



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

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

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A :**

**JUAN CARLOS IBAÑEZ SALVADOR**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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 está 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.

## CONTENIDO

	PAG.
RESUMEN	V
INTRODUCCION	1
I. - EFECTOS BIOLOGICOS DE LA RADIACION IONIZANTE	2
Interacción de las partículas	2
Efecto directo y efecto indirecto	4
Radicales libres	5
II. - DAÑO AL ADN POR RADIACION IONIZANTE	6
Daño a las bases del ADN por radiación ionizante	7
Rupturas de la cadena de ADN producidas por radiación ionizante	8
El mecanismo químico del rompimiento	9
Modificadores del efecto de la radiación	10
III. - RADIOPROTECCION	11
Panorama histórico	12
Cisteina	13
Mecanismos de acción de aminotioles en la radioprotección	16
Depuración de radicales libres y donación de hidrógeno	17
Producción de hipoxia	19
Mecanismo de mezcla de disulfuros	20
Liberación de sulfhidrilos de mezclas disulfuras celulares	20

Cambios reversibles en el metabolismo	21
IV. - INTERCAMBIO ENTRE CROMATIDES HERMANAS	22
Antecedentes	22
Significado biológico	26
ICH y radioprotección	30
OBJETIVO	33
MATERIAL Y METODOS	34
Animales	34
Incorporación de la BrdUrd	34
Cosecha y obtención de preparaciones de cromosomas	35
Tinción diferencial de las cromátides hermanas	36
Cisteína	36
Irradiación	37
Análisis	37
Rupturas Cromosómicas (RC)	37
Indice Mitótico (IM)	38
Tiempo de Generación Promedio (TGP)	38
Estadística	38
Protocolo	39
RESULTADOS	40
Efecto de la cisteína sobre la inducción de Intercambios entre Cromátides Hermanas (ICH) por radiación gamma	40
Efecto de la cisteína sobre la inducción de Rupturas Cro <u>mo</u> mosómicas (RC) por radiación gamma	42

Efecto de la cisteina sobre la modificación del Índice Mitótico (IM) por radiación gamma	43
Efecto de la cisteina sobre la modificación del Tiempo de Generación Promedio (TGP) producida por radiación gamma	43

#### DISCUSION

Efecto de la cisteina sobre la inducción de ICH por radiación gamma	45
Efecto de la cisteina sobre la inducción de RC por radiación gamma	49
Efecto de la cisteina sobre la modificación del IM por radiación gamma	50
Efecto de la cisteina sobre la modificación del TGP por radiación gamma	51

#### CONCLUSIONES

Tablas	54-57
Figuras	58-61
Bibliografía	62-68

## RESUMEN

El efecto de la cisteína sobre la inducción de Intercambios entre Cromátides Hermanas (ICH) por radiación gamma se determinó en células de médula ósea de ratón in vivo, observándose que la cisteína a una dosis de 600 mg/Kg no es capaz de evitar la inducción de ICH (aprox. 1.5 ICH/célula) por 0.7 o 2.0 Gy de radiación gamma.

Además se cuantificó el efecto de esta sustancia en otros eventos citogenéticos como son Rupturas Cromosómicas (RC), Índice Mitótico (IM) y Tiempo de Generación Promedio (TGP). En estos eventos se encontró lo siguiente:

- a) La cisteína no disminuye la inducción de rupturas cromosómicas por radiación gamma.
- b) Los resultados obtenidos para el índice mitótico muestran que la radiación gamma no tuvo efecto sobre este evento citogenético y que la cisteína per se posiblemente inhibe la división celular.
- c) En ninguno de los otros eventos citogenéticos analizados se presentó algún efecto de la cisteína per se.
- d) La radiación gamma (0.7 y 2.0 Gy) aumentó el tiempo de generación promedio y sólo en este caso la cisteína mostro efecto protector disminuyendo esta modificación.

## INTRODUCCION

El desarrollo de la física nuclear trae como resultado el uso extensivo de la energía nuclear en la tecnología, ciencia y medicina, originando que el estudio del daño inducido por la radiación y de la radioprotección adquieran mucha relevancia.

Es por esta razón que biólogos, físicos y químicos trabajan juntos en el área de las investigaciones nucleares para obtener más conocimientos sobre el daño producido por la radiación y la posible modificación de sus efectos.

En la medicina, las radiaciones se emplean en el tratamiento contra las enfermedades neoplásicas para lo cual existe estrecha relación entre los conocimientos de la radiobiología y la radioterapia. La eficiencia de la radioterapia en el control de tumores humanos depende de la dosis de radiación transmitida al tumor, no obstante esta dosis es reducida por el tejido normal adyacente que inevitablemente es irradiado. Además hay que tomar en cuenta que las radiaciones tienen la potencialidad de inducir daño genético y cáncer en el tejido sano.

Existe el interés de los biólogos y radioterapeutas por encontrar algún método, quizá mediante el uso de un agente químico protector que permita que el tratamiento por radiación sólo dañe a las células del tumor.

En principio existen dos posibilidades de inducir radiosensibilidad

diferencial entre las células tumorales y las normales por medios químicos; una sería reduciendo selectivamente la radiosensibilidad de las células normales con radioprotectores químicos (radioprotección diferencial) y la otra incrementando la radiosensibilidad de las células del tumor con sensibilizadores químicos que no afecten las células del tejido normal (radiosensibilización diferencial).

En el sentido de proteger a las células con radioprotectores químicos la cisteína se ha empleado en condiciones in vitro obteniéndose buenos resultados, por lo cual resulta de suma importancia conocer el efecto de este compuesto en sistemas in vivo y tomando como parámetro principal el fenómeno de Intercambio entre Cromátides Hermanas (ICH) el cual ha mostrado ser muy sensible al efecto de la radiación.

## I. - EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA RADIACIÓN IONIZANTE (1) .

### Interacción de las partículas.

La radiación es energía que viaja a través del espacio, es energía en tránsito ya sea en forma de ondas electromagnéticas o de partículas moviéndose a alta velocidad, estas pueden ser de varios tipos tales como electrones, protones y partículas alfa emitidas por átomos inestables.

Las radiaciones ionizantes producen partículas eléctricamente cargadas o iones cuando interactúan con la materia. Una interacción es elástica si la suma de la energía cinética de las entidades que par-

ticipa son inalteradas, si la suma de la energía cinética es alterada, entonces la interacción es inelástica. Protones ( ${}^1_1\text{H}$  núcleo), neutrones ( ${}^1_0\text{n}$  núcleo), partículas alfa ( ${}^4_2\text{He}$  núcleo) y otras partículas pesadas pierden más energía cuando interactúan inelásticamente con electrones de materia absorbentes. La transferencia de energía se lleva a cabo por la interacción de campos eléctricos y el contacto físico entre las partículas incidentes y los electrones no se requiere. Parte de la energía perdida por las partículas incidentes es usada para elevar electrones a niveles energéticos más alejados del núcleo, éste proceso es llamado excitación. Algunas veces los electrones son expulsados y a éste proceso se le conoce como ionización.

Los electrones expulsados por la radiación incidente son los electrones primarios. Algunos electrones primarios tienen suficiente energía cinética para producir un par iónico adicional cuando ellos migran de su sitio de liberación. Los electrones expulsados durante la interacción de electrones primarios se nombran electrones secundarios.

La energía transferida con exceso a un electrón se muestra como la energía del electrón expulsado. Estos electrones y el ión positivo residual constituyen un par iónico.

La ionización específica (SI) es el número de pares iónicos primarios o secundarios producidos por unidad de longitud del trayecto de la radiación ionizante.

La energía lineal de transferencia (LET) es el promedio de la pérdida de energía por unidad de longitud del trayecto de la radiación incidente

y es expresada como  $\text{KeV}/\mu\text{m}$  o  $\text{erg}/\mu\text{m}$  LET depende de la masa, carga y velocidad de las partículas.

$$\text{LET} = \text{SI} \times \text{W}$$

donde: LET= Energía lineal de transferencia

SI = Ionización específica

W = Masa

#### Efecto directo y efecto indirecto (2)

La radiación ionizante a la cual se expone el material biológico es de energía moderada, su intensidad y frecuencia depende de la dosis y el tipo de radiación considerada.

La energía lineal de transferencia (LET) tiende a ser mayor cuando la masa de las partículas aumenta, en consecuencia la irradiación fotónica (electrones) resulta comparativamente de bajo LET, la cual produce menor daño que la irradiación de neutrones de alto LET. Debido a esto varios tipos de radiación producen diferentes grados de daño con la misma dosis.

Cuando las células son irradiadas el daño es producido principalmente por ionización y radicales libres.

La radiación de bajo LET tal como los rayos X y rayos gamma producen daño principalmente por radicales libres mientras que la radiación de alto LET tales como protones y partículas alfa producen daño principalmente por ionización. El efecto producido por la radiación del alto LET no es modificable.

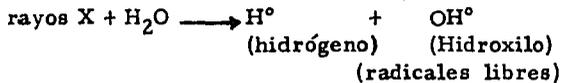
El daño producido a las células debido a la ionización directa de alguna de sus moléculas y como consecuencia la inactivación de ésta es de

efecto directo. El efecto indirecto o acción indirecta de la radiación por la cual moléculas biológicas son inactivadas se produce por radicales libres los cuales principalmente se forman cuando la radiación interactúa con el agua.

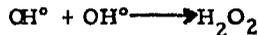
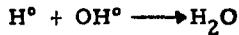
### Radicales libres ( I )

Los radicales libres son átomos o moléculas que tienen un electrón no apareado, se forman por el rompimiento de enlaces químicos, estos radicales son inestables y altamente propensos a interactuar con los átomos y moléculas que se encuentran alrededor de ellos.

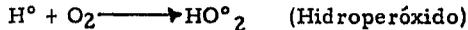
Cuando rayos X interactúan con el agua, dos tipos de radicales libres se forman:



Estos radicales se combinan y dan las siguientes reacciones:



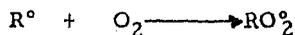
La presencia de un exceso de oxígeno durante la irradiación permite la formación de radicales libres adicionales:



La combinación de moléculas orgánicas (RH) con radicales hidroxilo forman un radical libre orgánico (R°)



El radical libre orgánico ( $R^\circ$ ) se combina con el  $O_2$  y se forma el radical libre peróxido ( $RO_2^\circ$ )



El exceso de  $O_2$  permite la formación de dos radicales libres adicionales que son el hidropéroxido ( $HO_2^\circ$ ) y el peróxido ( $RO_2^\circ$ ).

Esto puede ser en parte considerado para el incremento del daño producido por la 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 estos radicales es generalmente menor de  $10^{-10}$  seg. Sin embargo, existen algunos derivados de sustancias orgánicas complejas que son estables y no se combinan rápidamente.

Los radicales libres  $OH^\circ$  y  $HO_2^\circ$  son agentes oxidantes, el radical libre  $H^\circ$  es un agente reductor.

## II. - DAÑO AL ADN POR RADIACION IONIZANTE

La radiación ionizante puede causar daño a todos los componentes celulares, incluyendo al ADN, siendo éste el daño de mayor importancia debido a que ésta es la molécula portadora de la información genética, de la cual depende la transmisión de las características de una célula a sus descendientes o de un organismo a otro y regula funciones celulares tales como diferenciación, metabolismo y relación con otras células.

La radiación ionizante constituye una fuente de daño físico al ADN de los organismos y ha estado presente desde el inicio de la evolución biológica.

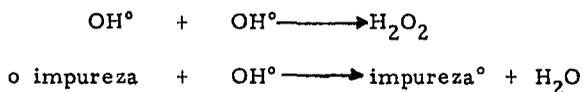
La disposición de energía de la radiación ionizante da como resultado la formación de moléculas excitadas y ionizadas. Tradicionalmente el daño radioinducido al ADN ha sido atribuido al efecto directo y al efecto indirecto. El efecto indirecto es el resultado de la interacción directa de la energía de la radiación con el ADN y el efecto indirecto resulta de la interacción de especies reactivas (formadas por la radiación) con el ADN.

Puesto que en las células vivas el ADN se encuentra en un medio que contiene numerosas especies moleculares, iones inorgánicos y agua, una gran variedad de fuentes potenciales de especies reactivas pueden existir como moléculas excitadas, radicales iónicos o radicales libres, los cuales posteriormente se convertirán en productos químicos estables. De la gran cantidad de mecanismos de reacción y el mismo número de reactivos potenciales, surge la posibilidad de formar una gran cantidad de productos derivados de la radiación ionizante en el ADN. Sin embargo la predominancia del agua en los sistemas biológicos sugiere que las especies formadas por la radiólisis del agua es la mayor fuente potencial de daño (3). Estas especies han sido bien caracterizadas anteriormente.

#### Daño a las bases del ADN por radiación ionizante

Las primeras medidas del daño de las bases del ADN indican que todas las bases parecen ser igualmente susceptibles al efecto producido por la radiación ionizante. No obstante la organización molecular del ADN aparentemente afecta el producto de las bases dañadas, por ejemplo, el número total de las bases dañadas depende en gran parte de la concentración de ADN.

Esto puede resultar de la relativamente baja constante de reacción de radicales hidroxilo con el ADN, así que a baja concentración de ADN la depuración de radicales hidroxilo ocurre debido a reacciones de competencia tales como:



Una variedad de moléculas depuradoras de hidroxilos tales como cisteína y glutatión existen en la célula y pueden competir con el ADN por los radicales libres altamente reactivos (3). En suma muchos radicales hidroxilo resultan de la radiólisis del agua y puesto que estos tienen un pequeño radio de efectividad, la región hidrofóbica del ADN es significativamente protegida del ataque por radicales. Así la orientación de las bases en el interior del ADN de cadena doble en algún grado protege a estas del daño producido por la radiación ionizante (4).

#### Rupturas de la cadena de ADN producidas por radiación ionizante.

La formación de rupturas de la cadena de ADN es una consecuencia biológica importante producto de la radiación ionizante sobre las células. La mayoría de estas rupturas son causadas por el rompimiento de enlaces fosfodiéster en una de las cadenas polinucleotídicas, pero la destrucción del anillo de desoxirribosa puede también dar como resultado interrupciones del esqueleto desoxirribosa-fosfato.

La inducción de rupturas de cadena simple en el ADN por radiación puede dar por resultado una desnaturalización en la vecindad del rompimiento

to, con lo cual se incrementa la probabilidad del ataque mediado por radicales libres a éstos sitios debido a la pérdida del efecto protector que otorgaba la orientación de las bases en el interior del ADN duplex.

Al igual que el daño a las bases, las rupturas de la cadena de ADN pueden resultar del efecto directo o indirecto de la radiación. En el primer caso la deposición de aproximadamente 9 eV de energía es suficiente para romper el esqueleto ribosa-fosfato (5).

En relación al efecto indirecto los radicales hidroxilo parecen ser de importancia principal de la lisis de los enlaces fosfodiéster (6).

#### El mecanismo químico del rompimiento

El mecanismo químico de rompimiento de la cadena de ADN es variado y complejo, como lo son muchos procesos radiolíticos. Estos pueden envolver ionización directa del enlace fosfodiéster o reacciones de fragmentación involucrado a las bases o a los azúcares. En los nucleótidos los radicales  $\text{OH}^\circ$  reaccionan preferencialmente con las bases en una reacción que permite la ruptura del enlace azúcar fosfato y sólo el 10%-20% de  $\text{OH}^\circ$ s reaccionan con la pentosa (3).

Con la excepción de los virus que contienen genomas de ADN de cadena simple, el grado de la formación de rupturas simples se correlaciona principalmente con la letalidad causada por la radiación ionizante. Una mejor correlación de la letalidad es obtenida con rupturas de cadena doble en el ADN de células vivas. Esto puede surgir de yuxtaposiciones muy estrictas de incisiones de cadena simple de diferente origen en cadenas

opuestas del ADN duplex, o por un simple evento resultado de la hidrólisis de las uniones fosfodiéster en ambas cadenas de ADN. Cualquiera de los dos fenómenos pueden resultar del efecto directo o indirecto de la radiación ionizante. El producto de las rupturas simples y dobles de las cadenas del ADN pueden ser modificadas por la presencia de depuradores de radicales libres y oxígeno (6).

#### Modificadores del efecto de la radiación

La respuesta de las células al efecto de la radiación puede ser afectada por la presencia de varios compuestos durante la radiación. Se postula que estos compuestos actúan durante el periodo de la producción del daño por radiación.

Si una reacción se proyecta para la producción de daño en el ADN in vivo se postulan las siguientes reacciones:

Efecto directo



Efecto indirecto



La reacción 1 representa el efecto directo de la radiación en la producción de especies reactivas de ADN. El grado de ésta reacción sólo es controlada por la relativa masa de ADN presente, la presencia de otros compuestos no pueden afectar la cantidad de reacción ocurrida.

Los modificadores del efecto de la radiación actúan durante las rea-

cciones 2, 3 y 4.

La reacción 2 representa la reacción de radicales libres móviles ( $X^\circ$ ) con el ADN. La modificación de ambos reactantes es posible; el ADN puede ser modificado, así que éste reacciona con un gran número de especies  $X^\circ$ , ejemplo, muchos de los productos de la radiación causan daño en el ADN.

La cantidad de especies  $X^\circ$  que reaccionan con el ADN puede ser reducida por adición de compuestos químicos que reaccionan con  $X^\circ$ .

La reacción 3 representa la restitución química por reacción química del ADN después del daño inicial causado por la reacción 2.

Las reacciones del tipo 3 pueden estar en competencia con reacciones tales como 4 en las cuales un radical en el ADN reacciona y se une químicamente a otra molécula S.

La reacción 3 y 4 probablemente ocurren in vivo en competencia, la cual es de la misma magnitud en ausencia de la adición de compuestos químicos. La adición de compuestos cambian las cantidades relativas de las reacciones 3 y 4.

Las reacciones de tipo 4 que ocurren con constituyentes naturales posiblemente sean reparadas más fácilmente que aductos formados por introducción de compuestos exteriores (3).

### III. - RADIOPROTECCION.

El estudio de la radioprotección ha sido estrechamente vinculada al uso de la radiación ionizante, puesto que es reconocido que la radiación

ionizante puede producir determinados efectos .

El desarrollo de la investigación en radioprotección proviene de los años 1920 s como el resultado del descubrimiento del efecto del oxígeno y su redescubrimiento en los primeros años 1940 s. De la observación de que la presencia de oxígeno durante la exposición a radiación aumenta el efecto surge la idea de que los compuestos que remueven o unen al oxígeno pueden ser usados en la radioprotección.

Durante mucho tiempo se ha tenido el conocimiento de que los grupos sulfhidrilo son una parte estructural importante de proteínas y juegan un papel substancial en sus funciones. Con el reconocimiento que los grupos sulfhidrilos contenidos en enzimas son muy sensibles a la radiación y que la presencia de cisteína en cierta manera puede prevenir algunos daños producidos por la radiación, las sustancias con grupos sulfhidrilo (SH) se convierten en las fuentes más prometedoras de agentes radioprotectores.

Los radioprotectores se definen como sustancias o procedimientos los cuales disminuyen significativamente el daño producido por la radiación cuando son administrados a los organismos antes de la exposición a la radiación, cuando son administrados después éstos no reducen el daño .

#### Panorama histórico.

La demostración del efecto protector de la cisteina realizada por Patt en 1949 y 1950 (7,8) da inicio a una continua investigación de agentes protectores mas efectivos . .

Poco tiempo después el glutatión y la mercaptoetilamina(MEA), uno de los agentes mas efectivos hoy en día fueron establecidos como protec-

tores(9)..

En 1955 en el curso de los estudios de mercaptoalkilaminas Doherty Burnett y Shapira(10) descubrieron una nuevaclase de agentes protectores las aminoalkilisotioureas (AET) y sus productos rearrreglados. las mercaptoalkilguanidinas (MEG) (9) , ellos tambien mostraron que la máxima actividad protectora puede ser encontrada solo en compuestos donde la separación entre base y tiol o tiol potencial no fuera mayor a tres átomos de carbono.

Estos descubrimientos con cisteina, MEA y AET proveen un estímulo necesario para la investigación de tioles protectores más efectivos y menos tóxicos.

#### Cisteina

La cisteina está incluida dentro del grupo de los aminotioles, el cual además comprende a 2-mercapto etilamina (cisteamina) , cistamina, aminoetilisotiourea dihidrobromuro ( AET ) y 2-mercapto etilguanidina (MEG).

Estas aminas sulfhidrilas son fuertes agentes reductores y todas presentan propiedades radioprotectoras.

El aminoácido cisteina es constituyente de la estructura protéica que en su molécula presenta un grupo amino y un grupo sulfhidrilo, se abrevia Cys. (IUPAC). La L-cisteina; mercaptoalanina  $C_3H_7NO_2S$ , tiene peso molecular de 121.16 con los siguientes porcentajes C 29.74%, H 5.82%, N 11.56% O 24.41% y S 26.47%,  $HSCH_2CH(NH_2)COOH$ .

La L-cisteina se convierte a L-cistina por hidrólisis en presencia de aire.

La primera evidencia del efecto radioprotector de la cisteína fue reportada por Patt en 1949 (7), quien observó el efecto de la cisteína HCL y cistina en la radiosensibilidad de las ratas y encontró que el pretrata-miento con cisteína reduce marcadamente la toxicidad de las ratas expues-tas a la radiación X, la administración posterior a la radiación no presentó algún efecto. Además observó que el disulfuro cistina administrado an-tes de la radiación no tiene efecto protector.

En 1950 Patt y col. continuaron los estudios de radioprotección y obtuvieron resultados que indican que la cisteína disminuye la radiosensibi-lidad de los organismos (ratas y ratones) cuando es administrada a 5 min.ó 1 hr. antes de la radiación X, la administración posterior a la radia-ción ó 6 hr. y 24 hr. antes no tuvieron efecto. Además compararon el efecto de otras sustancias como glutatión, cistina, metionina, ácido ascor-bico y sulfuro de sodio, encontrando que todas éstas sustancias excepto glu-tatión no alteran la supervivencia después de la radiación (8).

La investigación citológica de células de médula ósea de ratón in vivo realizada por Devik en 1952, a los cuales se les administró agentes pro-tectores y subsecuente irradiación muestra que la cisteína y otras sustan-cias como glutatión, ácido ascorbico, cloruro de tiocolina, vitamina B y tiourea no producen ningún efecto citológico per se, sin embargo ninguno de los agentes administrados modificó el daño causado a las células ex-puuestas a la radiación X (200r) la cual produce daño visible a 60% - 70% de las anafases, analizando fragmentos cromosómicos, retardo de los cromosomas hijos los cuales se mueven a los polos opuestos y cromosomas

dicéntricos. Sólo con la cisteina se presentó una ligera reducción en el número de fragmentos (11).

En 1954 Devik mostró los efectos protectores de la combinación de hipoxia y cisteina midiendo este efecto en letalidad y daños citogenéticos de la médula ósea de ratón. Los resultados indican que pocos ratones pudieron sobrevivir a 800 r irradiados después de la aplicación de la cisteina, siendo normalmente 600 r la dosis letal  $LD_{100}$ , la hipoxia incrementó la  $LD_{100}$  a cerca de 110 r. Cuando la cisteina fue combinada con la hipoxia la  $LD_{100}$  se incrementó moderadamente y el tiempo de supervivencia también se incrementó (12).

En contraste con el trabajo anterior de Devik (1952), se observó una reducción del daño citológico en las células de la médula ósea, siendo del mismo grado la producida por la cisteina y la producida por hipoxia, el efecto se suma cuando los dos tratamientos se combinan. El efecto de la cisteina no fue claro cuando la solución de cisteina no fue ajustada a PH 7 previamente.

Se han realizado diversos trabajos para conocer más sobre las propiedades de la cisteina en la radioprotección de los organismos, de los cuales sólo se mencionan algunos.

En células de raíces primarias de Tradescantia paludosa la cisteina reduce la inducción de aberraciones cromosómicas por radiación gamma (13).

Estudios realizados con Escherichia coli tomando como parámetro la supervivencia muestran que la cisteina ofrece protección significativa

contra los rayos X y además muestran que el mecanismo de acción de la cisteína incluye una reacción independiente del oxígeno (15,16).

Se ha demostrado en linfocitos humanos que la cisteína protege contra la formación de aberraciones cromosómicas por radiación gamma (17).

Además del efecto radioprotector de la cisteína se ha observado un efecto protector contra la inducción de aberraciones por mutágeno químico en cromosomas humanos in vitro (18).

#### Mecanismos de acción de aminotioles en la radioprotección

Como se ha mencionado anteriormente el grupo de los aminotioles es particularmente efectivo en la radioprotección de los organismos, pero el mecanismo de acción no ha sido posible explicarlo con una simple teoría debido a que éstos mecanismos son complejos y usualmente envuelven a más de uno de ellos.

Con pocas excepciones los aminotioles más efectivos son aquellos cuya estructura se encuentra estrechamente relacionada a la cisteamina  $\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ . Los disulfuros correspondientes son usualmente iguales en actividad a medida que éstos compuestos son fácilmente metabolizados a éste tipo de compuesto.

Algunas generalizaciones de la estructura son, el grupo tiol y el grupo amino no deben de estar separados por más de tres átomos de carbono (10), es requerido un grupo -SH libre puesto que tioesteres son inactivos (19).

Los siguientes mecanismos de acción han sido sugeridos para éstos compuestos; depuración de radicales libres y donación de hidrógeno, producción de hipoxia, mecanismo de mezcla de disulfuros, liberación de sulhidrilos de mezclas disulfuras celulares y cambios reversibles en el metabolismo.

#### Depuración de radicales libres y donación de hidrógeno

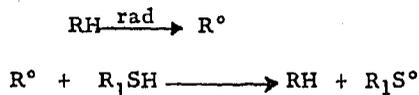
Johansen y Haward-Flanders en 1965 y Sanner y Pihl en 1969 encontraron una correlación similar entre la habilidad para depurar radicales  $\text{OH}^\circ$  y la reducción de la muerte celular en bacterias inducida por radiación. Estos investigadores no encontraron algún efecto análogo utilizando depuradores de electrones, indicando que los radicales  $\text{OH}^\circ$  son los de mayor responsabilidad del daño al ADN y la muerte celular (3).

Los compuestos aminotioles inactivan radicales libres formados por radiación, la adición de éstos compuestos a sistemas celulares generalmente protegen contra el efecto letal de la radiación. Su presencia también reduce la producción de rupturas de la cadena de ADN en bacterias (20) y células de mamífero (21).

Sasaki y Matsubara en 1977 estudiaron los efectos de las sustancias depuradoras de radicales libres sobre la inducción de aberraciones romosómicas por radiación gamma en linfocitos humanos y encontraron que los aminotioles cisteína y cisteamina, son más efectivos como depuradores - que los alcoholes (metanol y etanol) para proteger contra la formación de anillos cromosómicos y cromosomas dicentricos, concluyendo que el daño primario debido a la acción indirecta de la radiación produce radicales

libres que reaccionan con moléculas blanco (17).

Alexander y Charlesbi (1955) sugirieron que la protección ofrecida por los aminotioles ocurre por una reacción en la cual se presenta un mecanismo de donación de un átomo de hidrógeno, se sugiere que un átomo de hidrógeno perdido por una molécula significativa como resultado de la radiación puede ser remplazado por un átomo de hidrógeno donado por un compuesto aminotiol.



Así dentro de la célula esta reparación puede ser modificada por la administración de estos compuestos (3).

En 1972 Roots y Okada mostraron que la cantidad de rupturas de la cadena de ADN producidas en células de ratón pueden ser reducidas por la adición de varios químicos, la eficiencia con la cual éstos actúan corresponde a su razón de racción con radicales  $\text{OH}^\circ$ . Ellos también examinaron el efecto de los compuestos aminotioles y encontraron que éstos no sólo protegen más eficientemente (10 a 20 veces) que otros depuradores de ra radicales  $\text{OH}^\circ$  sino que ofrecen una máxima protección, y concluyen que éste incremento en eficiencia no puede ser relacionado a la habilidad para atrapar radicales  $\text{OH}^\circ$  sugieren que los compuestos aminotioles protegen por un mecanismo diferente, posiblemente por donación de un átomo de hidrógeno (22).

Este mecanismo se ha probado en varios sistemas pero aún no se ha demostrado que el efecto de los aminotioles en el ADN macromolecular

ocurra por éste mecanismo.

Los datos más confiables en la literatura sugieren que éste efecto puede ser explicado puramente en las bases de protección causada principalmente por la depuración de radicales  $\text{OH}^\circ$  por elevadas concentraciones de compuestos aminotioles.

#### Producción de hipoxia

Es bien conocido que las condiciones de hipoxia reducen el daño radioinducidos. Los compuestos aminotioles producen hipoxia al tejido, la cual debe ser un factor importante en la radioprotección.

Cuando los animales son desprovistos de oxígeno un número de reacciones reflejas toman lugar, en particular hay una intensa estimulación del sistema nervioso simpático el cual libera considerables cantidades de adrenalina y noradrenalina de las terminaciones de los nervios adrenérgicos. Estas dos aminas son buenas radioprotectoras (1).

En ratones se ha observado que la hipoxia incrementa la dosis letal  $\text{LD}_{100}$  de 600 r a 1100 r, además en células de médula ósea existió una reducción de aberraciones cromosómicas inducidas por 200 r de radiación X. La administración de cisteína aumenta ésta protección (12).

Las condiciones de hipoxia más la administración de alguno de los compuestos aminotiol aumentan el poder protector de éstos.

#### Mecanismo de mezcla de disulfuros.

Este mecanismo propone que los compuestos aminotioles forman mezclas disulfuro con proteínas tisulares que contienen grupos sulfhidrilos (-SH)

Se sugiere que un compuesto aminotiol forma un enlace S-S temporal con una enzima que tiene un grupo -SH, en las células estos enlaces protegen el átomo de azufre de la enzima contra la acción indirecta de la radiación. La reconstitución del grupo funcional SH de la enzima es posible después de la radiación debido a la actividad de la glutatión reductasa.

Esta hipótesis asume que las proteínas son el blanco más radiosensible dentro de la célula, sin embargo generalmente se considera que el ADN es la molécula blanco más radiosensible en la célula.

Este mecanismo ha sido postulado para los compuestos cisteamina y AET.

#### Liberación de sulfhidrilos de mezclas disulfuras celulares

Se ha observado (en cultivo de células de tumor de Ehrlich) que el incremento de la concentración de cisteamina en el medio de cultivo es asociado con un uniforme incremento del nivel de compuestos sulfhidrilos intracelulares no unidos a proteínas. Además existe una correlación entre el incremento de estos sulfhidrilos y la radioresistencia, esto sugiere que el mecanismo de radioprotección por cisteamina es dependiente de la concentración de sulfhidrilos no unidos a proteínas en la célula ( 23,24 ) .

Otro trabajo que apoya a este mecanismo es el reportado por Hans en 1971 en el cual observó que el tratamiento de células con cisteamina y AET provoca la liberación de glutatión unido a proteínas por una reacción de intercambio entre el radioprotector y el glutatión, por lo cual se propone que el glutatión unido a proteínas puede ser considerado como un reservorio de sustancias radioprotectoras las cuales pueden ser liberadas

bajo ciertas condiciones cuando son liberadas pueden contribuir al aumento de la radiorresistencia de las células ( 25 ).

### Cambios reversibles en el metabolismo

Si una sustancia se une al ADN es posible que la hélice de ADN sea más estable. Puesto que la replicación requiere de la separación de cadenas simples, la razón de replicación puede ser reducida por este incremento de estabilidad. Así un proceso de reparación puede intervenir sobre las alteraciones antes de que éstas sean replicadas.

La presencia de agentes que se unen al ADN previenen el rompimiento original de la cadena, pueden también tender a asegurar físicamente que la ruptura de una cadena simple no permita el desenrollamiento de ésta y consecuentemente un daño secundario .

Los principales agentes que se unen al ADN son las nucleohistonas las cuales presentan un gran número de grupos amino como característica común, esto junto con el hecho de que las aminas alifáticas se unen fuertemente al ADN hace claro que una molécula con dos o más grupos amino fácilmente se unan y estabilicen cualquier parte del ADN no unido a histonas.

Esta conclusión ha permitido sugerir que las formas disulfuro de aminotioles protectores también se unan fuertemente al ADN, lo cual explica la necesidad de un grupo amino y un grupo tiol libre en estos protectores.

Estos disulfuros deben cumplir dos requisitos; el primero es que tengan poder protector activo y segundo es que deben ser de fácil remoción (26).

#### IV. - INTERCAMBIO ENTRE CROMATIDES HERMANAS (ICH).

Se define al intercambio entre cromátides hermanas (ICH) como los intercambios recíprocos entre segmentos de las cromátides de un mismo cromosoma.

##### Antecedentes

El primer reporte que sugirió la existencia del evento de ICH fue observado en un estudio citológico de cromosomas en anillo de células somáticas de maíz, los cuales eventualmente formaban anillos dicéntricos del doble de su tamaño original y se propuso que éstos posiblemente se formaron por el intercambio entre cromátides hermanas (27).

La primera observación directa del ICH fue reportada por Taylor en 1957, quien encontró que las cromátides hermanas se podían distinguir una de la otra con respecto a su radioactividad, con la ayuda de métodos autorradigráficos después de la duplicación de los cromosomas en presencia de timidina tritiada ( $^3$  HdT ),

Observó que después de un ciclo los cromosomas de las células en metafase presentaban un marcaje igual en sus cromátides hermanas y que si estos cromosomas se dividían en el siguiente ciclo en ausencia de timidina tritiada los cromosomas presentaban una cromatide marcada y la otra sin marcar.

Estos estudios demostraron que la duplicación del ADN se realiza de una manera semiconservativa y que cada cromátide está formada por una sola molécula de ADN duplex.. Además observó que frecuentemente en algunos sitios se intercambiaban segmentos de la cromátide marcada con

segmentos de la cromátides hermanas no marcada, demostrando de ésta forma la existencia del ICH (28).

El método autorradiográfico presenta limitaciones técnicas tales como: una resolución limitada la cual no permite un análisis detallado del número y posición de los intercambios, además la producción de IHC puede ser inducida por la incorporación de timidina tritiada (<sup>3</sup>HdT) (29).

Los métodos autorradiográficos fueron remplazados por nuevas técnicas basadas en la incorporación de un análogo de la timina, la 5-bromo-2 desoxiuridina (BrdUrd), las cuales también permiten la diferenciación de las cromátides hermanas.

En la revisión del fenómeno de ICH realizada por Wolff (1977) menciona que el primer reporte de esta técnica fue publicada por Zakharov y Egolina en 1972, quienes encontraron que cuando trataron a células de hamster chino con BrdUrd durante dos ciclos celulares y subsecuentemente teñían los cromosomas con Giemsa las cromátides hermanas se teñían diferente. Después de dos ciclos una de las cromátides hermanas está uniformemente substituida con BrdUrd y se tife fuertemente mientras la otra cromátide está bifilarmente substituida y se tife levemente. Este trabajo da inicio al desarrollo de otras técnicas las cuales varían en el tratamiento de los cromosomas que han incorporado BrdUrd (30).

El desarrollo de la técnica de Latt (1973) en la cual la incorporación de la BrdUrd al ADN cromosómico durante dos ciclos celulares y la subsecuente tinción de los cromosomas con el colorante fluorescente Hoechst 33258 da como resultado cromosomas con tinción diferencial de sus cro-

mátides hermanas, las cuales al analizarse con el equipo de microscopía de fluorescencia se observa que la cromátide unifilarmente substituida se presenta brillante, en cambio la bifilarmente substituida se presenta opaca. Esto es debido a que la fluorescencia del Hoechst 33258 unido a cromosomas es inhibida por la incorporación de la BrdUrd al ADN cromosómico.

El empleo de otros colotantes fluorescentes como la quinacrina, naranja de acridina y proflavina dan buenos resultados, sin embargo las técnicas por fluorescencia tienen la desventaja de que ésta se pierde rápidamente (31).

Otro método basado en la incorporación de BrdUrd es el reportado por Korenberg J. R. y Freedlender en 1974, quienes encontraron que con un tratamiento con sales calientes previo a la tinción con Giemsa se obtiene buena diferenciación de las cromátides las cuales se pueden observar en el microscopio de campo claro y son permanentes (32).

En el mismo año (1974) se reportó el método Fluorescencia Plus Giemsa (FPG) desarrollado por Perry y Wolff, en el cual se usó Hoechst 33258 combinado con Giemsa. En esta técnica las células se replicaron durante dos ciclos celulares en presencia de BrdUrd, los cromosomas obtenidos fueron teñidos con Hoechst, posteriormente se expusieron a diferentes periodos de luz excitante y finalmente se tifieron con Giemsa. Las cromátides que incorporaron BrdUrd en ambas cadenas de ADN se tifieron debilmente mientras que las cromátides que incorporaron BrdUrd en sólo una cadena tomaron una coloración oscura (Fig. 1).

Las preparaciones FPG son permanentes y pueden ser claramente

observadas con el microscopio de campo claro (Fig. 2) realizando así un análisis preciso del fenómeno de ICH (33).

La fuente luminosa para las técnicas FPG puede ser luz solar, luz ultravioleta o fluorescente.

La causa de la diferenciación en las técnicas FPG es posiblemente la pérdida del ADN con BrdUrd incorporada, la cual es provocada por el tratamiento con luz o extracción con soluciones, por tal motivo la cromátide que incorpora más BrdUrd pierde más ADN y al tñirla con Giemsa aparece pálida (34).

En 1977 Scheres y col. obtuvieron una tinción diferencial de las cromátides hermanas la cual es completamente opuesta a la obtenida en los métodos FPG o a la técnica descrita por Korenberg y Freedlender en 1974. Ellos encontraron que el colorante básico Fucsina tiene la particularidad de tñir intensamente las cromátides bifilarmente substituidas con BrdUrd y debilmente las unifilarmente substituidas, a esta técnica le dieron el nombre de reverso de la tinción diferencial de las cromátides hermanas (35).

Otra técnica en la cual se obtuvieron resultados semejantes es la tinción diferencial de las cromátides hermanas después de la extracción con ácidos descrita por Takayama S. y Nakanishi (1977), en la cual los cromosomas substituidos con BrdUrd durante dos ciclos de replicación y subsecuente tratamiento con tripsina seguido de ácido perclórico mostraron una clara tinción diferencial de sus cromátides tñidas con Giemsa (36).

### Significado biológico

Se han reportado una gran cantidad de trabajos correspondientes al fenómeno de ICH pero su significado biológico hasta el momento no ha sido determinado.

Wolff en 1974 encontró que la luz ultravioleta (U. V.) induce ICH en los diferentes estados del ciclo celular por medio de lesiones persistentes las cuales se expresan como ICH cuando la célula pasa a través de la etapa de síntesis del ADN (S). Demostrando así que el proceso de ICH requiere el paso de la célula por la etapa de síntesis (S) (37).

Otra evidencia que sugiere que el intercambio de doble banda entre las cadenas de ADN se lleva a cabo durante o inmediatamente que se ha formado la horquilla de replicación es propuesta por Kato en 1980, se basa en que la frecuencia de ICH inducida por la luz azul fluorescente parece incrementar como se incrementa el número de puntos de síntesis ADN (38).

En base a que en el momento en que se realiza la síntesis del ADN es cuando las cadenas se encuentran lo suficientemente unidas en las zonas homólogas, se puede conjeturar que éste es el momento indicado para que se realice el ICH el cual al parecer se lleva a cabo de una manera simétrica y equivalente a nivel molecular. En este momento este proceso requeriría de menor cantidad de energía ya que después de la síntesis se necesitaría de sistemas de reconocimiento y asociación de las moléculas de ADN ya duplicadas, por lo cual este proceso requiere de mucho más energía que el anterior (39).

Si bien estas evidencias concluyen que el ICH se lleva a cabo durante la etapa de síntesis el mecanismo preciso por el cual se realiza no ha sido determinado y sólo se han propuesto algunos posibles mecanismos. Uno de éstos es el propuesto por Painter en 1960 y menciona que el daño al ADN retarda los puntos de crecimiento de la duplicación del ADN y rompe el programa de replicación de los clusters (agrupamiento de duplicones) continuos, de esta manera el ADN permanece irreplicado por mucho tiempo y esto incrementa la probabilidad de la producción de rupturas dobles de la cadena parental de ADN después de que el cluster ha finalizado la replicación. Cuando esto sucede hay una asociación al azar de las cadenas hijas o parentales con el ADN parental del cluster adyacente semireplicado. Si esta asociación se realiza con las cadenas hijas y la replicación de otros clusters finaliza, el proceso normal de ligamiento completa el intercambio.

Este modelo se basa en cuatro puntos fundamentales:

1. - La elevada frecuencia de ICH encontrada después del daño producido por agentes que causan lesiones en el ADN que retardan la progresión de puntos de crecimiento. Agentes tales como la mitomicina C.

2. - La producción de ICH es muchas veces menor que el número de lesiones en el ADN.

3. - En pacientes con el síndrome de Bloom la síntesis de ADN procede más lentamente y hay un número basal de ICH muy alto.

4. - La existencia de una topoisomerasa II que es capaz de producir y reunir rupturas dobles (40).

Otro modelo de la formación de ICH es el propuesto por Ishii y Bender en 1980 el cual se basa en los resultados obtenidos con inhibidores de la síntesis de ADN, los cuales aumentan la frecuencia de ICH basales y inducidos con luz U.V. en el mismo porcentaje a las mismas concentraciones y sugieren que los ICHs basales y inducidos pueden surgir por un mecanismo común. Debido a que estos inhibidores actúan por inhibición directa de la ADN polimerasa o deteniendo la elongación pero no por una acción directa sobre la polimerasa; parece que la elongación de la cadena es un momento sensitivo para la producción de ICH.

Con los argumentos anteriores proponen el modelo de formación de ICH llamado desviación duplicativa en el cual se propone que una interrupción de la cadena hija adyacente a una a una cadena portadora de un daño (dimer) comunmente es reparada pero en ocasiones la cadena parental portadora del daño cerca de la horquilla de replicación se rompe en éste sitio, ésta puede unirse con el extremo final de la cadena hija de la misma polaridad, la otra cadena parental entonces sufre una ruptura cerca del final de la cadena hija complementaria de la cadena portadora del daño y se une con ésta (41).

Otro aspecto importante del fenómeno de ICH es la existencia espontánea o basal de estos intercambios. Sobre este aspecto se han desarrollado diversos trabajos que tratan de esclarecer dicho problema.

Los análisis autorradiográficos de cromosomas que incorporaron timidina tritiada indican que todos los ICHs fueron inducidos por el sistema utilizado para su detección, esta conclusión se basa en el descubrimiento

de que la producción de ICH depende de la incorporación de la timidina, tritiada, sin embargo esta conclusión no es del todo cierta debido a que esta técnica presenta muchas limitaciones.

El uso de nuevos métodos basados en la incorporación de BrdUrd aunque muestran una determinación precisa de los ICHs no han podido aclarar si existe una proporción de ICHs espontánea incluida en la frecuencia basal, o todos los ICHs son producidos por la incorporación de BrdUrd ya que se ha observado que la frecuencia de ICH se incrementa proporcionalmente al incremento de incorporación de BrdUrd.

Con estos métodos se pueden determinar los ICH a bajas dosis de BrdUrd y consecuentemente se puede realizar una curva dosis respuesta para conocer la existencia de ICHs espontáneos.

Kato en 1974 utilizando la técnica de Latt (1973) examinó la frecuencia de ICH como respuesta al incremento de concentración de BrdUrd, observando que a las mínimas concentraciones que permiten el análisis del fenómeno, la frecuencia de ICH permanece estable (1.15 ICH/célula/ciclo div.) (42).

En el mismo año Wolff y Perry con la técnica FPG no observaron la estabilización de la frecuencia de ICH a bajas concentraciones de BrdUrd y extrapolando a cero la curva dosis respuesta obtuvieron un valor de 3.3 ICH/célula/ciclo div. y propone que el error estadístico asociado con los puntos es tal que la curva puede atravesar en cero ICH a cero concentración de BrdUrd, por consiguiente todos los ICHs son inducidos por la BrdUrd (43).

Los sistemas in vivo presentan una mejor alternativa para el esclarecimiento del problema, evitando las condiciones del cultivo de tejidos que pudieran influir en la frecuencia basal de ICH.

Efectivamente se han obtenido evidencias en donde la frecuencia basal de ICH en sistemas in vivo es menor que en los sistemas in vitro

Tice en 1976 en un trabajo in vivo reporta resultados acordes con los encontrados por Kato (1974), observando la no existencia de variación en la frecuencia de ICH obtenida con la mínima concentración de BrdUrd ( $1.9 \mu\text{g/g}$ ) la cual permite la detección de ICH a una concentración de  $7.5 \mu\text{g/g}$  de peso, a partir de esta concentración la frecuencia de ICH se incrementa y concluye que el ICH espontáneo in vivo tiene una frecuencia de 0.75 ICH/célula/ciclo div. (44).

Sin embargo Morales P. y col. en 1987 analizó la frecuencia espontánea de los ICH in vivo por medio del método de diferenciación en tres tonos, observando que la frecuencia de ICH en células de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, y 3<sup>a</sup> división en presencia de BrdUrd aumenta en cada ciclo de división por lo cual concluye que la frecuencia de ICH es directamente proporcional a la incorporación de BrdUrd. Así mismo encuentran una frecuencia espontánea de 0.15 ICH/célula/ciclo div. la cual es mucho menor a la reportada en otros trabajos y propone que es posible que todos los ICHs fueran producidos por la BrdUrd (45).

#### ICH y radioprotección

El análisis de ICH ha mostrado ser un sistema muy sensible para la detección de agentes mutagénicos y antimutagénicos.

Morales y col. usando este sistema in vivo han observado el efecto de algunos mutágenos tales como Ciclofosfamida en células de médula ósea y glándula salival (46); Mitomicina C, Ciclofosfamida, Metil-Metano-Sulfonato y Etil-Metano-Sulfonato en células de médula ósea (47). Todos los mutágenos mostraron inducción de ICH en diferentes grados. Además han observado el efecto de la BrdUrd y dosis bajas de radiación gamma, de tal manera que los rayos gamma a una dosis de (0.36 Gy) son capaces de inducir ICH en células con ADN sustituido con BrdUrd (48). En otro trabajo encuentran que la radiación gamma antes de la incorporación de BrdUrd también induce ICH en células de médula ósea y estos son persistentes (49). También se ha obtenido evidencia de que las radiaciones inducen lesiones capaces de producir ICH en el mismo locus en divisiones celulares sucesivas (50).

Abramovsky et al en 1978 utilizan la determinación de ICH y de viabilidad in vitro para conocer el efecto de los rayos X y el efecto de la L-cisteina administrada antes y después de la radiación X en linfocitos humanos, encontrando que el incremento de ICH depende de la dosis de radiación en linfocitos que fueron irradiados en la fase  $G_1$  de su segunda división mitótica, en linfocitos irradiados en  $G_2$  no se detectó incremento significativo de ICH debido a que éstos últimos ya habían pasado por la etapa de síntesis que es la etapa más probable para que se lleve a cabo dicho fenómeno. Además la viabilidad celular fue marcadamente disminuída en células irradiadas en  $G_2$ , siendo éstas más sensibles que las células  $G_1$  ya que las últimas tienen más tiempo para recuperarse del daño producido

por la radiación X y reparar su ADN dañado antes de entrar a la etapa de síntesis .

Los resultados obtenidos cuando la radiación ocurrió en presencia de L-cisteina indican que ésta es moderadamente efectiva en la reducción de la frecuencia de ICH, la administración posterior a la irradiación no produce reducción de la frecuencia de ICH (51) .

Recientemente se desarrolló un trabajo en el cual se analiza el efecto radioprotector de la cisteamina sobre la inducción de ICH en células de médula ósea de ratón (in vivo) por radiación gamma así como el análisis de otros eventos citogenéticos (rupturas cromosómicas, índice mitótico y tiempo generacional promedio) . En los resultados se observa que la cisteamina pudo disminuir la inducción de ICH por radiación gamma en un 100%, sin embargo no se observa modificación alguna de la variación de los otros eventos citogenéticos producida por la radiación gamma (52) .

El hecho de que la cisteamina evita la inducción de ICH por radiación gamma a diferencia de lo que ocurre con las rupturas cromosómicas sugiere que estos eventos ocurren de manera independiente . Además se propone que no existe correlación entre la modificación de la variación de la frecuencia de ICH por cisteamina y el efecto de esta substancia sobre el índice mitótico y el tiempo generacional promedio .

En general se propone que la inducción de ICH por radiación gamma se da por la acción indirecta de la radiación mientras que la modificación de los otros parámetros probablemente sea por vía directa por lo cual la cisteamina no tiene efecto sobre éstos .

## OBJETIVO

Considerando el efecto que ha mostrado la cisteína para proteger a las células del daño producido por las radiaciones ionizantes, resulta de gran importancia probar este efecto en un sistema próximo a las condiciones naturales como es el sistema in vivo. Para evaluar la protección por cisteína del daño producido sobre el ADN por radiación se emplea el análisis de células de médula ósea de ratón in vivo tomando como parámetro la frecuencia de Intercambios entre Cromátides Hermanas (ICH), el cual ha demostrado ser lo suficientemente sensible para la detección del daño producido por radiación, así como otros eventos citogenéticos como Rupturas Cromosómicas (RC), Índice Mitótico (IM) y Tiempo de Generación Promedio (TGP).

Por lo tanto el presente trabajo persigue el siguiente objetivo:

Observar el efecto de la cisteína per se y sobre la inducción de Intercambio entre Cromátides Hermanas (ICH), Rupturas Cromosómicas (RC) y variación en el Índice Mitótico (IM) y Tiempo de Generación Promedio (TGP) por radiación gamma.

## MATERIAL Y METODOS

Debido a las ventajas que proporcionan los sistemas in vivo para el desarrollo del presente trabajo se seleccionó el estudio de células de médula ósea de ratón. El suministro de la BrdUrd se realizó usando un método desarrollado por Morales P. en 1980 basado en la inyección intraperitoneal del BrdUrd previamente adsorvida a carbón activado (46).

### Animales

Se trabajó con machos de la cepa Balb C de aproximadamente 30±2g de peso y de dos a tres meses de edad, reproducidos en el bioterio del laboratorio de Radiobiología del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), alimentados con comprimidos purina. Y mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura y circulación de aire.

### Incorporación de BrdUrd

Para el suministro de Bromodesoxiudina (BrdUrd) a los animales experimentales se realizó previamente su adsorción a carbón activado, la cual se lleva a cabo mediante la agitación de una solución acuosa de BrdUrd (Sigma Chemical) (20 mg/ml) con 100 mg de carbón activado (Merck) por mililitro de solución, realizada en la obscuridad durante 5 minutos. Esta adsorción se realiza en condiciones estériles de tal manera que el carbón se esteriliza y se deseca al mechero antes de preparar la suspensión, la solución acuosa de BrdUrd se esteriliza al pasarla a través de un filtro

milipore de 0.2 micrómetros. Posteriormente se suministra intraperitonealmente con una aguja de 20X32 mm.

#### Cosecha y obtención de preparaciones de cromosomas

22 hr después de la inyección intraperitoneal de la suspensión BrdUrd-carbón activado, a los ratones se les suministró una solución acuosa de colchicina (Sigma) a una dosis de 15  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal por medio de una inyección intraperitoneal y 2 hr más tarde fueron sacrificados por ~~de~~ locación cervical.

Posteriormente se disectaron los fémures, se limpiaron y se cortaron por los extremos para extraer las células de la médula ósea inyectando por uno de sus lados 2ml de buffer fosfato salino o medio basal Eagle (PBS) a 37° C y por el otro se recuperó todo el contenido en un tubo de centrifuga. La suspensión celular se resuspendió y se centrifugó a 1200 rpm. durante 5 minutos, después se tiró el sobrenadante dejando sólo 0.5 ml para resuspender el botón celular, a éste se le agregaron 6 ml de la solución hipotónica de cloruro de potasio KCl (0.075 M) y nuevamente se resuspendió. A continuación se incubaron a 37° C durante 15 min. y se prosiguió con una centrifugación a 1200 rpm. durante 5 min., se tiró la solución hipotónica y las células se fijaron con 6 ml de fijador (ácido acético: metanol, 3:1) durante 15 min. a temperatura ambiente. Se realizaron 3 cambios de fijador por medio de centrifugaciones subsecuentes; finalizando la última sólo se agregó 0.5 ml de fijador para resuspender las células.

Posteriormente se procedió a hacer las preparaciones usando portau

objetos limpios y frios en los cuales se goteó la suspensión celular, finalmente se secaron al aire o al mechero.

#### Tinción diferencial de las cromátidas hermanas

Para la tinción diferencial de las cromátides se usó una técnica basada en el método de Wolff y Perry (1974) empleando bibencimida de Hoechst (43).

A las preparaciones de cromosomas se les agregaron 5 a 6 gotas de una solución de Hoechst  $10^{-4}$  M, se cubrieron con un cubreobjetos y permanecieron en la oscuridad durante 10 min., a continuación se colocaron en cajas petri con amortiguador Fosfato de Sodio (1.16 M)- Citrato de Sodio (0.04 M) a PH 7.0 como sobrenadente de tal manera que las laminillas siempre quedaron en contacto con este buffer de diferenciación pero nunca totalmente sumergidas. De esta manera las laminillas se colocaron bajo una lámpara de luz negra General Electric de 35 watts a un centímetro de distancia durante 60 - 90 min.

Posteriormente las laminillas se incubaron a 60°C (baño maría) sumergidas en una solución de SSC 2X (0.3 M NaCl - 0.3 M citratotrisódico) durante 15 min. y finalmente se tiñeron con Giemsa al 5% en amortiguador de fosfatos (0.01 M) durante 30 min.

#### Cisteina

La cisteina en solución acuosa fue administrada a una dosis de 600 mg/Kg de peso por medio de una inyección intraperitoneal. En el caso del

tratamiento cisteína previo a la radiación ésta se inyectó 30 min. antes de la exposición a la radiación.

#### Irradiación

La irradiación de los animales se llevó a cabo en diferentes fuentes de radiación. A los primeros animales se les expuso a la radiación en la fuente  $Vick R_{gd}^{60}Co$  durante 10 segundos, recibiendo aproximadamente una dosis de 0.7 Gy. La dosis 2 Gy se les suministró a los ratones exponiéndolos a la fuente Teratrón durante 17 min.

#### Análisis

El análisis del ICH se realizó en 30 células en metafase por ratón, las cuales tuvieran cromosomas con sus cromátidas claramente diferenciadas y con número cromosómico completo 40 cromosomas y en caso necesario se analizaron células con 39 cromosomas. Cuando se presentaron dudas sobre el análisis de alguna metafase se realizaron conteos por más de un observador.

Los ICH s dudosos no se tomaron en cuenta.

#### Rupturas Cromosómicas

El análisis de las Rupturas Cromosómicas (RC) se realizó en las mismas células en las que se determinó la frecuencia de ICH. Y se considero que la presencia de un dicentrico y/o dos fragmentos cromosómicos representaban dos rupturas al igual que la presencia de un anillo, mientras que las rupturas simples se consideraron en el caso de un sólo fragmento.

Cuando se presentaron dudas se pidió la opinión de otro observador.

### Índice Mitótico

Para el análisis del Índice Mitótico (IM) se realizó simultáneamente dos conteos independientes de 1000 células en cada animal y se consideraron en división únicamente a las células en metafase.

### Tiempo de Generación Promedio

Mediante la tinción diferencial de las cromátides hermanas es posible distinguir a las células que han pasado por uno, dos o tres ciclos de división, de tal manera que las células que presentaban cromosomas sin diferenciación de sus cromátides se consideraron de 1<sup>a</sup> división, las que presentaron todos los cromosomas con una cromátide clara y la otra obscura de 2<sup>a</sup> div. y de 3<sup>a</sup> cuando en éstas se presentaba el 50% de sus cromosomas con ambas cromátides claras.

Para calcular el Tiempo de Generación Promedio (TGP) se usó la siguiente ecuación propuesta por Ivett, J. L. y Tice, R. R. en 1962 (53).

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

Donde T = tiempo de administración de la BrdUrd.

Se analizaron 300 células por ratón de las cuales se obtuvo el porcentaje de las de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, y 3<sup>a</sup> división.

### Estadística

Los datos se expresan como el promedio ( $\bar{X}$ ), más o menos la desviación estandar (S), y en las tablas se hace mención de esto

Los resultados se compararon por medio de la prueba  $t$  de Student.

#### Protocolo

Para determinar el efecto de la cisteína sobre la inducción de ICH por radiación gamma se manejaron los grupos Control, Cisteína, Irradiado y Cisteína-irradiado de la siguiente manera.

En el grupo control o testigo sólo se administró la BrdUrd, para establecer el valor basal de ICH a una concentración dada de BrdUrd (1.0 mg/g de peso y 1.5 mg/g de peso).

Para conocer el efecto de la cisteína per se se formó el grupo Cisteína en el cual a los ratones integrantes se les suministró por medio de una inyección intraperitoneal una solución acuosa de cisteína a una dosis de 600 mg/kg de peso corporal, una hora antes de la inyección de la BrdUrd.

El daño radioinducido se observó por medio del análisis de los ratones del grupo irradiado a los cuales se les expuso a una dosis de radiación de 0.7 o 2.0 Gy, 30 minutos antes de la incorporación de BrdUrd.

Y finalmente en el grupo Cisteína-irradiado se les suministró una dosis de 600 mg/kg de peso corporal y 30 minutos después se irradiaron a las dosis antes mencionadas, inyectándoles la BrdUrd 30 minutos después.

## RESULTADOS

Con el método empleado en el presente trabajo las células en meta-fase de 2<sup>a</sup> división presentaron cromosomas con una clara diferenciación de sus cromátides hermanas, con los cuales se realizó un análisis preciso de los ICH. La figura 2 muestra un ejemplo de una célula de cada grupo experimental.

Efecto de la cisteína sobre la inducción de Intercambios entre Cromátides Hermanas (ICH) por radiación gamma

Como se observa en la tabla I el valor basal de ICH 3.0 ICH/célula fue el mismo para ambas dosis de BrdUrd (1.5 mg/g y 1.0 mg/g).

La radiación gamma a las dosis empleadas 0.7 Gy y 2.0 Gy tiene la capacidad de inducir ICH, este efecto se observó al comparar el valor basal (3.0 ICH/célula) con los valores obtenidos con los grupos irradiados (4.5 y 4.4 ICH/célula) antes de la incorporación de BrdUrd. La diferencia de los valores de estos grupos resultó ser altamente significativa  $p < 0.0001$  y  $p < 0.002$  respectivamente.

Además se observa que la cisteína per se no induce ICH ya que los grupos controles y los tratados con cisteína presentan el mismo valor de la frecuencia de ICH 3.0 ICH/célula.

Con respecto al efecto protector de la cisteína, en este caso se obtuvo que ésta no fue capaz de disminuir la inducción de ICH por radiación gamma. Los resultados obtenidos para los grupos irradiados respecto a los grupos cisteína-irradiados muestran que entre éstos no hay diferencia sig-

nificativa.

En general se puede observar en la tabla I que los resultados de los grupos tratados (usando una dosis de 1.5 mg/g de BrdUrd, 600 mg/kg de cisteína y 0.7 Gy de radiación gamma) y el grupo control (1.5 mg/g de BrdUrd) son muy parecidos a los obtenidos usando 1.0 mg/g de BrdUrd, 600 mg/kg de cisteína y 2.0 Gy de radiación. Por lo cual en suma se obtiene que la cisteína per se no induce ICH, la radiación gamma es capaz de inducir ICH y que esta inducción no puede ser evitada por la presencia de la cisteína.

En la figura 3 y 4 en la que se grafica la frecuencia acumulativa respecto al número de ICH/célula muestran que el comportamiento de las poblaciones celulares de los grupos controles y cisteína es muy semejante, además los grupos irradiados y cisteína-irradiados también se comportan de una manera similar pero la curva se desplaza hacia frecuencia más altas, observándose una clara diferencia del comportamiento de éstos grupos con el de los anteriores.

En la figura 3 se observa que el 50% de la población del grupo control y cisteína tienen un valor aprox. de 2.5 ICH/célula en comparación con el obtenido para el irradiado y cisteína-irradiado que es de aprox. 3.5 ICH/célula.

Por otro lado se observa que en el grupo control y cisteína la frecuencia de células con 3.0 ICH/célula o más es de aproximadamente el 35% mientras que para los grupos irradiado y cisteína - irradiado hay

aproximadamente un 60%. Además se observa que aproximadamente el 3% de las células irradiadas presentan un valor mayor a 10 ICH/célula (10-16) el cual no se presenta en ningún otro grupo.

En la figura 4 se observan resultados semejantes a los anteriores en los cuales el 50% de las células del grupo control y cisteína tiene un valor aprox de 2.3 ICH/célula y para los grupos irradiado y cisteína-irradiado es de aprox. 3.5 ICH/célula. La frecuencia de células con 3 ICH/célula o más para el grupo control y cisteína es de aproximadamente el 35% y para el irradiado y cisteína-irradiado es de aproximadamente el 65%.

#### Efecto de la cisteína sobre la inducción de Rupturas Cromosómicas (RC) por radiación gamma

En la tabla II se observa que la radiación gamma también es capaz de inducir rupturas cromosómicas. En los grupos controles no se observó alguna ruptura cromosómica, en cambio en los grupos irradiados se observó 0.026 RC/célula (0.7 Gy) y 0.025 RC/célula (2.0 Gy).

La cisteína per se no induce rupturas cromosómicas pero tampoco tiene algún efecto sobre la inducción de éstas por radiación gamma. En el grupo cisteína-irradiado (0.7 Gy) se observa una reducción de la inducción de las rupturas cromosómicas pero en contraste a esta reducción el otro grupo cisteína-irradiado presenta un incremento del valor de RC, por lo cual no se puede afirmar que la cisteína tenga algún efecto sobre la inducción de RC por radiación gamma.

Efecto de la cisteína sobre la modificación de Índice Mitótico por radiación gamma.

Los valores obtenidos del Índice Mitótico (IM) se muestran en la tabla III, observándose para los grupos controles un valor de 39.0 metafases/ $10^3$  células. y 43.6 metafases/ $10^3$  células. Además se observó que la radiación gamma 0.7 y 2.0 Gy no modificó el índice mitótico.

En el primer grupo tratado con cisteína aunque se observa una reducción del IM, ésta no fue significativa, sin embargo en el otro grupo tratado con cisteína la reducción del IM resultó ser significativa (p 0.03) obteniéndose un valor de 37.0 metafases/célula. Lo anterior sugiere que la cisteína per se induce muerte celular.

Efecto de la cisteína sobre la modificación del Tiempo de Generación Promedio (TGP) producida por radiación gamma

Con respecto al tiempo de generación promedio se observa (tablas IV) que la radiación gamma aumenta el tiempo del proceso de división celular. Para los grupos controles se obtuvo un TGP de 12 hr y 11.8 hr a diferencia de los grupos irradiados 12.8 hr (0.7 Gy) y 13.2 hr (2.0 Gy), ambos resultados presentaron diferencia significativa respecto a su control.

Este fue el único evento citogenético en el cual la cisteína suministrada antes de la irradiación presentó efecto protector. El incremento del TGP producido por 0.7 Gy de rad. gamma es completamente evitado por la presencia de la cisteína, mientras que el incremento inducido por 2.0 Gy sólo es parcialmente evitando, de tal manera que los grupos cisteína-

irradiados presentaron un valor de 11.9 hr y 12.7 hr los cuales no presentaron diferencia significativa respecto a sus controles.

La cisteína per se no modifica el Tiempo de Generación Promedio (TGP).

## DISCUSION

Efecto de la cisteina sobre la inducción de ICH por radiación gamma

El valor basal de ICH (3.0 ICH/células) obtenido en este trabajo está de acuerdo con los valores encontrados (in vivo) por Morales P. (1984) (47), Mendiola M. T. (1987) (52) y Rodríguez R. (1981) (54) los cuales son menores a los obtenidos in vitro.

Se ha observado tanto en trabajos in vitro (51) como en trabajos in vivo (39, 48, 49, 52) que la radiación a dosis tan bajas como 0.5 - 2.0 Gy producen estimable inducción de ICH. Morales P. R (1984) ha observado que el comportamiento de las curvas de inducción de ICH por radiación antes o después de la incorporación de BrdUrd es completamente diferente, en el caso de inducción de ICH por radiación gamma después de la incorporación de BrdUrd la respuesta es lineal en el intervalo probado (0-0.62 Gy), con una relación dosis-efecto de 8.4 ICH s/Gy. En cambio la inducción de ICH por radiación gamma antes de la incorporación de BrdUrd es bastante menor y aparentemente tiene dos pendientes, una entre 0-0.6 Gy con una relación de 2.5 ICH/Gy y otra entre 0.6 y 1.9 Gy con una relación de 0.62 ICH/Gy (39).

En el presente trabajo se presentó el mismo incremento de ICH (1.5 ICH/cél) inducido por dosis diferentes de radiación (0.7 y 2.0 Gy). Esto es probablemente debido a que el suministro de la BrdUrd fué posterior a la radiación (30 min) por lo cual le corresponde la curva de inducción de ICH por radiación gamma antes de la incorporación de BrdUrd encontrada por

Morales PR (1984) y a las dosis empleadas les corresponde la segunda pendiente de la curva. Además hay que tomar en cuenta que la exposición a la radiación se efectuó en diferentes fuentes radiactivas las cuales tienen diferente razón de dosis (0.7 Gy en 10 seg. Vickrad 2000 y 2.0 Gy en 17 min. Teratrón. En el presente trabajo se presentó un incremento de 1.5 ICH/célula (1.0 Gy aprox.) el cual no es de la misma magnitud que el encontrado por Mendiola M.T. 1987 (2.5 ICH/célula) (1.0 Gy) (52), sin embargo este incremento es una evidencia de la inducción de ICH por radiación en sistemas in vivo.

Existen resultados contradictorios de la influencia de los aminotioles cisteína y cisteamina sobre la frecuencia de ICH, mientras en un estudio se encontrará una marcada inducción de ICH por cisteína (55) en otro trabajo se obtuvo una nula inducción de ICH por este compuesto (56). En ambos trabajos realizados en diferentes líneas celulares de hamster chino la cisteamina produjo una fuerte inducción de ICH.

Speit en 1982 encontró que la cisteína, cisteamina y cistamina no causan incremento de la frecuencia de ICH en linfocitos humanos, en contraste con lo que sucede en células V. 79 en las cuales sí existió una inducción de ICH por cisteamina y cistamina. Propone que la formación de  $H_2O_2$  debida al proceso de autoxidación de los compuestos aminotioles posiblemente sea la causa de la inducción de ICH por estos compuestos, por lo cual la variación dicha de inducción está relacionada con la diferencia de la actividad catalásica de los tipos celulares involucrados en virtud de que las líneas celulares permanentes tienen reducida actividad catalásica mientras

que la sangre parece tener una alta capacidad para degradar el  $H_2O_2$  (57)

La cuestión resulta interesante respecto al conocimiento del efecto de los aminotioles in vivo para lo cual se ha observado que la cisteamina per se no induce ICH en células de médula ósea de ratón (in vivo) (52) además los resultados obtenidos en éste trabajo apoyan que la cisteína no induce ICH en el mismo tipo celular.

Con respecto al efecto de la cisteína sobre la inducción de ICH por radiación gamma, la nula protección conferida por este aminotiol no concuerda con los resultados obtenidos por Abramovsky en 1978 quien reportó que el suministro de L-cisteína a linfocitos humanos previo a la radiación X fue moderadamente efectiva en la reducción del incremento de la frecuencia de ICH. El obtuvo un valor de ICH de tres veces el valor control en linfocitos expuestos a radiación y con la protección de la cisteína sólo se observó un valor del doble del control. El autor llegó a la conclusión de que la L-cisteína actúa por enlazamiento y estabilización de las partes de la hélice no cubiertas por histonas produciendo dos efectos benéficos; prevenir las lesiones primarias y segundo reduciendo la tasa de replicación del ADN (51).

No obstante el mecanismo de esta acción protectora es todavía materia de discusión.

El hecho de que la cisteína tenga un efecto protector sólo cuando es administrada antes del mutágeno sugiere que la cisteína reacciona directamente con el mutágeno o sus subsecuentes productos y que su actividad se basa en la prevención del daño más que involucrada en el proceso de reparación.

Debido a que la cisteína reduce la inducción de ICH por sustancias formadoras de radicales libres in vitro (58) o por exposición a radiación in vitro, se propone que los radicales libres están involucrados directamente con la inducción de ICH y que la depuración de radicales libres juega un papel importante en la acción protectora de este compuesto.

Recientemente Mendiola M. T. (1987) ha desarrollado un trabajo en células de médula ósea de ratón in vivo en el cual concluye que la inducción de ICH por radiación es debida al efecto indirecto (via radicales libres) ya que puede ser completamente evitada por la acción de la cisteína atrapando los radicales.

La protección conferida (in vitro) por los compuestos aminotioles depende de varios factores tales como pH, concentración, pK y temperatura (59).

En un primer estudio realizado por Devik en 1952 (11) acerca del efecto de la cisteína sobre el daño cromosómico inducido por la radiación en células de médula ósea de ratón in vivo no se presentó un claro efecto cuando la cisteína no fue ajustada a pH 7, sin embargo en un segundo trabajo (12) se observó que el efecto protector es significativo y consistente cuando se usó una solución de cisteína ajustada a pH 7 por adición de una solución de hidróxido de Sodio 8%.

Estos trabajos probablemente pueden explicar el hecho que en los experimentos aquí realizados no se haya encontrado una reducción de la inducción de ICH ya que la cisteína no fue ajustada a pH 7.0 y el pH de la solución fue de 5.0.

Efecto de la cisteina sobre la inducción de Rupturas Cromosómicas (RC)  
por radiación gamma

La radiación ionizante constituye una fuente de daño físico al ADN de los organismos ya sea por el efecto directo o por el indirecto, siendo las principales lesiones las rupturas de cadena doble, rupturas de una sola cadena y daño a las bases, todas ellas son capaces de producir rupturas cromosómicas por el producto de la lesión más la actividad de reparación o por la falta de ésta.

En numerosos trabajos se ha establecido que la radiación induce alteraciones cromosómicas (11, 12, 17, 39, 45, 52), los resultados de esta tesis es otra evidencia de la inducción de RC por radiación gamma ya que a dosis de 0.7 y 2.0 Gy se presentó una frecuencia de 0.026 RC/célula y 0.025 RC/célula. Además se observa que casi no hay diferencia entre la inducción de RC por 0.7 o 2.0 Gy, esto también es posiblemente debido a lo antes mencionado respecto a la diferencia de las razones de dosis empleadas, sugiriendo que la razón de dosis juega un papel importante en el efecto de la radiación.

La cisteina no es capaz de evitar o disminuir la inducción de RC por la radiación. Estos resultados son similares a los previamente observados con cisteamina en el mismo sistema experimental y en el cual se concluye que las RC se producen por la vía directa de la radiación ya que la inducción de éstas no puede ser evitada por la cisteamina (52).

En oposición a los resultados obtenidos aquí, Devik en 1954 en célula de médula ósea de ratón encontró que la cisteina reduce la inducción de

fragmentos cromosómicos producidos por la radiación (12), Sasaki y Mat subara en 1977 observaron que las aberraciones cromosómicas inducidas por radiación gamma en linfocitos humanos pueden ser disminuidas por la acción de la cisteina y cisteamina (17).

De acuerdo a estos estudios es posible que las RC no sólo se produzcan por el efecto directo de la radiación.

#### Efecto de la cisteina sobre la modificación del Índice Mitótico (IM)

##### por radiación gamma

Es bien conocido que la radiación induce innibición de la división y muerte celular y ésta es dosis-dependiente pero aún no se ha establecido si los compuestos cisteina y cistamina son capaces de evitar tal inducción. Sin embargo existe algunas evidencias sugestivas.

Devik en 1954 encontró que la cisteina no tuvo efecto en la reducción del número de mitosis después de dosis bajas (2Gy) de radiación (12). Se ha observado el mismo efecto para la cisteamina (52).

En el presente trabajo no se pudo analizar el efecto antes mencionado debido a que no se observó alguna modificación del IM por la radiación de tal manera que no existió diferencia entre los valores de los controles y los irradiados.

Con respecto al efecto de la cisteina per se se observa una reducción del IM en todos los grupos en los que la cisteina se encuentra presente, sin embargo en sólo uno de ellos se presentó diferencia significativa respecto al control, por lo tanto la cisteina per se posiblemente inhibe la división celular.

Efecto de la cisteína sobre la modificación del Tiempo de Generación Promedio (TGP) por radiación gamma

El aumento del Tiempo de Generación Promedio (TGP) producido por la radiación gamma está de acuerdo con los resultados obtenidos por Yu y Sinclair en 1970 en células V79-S171 de hamster chino in vitro, observando que las células irradiadas sufren un retardo mitótico (60).

Morales et al (1984) en células de médula ósea de ratón in vivo observaron algunos cambios en el TGP a través de diferentes periodos post-irradiación producidos por 1.9 Gy de radiación gamma. Para un tiempo post-irradiación de 24 hr se observó un incremento del TGP de más de una hora (la BrdUrd se inyectó inmediatamente después de la radiación), para los tiempos 48 y 72 hr se observó un decremento de 1 y 2 hr respectivamente y para los tiempos 98 y 168 hr el TGP se incrementa hasta alcanzar el valor del control (12.4 hr) (la BrdUrd se suministró 24 hr antes del sacrificio).

Ellos han propuesto el significado biológico de la reducción del TGP es la mortandad celular inducida por la radiación lo que trae como consecuencia que un mecanismo homeostático del 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 activamente reduciendo el TGP (47).

Los resultados aquí presentados indican que no existió una mortandad celular por la radiación, posiblemente el aumento del tiempo de división

## CONCLUSIONES

De los resultados de la presente tesis se puede concluir que bajo las condiciones experimentales usadas:

- 1.- La cisteína no tiene la capacidad de proteger a las células contra la inducción de ICH por radiación gamma.
- 2.- La cisteína per se no induce ICH, ni rupturas cromosómicas y no modifica el TGP.
- 3.- La cisteína per se posiblemente inhibe la división celular.
- 4.- La radiación gamma aumenta el TGP, lo cual es evitado por la presencia de cisteína.

TABLA I

E FECTO DE LA CISTEINA SOBRE LA INDUCCION DE INTERCAMBIOS  
ENTRE CROMATIDES HERMANAS (ICH) POR RADIACION GAMMA

BrdUrd (mg/g)	RADIACION (Gy)	CISTEINA (mg/kg)	ICH/CELULA <sup>++</sup> $\bar{X} \pm S$	N
1.5	-----	-----	3.0 $\pm$ 0.33	6
1.5	-----	600	3.0 $\pm$ 0.39 <sup>NS</sup>	5
1.5	0.7	-----	4.5 $\pm$ 0.45***	5
1.5	0.7	600	4.3 $\pm$ 0.39**	5
1.0	-----	-----	3.0 $\pm$ 0.37	5
1.0	-----	600	3.0 $\pm$ 0.49 NS	4
1.0	2.0	-----	4.4 $\pm$ 0.35*	4
1.0	2.0	600	4.4 $\pm$ 0.52**	4

p<0.002\*, p<0.005\*\*, p<0.0001\*\*\*, NS no significativo respecto a su control prueba t de student.

++ 30 célula analizadas por ratón.

N Número de ratones analizados.

TABLA II

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

BrdUrd (mg/g)	RADIACION (Gy)	CISTEINA (mg/kg)	RC/CELULA <sup>++</sup> $\bar{X} \pm S$	N
1.5	-----	-----	0.0	6
1.5	-----	600	0.0	5
1.5	0.7	-----	$0.026 \pm 0.015$	5
1.5	0.7	600	$0.013 \pm 0.018$	5
1.0	-----	-----	0.0	5
1.0	-----	600	0.0	4
1.0	2.0	-----	$0.025 \pm 0.017$	4
1.0	2.0	600	$0.033 \pm 0.47$	4

N Número de ratones analizados.

++ 30 células analizadas.

TABLA III

EFEECTO DE LA CISTEINA SOBRE LA MODIFICACION DEL INDICE MITOTICO (IM) INDUCIDA POR RADIACION GAMMA

BrdUrd (mg/g)	RADIACION (Gy)	CISTEINA (mg/kg)	INDICE MITOTICO <sup>++</sup> $\bar{X} \pm S$	N
1.5	-----	-----	39.0 $\pm$ 9.6	6
1.5	-----	600	36.4 $\pm$ 12.4 <sup>NS</sup>	5
1.5	0.7	-----	49.0 $\pm$ 10.2 <sup>NS</sup>	5
1.5	0.7	600	34.0 $\pm$ 3.8	5
1.0	-----	-----	43.6 $\pm$ 4.0	5
1.0	-----	600	37.0 $\pm$ 2.7*	4
1.0	2.0	-----	38.0 $\pm$ 9.1 <sup>NS</sup>	4
1.0	2.0	600	37.0 $\pm$ 6.6 <sup>NS</sup>	4

\* $p < 0.03$ , NS no significativo respecto a su control

N Número de ratones analizados.

++ Número de metafases en 1000 células analizadas.

TABLA IV

EFFECTO DE LA CISTEINA SOBRE LA MODIFICACION DEL TIEMPO DE  
GENERACION PROMEDIO (TGP) POR RADIACION GAMMA

BrdUrd (mg/g)	RADIACION (Gy)	CISTEINA (mg/kg)	TGP <sup>++</sup> $\bar{X} \pm S$	N
1.5	-----	-----	12.0 $\pm$ 0.4	6
1.5	-----	600	11.5 $\pm$ 0.35 <sup>NS</sup>	5
1.5	-0.7	-----	12.8 $\pm$ 0.46 <sup>+</sup>	5
1.5	0.7	600	11.9 $\pm$ 0.5	5
1.0	-----	-----	11.8 $\pm$ 0.6	5
1.0	-----	600	12.0 $\pm$ 0.48 <sup>NS</sup>	4
1.0	2.0	-----	13.2 $\pm$ 0.25*	4
1.0	2.0	600	12.7 $\pm$ 0.3 <sup>NS</sup>	4

\*p<0.01, NS no significativo respecto a su control, prueba t de student.

N Número de ratones analizados.

++ 300 células analizadas por ratón.

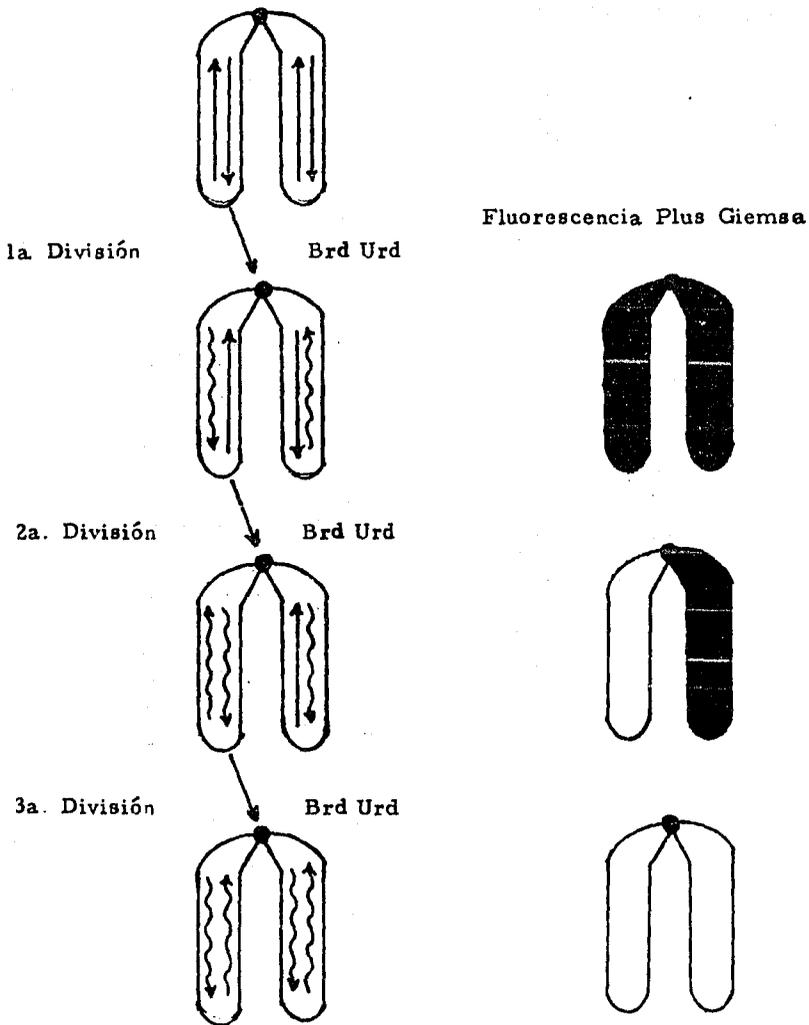


FIG. 1. DIFERENCIACION DE LAS CROMATIDES HERMANAS POR  
MEDIO DE LA TECNICA FLUORESCENCIA PLUS GIEMSA.

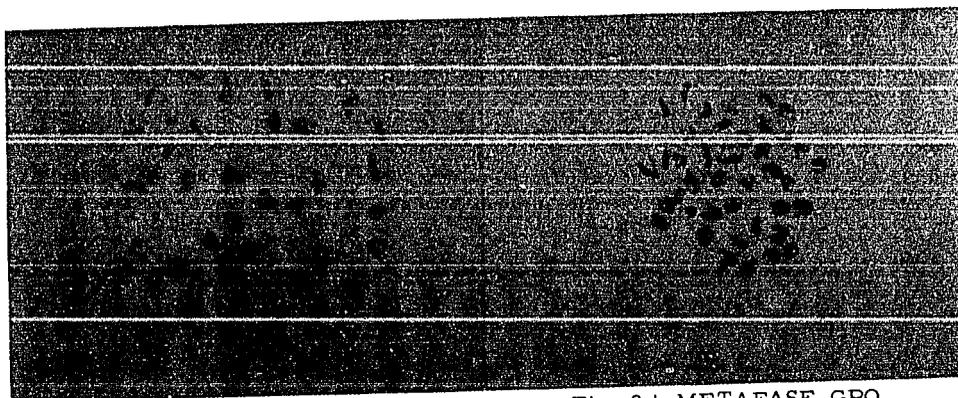


Fig. 2 a METAFASE GPO.  
CONTROL

Fig. 2 b METAFASE GPO.  
CISTEINA

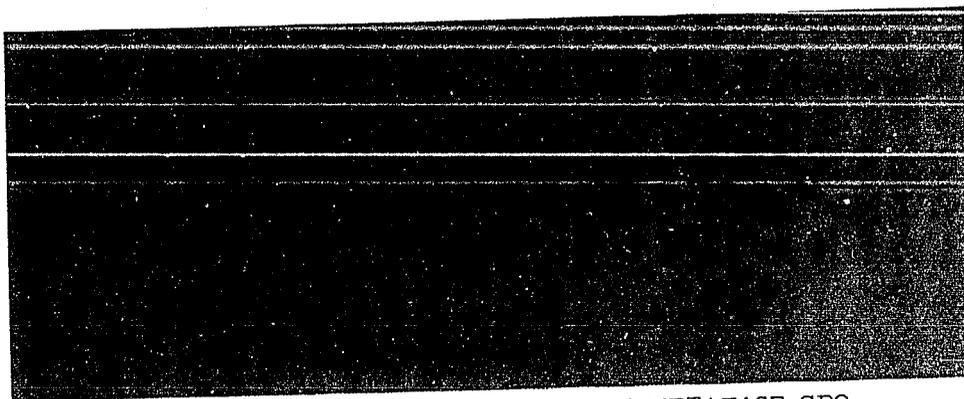


Fig. 2 c METAFASE GPO.  
IRRADIADO

Fig. 2 d METAFASE GPO.  
CIS-IRRAD.

Fig. 2 Metafases de los grupos experimentales, a) control, b) cisteina, c) irradiado, d) cisteina-irradiado. En las metafases c y d se observan rupturas cromosómicas dobles, un anillo cromosómico y un cromosoma dicéntrico respectivamente.

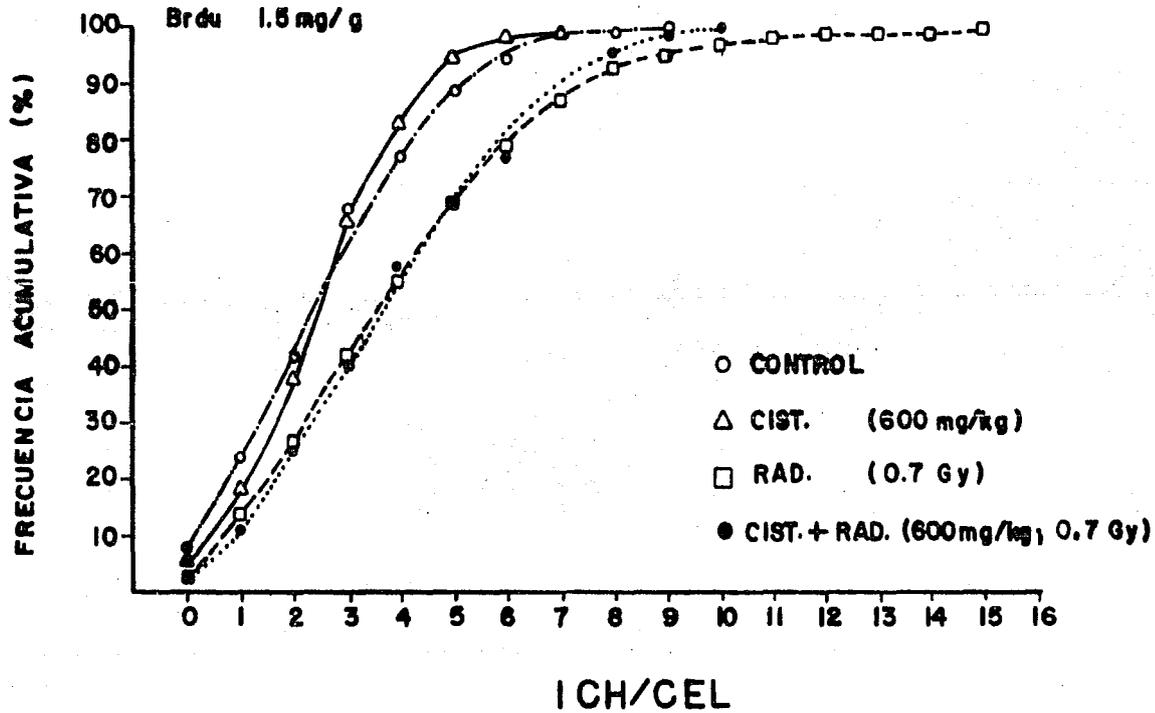


FIG. 3 EFECTO DE LA RADIACION, CISTEINA PER SE Y CISTEINA MAS RADIACION SOBRE EL NUMERO DE ICH/CELULA

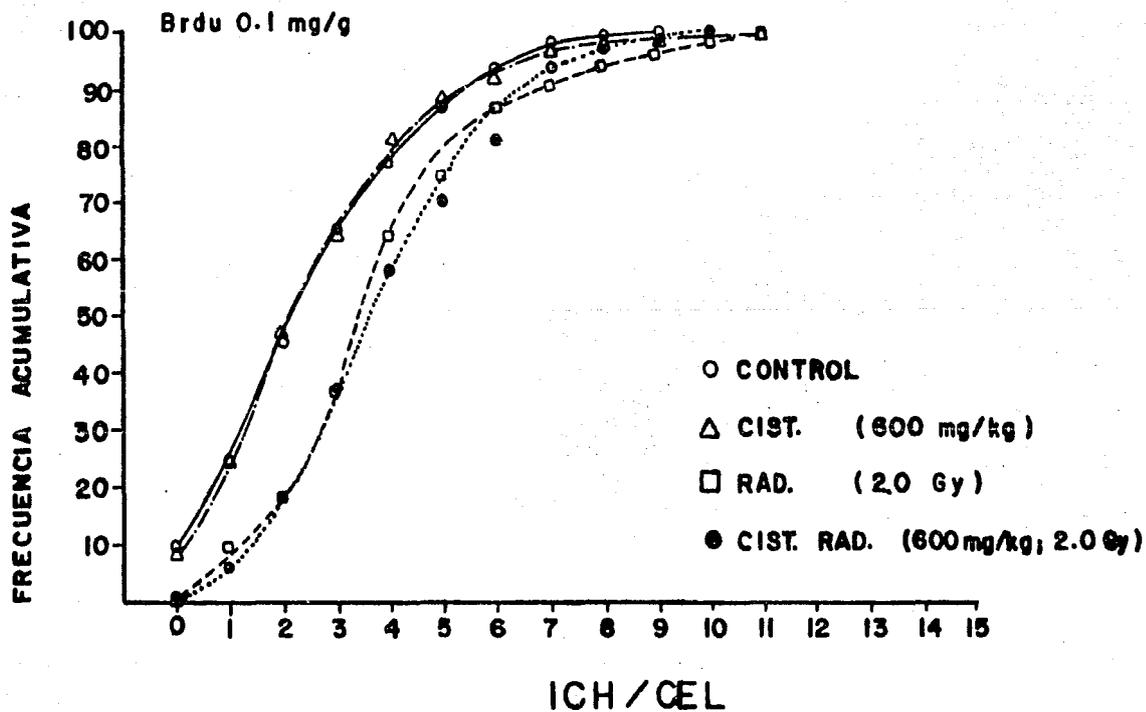


FIG. 4 EFECTO DE LA RADIACION, CISTEINA PER SE Y CISTEINA MAS RADIACION SOBRE EL NUMERO DE ICH/CELULA

## BIBLIOGRAFIA

1. - Kendar, N., Prasad. (1984) Handbook of Radiobiology. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, pp 298.
2. - Pizzarello, Donald, J. (1982) Radiation Biology. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, pp 296.
3. - Ward, J.F. Molecular mechanism of radiation - induced damage to nucleic acid. Adv. Rad. Biol., 5 (1975) 181-239.
4. - Friedberg, E. C. (1985) DNA repair. W.H. Freeman and Company, New York, Cap. 1
5. - Young, D.A. y Smith, K.C. The yield and repair of X-Ray-induced single-strand breaks in the DNA of Escherichia coli K-12 cells. Radiation Res. 68 (1976) 148-154.
6. - Bonura, T. y Smith, K. C. The involvement of indirect effects in cell-killing and DNA double-strand breakage in  $\gamma$ -irradiated Escherichia coli K-12. Int. J. Radiat. Biol. 29 (1976) 293-296.
7. - Patt, H.M., Tyree, E.B. y Smith, D.E. Cisteina protection against X-Irradiation. Science, 110 (1949) 213-214.
8. - Patt, H.M., Smith, D.E., Tyree, E.B. y Straube, R.L. Further studies on modification of sensitivity to X-rays by Cisteine. Pro. Soc. Exp. Biol. and. Med. 73 (1950) 18-21.
9. - Hollander, A. y Doherty D.G. The background for modification of radiation demage by sulphhydryl compounds. Radiation demage and sulphhydryl compounds IAEA, Viena (1969).

10. - Doherty, D.G., Burnett, W.T. and Shapira, R. Chemical protection against ionizing radiation. II Mercaptoalkylamines and related compounds with protective activity. Radiation Res. 7 (1957) 13-21.
11. - Devik, F. Cytological investigation of bone marrow subsequent X radiation. Brit. J. Rad. 25 (1952) 481-484.
12. - Davik, F. Protective effects of combined hypoxia and cysteine treatment on whole-body irradiation of mice. Brit. J. Radiol. 27 (1954) 463-466
13. - Mikaelson, K. Protective properties of cysteine, sodium hiposulfite and sodium cyanide against radiation induced chromosome aberrations. Proc. Nat. Acad. Sci. 40 (1954) 171-178
14. - Mikaelson, K. Protective effectiveness of cysteine, cysteamine and cystamine against X-ray induced chromosome aberrations at different stages of mitosis. Hereditas 60 (1969) 394-406.
15. - Kohon, I. H. and Gunter S. E. Factors influencing the radioprotective action of cysteine: Effects in *Escherichia coli* due to drug concentration, temperature, time and pH. Radiation Res. 11 (1959) 732-744.
16. - Kohon, I. H. and Gunter S. E. Cysteine protection against X-rays and the factor of oxygen tension. Radiation Res. 13 (1960) 250-255.
17. - Sasaki, M. S. and Matsubara, S. Free radical scavenging in protection of human lymphocytes against chromosome aberration formation by gamma ray irradiation. Int. J. Radiat. Biol. 32 (1977) 439-445.
18. - Gebhart, E. The effect of L-cysteine on the induction of aberration by chemical mutagens in human chromosomes. Humangenetik 10 (1970) 115-126 Resumen.

- 19.- Alexander, P., Bacq, Z. M., Cousens, S.F., Fox, M., Herve, A. and Lazard, J. Radiation Res. 2 (1955) Tomada de la referencia (26) de esta bibliografía.
- 20.- Ginsberg, D. M. y Webster, H.K. Radiation Res. 39 (1969) 421 que aparece en la referencia (3) de esta bibliografía.
- 21.- Sawada, S. y Okada, S. Cysteamine, cystamine and single strand break of DNA in cultured mammalian cells. Radiation Res. 44 (1970) 116-132
- 22.- 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 (1972) 329-342
- 23.- Révész, L. y Bergstrand, H. Radiation protection by cysteamine and cellular sulphhydryl levels. Nature. 200 (1963) 594-595.
- 24.- Révész, L. y Hans, M. Cysteamine - induced increase of cellular glutathione- level: A new hypothesis of the radioprotective mechanism. Nature 207 (1965) 430-431.
- 25.- Hans, G., Edgren, M. y Révész, L. Release of thiols from cellular mixed disulphides and its possible role in radiation protection. Int. J. Biol. 22 (1971) 257-268.
- 26.- Brown, P.E. Mechanism of action of aminothiols radioprotectors. Nature 28 (1967) 363-364.
- 27.- McClintock, B. The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristic by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes. Genetics 23 (1938) 315-376.

- 28.- Taylor, J. H. Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes. Genetics 43 (1958) 515-529.
- 29.- Brewen, J. G. y Peacock, W.J. The effect of tritiated Thymidine on sister chromatid exchange in a ring chromosome. Mutation Res. 7 (1969) 433, que aparece en la referencia 37 de esta bibliografía.
- 30.- Wolff, S. Sister Chromatid exchange, Ann. Rev. Genet. 11 (1977) 183-201
- 31.- Latt, S.A. Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid relication in human metaphase chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 (1973) 3395-3399.
- 32.- Korenberg, J.R. y Freedlander, E. F. Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. Chromosoma 48 (1974) 355-360
- 33.- Perry, P. y Wolff, S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatid. Nature (London) 251 (1974) 156-158
- 34.- Ockey, C H. Autorradiographic evidence of differential loss of BUdR-substituted DNA after UV exposure in FPG harlequin staining. Exp. Cell. Res. 125 (1980) 511-514.
- 35.- Scheres, J.M.J.C., Hustinx, Th. W.J., Rutten, F.J. y Merky G.F.M. Reverse differential staining of sister chromatids. Exp. Cell. Res. 109 (1977) 466-468
- 36.- Takayama, S. y Nakanishi, S. Differential Giemsa staining of sister chromatid after extraction with acids. Chromosoma 64 (1977) 109-115
- 37.- 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 (1974) 73- 81.
- 38.- Kato, H. Evidence that the replication point is the site of sister chromatid exchange. Cancer Genetics and cytogenetics. 2 (1980) 69-77.
- 39.- Morales Ramirez P. Efecto de los rayos gamma sobre la inducción y persistencia de intercambios entre cromátidas hermanas (ICH) y otros eventos citogenéticos en células de médula ósea y ratón in vivo. Tesis Doctoral. UNAM (1984) 143 P.
- 40.- Painter, R. A. replication model for sister chromatid exchange Mutation Res. 70 (1980) 337-341.
- 41.- 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 (1980) 19-32.
- 42.- Kato, H. Spontaneous sister chromatid exchanges detected by BrdUrd-labelling metod. Nature 251 (1974) 70-72.
- 43.- Wolff, S. y Perry, P. Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchange without autoradiography. Chromosoma 48 (1974 ) 341 - 353.
- 44.- Tice, R, Chaillet, J. y Schneider, E. Demonstration of spontaneous sister chromatid exchanger in vivo. Exp. Cell. Res. 102 ( 1976 ) 426 - 429 .
- 45.- Morales, P., R., Rodríguez, R., R. y Vallarino, T., K. Analysis of espontaneous sister chromatid exchanger in vivo by three way differentiation. Mutation Res. 178 ( 1987 ) 49 - 56.

- 46.- Morales, P., R. Analysis in vivo of sister-chromatid exchange in mouse bone-marrow and salivary-gland cells. Mutation Res. 74 (1980) 61-69
- 47.- Morales, P., R., Vallarino, T., K., y Rodríguez, R., R. Detection of SCE in rodent cells using the activated charcoal bromodeoxyuridine system. Proc. of International Symposium on sister chromatid exchange. Brookhaven Ntl. Lab. New York, (1984).
- 48.- Morales, P., R., Vallarino, T., K. y Rodríguez, R., R. Effect of Brd-Urd and Low doses of gamma radiation on sister chromatid exchange, chromosome breaks, and mitotic delay in mouse bone marrow cells in vivo. Environmental Mutagenesis 5 (1983) 589-602
- 49.- Morales, P., R., Vallarino, T., K. y Rodríguez, R., R. In vivo persistence of sister chromatid exchange (SCE) induced by gamma rays in mouse bone marrow cells. Environmental Mutagenesis. 6 (1984) 529-537.
- 50.- Morales, P., R., Vallarino, T., K. y Rodríguez, R., R. Occurrence in vivo, of sister chromatid exchanges at the same locus in successive cells divisions caused by nonrepairable lesions induced by gamma rays. Environmental and Molecular Mutagenesis 11 (1988).
- 51.- Abramovsky, I., Vorsanger, G. y Kurt H. Sister-Chromatid exchange induced by X-ray of human lymphocytes and the effect of L-cysteine. Mutation Res. 50 (1978) 93-100
- 52.- Mendiola Cruz María Teresa. Efecto de la cisteamina sobre la inducción de intercambio entre cromátides hermanas (ICH) por radiación gamma. Tesis Profesional UNAM (1987) 114 p.
- 53.- Ivett, J. L. y Tice, R. R. Average generation time A new method of

- analysis and quantitation of cellular proliferation kinetics. Environ Mutagen, 4 (1982) 358 (Abstract).
- 54.- Rodríguez, R., R. Inducción de intercambios entre cromátides hermanas por radiación gamma y mutágenos químicos, en células de médula ósea de ratón in vivo. Tesis Profesional UNAM (1981) 56 p.
- 55.- McRae, W., D. y Stich, H., F. Induction of sister-chromatid exchanges in chinese hamster ovary cells by thiol and hydrazine compounds. Mutation Res. 68 (1979). que aparece en la referencia 57 de esta bibliografía.
- 56.- Speit, G., Wolf, M. y Vogel, W. The effect of sulfhydryl compounds on sister-chromatid exchanges. Mutation Res. 78 (1980) 267-272.
- 57.- Speit, G. y Vogel, W. The effect of sulfhydryl compounds on sister-chromatid exchanges. II The question of cell specificity and the role of  $H_2O_2$ . Mutation Res. 93 (1982) 175-183
- 58.- Speit, G., Wick, C. y Wolf, M. Induction of sister chromatid exchanges by hidroxialamine, hidrazine and isoniazid and their inhibition by cysteine. Human Genet. 54 (1980) 155-158.
- 59.- Vergosen, A., J., Budke, L. y Vos, O. Protection against X-irradiation by sulfhydryl compounds. Int. J. Radiat. Biol. 13 (1967) 77-92
- 60.- Yu, M. y Sinclair, K. Protection by cysteamine against mitotic delay and chromosomal aberration by X-ray in synchronized chinese hamster cells. Radiation Res. 43 (1970) 357-371.