efectos Colaterales de la Cisteamina

A pesar de que varios autores han reportado que la cisteamina per se tiene efectos citotóxicos secundarios como inducción de rompimientos de cadena sencilla del ADN (58), inhibición de la síntesis de ADN (61, 75), inducción de aberraciones cromosómicas (78), inhibición de la proliferación celular (76), e incluso inducción de ICH (79, 80, 83); los resultados de este trabajo mostraron que la cisteamina por si sola no afecta a ninguno de los cuatro parámetros analizados.

Sin embargo, es importante resaltar que las condiciones experimentales son determinantes para poder comparar resultados, ya que varios aspectos como tipo celular, organismo, concentraciones utilizadas del compuesto radioprotector, y algunas otras condiciones experimentales como temperatura, pK, pH, concentración de oxígeno y la realización del experimento in vivo o in

vitro influyen directamente sobre el tipo de respuesta que se desea estudiar. Por ejemplo, Speit et. al., en 1980 (79) reportaron inducción de ICH por cisteamina en células V 79 de hamster - Chino, mientras que en 1982 (84) encontraron que la cisteamina per se no induce ICH en linfocitos humanos.

Así mismo, otros autores también han reportado que no hay citotoxicidad inducida por la cisteamina sobre algunos parámetros como aberraciones cromosómicas (49,50), supervivencia celular y frecuencia de mutación (54), retardo mitótico (62) e inhibición mitótica (75).

Como se puede apreciar los efectos de los compuestos -SH son múltiples y sus mecanismos de acción no se conocen a fondo. Por un lado exhiben un amplio espectro de actividad antimutagénica y anticlastogénica, mientras que en otros experimentos producen varios tipos de daño celular por sí solos.

Por lo menos bajo las condiciones experimentales de este trabajo no se apreció efecto tóxico de la cisteamina per se.

8. CONCLUSIONES

De los resultados analizados anteriormente en células de médula ósea de ratón in vivo se pueden obtener las siguientes conclusiones:

1. La cisteamina tiene la capacidad de proteger a las células contra la inducción de ICH's en forma dosis - dependiente, obteniéndose el 100% de protección con una dosis de 150 $\mu\text{g/g}$ de cisteamina.
2. Es posible que la inducción de ICH sea causada por la vía indirecta de producción de daño por radiación, ya que la cisteamina tiene la capacidad de evitar tal inducción por la captación de radicales libres.
3. El efecto de la radiación sobre el Índice Mitótico, Tiempo Generacional Promedio y Rupturas Cromosómicas se produce por la vía directa ya que no puede ser evitado por la cisteamina.
4. El hecho de que la cisteamina proteja contra la inducción de ICH más no contra Rupturas Cromosómicas indica que no hay relación entre el daño inductor de ICH y el inductor de Rupturas Cromosómicas.
5. No existe citotoxicidad ni genotoxicidad colateral provocada por la cisteamina per se, al menos sobre los parámetros analizados en estos experimentos.

BIBLIOGRAFIA

1. Pizzarello, Donald, J; Radiation Biology. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida; 298 p; (1982)
2. Weisseberger, E; y Okada, S; Radiosensitivity of single and double - stranded deoxyribonucleic acid. Int. J. - Radiat. Biol., 3: 331; (1961)
3. Kedar, N, Prasad; Handbook of Radiobiology. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida; 296 p; (1984)
4. McClintock, B; The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes. Genetics, 23: 315 - 176; (1938)
5. Taylor, H; Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes. Genetics, 43: 515 - 529; (1958)
6. Latt, A; Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. - Proc. Nat. Acad. Sci., 70(12): 3395 - 3399; (1973)
7. Perry, P; y Wolff, S; New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. Nature, 251: 156 - 158; (1974)
8. Goto, K; Akematsu, T; Shimaza, H; y Sugiyama; Simple differential Giemsa staining of sister chromatids after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining. Chromosoma, 53: 223 - 230; (1975)

9. Morales Ramírez, Pedro; Efecto de los rayos gamma sobre la inducción y persistencia de intercambios entre cromátides hermanas (ICH) y otros eventos citogenéticos en células de médula ósea de ratón in vivo. Tesis Doctoral. UNAM, 143p; (1984) .
10. Morales-Ramírez, P; Vallarino-Kelly, T; y Rodríguez-Reyes, R; Detection of SCE in rodent cells using the activated charcoal bromodeoxyuridine system. Sister chromatid exchanges, 599 - 611; (1984)
11. Wolff, S; Bodycote, J; y Painter, R; Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by U.V. irradiation of different stages of the cell cycle: The necessity for cells to pass through S. Mutation Res., 25: 73 - 81; (1974)
12. Kato, H; Evidence that the replication point is the site of sister chromatid exchange. Cancer genetics and cytogenetics, 2: 69 - 77; (1980)
13. Schvartzman, J; y Gutierrez, C; The relationship between the cell time available for repair and the effectiveness of a damaging treatment in provoking the formation of sister - chromatid exchanges. Mutation Res., 72: 483 - 489; (1980)
14. Kato, H; Spontaneous sister chromatid exchanges detected by BrdUrd - labelling method. Nature, 251: 70 - 72; (1974)
15. Tice, R; Chaillet, J; y Schneider, E; Demonstration of spontaneous sister chromatid exchanges in vivo. Exp. - Cell Res., 102: 426 - 429; (1976)

16. Davidson, R; Kaufman, E; Dougherty, C; y Latt, S; Induc_ution of sister chromatid exchanges by BrdUrd is largely independent of the BrdUrd content of DNA. Nature, 284: 74 - 76; (1980)
17. Morales-Ramírez. P; Vallarino-Kelly, T; y Rodríguez-Reyes, R; Analysis of spontaneous sister - chromatid exchanges in vivo by three way differentiation. Mutation Res., 178: 49 - 56; (1987)
18. Latt, S; Sister Chromatid Exchanges. Genetics, 92: 83 - 95; (1979)
19. Chaganti, S; Schongerg, S : y German, J; A many fold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes. Proc. Nat. Acad. Sci., 77(11): 4508 4512; (1974)
20. Perry, P; y Evans, H; Cytological detection of mutagen carcinogen exposure by sister chromatid exchange. Nature, 258: 121 - 125; (1975)
21. Ishii, Y; y Bender, M; Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light-induced sister - chromatid exchanges in Chinese hamster cells. Mutation Res., 79: 19 - 32; (1980)
22. Carrano, A; Thompson, L; y Steka, D; DNA crosslinking sister - chromatid exchange and specific locus mutations. Mutation Res., 63: 175 - 188; (1979)

23. Kato, H; Temperature - dependence of sister chromatid exchange: An implication for its mechanism. Cancer - Genetics and cytogenetics, 2: 61 - 67; (1980)
24. Liebeskind, D; Bases, R; Méndez, F; Elequin, F; - Koeninsberg, M; Sister chromatid exchanges in human lymphocytes after exposure to diagnostic ultrasound. Science, 205: 1273 - 1275; (1979)
25. Morales-Ramírez, P; Vallarino-Kelly, T; y Rodríguez-Reyes, R; Effect of BrdUrd and low doses of gamma radiation on SCE, chromosome breaks and mitotic delay in mouse bone marrow cells in vivo. Enviromental Mutagenesis, 5: 589 - 602; (1983)
26. Morales-Ramírez, P; Vallarino-Kelly, T; y Rodríguez-Reyes, R; In vivo persistence of SCE induced by gamma rays in mouse bone marrow cells. Enviromental Mutagenesis, 6: 529 - 537; (1984)
27. Renault, G; Gentil, A; Chouroulinkov, V; Kinetics of induction of sister - chromatid exchanges by X-ray through two cell cycles. Mutation Res., 94: 359 - 368; (1982)
28. Fornace, A; Nagasawa, H; y Little, B; Relation of DNA repair to chromosome aberrations, SCE and survival during liquid-holding recovery in X-irradiated mammalian cells. Mutation Res., 70: 323 - 336; (1980)
29. Abramovsky. I; Vorsanger, G; Kurt, H; Sister-chromatid exchange induced by X-ray of human lymphocytes and the effect of L-cysteine. Mutation Res., 50: 93 - 100 (1978)

30. Painter, R; A replication model for sister chromatid exchange. Mutation Res., 70: 337 - 341; (1980)
31. Ishii, Y; y Bender, M; Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light induced sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells. Mutation Res., 79: 19 - 32; (1980)
32. Latt, S; Allen, J; Bloom, S; Carrano, A; Falke, E; Kram, D; Schneider, E; Schreck, K; Tice, R; Whitfield, B;; Wolff, S; Sister-chromatid exchanges: a report of the gene - tox program. Mutation Res., 87: 17 - 62; (1981)
33. Latt, S Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair; detection by fluorescence and induction by Mitomycin C. Proc. Nat. Acad. Sci., 71(8): 3162 - 3162; (1974)
34. Stenstrand, K; Effects of ionizing radiation on chromosome aberrations, SCE and micronuclei in lymphocytes of smokers and non smokers. Hereditas, 102: 71 - 76; (1985)
35. Littlefield, G; Colyer, S; Joiner, E; Sister chromatid exchanges in human lymphocytes exposed to ionizing radiation during G₀. Radiation Res., 78: 514 - 521; (1979)
36. Nagasawa, H; y Little, J; Induction of chromosome aberrations and sister chromatid exchanges by X-rays in density inhibited cultures of mouse 10 T 1/2 cells. Radiation Res., 87: 538 - 551; (1981)

37. Andersson, A; Khilman, B; Palitti, F; Production of sister chromatid exchanges by X-rays under aerobic conditions. Hereditas, 94: 41 - 44; (1981)
38. Sankaranarayanan, K; Genetic effect of ionizing radiation in multicellular eukaryotes and the assesment of genetic radiation hazards in man. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam; (1982)
39. Müller, H; The nature of the genetic effects produced by radiation, in: A. Hollaender (Ed.), Radiation Biol., - McGraw Hill, New York; Parte 1, Capítulo 7, 351 - 473; (1954); que aparece ne la referencia 38 de esta bibliografía.
40. Corry, P; Cole, A; Radiation - induced double strand scission of DNA of mammalian metaphase chromosomes. - Radiation Res., 36: 528 - 543; (1968)
41. Evans, H; Chromosome aberrations induced by ionizing radiation. Int. Rev. Cytol., 13: 221 - 321; (1962)
42. Yuhas, M; Radiotherapy of experimental lung tumors in the presence and absence of radioprotective drug S-2-(3-aminopropylamino) ethylphosphorothioic acid (WR-2721). J. of the Nat. Can. Inst., 50: 69 - 78; (1973)
43. Harris, W; Phillips, L; Radiobiological and biochemical studies of thiophosphate radioprotective compound related to cysteamine. Radiation Res., 46: 362 - 379; (1971)

44. Yuhás, M; Yurconic, M; Combined use of radioprotective and radiosensitizing drugs in experimental radiotherapy. Radiation Res., 70: 433 - 443; (1977)
45. Mitzneg, P; On the mechanism of radioprotection by cysteamine. II. The significance of cyclic 3'5' AMPc for the cysteamine induced radioprotective effects on white mice. Int. J. Radiat. Biol., 24(4): 339 - 344; (1973)
46. Patt, H; Tyree, E; Straube; y Smith J; Cysteine protection against X irradiation. Science, 110: 213 - 214; (1949)
47. Bacq, Z; Herve, A; Lacompte, J; Fischer, P; Blavier, J; Dechamps, G; Lebihan, H; Rayet, P; Protection contre le rayonnement X par la β -mercaptoéthylamine. Arch. Int. Physiol., 59: 442 - 447; (1951)
48. Rugh, R; Wolff, J; Evidence of some chemical protection of the mouse ovary against X - irradiation sterilization. Radiation Res., 7: 184 - 189; (1957)
49. Luning, K; y Frolen, H; The protective effect of cysteamine against genetic damages by X - rays in spermatozoa from mice. Radiation Res., 14: 813 - 818; - (1961)
50. Sarkovic, N; y Pecevski, J; The effects of cysteamine and AET Cl HCl on the induction of meiotic chromosome rearrangements in irradiated male mice. Can. J. Genet. Cytol., 16: 85 - 89; (1974)

51. Sasaki, M; y Matsubara, S; Free radical scavenging in protection of human lymphocytes against chromosome aberration formation by gamma-ray irradiation. Int. J. Radiat. Biol., 32(5): 439 - 445; (1977)
52. Vergroesen, A; Budke, L; y Vos, O; Protection of tissue -culture cells against ionizing radiation. III. The influence of anoxia on the radioprotection of tissue - culture cells by cysteamine. Int. J. Radiat. Biol., - 6(2): 117 - 126; (1962)
53. Sato, F; Shikita, M; y Terasima, F; Gradual development of radioprotection in HeLa S₃ cells during treatment with mercapto ethyl guanidine. Radiation Res., - 44: 660 - 669; (1970)
54. Pitra, C; Hartwig, M; y Korner, J; Radioprotective action of cysteamine: primary DNA lesions, cell survival and mutation frequency. Stud. Biophys., 62: 31 - 43; (1977)
55. Kusnetsova, N; Feoktistova, P; y Shapiro, I; Influence of cysteamine on X-ray induction mutations on resistance to 8 - azaguanine in Chinese hamster cells in vitro. Genetika, 11(2): 56 - 63; (1975)
56. Cerda, H; y Rosander, K; DNA damage in irradiated endothelial cells of the rat cerebral cortex. Protective action of cysteamine in vivo. Radiation Res., 95: 317 - 326; (1983)
57. Ono, T; y Okada, S; Estimation in vivo of DNA strand breaks and their rejoining in thymus and liver of mouse. Int. J. Radiat. Biol., 25: 291 - 301; (1974)

58. Sawada, S; y Okada, S; Cysteamine, cystamine and single strand break of DNA in cultured mammalian cells. Radiation Res., 44: 116 - 132; (1970)
59. Modig, H; Edgren, M; Révész, L; Effect of radioprotective aminothiols on the induction and repair of single - strand breaks in the DNA of irradiated mammalian cells. Acta Radiol. Therapy Physics Biol., 16: 245 - 256; (1977)
60. Lafleur, M; Woldhuis, J; y Loman, H; Effects of sulphydryl compounds on the radiation damage in biologically active DNA. Int. J. Radiat. Biol.
61. Sinclair, K; Protection by cysteamine against lethal X-ray damage during the cell cycle of Chinese hamster cells. Radiation Res., 39: 135 - 154; (1969)
62. Yu, K; y Sinclair, K; Protection by cysteamine against mitotic delay and cromosomal aberrations by X - ray in synchronized Chinese hamster cells. Radiation Res., 43: 357 - 371; (1970)
63. Pomerantseva, M; y Vilkina, G; Influence of cysteamine on the yield of dominant lethal mutations and reciprocal translocations in germ cells of mice subjected to gamma radiation at various doses. Genetika, 10(7); 56 - 61; (1974)
64. Pomerantseva, M; y Ramaija, L; Effectiveness of application of various radioprotective agents against genetic effects of ionizing radiation in mice male. J. Radiobiology, 21(5): 722 - 729; (1981)

65. Pomerantseva, M; y Ramaija, L; Chemical protection against genetic effect of radiation in male mice. Mutation Res., 140: 131 - 135; (1984)
66. Roots, R; y Okada, S; Protection of DNA molecules of cultured mammalian cells from radiation - induced single - strand scissions by various alcohols and SH compounds. Int. J. Radiat. Biol., 21: 329 - 342; (1972)
67. Révész, L; y Bergstrand, H; Radiation protection by cysteamine and cellular sulphhydryl levels. Nature, - 200: 594 - 595; (1963)
68. Révész, L; y Modig, H; Cysteamine - induced increase of cellular glutathione - level: a new hypothesis of the radioprotective mechanism. Nature, 201: 430 - 431; - (1965)
69. Modig, G; Edgren, M; y Révész, L; Release of thiols form cellular mixed disulphides and its possible role in irradiation protection. Int. J. Radiat. Biol., 22(3): 257 - 268; (1971)
70. Griem, K; Weichselbaum, R; y Umans, R; Work in progress: radioprotection of human brest cancer cells by elevation of intracellular cyclic AMP. Radiology, 148: 289 - 290; (1983)
71. Conger, A; Sodicoff, M; y Samel, A; Comparison of cAMP with other radioprotectors against chronic damage to the rat parotid gland. Radiation Res., 102: 99 - 105; - (1985)

72. Devik, F; y Lothe, F; The effect of cysteamine and hypoxia on mortality and bone marrow chromosome aberrations in mice after total body roentgen irradiation. Acta Radiol., 44: 243; (1955)
73. Adams, G; McNaughton, G; y Michael, B; Trans. Faraday Soc., 64: 90; (1968), que aparece en la referencia 60 de esta bibliografía.
74. Rix - Montel, M; Vasilescu, D; y Sentenac, H; Dielectric, potentiometric and spectrophotometric measurements of the interaction between DNA and cysteamine. Stud. - Biophys., 69(3): 209 - 224; (1978)
75. Mitzneg, P; y Sabel, M; On the mechanism of radioprotection by cysteamine. I. Relationship between cysteamine - induced mitotic inhibition and radioprotective effects in the liver of young and senile white mice. Int. J. Radiat. Biol., 24(4): 329 - 337; (1973)
76. Eker, P; y Phil, A; Studies on the growth inhibiting and radioprotective effect of cysteamine, cystamine and AET on mammalian cells in tissue culture. Radiation - Res., 21: 165 - 179; (1964)
77. Vergroesen, A; Budke, L; y Vos, O; Protection against X - irradiation by sulphhydryl compounds. II. Studies on the relation between chemical structure and activity for tissue culture cells. Int. J. Radiat. Res., 13(1): 77 - 92; (1967)
78. Nasjleti, E; y Spencer, H; Chromosome damage after treatment with cysteamine in non irradiated human leukocytes.

J. Nucl. Med., 10(7): 495 - 500; (1969)

79. Speit, G; Wolf, M; y Vogel, W; The effect of sulphhydryl compounds on sister chromatid exchanges. Mutation Res., 78: 267 - 272; (1980)
80. Speit, G, Wolf, M; y Vogel, W; Synergistic action of cysteamine and BrdUrd - substituted DNA in the induction of sister chromatid exchanges. Chromosoma, 81: 461 - 471; (1980)
81. Speit, G; Wolf, M; y Vogel, W; The SCE inducing capacity of vitamin C: investigations in vitro and in vivo. Mutation Res., 78: 273 - 278; (1980)
82. Speit, G; Wick, C; y Wolf, M; Induction of sister - chromatid exchanges by hydroxylamine, hydrazine and isoniazid and their inhibition by cysteine. Human Genet., 54: 155 - 158; (1980)
83. McRae, W; y Stich, H; Induction of sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells by thiol and hydrazine compounds. Mutation Res., 68: 351 - 365; (1979)
84. Speit, G; y Vogel, W; The effect of sulphhydryl compounds on sister chromatid exchanges. II. The question of cell specificity and the role of H₂O₂. Mutation Res., 93: 175 - 183; (1982)
85. Morales - Ramírez, P; Analysis in vivo of sister chromatid exchange in mouse bone marrow and salivary gland cells. Mutation Res., 74: 61 - 69; (1980)

86. Hafez, M; y El-nabi, A; Enhanced response to the induction of sister chromatid exchange by gamma radiation in neurofibromatosis. (Resumen) Cancer, 10: 1937 - 1940; (1986)
87. Morales-Ramírez, P; y Mendiola-Cruz, M.T; Effect of cysteamine on SCE induction by gamma rays in murine bone marrow cells in vivo. Journal of the Environmental Mutagen Society, Vol. 9, Suppl. 8, EMS abstracts; (1987)
88. Schmidt, M; Provocation and palliation of of in vitro cellular aging. (Resumen) Tesis Doctoral, 96 p. (1983)
89. Littlefield, L; Joiner, E; y Frome, E; Modulation of radiation-induced chromosome aberrations by DMSO - an OH⁻ radical scavenger. Journal of the Environmental Mutagen Society, Vol. 9, Suppl. 8, EMS abstracts; (1987)
90. Mac Laren, A; Au, W; Ramanujam, S; y Legator, M; The effect of hydroxyl radical scavengers on X-ray induced DNA damage in normal and down syndrome (DS) lymphocytes. Journal of the Environmental Mutagen Society, Vol. 9, - Suppl. 8, EMS abstracts; (1987)
91. Kligerman, A; Erexon, G; y Westbrook-Collins, B; A comparison of the frequencies of chromosome breakage in mouse and human peripheral blood lymphocytes (PBLs). Journal of the Environmental Mutagen Society, Vol. 9, Suppl. 8; (1987)
92. Therkelsen, A; Protection of cells in tissue culture by means of cysteamine and cystamine against the action of nitrogen mustard and X-rays. Biochem. Pharmacol, 8: 269 - 271; (1961)

93. Radford, I; y Broadhurst, S; Enhanced induction by X-irradiation of DNA double - strand breakage in mitotic as compared with S-phase V 79 cells. Int. J. Radiat. - Biol. Relat. Stud, Phys. Chem. Med., 49(6): 909 - 914; (1986)
94. Speit, G; Menhert, K; y Wolf, M; Ultraviolet-induced sister chromatid exchanges in V 79 cells with normal and BrdUrd - substituted DNA and the influence of intercalating substances and cysteine. Radiation Res., 90: 538 - 546; (1982)
95. Kato, H; Induction of sister chromatid exchanges by U.V. light and its inhibition by caffeine. Exp. Cell Res., 82: 383 - 390; (1973)
96. Inoue, K; Shibata, T; y Kosaka, H; Induction of sister chromatid exchanges by N-nitrosocimetidine in cultured human lymphocytes and its inhibition by chemical compound. Mutation Res., 156: 117 - 121; (1985)
97. Vexler, F; Eidus, L; y Vexler, A; Kinetics of repair of DNA single-strand breaks in cultured mammalian cells. The effect of chemical modifying agents. Stud. Biophys., 99(3): 169 - 176; (1984)
98. Howard, A; Radiation Biophysics. Prentice - Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey; USA. (1961)
99. Evans, H; Lloyd, D; Mutagen-induced chromosome damage in man. New Haven Yale University Press, (1978)
100. Kovalev, V; Plotnikova, E; Eidus, K; Effect of chemical protection on the post-radiation recovery of cri-

- tical system in the bodies of mammals. Radiobiologiya, 13(2): 225 - 229; (1973)
101. Purdie, W; y Inayeh, A; Antagonism of adenosine triphosphate towards the radioprotective effect of cysteamine in cultured human cells. Int. J. Radiat. Biol., 33(4): 387 - 391; (1978)
102. Liquier, J; Fort, L; y Nguyen, D; DNA protection by aminothiols: study of the cysteamine - DNA interaction by vibrational spectroscopy. Int. J. Biol. Macromol., 5: 89 - 92; (1982)
103. Bresler, E; Noskin, L; y Sverslov, A; Genetic comparison of the radioprotective action of cysteamine on the gamma - irradiated E. coli cells. (Resumen) Radiobiologiya. 16(6): 824 - 829; (1976)
104. Bresler, E; y Noskin, L; Mechanism of repair and effects of radioprotectors on E. coli cells. (Resumen) Radiobiologiya, 18(4): 548 - 556; (1978)
105. Vexler, F; Eidus, L; y Kondakova, N; Influence of cysteamine on the repair of DNA single-strand break in the irradiated Chinese hamster fibroblast. (Resumen) Radiobiologiya, 12(2): 191 - 195; (1972)
106. Gebhart, E; y Becher, R; Comparative studies on the specificity of anticlastogenic action in human lymphocytes in culture. Human Genet., 32: 49 - 64; (1976)
107. Dubinin, H; Nemtseva, L; y Mamedov, K; Cysteamine and the phenomenon of chromosome vesting. Genetika, 12(2): 59 - 65; (1976)

108. Morales - Ramírez P; Efectos genéticos de las radiaciones. Cuadernos del ININ. Serie de divulgación técnico científica. p. 16; (1982)
109. Evans, H; Molecular mechanism in the induction of chromosome aberrations, en: D. Scott, B. A. Bridges and F.H. Sobels (Eds), Progress in Genetic Toxicology, Elsevier/North - Holland Biochemical, Amsterdam, 57 - 74; (1977a)