



00361
20je. 17

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**"EFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE LA INDUCCION DE
INTERCAMBIOS EN LAS CROMATIDAS HERMANAS (ICH)
POR RADIACION GAMMA EN ESPERMATOGONIAS
DE RATON IN VIVO"**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)**

PRESENTA:

BIOL. MARIA TERESA MENDIOLA CRUZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. PEDRO ROSENDO MORALES RAMIREZ

MEXICO, D.F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

El interés, apoyo y asesoría del Dr. Pedro Morales Ramírez fueron determinantes para el desarrollo y culminación de este trabajo. Agradezco profundamente su enseñanza, su amistad y su calidad humana.

Aprecio la valiosa colaboración que me brindaron en todo momento mis compañeros y amigos del laboratorio de Radiobiología Celular: Regina Rodríguez, Tere Vallarino, Vicky Cruz, Felipe Beltrán, Enrique Fernández, Perfecto Aguilar y Angel Reyes. Especialmente agradezco la ayuda desinteresada de Jorge Mercader sin la cual hubiera sido mucho más difícil el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a las Autoridades del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares las facilidades brindadas para el desarrollo e impresión de esta tesis.

A los miembros del Jurado les manifiesto mi agradecimiento por sus comentarios y sugerencias tan valiosas que enriquecieron esta tesis:

Dr. Pedro Morales Ramírez.

Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz.

Dra. Sandra Gómez Arroyo.

Dr. Mario Altamirano Lozano.

Dr. Miguel Betancourt Rule.

Dra. Judith Guzmán Rincón

Dr. Javier Espinoza Aguirre.

Un especial agradecimiento a mi amigo Alejandro Santiago y a mi querido hermano Sergio por su grandiosa ayuda para el diseño, edición e impresión de esta tesis. Muchas gracias por sus horas de paciencia y dedicación.

A Miguel

***Quien es un pilar en mi vida...
Gracias por tu apoyo en mi desarrollo
profesional.***

Con todo mi amor.

A mi niño Aldo

***Quien me ha permitido vivir la gran
experiencia de ser madre...***

***Quien ha sido un gran estímulo para mi en
todos sentidos...***

***Por regalarme esa sonrisa que me hace
infinitamente feliz...***

Te quiero tanto hijito .

A mis padres

Por brindarme su apoyo y amor en todo momento...

Por darme siempre lo mejor de si mismos...

Porque siempre me han ayudado a llegar a la meta...

Los amo y admiro verdaderamente.

Mil Gracias.

A mis queridos hermanos:

Roberto, Oscar y Sergio
Por su apoyo incondicional

Con mi cariño de siempre.

***A mis queridas amigas Lorena y Miriam
agradezco su gran amistad y cariño que me han
manifestado siempre.***

***A mi Abuelita Tere
A quien le hubiera gustado tanto haber podido llegar
a este momento...
Con todo mi cariño en donde quiera que estés.***

***A Rufi
Por su gran disposición para ayudarme
siempre, mi más sincero agradecimiento.***

***A todas aquellas personas que de una manera u otra
me ayudaron a terminar este trabajo.***

A todos mis familiares y amigos.

INDICE

1. ABSTRACT	1
1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCION	3
2.1. INDUCCION DE DAÑO POR RADIACION IONIZANTE.	5
2.1.1. Mecanismos de Inducción de Daño por Radiación sobre la Materia Viva.	5
2.1.2. Efectos Genéticos de la Radiación Ionizante	8
2.1.3. Efectos Genéticos de la Radiación Ionizante sobre Células Germinales.	12
2.2. LOS ICH COMO INDICE DE DAÑO GENETICO	17
2.2.1. La Radiación Ionizante como Agente Inductor de ICH.	20
2.3. LAS ESPERMATOGONIAS COMO MODELO EXPERIMENTAL.	17
2.3.1. Inducción de ICH en Espermatogonias.	28
2.4. REDUCCION DEL DAÑO INDUCIDO POR RADIACION: RADIOPROTECCION.	29
2.4.1. Mecanismos de Radioprotección.	31
2.4.2. Radioprotección en Células Germinales.	32
2.4.3. Clorofilina.	34

2.4.3.1.	Características generales.34
2.4.3.2.	Antecedentes.35
2.4.3.3.	Efecto antimutagénico y radioprotector de la clorofilina.37
2.4.3.4.	Mecanismos de acción de la clorofilina como antimutágeno y radioprotector.40
2.4.3.5.	Toxicidad.43
3.	OBJETIVOS45
3.1.	OBJETIVO GENERAL.45
3.2.	OBJETIVOS PARTICULARES.45
4.	MATERIALES Y METODOS.46
4.1.	ANIMALES.46
4.2.	PROTOCOLOS.46
4.3.	ADMINISTRACION DE BrdU.50
4.4.	IRRADIACION.50
4.5.	ADMINISTRACION DE CLOROFILINA.50
4.6.	ADMINISTRACION DE COLCHICINA.50
4.7.	OBTENCION DE ESPERMATOGONIAS Y PREPARACION DE LAMINILLAS.51
4.8.	TINCION DIFERENCIAL DE LAS CROMATIDAS HERMANAS.51
4.9.	ANALISIS.51
4.10.	ESTADISTICA.51

5.	RESULTADOS.	53
5.1.	EFFECTO DE LA RADIACION GAMMA SOBRE LA FRECUENCIA DE ICH EN ESPERMATOGONIAS ANTES DE LA INCORPORACION DE BrdU AL ADN.	53
5.2.	EFFECTO DE LA RADIACION GAMMA SOBRE LA FRECUENCIA DE ICH EN ESPERMATOGONIAS DESPUES DE LA INCORPORACION DE BrdU AL ADN.	56
5.3.	EFFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE LA INDUCCION DE ICH POR RADIACION GAMMA EN ESPERMATOGONIAS ANTES DE LA INCORPORACION DE BrdU AL ADN.	60
5.4.	EFFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE LA INDUCCION DE ICH POR RADIACION GAMMA EN ESPERMATOGONIAS DESPUES DE LA INCORPORACION DE BrdU AL ADN.	64
6.	DISCUSION.	69
6.1.	EFFECTO DE LA RADIACION GAMMA SOBRE LA FRECUENCIA DE ICH EN ESPERMATOGONIAS ANTES O DESPUES DE LA INCORPORACION DE BrdU AL ADN.	69
6.2.	EFFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE LA INDUCCION DE ICH EN ESPERMATOGONIAS POR RADIACION GAMMA ANTES O DESPUES DE LA INCORPORACION DE BrdU AL ADN.	76
7.	CONCLUSIONES.	80
8.	REFERENCIAS.	81

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico.
AEI	Dihidrobromuro de aminoetil isotiourea.
AFB	Aflatoxina B.
AMPc	Adenosin monofosfato ciclico.
ARN	Acido ribonucleico.
ATP	Adenosin trifosfato.
B[a]P	Benzo[a]pireno.
Ble	Bleomicina.
BrdU	5-Bromo-2'-desoxiuridina.
CF	Ciclofosfamida.
CS	Complejo sinaptonemico.
⁶⁰ Co	Fuente de Cobalto 60.
Cu-CI-Na	Clorofilina cuprisodica.
DMSO	Dimetilsulfoxido.
D.E	Desviación estándar.
EMS	Etilmetanosulfonato.
FSH	Hormona foliculo estimulante.
FPG	Fluorescencia plus Giemsa.
Gy	Unidad de dosis de radiación (Energía absorbida por unidad de masa). Equivalente a 100 rad.
3 HdT	Timidina tritiada.
ICH	Intercambio en las Cromátidas Hermanas.
IM	Indice Mitótico.
IP	Intraperitoneal.
IQ	2-amino-3-metil imidazo [4,5-f]-quinolina
IV	Intravenosa.
LD ₅₀	Dosis letal al 50%.
MEG	Mercapto etilguanidina.
MMC	Mitomicina C.
MMS	Metilmetanosulfonato.

MNNG	Metil N-nitrosoguanidina.
4NQO	4-nitroquinolina-1-oxido.
PMN	Polimorfonuclear.
rad	Unidad de radiación equivalente a 0.01 Gy.
RC	Rupturas cromosómicas.
RDC	Rupturas de doble cadena del ADN.
rpm	Revoluciones por minuto.
SH	Grupo sulfhidrilo.
TGP	Tiempo generacional promedio.
TR	Translocación recíproca.
\bar{x}	Promedio.

1. ABSTRACT

Mouse were exposed to different doses of gamma radiation and the effect on Sister Chromatid Exchange (SCE) frequency in spermatogonias was evaluated. The effect was analyzed before and after Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation to determine the interference of such agent with the cellular response induced by radiation. The capacity of chlorophyllin (Sodium and Copper salt derivative from chlorophyll) to reduce SCE induction by radiation in normal and BrdU radiosensitized spermatogonias was also determined.

The results indicate that there was a significant increase in SCE frequency by gamma radiation exposure in these cells, such effect was higher irradiating after BrdU incorporation than before. This fact confirms previous observations that BrdU sensitizes some cells to SCE induction.

With regard to the chlorophyllin effect, it was determined that this salt acts as a radioprotector reducing gamma-rays-induced SCE before or after BrdU incorporation. Total protection was obtained with 200 µg of chlorophyllin per g of body weight in both protocols.

Under the experimental conditions of this study there was no evidence of genotoxicity induced by chlorophyllin itself. The results suggest that this agent may act as a radioprotector by scavenging free radicals produced by gamma-radiation which cause DNA lesions that are involved in SCE formation.

1. RESUMEN

En este trabajo se determinó el efecto de la exposición a diferentes dosis de radiación gamma sobre la frecuencia de Intercambios en las Cromátidas Hermanas (ICH) en espermatozonias de ratón *in vivo*. Dicha acción se analizó antes y después de la incorporación de Bromodesoxiuridina (BrdU), para detectar la consecuencia del tratamiento con este agente sobre la respuesta celular inducida por radiación. Asimismo, se analizó la capacidad de la clorofilina (sal de sodio y cobre derivada de la clorofila) para reducir la cantidad de ICH provocada por radiación gamma tanto en células normales como radiosensibilizadas con BrdU.

Los resultados indican que la radiación gamma incrementó de manera significativa la frecuencia de ICH en estas células y que el efecto fué mayor cuando la irradiación se realizó después de la incorporación de BrdU. Esto confirma observaciones previas de que la BrdU sensibiliza a las células respecto a la producción de ICH.

Además se obtuvo evidencia de que la clorofilina actuó como radioprotector reduciendo la frecuencia de ICH causada por radiación gamma, obteniéndose el 100% de protección con una dosis de 200 µg/g. Este efecto se observó tanto antes como después de la incorporación de BrdU.

No se encontraron evidencias de genotoxicidad provocadas por la clorofilina *per se*. Se sugiere que la acción radioprotectora de la clorofilina se da a través de la captura de radicales libres producidos por el efecto indirecto de la radiación gamma, los que al dañar al ADN traen como consecuencia la formación de ICH.

2. INTRODUCCION

La radiación ionizante se caracteriza por viajar con alta frecuencia y baja longitud de onda, y se encuentra dentro del espectro electromagnético general (Figura 2.1). Esta radiación no sólo se comporta como ondas electromagnéticas, sino también como paquetes de energía extremadamente pequeños llamados quantum o fotones, cuya energía es directamente proporcional a la frecuencia. La ionización inducida por radiación se refiere a la capacidad de ésta para transformar átomos y/o moléculas en iones cargados positiva o negativamente por remoción o adición de electrones (Selman, 1983).

Cuando la radiación ionizante pasa a través de la materia, los fotones interactúan primero con los átomos liberando electrones de los orbitales y después estos electrones primarios viajan por la materia ionizando y excitando a otros átomos. La ionización implica la remoción completa de un electrón orbital de su átomo, mientras que la excitación se refiere al desplazamiento de un electrón a niveles más altos de energía. Ambos procesos causan efectos biológicos, siendo mucho más importante la ionización.

En la naturaleza todos los sistemas biológicos se dañan por la radiación ionizante. La recuperación de éstos puede ocurrir si la radiación es recibida en pequeñas dosis y causa un daño mínimo. Sin embargo, por arriba de ciertos límites, la radiación produce una gran cantidad de daño biológico que dificulta o imposibilita la recuperación (Selman, 1983).

Se ha descrito que la radiación ionizante desencadena una serie de reacciones en menos de 10^{-6} segundos, que involucran cambios químicos en todas las moléculas teniendo especial importancia las que afectan al ADN, ARN, proteínas, enzimas y al agua. El resultado son lesiones que pueden provocar la muerte (Sanders y Kathren, 1983). En el caso del ADN, algunas de estas lesiones pueden ser reparadas a través de ciertos procesos celulares y otras posiblemente se evitan debido a la presencia de algún agente natural con actividad radioprotectora (Selman, 1983).

La radiación ionizante ocasiona efectos a diferentes niveles de organización, que dependen directamente del tipo de radiación (rayos X, rayos gamma, rayos cósmicos, partículas alfa, partículas beta, neutrones y protones), dosis total, tiempo de exposición, razón de dosis, dosis absorbida, radiosensibilidad y condiciones ambientales en general (Pizzarello, 1982).

Actualmente los organismos vivos se encuentran expuestos continuamente a diversos tipos de radiación ionizante, tanto de origen natural como artificial. La radiación de tipo natural proviene de los rayos cósmicos y de algunos elementos químicos que se encuentran en el suelo, en el aire y en el agua. La radiactividad terrestre es producida principalmente por radionúclidos como el Uranio, Torio y Radio. Estos elementos se localizan en la biosfera, en el suelo, en materiales de construcción y en rocas. Ciertas cantidades de estos elementos se incorporan a los organismos a través de los alimentos y propician determinada exposición interna. Asimismo, los gases radiactivos como el Radón (Rn^{222}) y el Torón (Tn^{220}), que se originan por el decaimiento natural del Uranio y del Torio respectivamente, son inhalados y provocan daño en el epitelio del tracto respiratorio. Los rayos cósmicos son una fuente externa de energía y forman radioisótopos de importancia biológica como el Trito (H^3) y Carbono 14 (C^{14}) mediante reacciones nucleares en la atmósfera (Sanders y Kathren, 1983).

Las fuentes artificiales de radiación creadas por el hombre para fines médicos, científicos, tecnológicos, bélicos e industriales como los aparatos de rayos X, la producción de radioisótopos, los aceleradores de partículas y los reactores nucleares, constituyen fuentes adicionales de exposición (Sanders y Kathren, 1983).

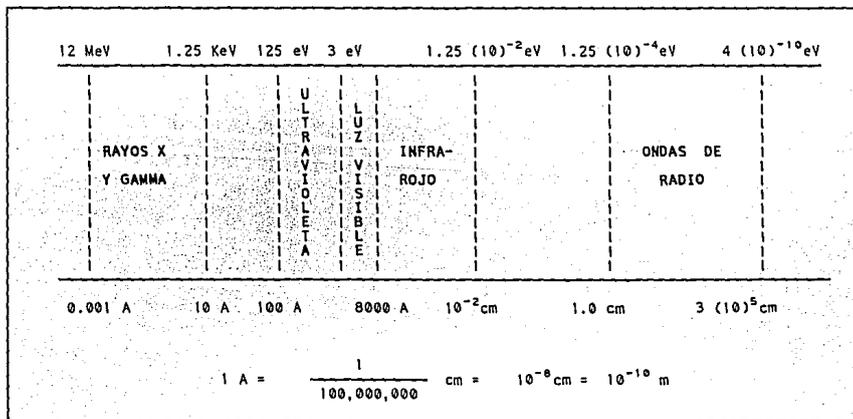


Figura 2.1. Espectro electromagnético general. El rango de longitud de onda y energía de la radiación por diagnóstico con rayos X es igual a 0.1-1.0 A (124-12.4 KeV) y por rayos gamma (^{60}Co) es igual a 0.01 A (1.25 MeV).

2.1. INDUCCION DE DAÑO POR RADIACION IONIZANTE.

2.1.1. Mecanismos de Inducción de Daño por Radiación sobre la Materia Viva.

Los mecanismos a través de los cuales la radiación ejerce sus efectos sobre la materia viva pueden ser de acción directa o indirecta, aunque ambos tienen la posibilidad de actuar finalmente sobre blancos vitales de las células y contribuir al total del daño inducido (von Sonntag, 1987).

El primer mecanismo opera ionizando directamente algunas moléculas blanco altamente radiosensibles dentro de la célula. Hasta el momento, las evidencias indican que más de un blanco debe ser ionizado para inactivar a la célula por pérdida de su capacidad reproductiva o por muerte, debido al gran número de alteraciones tanto en los ácidos nucleicos como en las enzimas (Selman, 1983). Como resultado de la acción directa se produce daño al ADN ocasionando alteraciones estructurales que dan origen a mutaciones, rupturas cromosómicas y/o distribución atípica de los cromosomas durante la mitosis.

La acción directa ocurre principalmente con partículas altamente energéticas como neutrones, protones y partículas alfa, que tienen más probabilidad de golpear blancos múltiples inactivando a la molécula o provocando serias alteraciones (Sanders y Kathren, 1983; Kedar, 1984).

Sin embargo, aquellas moléculas que no fueron ionizadas en forma directa pueden sufrir daño causado por los productos de ionización de otras moléculas circundantes, siendo éste el mecanismo de acción indirecta. Dado que la ionización no es un proceso selectivo, los elementos predominantes de un sistema complejo tendrán más probabilidad de ser ionizados. El agua es el elemento más abundante en la célula y su ionización da origen a productos altamente reactivos llamados radicales libres (Figura 2.2). Estos son átomos o moléculas que tienen electrones no apareados por lo que pueden oxidar o reducir moléculas biológicas. Los radicales libres más reactivos son: OH^\bullet , HO_2^\bullet y H^\bullet , los dos primeros son oxidantes y el último es reductor. Debido a su alta velocidad de reacción tienen vida media corta (10^{-10} - 10^{-12} seg.), pero dada la posibilidad de dispersarse pueden o no producir su efecto en el sitio de origen, en contraste con el mecanismo de acción directa en el que la energía se deposita directamente en las moléculas blanco (Troll y Wiesner, 1985).

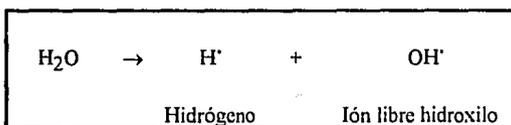
Por su marcada reactividad, los radicales libres producidos por la radiólisis del agua

(Figura 2.2.1), se combinan fácilmente con el oxígeno (Figura 2.2.3), con moléculas orgánicas (Figura 2.2.4) y también reaccionan entre sí dando origen a otros radicales igualmente tóxicos para la célula (Figura 2.2.2) (Pryor, 1986).

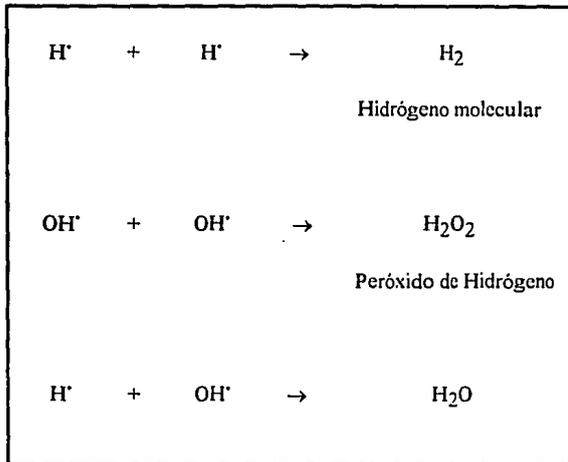
Estas entidades altamente reactivas se combinan con ciertas moléculas sensibles como proteínas, carbohidratos, lípidos, enzimas y principalmente ácidos nucleicos, descomponiéndolas por rupturas de puentes químicos y provocando severos trastornos.

A pesar de que el ADN puede sufrir grandes cambios por la ionización debida a la acción directa de la radiación, el daño que ocurre con mayor frecuencia en él es causado por los radicales libres generados durante la acción indirecta de la misma (Pizzarello, 1982; Sanders y Kathren, 1983; Selman, 1983; Hutchinson, 1985). Sin embargo, cuando las células son irradiadas en presencia de algún agente que captura radicales libres, sufren menos cambios moleculares y tienen mayor probabilidad de sobrevivir (Roots y Okada, 1972).

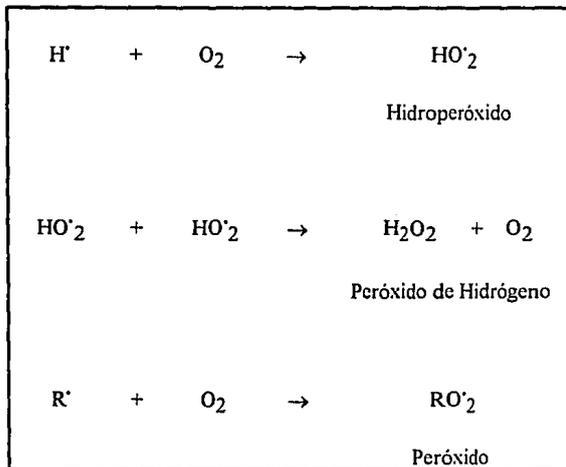
FIGURA 2.2 REACCIONES DE LOS RADICALES LIBRES



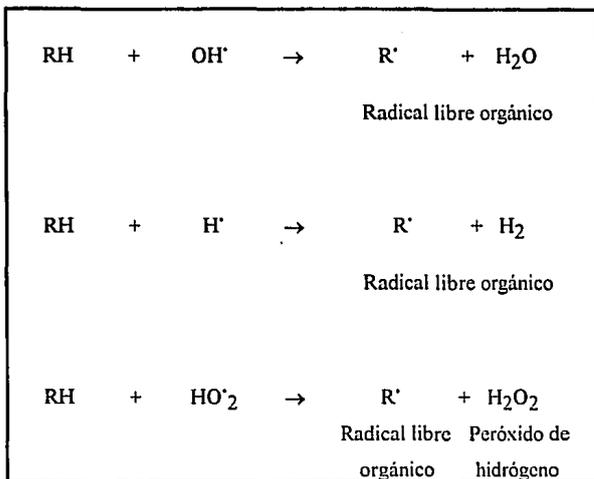
2.2.1. Radicales libres producidos por la interacción de la radiación ionizante con el agua. El punto representa un electrón no pareado.



2.2.2.- *Combinación entre los radicales libres producidos por la radiólisis del agua:*



2.2.3.- *Reacción entre radicales libres y oxígeno.*



2.2.4. Reacciones entre moléculas orgánicas (RH) y radicales libres orgánicos (R').

2.1.2. Efectos Genéticos de la Radiación Ionizante.

El ADN es la molécula portadora de la información genética que regula las funciones celulares tanto en el crecimiento como en la diferenciación y que se transmite de una célula a sus descendientes o de un organismo a otro.

Los polipéptidos que se producen por la traducción del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que a su vez es producto de la transcripción del ADN, llevan a cabo funciones celulares específicas y su actividad depende totalmente de la secuencia de aminoácidos que los constituyen. Por lo tanto, los cambios en la secuencia de bases del ADN se expresarán como errores en la secuencia de aminoácidos de las proteínas y éstas no podrán llevar a cabo sus funciones adecuadamente o las realizarán en forma deficiente (Alberts y col., 1989).

Si además consideramos que a diferencia de otras moléculas que constituyen a las células, el ADN no tiene la posibilidad de ser recambiado continuamente, entonces las

consecuencias a nivel celular por el daño inducido en el ADN son mucho más graves que las que se sufren por el causado en otras moléculas. Por tal razón, se ha considerado que el ADN es la molécula blanco más vulnerable de la célula (Sanders y Kathren, 1983).

Cuando la radiación incide sobre el ADN se generan varios tipos de lesiones como son las rupturas de cadena sencilla y doble, rompimientos en los puentes de hidrógeno, cambios en el esqueleto azúcar-fosfato, formación de enlaces cruzados, daño en las bases nitrogenadas, modificación en la secuencia de las mismas, entre otras. Todas estas alteraciones impiden que el ADN funcione adecuadamente tanto en la síntesis como en la transcripción y además traen como consecuencia la producción de aberraciones y/o mutaciones cromosómicas (Figura 2.3.) (Kedar, 1984).

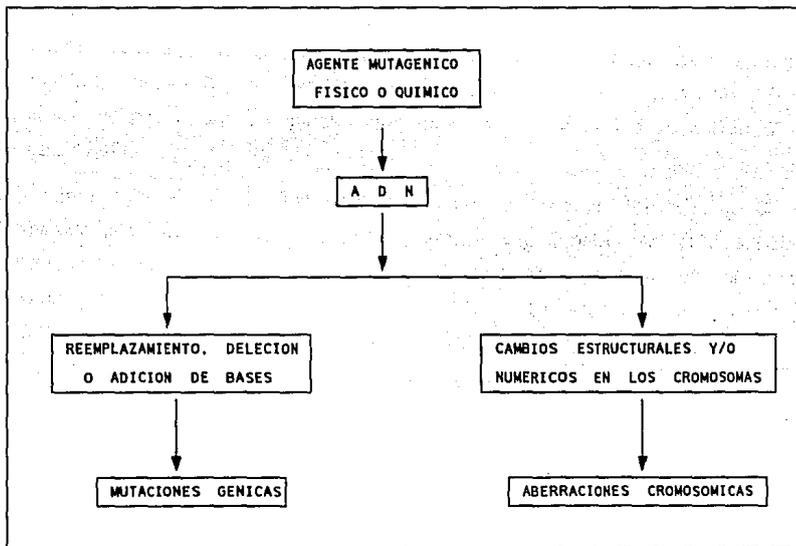


Figura 2.3. Efectos genéticos de la exposición a mutágenos físicos o químicos.

Las mutaciones génicas son el resultado del reemplazamiento, deleción o adición de una simple base en la secuencia normal de un gene. Las aberraciones cromosómicas se caracterizan por cambios en el número y/o la estructura física de los cromosomas. Estas implican rompimientos que provocan pérdidas o rearrreglos de fragmentos cromosómicos. Todos los genes pueden sufrir alteraciones en forma "espontánea", pero la frecuencia de éstas se incrementa cuando las células se irradian o se exponen a diferentes agentes químicos o físicos. Cuando las mutaciones alteran la actividad del producto génico causan consecuencias dañinas para la célula o incluso para el organismo .

Los daños inducidos en el ADN por radiación son susceptibles a ser corregidos mediante algún mecanismo intrínseco de reparación celular. Este mecanismo puede operar permitiendo la recuperación de la secuencia original, o bien mediante la reparación infiel que elimina la lesión pero produce algún cambio o alteración en la secuencia de nucleótidos. En el segundo caso, la mutación se fija y desencadena procesos relacionados con el cáncer y el envejecimiento prematuro en células somáticas principalmente, o da lugar a esterilidad o descendencia afectada cuando se dañan las células germinales. En algunas ocasiones dichas mutaciones pueden ser letales y causar la muerte celular (Figura 2.4) (Brusick, 1987).

En resumen, la radiación ionizante induce cambios en el ADN dando origen a información alterada para la producción de proteínas y enzimas que son esenciales para mantener la estructura y función celular. Las principales consecuencias del daño al ADN por radiación son las mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas estructurales y/o numéricas, intercambios en las cromátidas hermanas, micronúcleos, retardo o inhibición mitótica, mitosis anormal, alteración meiótica y muerte celular (Pizzarello, 1982).

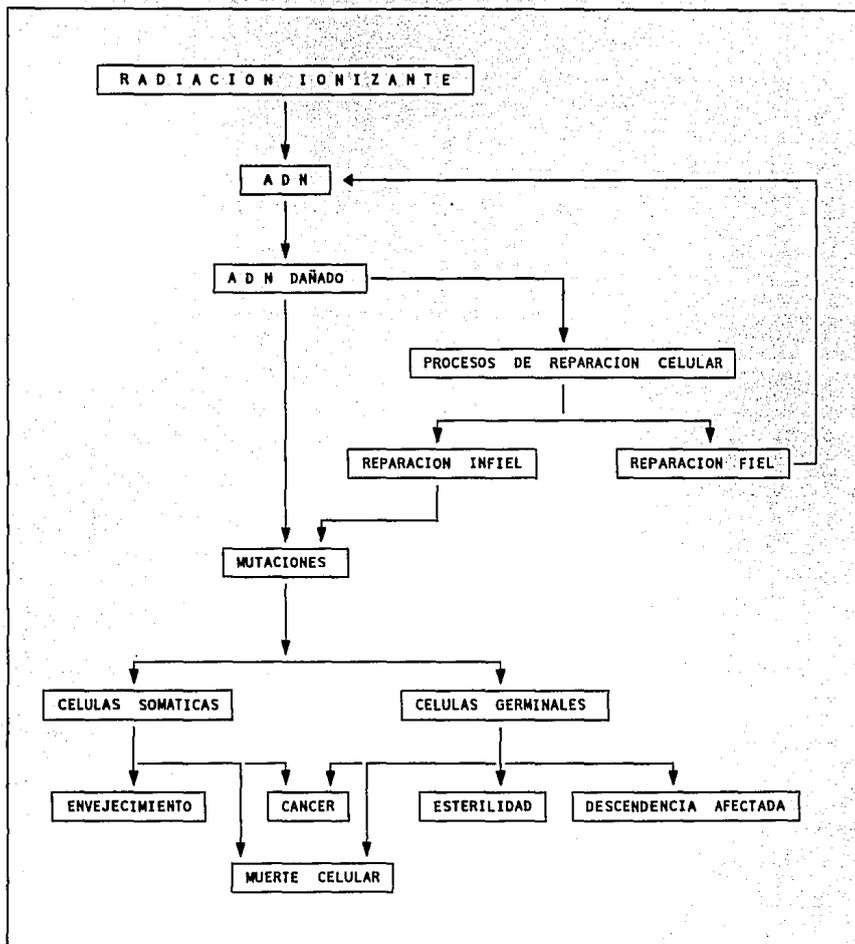


Figura 2.4. Efectos de la radiación ionizante sobre el ADN.

2.1.3. Efectos Genéticos de la Radiación Ionizante sobre las Células Germinales.

El estudio de los efectos de la radiación ionizante sobre las células germinales data de los experimentos pioneros de Heinrich Albers-Schoenberg en 1903 (citado en Sanders y Kathren, 1983), en los que observó esterilidad inducida en conejos y en cuyos expuestos a rayos X. Los machos irradiados se aparearon con hembras no expuestas a radiación y en ningún caso se produjeron descendientes a pesar de que no hubo pérdida de la potencia sexual. Los estudios histológicos revelaron azoospermia en todos los casos, siendo ésta la causa de la esterilidad. Posteriormente, se observaron efectos similares con diferentes fuentes de radiación ionizante, además de detectarse una severa atrofia testicular (Sanders y Kathren, 1983). Más adelante se reportó la esterilidad en humanos en individuos que recibieron irradiación terapéutica en la región perineal y en algunos trabajadores relacionados con el manejo de fuentes radiactivas (Selman, 1983).

Años más tarde se diseñaron algunos experimentos para evaluar el efecto de la radiación en células germinales femeninas. Analizando los ovarios de conejas irradiadas se evidenció una disminución notable en el tamaño de este órgano y en el número de folículos de Graaf, sin lesionar considerablemente la glándula intersticial ni el cuerpo lúteo. Los daños inducidos por radiación en el ovario, no sólo reducen el número de ovocitos causando esterilidad, sino que también disminuyen la producción de hormonas sexuales femeninas debido a las alteraciones en la ovogénesis. De esta forma la esterilidad causada por radiación o el daño inducido en los ovarios puede provocar menopausia prematura temporal o permanente (Casarett, 1980; Sanders, 1983).

Desde estas primeras observaciones a la fecha se ha trabajado ampliamente en este campo y existe una gran cantidad de literatura al respecto.

Algunos de los parámetros que se han utilizado para evaluar el daño inducido por radiación ionizante en células germinales son:

A).- Aberraciones Cromosómicas. Las aberraciones cromosómicas más frecuentes son: translocaciones recíprocas, deleciones y dicéntricos, producto de rompimientos de cadena sencilla y doble del ADN.

Se ha descrito que la radiación ionizante incrementa la frecuencia de translocaciones recíprocas (TR) en espermatogonias de varias especies de mamíferos

como ratones, monos y seres humanos. Las translocaciones se detectan en espermatoцитos primarios en diacinesis o metafase I y la inducción es dependiente de la dosis (Adler y Erbelding, 1988). Sin embargo, existen diferencias en cuanto a la forma de la curva dosis-respuesta entre las distintas especies, por lo que se han hecho más estudios en relación a la inducción de TR por exposición a dosis agudas o crónicas con diferentes velocidades de dosis (Tobari y col., 1988).

Pomerantseva y col. (1984) observaron que la inducción de TR por exposición a dosis crónicas de radiación gamma en ratón es menor que la provocada por dosis agudas. Además reportaron que la frecuencia de TR después de exposiciones crónicas es mayor cuando la velocidad de dosis es menor. Sugieren que esto tal vez se deba a: 1) cambios en la capacidad de reparación, o 2) reducción en la mortalidad de las espermatogonias más radiosensibles a bajas velocidades de dosis, con lo cual se reduce la selección de células dañadas. El protocolo utilizado en estos experimentos no es adecuado por que implica la irradiación de los organismos durante años, lo cual puede afectar la frecuencia de TR debido tanto a la reducción de las lesiones por reparación como a la muerte celular.

Sin embargo, se ha reportado que en algunos primates como el mono rhesus, la incidencia de TR es menor al disminuir la velocidad de dosis de rayos gamma en exposiciones crónicas (van Buul y col., 1986). Esta reducción es mucho menor en el mono que la reportada en el ratón (Searle y col., 1971). Parece que las espermatogonias del mono rhesus son menos susceptibles a la muerte por exposición crónica a radiación gamma, lo cual contribuye al factor de reducción bajo observado en esta especie en comparación con el ratón.

Otro dato interesante obtenido en el mono rhesus es que la relación entre aberraciones cromosómicas inducidas en células somáticas y germinales es de 25:1 a 1.0 Gy y de 7:1 a 2.0 Gy. Se considera que las diferencias en el ciclo celular y en la capacidad de reparación pueden ser responsables de este comportamiento (van Buul, 1976).

Asimismo, se ha determinado que la frecuencia de TR causadas por distintas dosis de rayos gamma en espermatogonias es menor en el mono *Macaca mulatta* (rhesus) que en el *Macaca fascicularis*. Al evaluar el efecto de la velocidad de dosis en esta última se detectó que la exposición a dosis crónicas origina solo 1/10 de las TR provocadas por las agudas. En este sentido también existe una marcada diferencia con respecto a *M. mulatta*, ya que no se observa efecto tan pronunciado en relación a la velocidad de dosis (Tobari y

col., 1988), aunque en ambas especies se han obtenido curvas de dosis-respuesta con un pico de frecuencia máxima alrededor de 2.0 Gy (Matsuda y col., 1984). Se ha propuesto que estas diferencias en la respuesta se deben a la sensibilidad de las espermatogonias que depende de la actividad proliferativa determinada por cambios estacionales. Se sabe que la espermatogénesis en *M. fascicularis* es continua durante todo el año y que no hay cambios en la reproducción relacionados con las estaciones anuales. Por lo tanto, en esta especie se irradian espermatogonias en división activa (Matsuda y col., 1985b). Sin embargo, existen trabajos que contradicen dicha hipótesis de influencias estacionales (Adler y Erbeling, 1988; van Buul, 1991).

Los monos *M. fascicularis* muestran radiosensibilidad a la inducción de TR semejante a la del criceto chino, ratón, conejo y humano. Por esto se han considerado un buen modelo para estimar el riesgo de exposición a radiación ionizante en el hombre (Matsuda, 1985b; Tobarí y col., 1988).

Coogan y Rosenblum (1988) utilizaron la técnica de elución neutra para evaluar la respuesta genotóxica en ciertos tipos celulares específicos de la línea germinal en ratas, analizando la producción de rompimientos de doble cadena (RDC) por radiación gamma en el ADN de espermatogonias, espermatocitos proleptoténicos, espermatocitos paquiténicos y espermátidas. Observaron que la inducción de RDC es dependiente de la dosis en todas las células, siendo más sensibles las espermatogonias y los espermatocitos preleptoténicos que las demás células. Los distintos tipos celulares mostraron una capacidad similar para reparar las RDC después de 3000 rad, dicha reparación fue rápida (45 min) e incompleta (40%).

B).- Modificaciones en el Complejo Sinaptonémico.

Algunos autores han considerado que la incidencia de anomalías estructurales en el complejo sinaptonémico (CS) de espermatocitos primarios en paquiteno es un indicador más sensible para determinar efectos de radiación que la incidencia de multivalentes y translocaciones recíprocas en espermatocitos primarios en diacinesis o metafase I (Baker y col., 1991).

El número de multivalentes inducidos en espermatocitos de criceto sirio por rayos X fué mucho mayor en paquiteno que en diacinesis o metafase I. Estos datos apoyan la idea de que el análisis del CS es de gran utilidad para estudiar los efectos de diversos

tratamientos sobre células germinales, ya que el análisis de células en diacinesis o metafase pueden subestimar la cantidad del daño inducido por radiación en estas células (Cawood y Breckon, 1983; 1985).

C).- Cinética de Proliferación Celular.

Estudiando la cinética de proliferación celular en espermatogonias de ratón mediante el método de marcaje con BrdU *in vivo*, se ha determinado que la exposición a radiación X induce una disminución considerable en la actividad mitótica la cual es dependiente de la dosis. Esta reducción puede ser reflejo tanto de retardo mitótico como de muerte celular (Momoki y van Buul, 1982).

D).- Malformaciones Congénitas.

Otro parámetro utilizado para evaluar el riesgo genético de la radiación a nivel reproductor, es la ocurrencia de malformaciones congénitas en la descendencia de animales irradiados antes de la concepción.

Kirk y Lyon (1984) reportaron que la irradiación en ratones machos, tanto en espermatogonias como en estados post-meióticos, causa malformaciones congénitas en la descendencia dependiendo de la dosis. Observaron que las espermatogonias son menos sensibles que las células en etapas post-meióticas. En estas últimas, se obtuvo evidencia de que las espermátidas tempranas son más sensibles que las tardías y que los espermatozoides. El tipo de anomalía más comunmente encontrado fue el enanismo y después malformaciones en el tubo neural.

Datos similares fueron descritos por Nomura (1988), quien además de estas malformaciones, observó paladar hendido, párpado abierto y exencefalia. También encontró que las espermatogonias son menos sensibles a los rayos X que los espermatozoides y los espermatoцитos primarios y en hembras los ovocitos inmaduros fueron más sensibles que los maduros. Las dosis de rayos X que duplica la frecuencia espontánea de anomalías prenatales (dosis de doblaje) fueron: 12 rad para espermatozoides, 27 para espermatogonias y 19 para ovocitos inmaduros. Asimismo, se analizó la herencia de las alteraciones en la línea germinal que causan anomalías fenotípicas viables y se detectó que éstas se transmiten a varias generaciones. Aunque no

se determinó que tipo de mutaciones son las causantes de las anomalías se sugirió que ciertas deleciones o inversiones cromosómicas deben estar involucradas.

Dado que las anomalías fenotípicas detectadas en humanos son muy semejantes a las reportadas en ratón, se ha considerado que la información obtenida de estos estudios es muy útil para evaluar el daño genético inducido en humanos.

E).- Otros. Supervivencia celular, niveles hormonales y tasa de fertilización *in vitro*.

Al estimar la supervivencia de células germinales de ratón después de diversas dosis de radiación ionizante por medio de cortes histológicos y técnicas citométricas, se ha determinado que la radiación reduce el número de células germinales en forma dependiente de la dosis. Sin embargo, la capacidad de regeneración de estas células en el epitelio seminífero es sorprendentemente elevada. Aún después de la exposición a dosis tan altas como 10.0 Gy, que es aproximadamente el doble de la necesaria para inducir esterilidad permanente en el hombre, la espermatogénesis y la fertilidad en el ratón se recupera (Hacker-Klom, 1985).

van Alphen y De Rooij (1986) y van Alphen y col. (1988 ; 1989b) han realizado varios experimentos para analizar la reducción en el número de las espermatogonias del epitelio seminífero del mono rhesus (*M. mulatta*) después de radiación X. Estos autores han detectado que durante los primeros 8 días después de la irradiación (0.5-4.0 Gy), hay una disminución gradual de las espermatogonias A pálidas (eAp), que se dividen continuamente y dan origen a las espermatogonias B, mientras que el número de espermatogonias A oscuras (eAo), que son no proliferantes o de reserva, no cambia significativamente. Entre el día 8 y 14 se observó una notable reducción en el número de las eAo junto con un aumento en las eAp. Estos datos indican que las eAo en reposo se activan entre los días 8 y 14 hacia eAp y después ambas decrecen continuamente hasta el día 44 en el que ya desaparecen totalmente del epitelio seminífero.

Las espermatogonias tipo B son más sensibles que las A ya que durante los primeros 4 días después de la irradiación se mueren rápidamente y sólo sobreviven algunas cuando son irradiadas con dosis menores a 0.5 Gy (van Alphen y De Rooij, 1986). También notaron que los niveles de ciertas hormonas como la foliculo estimulante (FSH) y la luteinizante aumentan después de la irradiación, mientras que la testosterona permanece constante. Este mismo efecto fue observado en ratas por Pinon-Lataillade y col. (1991). Se postuló que la FSH tiene un efecto radioprotector asumiendo que dispara la transformación

de espermatogonias Ao en Ap (van Alphen y col., 1988). Tal vez la radiosensibilidad de las espermatogonias del mono rhesus está relacionada con su baja actividad proliferante (van Alphen y col., 1989a).

También se ha considerado importante estudiar la tasa de fertilización *in vitro* con espermatozoides de organismos irradiados. En este sentido, Matsuda y col. (1985a) analizaron la frecuencia de óvulos fecundados *in vitro* por espermatozoides obtenidos semanalmente (1-9 semanas) del epididimo de ratón después de irradiación testicular con 200 rad de rayos X. Observaron que el número de huevos fertilizados permanece constante (90-98%) hasta la cuarta semana; entre ésta y la sexta semana la tasa de fertilización declina drásticamente hasta alcanzar el nivel más bajo (30-50%) y de ahí se va recuperando hasta la octava semana. Esta tendencia se evidenció independientemente de la concentración de espermatozoides utilizada. Los resultados indican que el estadio más sensible a la radiación X en términos de la capacidad para fecundar del espermatozoide es la espermatogonia tardía o el espermatozoides primario. Al notar que la reducción en la tasa de fertilización no pudo compensarse aumentando la concentración de espermatozoides, se sugirió que dicho efecto no depende tanto del número, sino de la proporción de espermatozoides con anomalías morfológicas o defectos que alteren la capacidad para fertilizar.

2.2. LOS ICH COMO INDICE DE DAÑO GENETICO

Uno de los parámetros utilizados para la evaluación del daño genético inducido por ciertos agentes físicos y químicos es el intercambio en las cromátidas hermanas (ICH).

Este evento citogenético se detecta en cromosomas metafásicos cuyas cromátidas se puedan teñir en forma diferencial. La producción de los ICH involucra rompimientos y reuniones de doble banda entre las moléculas de ADN de las cromátidas hermanas de un mismo cromosoma.

La primera evidencia directa del ICH fue obtenida por Taylor (1957) con la ayuda de técnicas autorradiográficas en células de *Bellevalia romana*. Permitiendo la duplicación de los cromosomas por un ciclo en presencia de timidina tritiada (^3Hdt) seguido por un ciclo en un medio sin ésta, observó que los cromosomas presentaban una cromátida marcada y otra sin marca. Asimismo, detectó que frecuentemente se presentaban alteraciones en el marcaje de los cromosomas de segunda división, ya que algunos fragmentos de la

cromátida marcada se intercambiaban con la no marcada y viceversa. Este método autorradiográfico no constituyó un sistema adecuado para determinar la frecuencia de ICH debido a su resolución limitada y al requerimiento de (^3Hdt) que induce ICH *per se*.

Posteriormente, Latt (1973) desarrolló otra técnica que se basa en la incorporación del análogo de base 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) durante al menos el primero de dos ciclos de división y la tinción con un colorante fluorescente bibenzimida 33258 Hoechst. Dado que el átomo de bromo del análogo reduce la fluorescencia del colorante, al analizar las preparaciones en el microscopio la cromátida sustituida bifilarmente se observa opaca mientras que la sustituida unifilarmente se observa brillante. Esta alternativa constituyó una técnica de alta resolución, sin embargo tiene la desventaja de que la fluorescencia se desvanece rápidamente.

Las técnicas para detectar ICH se han modificado a través del tiempo y en la actualidad se utiliza más la técnica de fluorescencia más Giemsa. Esta consiste en la incorporación de BrdU durante al menos el primero de dos ciclos replicativos, el tratamiento de los cromosomas con algún colorante fluorescente, luz negra y finalmente la tinción con Giemsa. De esta forma se obtienen cromosomas teñidos diferencialmente en forma permanente que facilitan la detección de los ICH con el microscopio óptico (Perry y Wolff, 1974) (Figura 2.5).

Existen varias formas para administrar la BrdU *in vivo*, como la aplicación de inyecciones intraperitoneales múltiples (Allen y Latt, 1976b), infusiones subcutáneas (Pera y Mattias, 1976), intravenosas (Schneider y col., 1976) o por implantación de una tableta (Allen y col., 1977; King, 1982). Morales-Ramírez y col. (1984b) desarrollaron otro método alternativo que consiste en la inyección intraperitoneal del análogo adsorbido a carbón activado. Este procedimiento además de ser más sencillo y rápido, ha permitido lograr una clara diferenciación entre las cromátidas hermanas tanto de espermatogonias como de células de la glándula salival y de la médula ósea. Los resultados obtenidos con este sistema son prácticamente iguales a los reportados con implantación de la tableta (Madrigal-Bujaidar y Sánchez-Sánchez, 1991), con la ventaja de ser más sencillo.

Se sabe que los ICH ocurren con una frecuencia basal determinada para cada tipo celular. En ratones de la cepa Balb/c; el valor más bajo se ha obtenido en espermatogonias (1.7 ICH/célula), el más alto en células de la glándula salival (5.6 ICH/célula) y las células de la médula ósea presentan frecuencias basales intermedias (3.5 ICH/célula) (Morales-Ramírez y col., 1984b). Existe evidencia de que la BrdU requerida para la diferenciación de

las cromátidas hermanas es responsable directa o indirectamente del valor basal. Se han hecho estimaciones de la frecuencia espontánea de ICH y ésta ha resultado igual a 0.15 ICH/cel/ciclo, la cual es sustancialmente menor que la basal (Morales-Ramírez y col. , 1987).

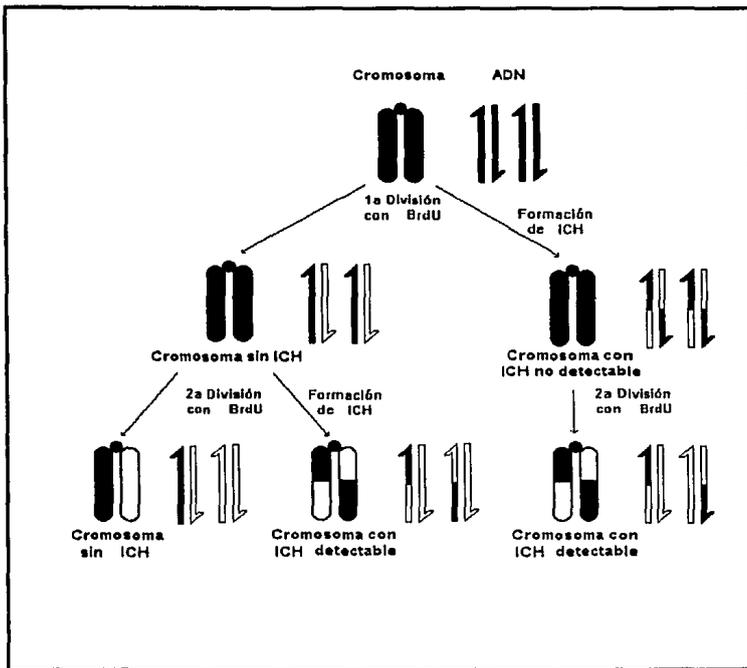


Figura 2.5. Visualización de los intercambios en las cromátidas hermanas (ICH) producidos en células de la primera y/o segunda división.

Se ha demostrado que agentes químicos con diversas formas de acción tienen la capacidad de inducir ICH en varios sistemas. Entre ellos se encuentran la mitomicina C (MMC), metilmetano sulfonato (MMS), etilmetano sulfonato (EMS), ciclofosfamida (Perry y Evans, 1975; Morales-Ramírez y col., 1980;1984b), afidicolina, adriamicina, fluorocromo 33258 Hoescht, mostaza nitrogenada, mostaza de quinacrina, 4-nitroquinolina-1-óxido

(Perry y Evans, 1975); porfiromicina, decarbamoil mitomicina C (Carrano y col., 1979); hidroxurea, 1-D-arabinofuronasil y citosina (Ishii y Bender, 1980).

Los agentes físicos que inducen ICH son: luz ultravioleta (Wolf y col., 1974), luz azul fluorescente (Kato, 1977), ultrasonido (Liebeskind, 1979), calor (Kato, 1980), luz visible (Schvartzman y Gutiérrez, 1980) y radiaciones ionizantes (Abramovsky, 1978; Fornance y col., 1980; Renault, 1982; Morales-Ramírez y col., 1983, 1984a, 1988).

2.2.1. La Radiación Ionizante como Agente Inductor de ICH

Perry y Evans (1975) observaron que la dosis que duplica la frecuencia basal de ICH (dosis de doblaje) en células CHO (4.0 Gy) induce incrementos de 20 veces sobre la frecuencia basal de aberraciones cromosómicas y consideraron que la radiación ionizante no es un buen inductor de ICH o que las lesiones producidas se reparaban rápidamente.

No obstante, Morales-Ramírez y col. (1983) detectaron incrementos significativos en la frecuencia de ICH en células de médula ósea de ratón con su ADN unifilarmente sustituido con BrdU, expuestas a dosis tan bajas como 0.12 Gy. La dosis de doblaje calculada fue de 0.4 Gy que es 10 veces menor que la reportada por Perry y Evans en 1975. Se ha considerado que no es adecuado utilizar la dosis de doblaje como criterio de comparación para evaluar los efectos de la radiación en diversos tipos celulares cuando las frecuencias basales de ICH son totalmente distintas. Así por ejemplo, la frecuencia basal en médula ósea *in vivo* es de 3.6 ICH/célula, mientras que la de células CHO *in vitro* es de 12.2 ICH/célula, es decir 3 veces mayor que la primera. Incluso resulta menos recomendable aún la comparación de la dosis de doblaje para sistemas en los que se evalúan parámetros con frecuencias basales muy diferentes tales como ICH y aberraciones cromosómicas (0.05 /célula).

Existen varios estudios que demuestran que la radiación ionizante es capaz de inducir aumentos significativos sobre la frecuencia basal de ICH en varios tipos celulares tanto *in vitro* (Abramovsky y col., 1978) como *in vivo* (Ugglá y Natarajan, 1983; Chao y Rosenstein, 1984; Morales-Ramírez y col., 1983, 1984a). Este incremento en la frecuencia de ICH puede provocarse tanto en células con su ADN sustituido o no con BrdU (Perry y Evans, 1975; Morales-Ramírez, 1984a; b). Incluso Littlefield y col. (1979) al no detectar aumentos en la frecuencia de ICH en linfocitos humanos irradiados *in vitro* en etapa G₀ con

dosis de 150-300 rad de rayos gamma, suponen que la inducción de ICH por radiación ionizante reportada en células con su ADN sustituido con BrdU, se debe al efecto aditivo de la misma.

Se ha observado que la presencia de oxígeno eleva en mayor proporción la frecuencia de aberraciones cromosómicas que la de ICH causados por radiación gamma en células de *Vicia faba*. Estos datos aunados a la observación de que el oxígeno produce un mayor número de rompimientos de cadena sencilla que de bases dañadas por exposición a rayos X, permiten concluir que los ICH se ocasionan por alteraciones en las bases más que por rompimientos de cadena sencilla (Andersson y col., 1981). Al comparar la cinética de producción de ICH y aberraciones cromosómicas inducidos por rayos X, se sugirió que la formación de ambos eventos es independiente. Por otro lado, Abramovsky y col. (1979) detectaron formación de ICH en linfocitos humanos cultivados e irradiados con rayos gamma a dosis de 25-200 rad tanto en G₁ como en G₂, siendo mayor en la primera etapa.

Morales-Ramírez y col. (1983, 1984a), han determinado que la radiación gamma puede originar ICH tanto en células con su ADN sustituido con BrdU como en aquellas cuyo ADN no ha incorporado dicho análogo. Sin embargo, reportaron que la BrdU sensibiliza al ADN respecto a la inducción de ICH por radiación gamma. Los mismos autores han obtenido evidencia de que la lesión provocada por radiación gamma que produce ICH en células de la médula ósea de ratón *in vivo* antes de la incorporación de BrdU, es estable y no fácilmente reparable persistiendo al menos por 8 ciclos celulares después de la radioexposición (Morales-Ramírez y col., 1984a). En 1988 reportaron que la radiación gamma causa lesiones capaces de originar ICH en el mismo locus en divisiones celulares sucesivas (Morales-Ramírez y col., 1988).

En general, se puede decir que la formación de ICH por radiación depende de varios factores como son: el sistema de prueba, dosis de radiación, dosis de BrdU, experimentos *in vivo* o *in vitro*, etapa del ciclo celular al momento de irradiar, etc., los cuales deben ser tomados en cuenta para los diseños experimentales.

2.3. LAS ESPERMATOGONIAS COMO MODELO EXPERIMENTAL

Las espermatogonias son células que pertenecen a la línea germinal y que por sus características tan particulares y por la trascendencia del tejido al que pertenecen, han constituido un modelo relevante para el estudio del riesgo genético de mutágenos potenciales. Son las células precursoras de los gametos masculinos, provienen de células germinales primordiales que en cierta etapa de la embriogénesis migran hacia la gónada y posteriormente cuando el organismo alcanza la madurez sexual se diferencian, sufriendo varias divisiones mitóticas y una meiótica, dando origen finalmente a los espermatozoides (Figura 2.6).

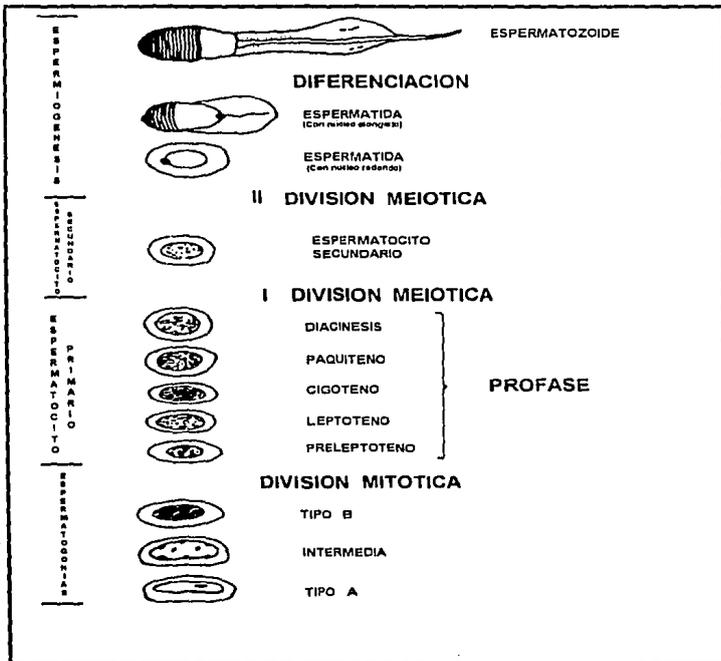


Figura 2.6. Espermatogénesis en rata. (Cameron y col., 1971)

Las espermatogonias se encuentran en la membrana basal de los túbulos

seminíferos y se dividen constantemente. Se han distinguido 3 tipos principales de espermatogonias en mamíferos: las de tipo A, las intermedias y las de tipo B; éstas se distinguen con base en la morfología y tinción del núcleo (Cameron y col., 1971).

De las espermatogonias B se originan los espermatoцитos primarios en los que se da la síntesis premeiótica del ADN y no vuelve a haber replicación en etapas posteriores de la espermatogénesis. La profase del espermatoцитo primario, a diferencia de la del secundario, comprende varias etapas: preleptóteno, leptóteno, cigóteno, paquíteno, diplóteno y diacinesis; durante esta etapa ocurre la sinapsis de cromosomas homólogos y el entrecruzamiento por medio de la formación del complejo sinaptonémico.

El espermatoцитo primario sufre la primera división meiótica dando origen a dos espermatoцитos secundarios, cada uno de los cuales rápidamente pasa la segunda división meiótica formando dos espermátidas haploides. Posteriormente éstas se diferencian mediante la espermiogénesis originando los espermatozoides que se liberan hacia el lumen del túbulo seminífero completando el ciclo (Monesi, 1962; Kofman-Alfaro y Chandley, 1970; Cameron y col., 1971).

La duración de la espermatogénesis varía dependiendo de la especie, pero el promedio general es de 4 a 7 semanas. Las espermatogonias tipo A persisten durante todo el ciclo, las que comienzan a pasar a intermedias y las B permanecen menos de la mitad del mismo.

La sensibilidad de las células germinales masculinas con respecto a ciertos mutágenos, depende de la etapa en la que éstas se encuentren al momento de la exposición. Algunos datos con agentes químicos que actúan en etapas pre y/o post-meióticas de las células germinales, indican que los estadios premeióticos son más resistentes a la inducción de mutaciones (Brusick, 1987).

A diferencia de las células somáticas, las mutaciones provocadas en las células germinales pueden persistir en la población si no son letales y transmitirse a través de generaciones sucesivas. De tal forma, las nuevas mutaciones en cada generación subsecuente se suman a aquellas causadas en generaciones anteriores. Las únicas mutaciones que no persisten son las letales dominantes y aquellas que producen esterilidad en los individuos afectados. El tiempo de persistencia de una mutación en las poblaciones humanas es por lo general inversamente proporcional a la severidad de la misma (Brusick, 1987).

Otra situación muy peculiar por la ubicación del tejido germinal es la protección

conferida por barreras morfológicas que dificultan o impiden el acceso de ciertas sustancias hacia él evitando sus efectos adversos (Figura 2.7).

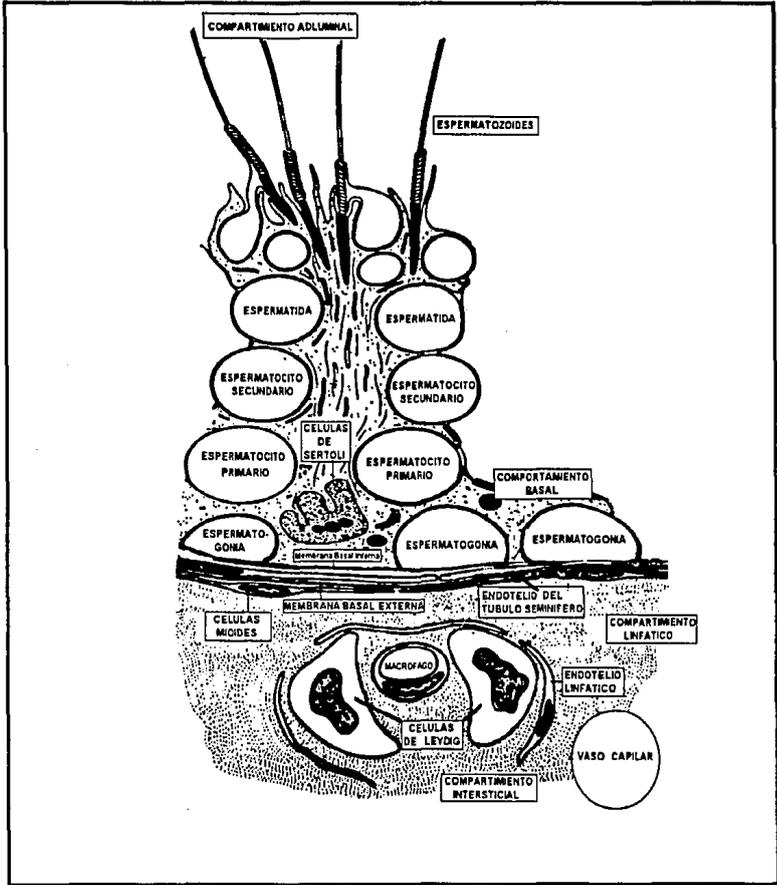


Figura 2.7. Barreras celulares y compartimientos del epitelio germinal. (Modificado de Russell, 1990)

Una sustancia que llega a dañar el genoma de los gametos masculinos, debe lograr el acceso hacia las células germinales pasando por diferentes vías complejas para poder ejercer sus efectos (Russell, 1990).

Para que una sustancia que está presente en la sangre llegue a las células germinales, debe atravesar primero la pared capilar y llegar al compartimiento intersticial en los testículos, transportarse entre las células perivasculares de Leydig y algunas otras células del intersticio como macrófagos, penetrando el espacio sinusoidal presente entre las células intertubulares y los túbulos seminíferos. Traspasar la membrana exterior de los túbulos seminíferos no es tan complicado, ya que las células endoteliales de los mismos parecen encimarse y aparentemente no hay uniones fuertes que impidan el paso de ciertos materiales. Entre estas células endoteliales y la lámina basal interna, existe una o varias capas de células mioideas poligonales que forman una barrera importante (Russell, 1990). Una vez que la sustancia ha cruzado la lámina basal interna y se encuentra en el compartimiento basal dentro de los túbulos seminíferos, tiene acceso directo a las células de Sertoli y tal vez a las células germinales inmaduras como espermatogonias y espermatocitos. Las células de Sertoli poseen estructuras especializadas en su superficie que funcionan como receptores de ciertas sustancias; además constituyen complejos Sertoli-Sertoli fuertemente unidos que conforman barreras especiales. Pasando el compartimiento basal se localiza el adluminal en el que se acumulan las espermátidas y los espermatozoides (Dym y Fawcett, 1970).

Además de las barreras que pueden impedir el acceso de ciertas sustancias, el peso molecular y la solubilidad de las mismas juegan un papel determinante en la penetración (Russell, 1990).

Muchos investigadores han utilizado este modelo para el estudio del efecto mutagénico tanto de agentes físicos como químicos (Cuadros 2.1 y 2.2).

Cuadro 2.1 Inducción de daño por agentes físicos en células germinales.

Agentes Físicos	Índice de Daño	Autores y Año
Radiación gamma	Aberraciones cromosómicas, rompimientos dobles y sencillos del ADN y mutaciones letales dominantes.	Pomerantseva y Vilkina, 1974; van Buul, 1976; Pomerantseva y Ramaija, 1984; Pomerantseva y col., 1984; Matsuda y col., 1984; 1985b; van Buul y col., 1986; Adler y Erbeling, 1988; Coogan y Rosenblum, 1988; Tobarí y col., 1988.
Radiación X	Reducción en la cantidad de células, malformaciones congénitas, aberraciones cromosómicas, alteraciones en el complejo sinaptonémico, cinética de proliferación y fertilización <i>in vitro</i> .	van Buul, 1976; Momoki y van Buul, 1982; van Buul y Léonard, 1984; Kirk y Lyon, 1984; Matsuda y col., 1985a; van Alphen y De Rooij, 1986; van Buul, 1986; van Alphen y col., 1988; van Alphen y col., 1989a; b; van Buul, 1991; Backer y col., 1991.

Cuadro 2.2. Inducción de daño por agentes químicos en células germinales.

Agentes Químicos	Índice de Daño	Autores y Año
Etanol	Micronúcleos, aberraciones cromosómicas.	Tates y Natarajan, 1976.
Ciclofosfamida	Aberraciones cromosómicas	Rathenberg, 1975; Miltenburger y col., 1981.
Mitomicina C	Aberraciones cromosómicas.	Manyaka y Schleiermacher, 1973.
Adriamicina, Metotrexato, Procarbazina y Actinomicina	Muerte celular y alteraciones morfológicas.	Meistrich y col., 1982.
Procarbazina, Mitomicina C y Busulfan.	Número de descendientes.	Ehling, 1980.
Ciclofosfamida, Mitomicina C, Metilmetano sulfonato, 4NQ-10, Blomicina, Procarbazina, Adriamicina y gosispol	Intercambios en las Cromátidas Hermanas (ICH).	Allen y Latt, 1976a; b; Palitti y col., 1982; Abraham y Fränz, 1983; Ren-Li y col., 1988.

Al hacer comparaciones del efecto que causan algunos mutágenos en células germinales y somáticas, se ha reportado que las espermatogonias son menos susceptibles de sufrir daño que las células de médula ósea y bazo (Tates y Natarajan, 1976; Miltenburger y col., 1981; Palitti y col., 1982).

2.3.1. Inducción de ICH en Espermatogonias

Particularmente se ha demostrado que diversos mutágenos químicos son capaces de incrementar la frecuencia de ICH en espermatogonias. Por ejemplo, Allen y Latt (1976 a; b) utilizando el método de inyecciones múltiples de BrdU, determinaron que la frecuencia basal de ICH en espermatogonias aumenta por efecto de la ciclofosfamida y de la mitomicina C. Con ambos agentes se observó que la inducción de ICH es dependiente de la dosis y por arriba de cierto límite, el número de metafases para analizar se reduce considerablemente. Los resultados sugieren que estos fármacos son capaces de atravesar las diferentes barreras que protegen a las espermatogonias y dañar el ADN de las mismas. También se determinó que tanto las frecuencias basales como las causadas por los agentes alquilantes son mayores en células de médula ósea que en las espermatogonias.

Con el objeto de comparar la sensibilidad relativa de las espermatogonias con células de bazo y médula ósea de ratón suizo albino, Palitti y col. (1982) analizaron tanto la frecuencia basal como la inducida por ciertos mutágenos químicos en los tres tejidos. Estos autores reportaron que no hubo diferencia significativa en cuanto a los valores basales en los tres tipos celulares; pero las frecuencias se incrementaron notablemente por efecto de los compuestos químicos siguientes: ciclofosfamida (CF), mitomicina C (MMC), metilmetano sulfonato (MMS), 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) y bleomicina (Ble). Sin embargo, dicho aumento fue menor en espermatogonias que en los otros tejidos, lo cual implica que son menos sensibles que las otras células a la producción de ICH por estos mutágenos o que los agentes externos no tienen acceso tan fácilmente a ellas. Estos resultados fueron observados igualmente en ratones de la cepa NMRI tratados con CF a diferentes concentraciones (King y col., 1982).

También Abraham y Fränz (1983) detectaron la alta potencialidad de CF y MMC para inducir ICH en espermatogonias con respecto a otros compuestos quimioterapéuticos como procarbazona y adriamicina. Al comparar las dosis de los agentes utilizados en dicho estudio con las que se administran a los humanos durante tratamientos de quimioterapia, se determinó que las dosis de los fármacos citostáticos que causan incrementos significativos de ICH en espermatogonias de ratón son muy semejantes a las que reciben los pacientes. Por esta razón es tan importante evaluar la genotoxicidad que puede provocarse en células germinales antes de cada administración. El aumento observado en la frecuencia de ICH por CF y MMC en estos experimentos en espermatogonias, es menor que el reportado en médula ósea de ratones de la misma cepa C57B1/6 (Nakanishi y Schneider,

1979).

Así mismo, se ha utilizado este modelo para valorar el efecto de anticonceptivos de uso masculino, el gopipol es uno de éstos y se ha demostrado que a dosis clínicas no eleva la frecuencia de ICH ni de micronúcleos por encima de la basal, pero por arriba de éstas aumenta el número de ambos indicadores de daño. La dosis mínima de gopipol que incrementó significativamente la frecuencia de ICH fue de 12 mg/kg/día en espermatogonia, mientras que para médula fue de 4 mg/kg/día. El aumento detectado se relaciona directamente con la dosis administrada. A pesar de que en estos experimentos se utilizaron cantidades mayores que las empleadas clínicamente, no se puede negar la posibilidad de que el gopipol dañe el material genético de los pacientes. Dadas las características de este agente, no se aconseja su uso por períodos prolongados y es recomendable dejar pasar 2 ó 3 meses para la concepción después del tratamiento (Ren-Li y col., 1988).

2.4. REDUCCION DEL DAÑO INDUCIDO POR RADIACION: RADIOPROTECCION

Dado que las poblaciones humanas se encuentran expuestas a diferentes fuentes de radiación, tanto naturales como artificiales, desde hace varias décadas se comenzó a investigar la posibilidad de protegerse contra los daños inducidos por éstas.

Cualquier sustancia que se administra antes de la exposición a radiación y que atenúa o evita los efectos dañinos de la misma, se considera como un radioprotector. Los objetivos principales del estudio de la modificación del daño por radioprotectores son: 1) Conferir protección a los individuos que se encuentren expuestos a radiación; 2) Proteger a los tejidos normales durante las terapias de irradiación de tejidos malignos y 3) Ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de inducción de daño por radiación (Pizzarello, 1982).

Se han hecho una gran cantidad de experimentos en relación a la capacidad radioprotectora de varias sustancias de diversa índole, no obstante la mayoría parece tener efectos tóxicos a las dosis más efectivas. Sin embargo, se ha logrado obtener bastante información sobre los mecanismos involucrados tanto en la producción del daño como en la disminución del mismo.

Los compuestos que se han analizado tienen diferente capacidad radioprotectora, la cual depende en parte de sus características físico-químicas y de otros factores como la dosis de radiación, la ruta y tiempo de administración, el animal de experimentación y el

tiempo de exposición. Los radioprotectores más comunes son sustancias químicas que se han estudiado ampliamente y se han dividido en cinco grupos principales (Pizzarello, 1982):

1) Aminotioles. Son compuestos con grupos NH_2 y SH , como la cisteína, cisteamina, dihidrobromuro de aminoetil-isotiurea (AET) y 2-mercaptoetilguanidina (MEG) entre otros.

Las aminas con grupos sulfhidrilos son fuertes agentes reductores y capturadores de radicales libres, éstas han sido objeto de numerosas investigaciones por su alta capacidad radioprotectora.

2) Otros compuestos con azufre. Algunos de los más efectivos son tiurea, tiouracilo, ditiocarbamato, ditiouxamidas, tiazolinas, sulfóxidos y sulfonas.

3) Agentes Farmacológicos. Algunos agentes como el alcohol etílico confieren protección contra la radiación X en ratones, tal vez debido a la depresión respiratoria que a su vez produce hipoxia. Ciertos analgésicos como la morfina y la heroína y varios tranquilizantes como la reserpina incrementan la LD_{50} y el porcentaje de supervivencia celular en ratones.

4) Algunas Biomoléculas. Otras biomoléculas como la dopamina, histamina, serotonina, epinefrina, acetil colina y algunas hormonas tienen determinado valor radioprotector.

5) Otros Agentes Radioprotectores. El cianuro, ATP, AMP, fluoroacetato de sodio, para-aminopropiofenona y endotoxinas, también proporcionan diferentes grados de radioprotección.

De los agentes mencionados, el grupo de los aminotioles es el que se ha estudiado con mayor detalle dada su gran capacidad radioprotectora.

Se ha reportado que la cisteamina y la cisteína son más efectivas que los alcoholes (etanol y metanol) para proteger contra la inducción de anillos y dicéntricos por radiación gamma en linfocitos humanos (Sasaki y Matsubara, 1977).

Asimismo, el porcentaje de supervivencia de células de riñón humano cultivadas *in vitro* es mayor cuando las células son irradiadas en presencia de cisteamina que en condiciones de anoxia (Vergoesen y col., 1967). Evaluando el mismo parámetro, Sato y col. (1970) detectaron que la cisteamina es un radioprotector más efectivo que la 2-

mercaptoetilguanidina en células HeLa.

En células de criceto chino la cisteamina tiene un efecto protector contra la producción de mutaciones y lesiones letales (Pitra y col., 1977) y reduce las aberraciones cromosómicas y el retardo mitótico causados por radiación (Yu y Sinclair, 1970). Igualmente, la cantidad de rompimientos de cadena sencilla y doble inducidos por radiación en células endoteliales de corteza cerebral de rata, se reduce notablemente en presencia de cisteamina (Cerdeja y Rosander, 1983).

Abramovsky y col. (1978) reportaron que la L-cisteína tiene acción protectora contra la inducción de ICH por rayos X en linfocitos humanos *in vitro* y que también incrementa la viabilidad celular especialmente a dosis por arriba de 100 rads.

En un estudio previo se observó que la administración intraperitoneal de cisteamina en ratones, antes de la exposición a radiación gamma, protege a las células de la médula ósea contra la producción de ICH en forma dependiente de la dosis. Sin embargo, no se observó efecto sobre otros parámetros como tiempo generacional promedio, rupturas cromosómicas e índice mitótico. Dado que la cisteamina es un capturador de radicales libres, se sugirió que la inducción de ICH es causada por los radicales libres originados por el efecto indirecto de la radiación (Mendiola-Cruz y Morales-Ramírez, 1989).

2.4.1. Mecanismos de Radioprotección.

Se han propuesto diferentes mecanismos de acción para los compuestos que contienen grupos sulfhidrilo (SH). Uno de ellos, considera que estos grupos inactivan a los radicales libres que se forman por la radiólisis del agua, al combinarse con ellos se evita que reaccionen dañando a otras moléculas blanco como el ADN (Roots y Okada, 1972).

La producción de hipoxia por estos compuestos puede ser otro factor importante en la radioprotección. Asimismo, se ha considerado la posibilidad de que el grupo SH proteja químicamente a través de un enlace disulfuro, a las proteínas que son esenciales para las funciones celulares (Sasaki y Matsubara, 1977).

En células de hígado de ratón se observó que algunos compuestos SH reducen el porcentaje de síntesis de ADN, por lo que se ha propuesto que esta situación podría dar más oportunidad para la reparación del daño al haber más tiempo antes de la duplicación (Mitzneg y Säbel, 1973). También se sugiere que posiblemente reducen los rompimientos de cadena sencilla del ADN por rayos X, mediante una reacción de reparación a través de la transferencia de H^+ a la porción de azúcares dañados (Lafleur y col., 1980).

2.4.2. Radioprotección en Células Germinales.

Es de particular importancia la radioprotección que pueda ser conferida a las células reproductoras para evitar daños en generaciones futuras. Uno de los criterios más usados en este aspecto durante los primeros años de estudio de los compuestos radioprotectores, fue analizar el efecto sobre la fertilidad de los organismos o sobre la viabilidad de su descendencia (Pizzarello, 1982).

Se ha observado que la inyección de cisteamina o cistamina protege a ratones hembra contra la esterilidad radioinducida. El número de camadas obtenidas de ratonas inyectadas con cisteamina o cistamina previo a la irradiación, es 2.8 ó 1.7 veces mayor respectivamente, que el logrado de las hembras irradiadas sin tratamiento radioprotector (Rugh y Wolff, 1957).

Al evaluar la acción de la cisteamina contra las mutaciones inducidas por rayos X en espermatozoides de ratón, se determinó que cuando el padre es tratado antes de la irradiación, se obtiene un considerable decremento (75%) en la tasa de muerte postimplantación con respecto al grupo no tratado. Además, el número de embriones vivos, implantaciones/hembra, implantaciones totales y hembras preñadas es casi igual entre el grupo tratado con cisteamina e irradiado y el grupo testigo sin irradiar (Lüning y Frolen, 1961).

El tratamiento con AET o mercapto-etilamina en ratones machos reduce significativamente la frecuencia de translocaciones recíprocas inducidas por rayos X en la primera fase meiótica de la espermatogénesis (Sarkovic y Pecevski, 1974).

Diversos protectores como el gamafos, citafos y cistamina, disminuyen la frecuencia de mutaciones letales dominantes en espermatozoides de ratón causadas por rayos gamma (Pomerantseva y Ramajija, 1984).

Desafortunadamente, algunos de estos compuestos resultan citotóxicos a las dosis más efectivas. Se ha reportado en diferentes sistemas que dicha toxicidad imposibilita el uso de algunos agentes como radioprotectores en humanos, ya que pueden inhibir el crecimiento celular (Eker y Phil, 1964), provocar ciertos tipos de aberraciones (Nasjleti y Spencer, 1969), ICH y poliploidias (Speit y Vogel, 1982).

Se ha asumido que la toxicidad de los compuestos tioles puede ser causada por los productos de su oxidación, ya que la adición de agentes reductores disminuye la toxicidad de los mismos (McRae y Stich, 1979).

Con el afán de encontrar agentes radioprotectores menos tóxicos, se organizó en EUA un programa de desarrollo de drogas radioprotectoras derivadas principalmente de la

cisteamina. Uno de los primeros compuestos estudiados fue el S-2-(3-aminopropilamino) etilfosforotioato (WR-2721) (derivado tiofosfatado de la cisteamina), que es un efectivo protector contra el daño inducido por radiación, y que además de ser menos tóxico que la cisteamina confiere mayor protección a los tejidos normales que a los tumorales (Yuhás y Yurconic, 1977). Se ha observado que este agente protege significativamente contra la reducción de espermatogonias A causada por radiación gamma en ratón suizo albino (Jaimala y col., 1984). Asimismo, se ha reportado que el pretratamiento con WR-2721 baja la frecuencia de translocaciones recíprocas (TR) en espermatoцитos primarios con una factor de reducción de 2.4. Este agente resultó más efectivo que algunas mezclas como ATP-AET-serotonina (Benova, 1986a; b).

También se han hecho experimentos con este tipo de agentes en células germinales femeninas. Se ha caracterizado cuantitativamente la capacidad de compuestos como WR-1065, WR-255591, WR-151326 entre otros, para proteger a las células de ovario de criceto chino *in vitro* contra la inducción de lesiones al ADN y muerte celular por radiación gamma. En dichos estudios, se observó que la mayoría de estos aminotioles eleva considerablemente la supervivencia celular al estar presentes durante la irradiación. Asimismo, reducen de manera dosis-dependiente la eficiencia con que la radiación gamma induce rompimientos de cadena sencilla y doble. Sin embargo, el nivel de protección detectado para rupturas siempre fue menor que el encontrado para supervivencia celular. Se sugiere que la radioprotección no sólo ocurre por la disminución uniforme de los niveles iniciales de distintas lesiones al ADN causadas por radiación gamma. Tal vez ciertos tipos particulares de daño, que son cruciales para la supervivencia celular, son preferencialmente evitados por estos agentes (Murray y col., 1988a; b; 1990).

En general, se puede decir que el futuro de la radioprotección es aún incierto, pero el continuo estudio de diversos agentes radioprotectores sigue proporcionando información sobre los mecanismos de inducción de daño por radiación y protección contra el mismo.

2.4.3. Clorofilina.

2.4.3.1. Características generales

La clorofilina es un compuesto derivado de la clorofila, cuya estructura química consiste de un anillo tetrapirrólico que contiene puentes dobles conjugados y un metal al centro (Newmark, 1987). Es un pigmento semejante a la hemina, biliverdina y protoporfirina; incluso su estructura es similar a la del grupo hemo que tiene estructura de porfirina con un Mg al centro y una cola hidrofóbica.

Mediante la hidrólisis alcalina de la clorofila se sustituyen los grupos metil y fitil por algún metal como sodio, cobre o potasio y las sales que se forman son las metaloclorofilinas, que pueden aún contener magnesio (Kurk, 1962) (Figura 2.8).

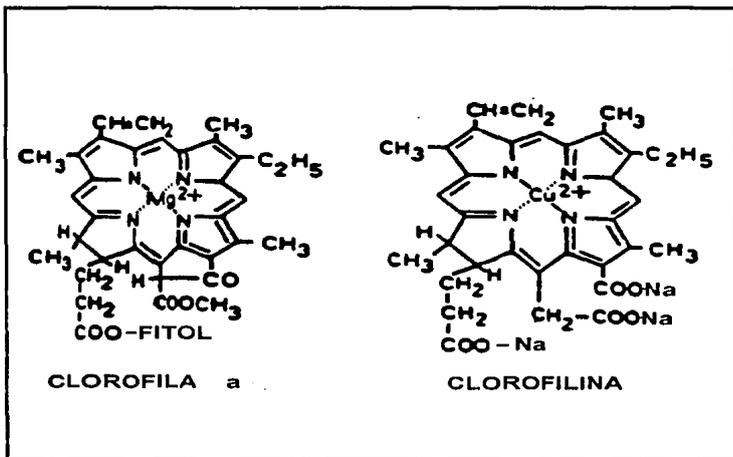


Figura 2.8. Estructura química de la clorofila y de la clorofilina cuprisódica. (Newmark, 1987)

Estas sales de color verde-azul oscuro son altamente solubles en agua y en alcohol. El espectro infrarrojo de la clorofilina muestra la ausencia del grupo

carbonilo y del anillo ciclopentano (que existe en la clorofila), sin embargo en el espectro de absorción visible se notan características en común con la clorofila. Particularmente, la aparición de una absorción máxima pronunciada a 688 nm, es análoga a la observada en los espectros de absorción de soluciones concentradas de clorofila-a. Esta característica es atribuida a la formación de dímeros de carbono en la estructura porfirínica (Oster y col., 1964).

El alto grado de resonancia y la deslocalización de electrones en la molécula de clorofilina, sugieren que puede ser un capturador efectivo de radicales libres (Simic, 1988).

2.4.3.2. Antecedentes

Dada la semejanza estructural de la clorofilina con el pigmento de la sangre (hemoporfirina), se comenzó a utilizar este compuesto como agente terapéutico en ciertos tipos de anemia. En estas primeras investigaciones, se observó que la administración oral de la clorofilina a conejos anémicos aceleró la regeneración de células sanguíneas y elevó eficazmente los niveles de hemoglobina en pacientes anémicos (Kephart, 1955). Se pensó que el organismo podría utilizar sustancias pirrólicas preformadas para la producción de hemoglobina.

Asimismo, se estudió la acción de la clorofilina sobre la presión sanguínea de sujetos normales e hipertensos. Se evidenció que la administración oral de la clorofilina regula la presión arterial en pacientes hipertensos sin causar efectos tóxicos. Esta acción se relaciona con la capacidad para reducir la arteriosclerosis (Kephart, 1955).

También se demostró que la clorofilina sódica disminuye el tiempo de coagulación en el sangrado de individuos normales, lo cual podría tener aplicaciones clínicas en el tratamiento del síndrome hemorrágico (Buttitta, 1946).

Por otro lado, se comenzó a estudiar el efecto de la clorofilina sobre el crecimiento celular *in vitro*. Smith y Sano (1944) reportaron que la adición de clorofilina (0.05 - 0.5%) al medio de cultivo de fibroblastos embrionarios, provocó una respuesta inmediata de crecimiento eliminando el período de latencia (que dura de 6 a 18 hrs). Esta capacidad de estimulación del crecimiento pudo mantenerse añadiendo clorofilina al medio cada 48 h.

Con base en esta propiedad, la clorofilina se empezó a utilizar para acelerar la cicatrización de heridas y quemaduras de la piel con buenos resultados (Kephart, 1955).

Krasnikova (1973) hizo un estudio detallado de la actividad mitótica inducida por clorofilina en heridas de la piel de ratones sin pelo. Observó un incremento en la división celular en el epitelio de la herida y zonas vecinas. A los 21 días del tratamiento, el índice mitótico fue 5 veces mayor que en el epitelio intacto. Bajo la influencia de la clorofilina, la curación de la herida procedió de manera usual pero más rápidamente. Es decir que no se detectaron diferencias estructurales en el tejido.

Otra propiedad interesante de la clorofilina es su capacidad para interferir con el desarrollo de algunos microorganismos como ciertos hongos filamentosos (El-Nakeeb y Yousef, 1974).

Se ha establecido que la administración continua intravenosa de clorofila-a en pacientes con pancreatitis crónica ayuda a disminuir el dolor abdominal, la náusea y el vómito y los niveles de amilasa en orina se reducen hasta los valores normales. Algunos medicamentos que inhiben la actividad de la tripsina se han usado ampliamente en el tratamiento de la pancreatitis. La clorofila-a como tal no tiene efecto inhibitorio de la tripsina, sin embargo se ha probado que la clorofilina *in vitro* si inhibe la actividad de la tripsina y de algunas otras proteasas. Dado que la clorofilina surge como el resultado de cambios químicos en la molécula de clorofila, se asume que esta reacción se da en el organismo y que contribuye notablemente en el tratamiento clínico de pancreatitis. Dado que la clorofilina no es antigénica, tiene ventajas como agente terapéutico en relación a otros medicamentos (Oda y col., 1971).

Se ha descrito que la clorofilina cupri-sódica (Cu-Cl-Na) tiene acción protectora contra la peroxidación lipídica de microsomas y mitocondrias del hígado de rata. La peroxidación lipídica provoca la destrucción de biomembranas y deprime sus funciones. Esta misma reacción está involucrada en ciertos procesos degenerativos como el envejecimiento, la arteriosclerosis, el daño hepático, entre otros. Se sugiere que la clorofilina se absorbe en el hígado y se distribuye en forma activa entre mitocondrias, microsomas y fracciones solubles, funcionando como antioxidante y confiriendo protección contra los procesos de desintegración

peroxidante (Sato y col., 1984).

La clorofilina se ha utilizado ampliamente en el tratamiento y cuidado de pacientes geriátricos, dadas sus propiedades desodorantes y laxantes (Young y Beregi, 1980).

Es importante resaltar que en la mayoría de los trabajos mencionados no se detectaron efectos tóxicos inducidos por la clorofilina.

Posteriormente se comenzaron a observar y estudiar las propiedades antimutagénicas y radioprotectoras de la clorofilina.

2.4.3.3. Efecto antimutagénico y radioprotector de la clorofilina

Se ha demostrado que la clorofila es el compuesto responsable de la mayor actividad antimutagénica de ciertos extractos vegetales (Lai y col., 1980; Kimm y col., 1982).

La clorofilina, siendo un derivado estable de la clorofila, de fácil manejo y de baja o nula toxicidad, posee una capacidad antimutagénica efectiva contra gran variedad de compuestos mutágenos y carcinógenos tanto de acción directa como indirecta (Ong y col., 1986).

Incluso se ha reportado que la clorofilina puede ser más eficiente que los extractos de clorofila para inhibir la actividad mutagénica de ciertos compuestos. Resulta importante mencionar que la viabilidad celular no se ha visto afectada por clorofila ni por clorofilina (Lai, 1979; Lai y col., 1980). Se ha propuesto que ambos pigmentos podrían usarse en la prevención de oncogénesis (Kimm y col., 1982).

Arimoto y col. (1980a;b) y Katoh y col. (1983) detectaron que algunos pigmentos biológicos como la hemina, biliverdina y clorofilina inhiben la mutagenicidad inducida por derivados de la pirrólisis de amino ácidos y por algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos en células de mamífero V79 *in vitro*. Dado que la hemina y biliverdina se encuentran en el cuerpo humano y la clorofilina en plantas, se asume que varios sistemas biológicos son protegidos por componentes endógenos contra los riesgos muta-carcinogénicos ambientales.

Al evaluar el efecto de varios compuestos presentes en la dieta sobre la

mutagenicidad inducida por el benzo(a)pireno (B(a)P) y el humo concentrado del cigarro en *Salmonella*, Terwel y Van der Hoeven (1985) observaron que la clorofilina es una de las sustancias que reduce considerablemente la inducción de mutaciones por dichos compuestos. Con experimentos semejantes, Ong y col. (1986; 1989) han determinado que la clorofilina inhibe eficientemente las mutaciones inducidas por una variedad de mutágenos conocidos como el B(a)P, 3-metilcolantreno, aflatoxinas, 2-aminoantraceno y MNNG; y de agentes químicos potencialmente peligrosos que se encuentran en el ambiente, como el humo del cigarro, emisiones de motores diesel, polvo de carbón y en mezclas complejas de la dieta como carne frita, jugo de uva, pimienta negra, vino tinto, etc. Se ha observado que la clorofilina es un antimutágeno más efectivo que el retinol, el β -caroteno y las vitaminas C y E.

Utilizando el ensayo de transformación morfológica en células de mamífero (Balb/3T3), los mismos autores demostraron que la clorofilina inhibe la actividad transformante de los mutágenos mencionados anteriormente. Este efecto es dosis-dependiente y no se debe a inhibición del crecimiento de las células transformantes (Ong y col., 1994).

Hadnagy y Seemayer en 1988, reportaron que la clorofilina inhibe significativamente la frecuencia de ICH inducida por partículas contaminantes del ambiente en linfocitos humanos *in vitro*.

La mayoría de los experimentos que se han diseñado para evaluar las propiedades antimutagénicas de la clorofilina se han realizado *in vitro* con diferentes sistemas. Sin embargo, también se han hecho algunos trabajos en sistemas *in vivo*.

Por medio de la prueba de manchas en la alas de *Drosophila*, se demostró que tanto la clorofila como la clorofilina inhiben las mutaciones somáticas inducidas por Trp-P-2 (una amina heterocíclica mutacarcinogénica que se encuentra en algunos alimentos cocinados y en fluidos corporales de pacientes urémicos) (Negishi y col., 1989). Así mismo, reduce el número y proporción de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo inducidas por dimetil nitrosamina (Rodríguez-Arnaiz y Zimmering, 1989).

Se ha observado que el tratamiento oral con clorofilina reduce la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas por algunos mutágenos en células del epitelio colónico de ratas *in vivo* (Robins y Nelson, 1989).

Esta misma actividad de la clorofilina se evidenció en relación al efecto

clastogénico de algunos carcinógenos en células de la médula ósea de criceto chino. En comparación con el β -caroteno, la clorofilina ha mostrado un efecto anticlastogénico más potente contra la inducción de todo tipo de aberraciones cromosómicas (Renner, 1985; 1990).

Recientemente Dashwood y col. (1991) reportaron que la clorofilina tuvo una potente actividad antimutagénica contra la aflatoxina B1 y 2 aminos heterocíclicas activadas por el sistema de metabolización del hígado de trucha en *Salmonella*. De igual manera, estos autores han diseñado varios experimentos para estudiar algunas propiedades antimutagénicas de la clorofilina evaluando el metabolismo, farmacocinética y cinética de unión de algunos mutágenos con el ADN de diferentes células en presencia y ausencia de este pigmento tanto *in vivo* como *in vitro*. Los resultados obtenidos han sido la base para explicar varios aspectos relacionados con el mecanismo de acción de la clorofilina (Dashwood y col., 1991; Dashwood, 1992; Dashwood y Guo, 1992; Dashwood y Liew, 1992).

Dada la actividad antimutagénica y anticarcinogénica de la clorofilina, por sus características químicas como antioxidante y captadora de radicales libres, por su alta solubilidad y baja toxicidad, se comenzó a especular sobre la posibilidad de que también tuviera propiedades radioprotectoras.

Hasta el momento, se ha estudiado poco con respecto a la capacidad de la clorofilina para atenuar o inhibir los efectos genotóxicos de la radiación ionizante.

Con los experimentos realizados por Zimmering y col. (1990) se observó que el tratamiento con clorofilina previo a la exposición de las larvas de *Drosophila* a radiación gamma, redujo a un 50% la frecuencia de manchas sencillas tanto grandes como pequeñas e inhibió 100% la inducción de manchas gemelas en las alas de los individuos adultos. Estos resultados muestran la capacidad de la clorofilina para reducir la frecuencia de mutaciones somáticas originadas por radiación gamma, actuando como radioprotector. En dicho trabajo no hay evidencia directa para eliminar la posibilidad de que la reducción encontrada haya sido el resultado de la inhibición del crecimiento celular provocado por clorofilina. Sin embargo, ese proceso debería ser altamente selectivo y existen datos en relación al efecto nulo de la clorofilina sobre el crecimiento celular (Ong, 1986; 1994). Además las dosis usadas del compuesto no presentaron efectos tóxicos.

También se ha notado que las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*)

expuestas a radiación X en presencia de clorofilina tienen un mayor porcentaje de supervivencia y menor frecuencia de mutaciones (Bronzetti y col., 1990).

Recientemente, Morales-Ramírez y García-Rodríguez (1994) realizaron un trabajo para determinar si la clorofilina tiene propiedades radioprotectoras respecto a los cambios causados en la frecuencia de ICH, índice mitótico (IM) y tiempo generacional promedio (TGP) por radiación gamma en células de la médula ósea de ratón *in vivo*. Se observó que efectivamente el tratamiento con clorofilina disminuye en forma dependiente de la dosis la frecuencia de ICH inducida por radiación. Igualmente, este tratamiento evita la reducción en el IM que causa la radiación. También encontraron que la clorofilina *per se* acorta el TGP, pero no tiene efecto sobre la frecuencia basal de ICH ni sobre el IM. Se sugirió que el mecanismo de acción de la clorofilina es por medio de la captura de radicales libres.

El conjunto de resultados son congruentes a favor de la actividad antimutagénica y radioprotectora de la clorofilina y apoyan la posibilidad de su uso para reducir los efectos de la exposición de poblaciones humanas a ciertos agentes genotóxicos.

2.4.3.4. Mecanismos de acción de la clorofilina como antimutágeno y radioprotector

Con base en los resultados que se han obtenido respecto a las propiedades antimutagénicas y radioprotectoras de la clorofilina, se ha tratado de elucidar cual es el mecanismo mediante el que este compuesto puede ejercer su acción.

Al parecer el mecanismo es complejo y probablemente la clorofilina actúa de diferentes maneras dependiendo del agente mutagénico, sistema de prueba, dosis, ensayo *in vivo* o *in vitro*, etc. Se han propuesto varias hipótesis en relación a este aspecto.

1) Efecto sobre Enzimas. Kimm y col. (1982) y Terwell y van der Hoeven (1985) detectaron que la clorofilina tiene un efecto mayor contra mutágenos indirectos que contra los de acción directa, usando la prueba de Ames con

Salmonella y la fracción S9. Ellos sugirieron que la clorofilina interviene inhibiendo la función de las enzimas del sistema de activación metabólica. Aunque no se descartó la posibilidad de que pueda actuar directamente sobre el mutágeno para inactivarlo químicamente. Ambos mecanismos ya se habían postulado anteriormente para compuestos con estructura química semejante, como la porfirina, la hemina y sus metabolitos biliverdina y bilirrubina (Arimoto y col., 1980a; b).

En otros trabajos realizados *in vivo* se ha reportado que la clorofilina afecta diferentes enzimas intra y extracelulares. La administración intraperitoneal de clorofilina en ratas evita efectivamente el deterioro de las funciones microsómicas hepáticas que resulta de la peroxidación lipídica inducida por el ácido ascórbico. Se consideró que este efecto es un reflejo de la actividad antioxidante de la clorofilina (Sato y col. 1984). Además, la clorofilina disminuye e inhibe la actividad de las enzimas hepáticas microsómicas que forman parte del sistema de metabolización de drogas o genotoxinas. Entre estas enzimas se encuentran la aminopirina N-demetilasa, anilina-hidrogenasa y NADPH-citocromo c-reductasa (Imai y col., 1986).

También se sabe que la clorofilina inhibe la actividad de varias proteasas incluyendo la tripsina, quimiotripsina, pepsina y elastasa (Oda y col., 1971).

2) Captura de Radicales Libres. Por otro lado, se ha propuesto que la clorofilina actúa atrapando o capturando radicales libres que pueden ser en gran parte responsables de los efectos genotóxicos de varios agentes (Kimm y col., 1982; Sato y col., 1984; Ong, 1986; 1989; Robins y Nelson, 1989; Warner, y col., 1991).

El efecto antioxidante de la clorofilina durante la peroxidación de lípidos *in vivo* probablemente se deba a su acción como atrapador de radicales libres (Sato y col., 1984).

Para elucidar el mecanismo mediante el cual la clorofilina reduce la inducción de ICH por contaminantes ambientales en linfocitos, Hadnagy y Seemayer (1988), hicieron algunos experimentos midiendo la producción de quimioluminiscencia en fagocitos polimorfonucleares (PMN). Observaron que la quimioluminiscencia causada por forbol-13-acetato en leucocitos PMN, se

reduce de manera dependiente de la dosis de clorofilina. Estos resultados indican que la clorofilina inactiva radicales oxígeno, como O_2 , H_2O_2 y OH^\cdot , que deben estar involucrados en la formación de ICH, rupturas en las cadenas del ADN, mutaciones y juegan un papel importante en la iniciación y promoción de tumores (Troll y Weisner, 1985).

Bronzetti y col. (1990) detectaron que las levaduras expuestas a rayos X en presencia de clorofilina, mostraron mayor porcentaje de supervivencia y menor frecuencia de mutación puntual reversa, propusieron que este compuesto actúa como capturador de radicales libres, apoyando las hipótesis anteriores.

Este es el mecanismo que se ha sugerido para explicar las propiedades radioprotectoras de la clorofilina en células de la médula ósea de ratón (Morales-Ramírez y García-Rodríguez, 1994), al igual que para otros radioprotectores (Mendiola-Cruz y Morales-Ramírez, 1989).

3) Formación de Complejos. Dada la estructura química de la molécula de clorofilina, se considera que la facilidad de ésta para formar complejos por la unión de mutágenos a su anillo tetrapirrólico, explica en parte el mecanismo del proceso antimutagénico (Newmark, 1987). Se ha explicado que la clorofilina ejerce su efecto antimutagénico bloqueando o capturando al mutágeno, en su configuración metabólicamente activa o inactiva, por medio de una reacción química nucleofílica dando origen a un producto inocuo (Morita y col., 1978; Arimoto y col., 1980a; b; Negishi y col., 1989; Bronzetti y col., 1990).

Negishi y col. (1989) detectaron por espectrofotometría que el mutágeno Trp-p-2 y la clorofilina pueden interactuar en un medio acuoso originando un complejo.

Dashwood y col. (1991; 1992) han realizado varios experimentos para ahondar en el mecanismo de acción de la clorofilina. Al analizar sus propiedades antimutagénicas, utilizando como índice la unión del mutágeno aflatoxina-B1 (AFB1) con el ADN hepático en trucha arcoiris *in vivo*, estos autores determinaron que dicho enlace disminuye conforme aumenta la dosis de clorofilina administrada conjuntamente con el mutágeno en la dieta. Estos resultados apoyan la idea de que la clorofilina interactúa directamente con el mutágeno reduciendo su distribución al órgano blanco. Se infiere que el sitio de

inhibición es en el tracto digestivo y que la clorofilina puede ser un potente inhibidor de la hepatocarcinogénesis inducida por AFB1 (Dashwood y col., 1991).

Posteriormente, observaron que la co-incubación *in vitro* de clorofilina con IQ (2-amino-3-metilimidazo [4,5-f]-quinolina) atenúa significativamente la unión del mutágeno al ADN. Con la adición de clorofilina al medio la absorbancia de IQ decae en el pico de 264 nm de manera dependiente de la dosis, lo cual da evidencia de la formación de un complejo estable no covalente entre la clorofilina e IQ (Dashwood y Guo, 1992).

También observaron que la tasa del metabolismo de IQ se redujo notablemente en presencia de clorofilina. Esta interferencia en el metabolismo puede darse por inhibición de enzimas de activación o disminuyendo la concentración del sustrato efectivo por interacción directa con IQ formando un complejo molecular. Se sugirió que el mecanismo inhibitor de la clorofilina debe involucrar una interacción IQ-CL que aminora la biodisponibilidad del mutágeno (Dashwood, 1992).

Posteriormente observaron que el tratamiento con clorofilina *in vivo* reduce la cantidad de IQ recuperada en hígado de rata y disminuye la unión IQ-ADN como se había evidenciado anteriormente. Asimismo, se demostró claramente que la clorofilina al 1% en agua de beber aumenta el total de dosis del mutágeno excretado en orina y heces, evitando así su absorción y favoreciendo su eliminación (Dashwood y Liew, 1992).

El conjunto de estos resultados apoyan la hipótesis de que la clorofilina actúa como antimutágeno o molécula interceptora, interactuando directamente con el mutágeno formando complejos y disminuyendo su interacción y distribución en órganos blanco (Dashwood y Guo, 1992; Dashwood y Liew 1992).

2.4.3.5. Toxicidad

Dadas las posibles aplicaciones de la clorofilina como agente terapéutico, antimutagénico y radioprotector se ha considerado de gran importancia determinar los efectos tóxicos colaterales que se pudieran producir.

Desde los primeros estudios, se observó que la administración oral,

intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o subcutánea de clorofilina por varios días, a dosis equivalentes a 1-2 g en conejos, 100 mg en perros y 100-800 mg en humanos, no produjo efectos tóxicos colaterales (Kephart, 1955).

Con algunas pruebas de toxicidad se determinó que la inclusión de 3% de clorofilina en la dieta de las ratas albinas a lo largo de su vida no dió indicios de toxicidad en diversos aspectos. Lo anterior se basó en las siguientes observaciones: 1) La tasa de crecimiento, supervivencia, fertilidad y los factores sanguíneos y urinarios fueron normales. 2) No se detectó patología macro ni microscópica durante la necropsia. 3) No se manifestó toxicidad metálica (por el Cu de la molécula de clorofilina) en hígado, riñón ni bazo y 4) No ocurrió fotosensibilización por aplicación intraperitoneal o local (Harrison y col., 1954).

De estos primeros trabajos a la fecha se ha acumulado bastante información que apoya la inocuidad de la clorofilina.

Se ha observado que el uso de la clorofilina a dosis terapéuticas en pacientes con diferentes padecimientos no tiene consecuencias colaterales. Así por ejemplo, la administración de clorofilina por diferentes vías, a dosis de 100 mg 2 ó 3 veces al día en pacientes geriátricos, 0.35 mg/día en pacientes con pancreatitis, 0.8-1.5 g/día en pacientes hipertensos, 700 mg/día en pacientes anémicos y 100 mg/día en pacientes cancerosos, no produce efectos tóxicos secundarios ni desencadena reacciones antigénicas (Oda y col. 1971, Young y Beregi, 1980).

En estudios de antimutagénesis se ha obtenido evidencia de que la clorofilina no inhibe el crecimiento celular de *Salmonella thyphimurium* en diversos medios (Lai, 1979; Kimm y col., 1982; Ong y col., 1986; 1989; 1994), ni de células Balb/3T3 cultivadas *in vitro* (Ong y col., 1994). Tampoco disminuye la viabilidad de *S. cerevisiae* (Bronzetti y col., 1990); ni induce citotoxicidad en células V79 (Kato y col., 1983), *Drosophila* (Negishi y col., 1989), células del epitelio colónico de ratas (Robins y Nelson, 1989), cultivos de *S. thyphimurium* (Warner y col., 1991) ni en células hepáticas de trucha arcoiris (Dashwood y col., 1991).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL:

El objetivo general de este trabajo de investigación fue estudiar el efecto de la clorofilina sobre la frecuencia de Intercambios en las Cromátidas Hermanas (ICH) inducida por radiación gamma, en espermatogonias de ratón *in vivo* con su ADN sustituido y no sustituido con BrdU.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

3.2.1. Analizar el efecto de la exposición a diferentes dosis de radiación gamma sobre la frecuencia de ICH.

3.2.1.1. Determinar el efecto de la radiación gamma sobre la frecuencia de ICH, antes de la incorporación de BrdU en el ADN.

3.2.1.2. Detectar el efecto de la radiación gamma sobre la frecuencia de ICH, después de la incorporación de BrdU en el ADN.

3.2.2. Analizar el efecto del pretratamiento con clorofilina sobre la frecuencia de ICH inducida por radiación gamma.

3.2.2.1. Determinar el efecto de la clorofilina sobre los daños inducidos por radiación gamma que se manifiesten como ICH en espermatogonias cuyo ADN no se encuentre sustituido con BrdU al ser irradiadas.

3.2.2.2. Detectar el efecto de la clorofilina sobre la inducción de ICH por radiación gamma en espermatogonias radiosensibilizadas mediante la incorporación de BrdU previa a la irradiación.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL:

El objetivo general de este trabajo de investigación fue estudiar el efecto de la clorofilina sobre la frecuencia de Intercambios en las Cromátidas Hermanas (ICH) inducida por radiación gamma, en espermatogonias de ratón *in vivo* con su ADN sustituido y no sustituido con BrdU.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

3.2.1. Analizar el efecto de la exposición a diferentes dosis de radiación gamma sobre la frecuencia de ICH.

3.2.1.1. Determinar el efecto de la radiación gamma sobre la frecuencia de ICH, antes de la incorporación de BrdU en el ADN.

3.2.1.2. Detectar el efecto de la radiación gamma sobre la frecuencia de ICH, después de la incorporación de BrdU en el ADN.

3.2.2. Analizar el efecto del pretratamiento con clorofilina sobre la frecuencia de ICH inducida por radiación gamma.

3.2.2.1. Determinar el efecto de la clorofilina sobre los daños inducidos por radiación gamma que se manifiesten como ICH en espermatogonias cuyo ADN no se encuentre sustituido con BrdU al ser irradiadas.

3.2.2.2. Detectar el efecto de la clorofilina sobre la inducción de ICH por radiación gamma en espermatogonias radiosensibilizadas mediante la incorporación de BrdU previa a la irradiación.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. ANIMALES. En estos experimentos se utilizaron ratones machos de la cepa Balb/c de 2 a 3 meses de edad y de 30 ± 2 g. de peso. Los ratones fueron reproducidos en el bioterio de Radiobiología del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares y mantenidos en jaulas de plástico con cama de aserrín, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y períodos de luz-oscuridad. Fueron alimentados con comprimidos Purina Chow para roedores y agua *ad libitum*.

4.2. PROTOCOLOS. Se usó un grupo testigo por cada grupo experimental, con un mínimo de 3 ratones en cada uno. En algunas ocasiones los experimentos se realizaron por duplicado.

Al grupo testigo se le administró bromodesoxiuridina (BrdU) al tiempo cero, colchicina a las 53 h y se sacrificó por dislocación cervical a las 56 h para la cosecha de células.

Para analizar el efecto de la exposición a radiación gamma sobre la frecuencia de ICH en espermatogonias antes o después de la incorporación de BrdU, se incluyeron además del testigo no tratado, grupos expuestos a diferentes dosis de radiación gamma, 1 h antes o 26 h después de la inyección de BrdU, dependiendo del protocolo (Figura 4.1).

Para estudiar la capacidad radioprotectora de la clorofilina tanto en las espermatogonias irradiadas antes de la incorporación de BrdU como después de la misma, se incluyó además del testigo, un grupo tratado solo con clorofilina, otro con radiación y los grupos experimentales a los que se les administró clorofilina por lo menos 4 h antes de la irradiación. Estos ensayos se realizaron irradiando antes o después de la incorporación de BrdU por un ciclo de división (Figuras 4.2 y 4.3).

Posteriormente los diferentes grupos experimentales fueron tratados de la misma forma que el grupo testigo.

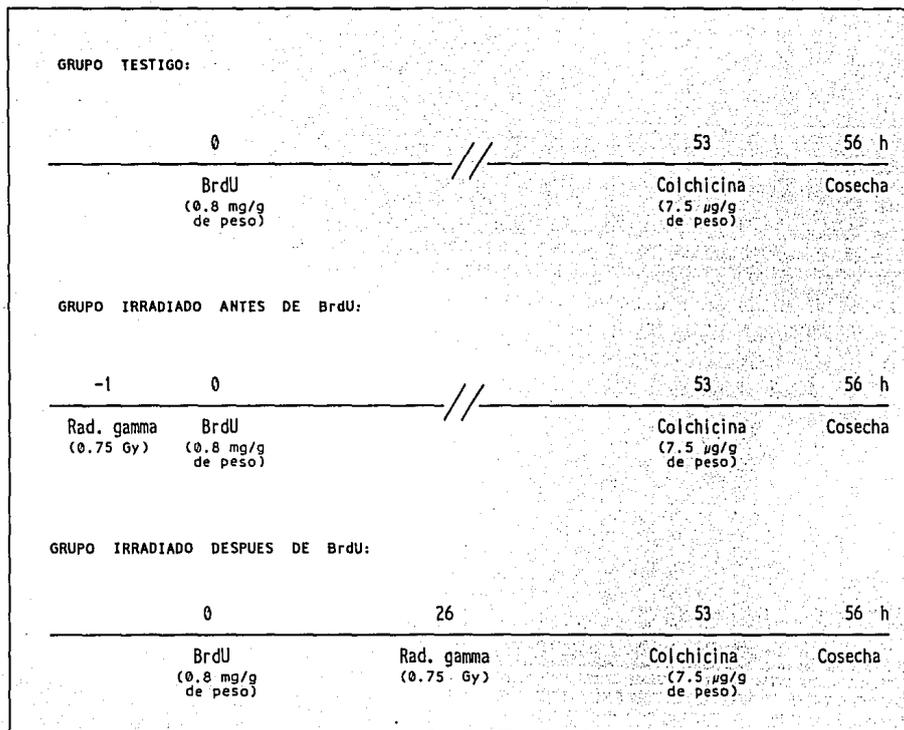


Figura 4.1. Protocolos para la evaluación del efecto de la radiación gamma sobre la frecuencia de ICH en espermatogonias de ratones Balb/c.

GRUPO TESTIGO:

0	53	56 h
BrdU (0.8 mg/g de peso)	Colchicina (7.5 µg/g de peso)	Cosecha

GRUPO IRRADIADO ANTES DE BrdU:

-1	0	53	56 h
Rad. gamma (0.75 Gy)	BrdU (0.8 mg/g de peso)	Colchicina (7.5 µg/g de peso)	Cosecha

GRUPO TRATADO CON CLOROFILINA ANTES DE BrdU:

-4	0	53	56 h
Clorofilina (100/200 µg/g de peso)	BrdU (0.8 mg/g de peso)	Colchicina (7.5 µg/g de peso)	Cosecha

GRUPO TRATADO CON CLOROFILINA E IRRADIADO ANTES DE BrdU:

-4	-1	0	53	56 h
Clorofilina (100/200 µg/g de peso)	Rad. gamma (0.75 Gy)	BrdU (0.8 mg/g de peso)	Colchicina (7.5 µg/g de peso)	Cosecha

Figura 4.2. Protocolos para la evaluación de la clorofilina como radioprotector en espermatozonias de ratones Balb/c irradiados antes de la incorporación de BrdU al ADN.

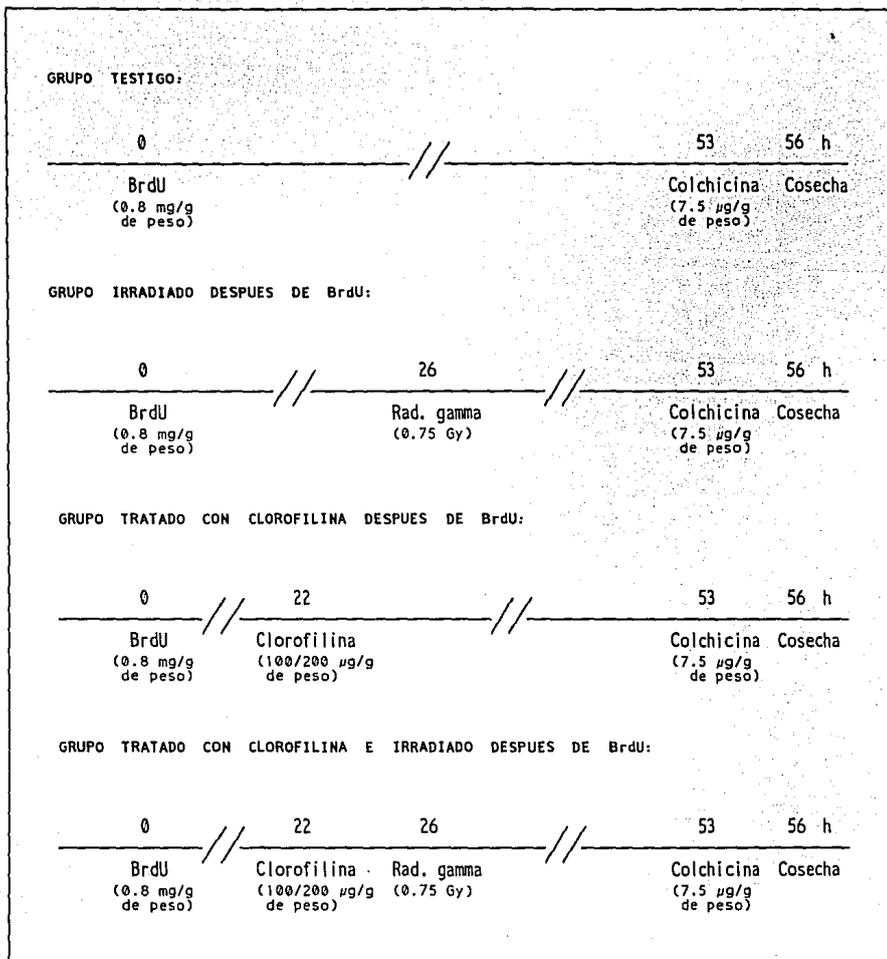


Figura 4.3. Protocolos para la evaluación de la clorofilina como radioprotector en espermatogonias de ratones Ba1b/c irradiados después de la incorporación de BrdU al ADN.

4.3. ADMINISTRACION DE BrdU. Los ratones fueron anestesiados con éter e inyectados intraperitonealmente (ip) con una suspensión de BrdU, previamente adsorbida a carbón activado de entre 250-300 mallas (Morales-Ramírez y col., 1984b), a una dosis de 0.8 mg de BrdU/g de peso, la cual se determinó en ensayos preliminares como la óptima para obtener una diferenciación adecuada (Morales-Ramírez y col., 1989).

4.4. IRRADIACION. La irradiación de los ratones se efectuó en una fuente Vick Rad (^{60}Co) que presentaba una velocidad de dosis de 2.6 Gy/min aproximadamente. La dosis de radiación recibida fue confirmada mediante dosímetros termoluminiscentes TLD-200 (4 cristales/dosímetro) que se colcaron en la región genital durante la irradiación.

Las dosis de radiación a que se expusieron los ratones antes o después de la incorporación de BrdU se seleccionaron considerando datos obtenidos en médula ósea (Morales-Ramírez y col., 1983; 1984a). De la dosis inicial aplicada se calculó el doble para el siguiente experimento y así sucesivamente. Sin embargo, no se pudieron aplicar dosis mayores a 1.0 Gy debido al alto porcentaje de muerte celular que dificultaba el análisis de ICH. Las dosis de exposición en ambos protocolos son similares y las diferencias entre ellas se deben a variaciones propias de la dosimetría y del dispositivo para irradiar.

Para la determinación del efecto de la clorofilina sobre la inducción de ICH antes o después de la incorporación de BrdU, se seleccionó la dosis de 0.75 Gy que inducía incrementos significativos en la frecuencia de ICH sin afectar considerablemente el índice mitótico.

4.5. ADMINISTRACION DE CLOROFILINA. La clorofilina se administró en solución acuosa por vía intraperitoneal a dosis de 100 ó 200 $\mu\text{g/g}$ de peso. Estas se eligieron con base en los resultados logrados en médula ósea (Morales-Ramírez y García-Rodríguez, 1994).

4.6. ADMINISTRACION DE COLCHICINA. La colchicina se administró subcutáneamente en solución acuosa a una dosis de 7.5 $\mu\text{g/g}$ de peso 3 h antes de la cosecha de células. En experimentos anteriores se demostró que esta concentración es la óptima para obtener buena cantidad de espermatozonias en metafase (Morales-Ramírez y col., 1989; Cruz-Vallejo y col., 1991).

4.7. OBTENCION DE ESPERMATOGONIAS Y PREPARACION DE LAMINILLAS.

Básicamente se utilizó el método de Yamamoto y Kikuchi (1978) con algunas modificaciones (Figura 4.4). Una vez sacrificados los ratones por dislocación cervical, se extrajeron ambos testículos, se les quitó la túnica albugínea y se cortaron los túbulos seminíferos en fragmentos pequeños, éstos se lavaron varias veces con PBS para eliminar los espermatozoides y células meióticas. Posteriormente se incubó el tejido en 20 ml de una solución de tripsina al 0.1% en solución libre de calcio/magnesio y ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) a 37°C con 30 ciclos de agitación por minuto durante 5 min. Se colectó el tejido disgregado, eliminando los fragmentos que no se separaron y se centrifugó 8 min a 2000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó varias veces con una solución de EDTA, se centrifugó nuevamente y el paquete celular se resuspendió en 10 ml de KCl 0.075 M y se mantuvo en incubación a 37°C durante 5 min dejando sedimentar. El sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 500 rpm 5 min para obtener el paquete celular, el cual se resuspendió en 0.5 ml de sobrenadante y se fijó durante 3 periodos de 5 min c/u con 8 ml de fijador Carnoy (ácido acético - metanol, 1:3). La suspensión celular en fijador se goteó sobre portaobjetos limpios colocados sobre una placa de hielo y se flamearon al mechero.

4.8. TINCION DIFERENCIAL DE LAS CROMATIDAS HERMANAS. La tinción diferencial de las cromátidas hermanas se llevó a cabo mediante el método fluorescencia más Giemsa (FPG) de Perry y Wolf (1974) modificado por Goto y col. (1975). Las laminillas se cubrieron con 6 gotas de una solución de Hoechst 33258 (5 µg/ml) en amortiguador fosfato-citrato (pH 7.0), se les colocó un cubreobjetos y se mantuvieron en la oscuridad 10 min. Posteriormente se colocaron en un caja de petri con amortiguador fosfato-citrato de sodio, bajo una lámpara de luz negra durante 60-90 min. Se lavaron con agua destilada y se incubaron en una solución de cloruro de sodio-citrato de sodio (0.03 M) a 60°C en baño maría durante 5 min. Finalmente se lavaron con agua destilada a 60°C y se tñieron con Giemsa al 10% en amortiguador fosfatos durante 15-20 min.

4.9. ANALISIS. Para determinar la frecuencia de ICH se analizaron 30 metafases bien diferenciadas por ratón.

4.10. ESTADISTICA. Para el análisis de significatividad respecto al grupo testigo se usó la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples con muestras de diferentes tamaños (Cheung y Holland, 1992), y la t de student para comparar las diferencias entre los grupos

irradiados y los pretratados con clorofilina, utilizando un programa para computadora personal desarrollado por Camps y col. (1993). Se consideraron diferencias significativas con una $\alpha = 0.01$ (Dunnett) y $p < 0.01$ (t student).

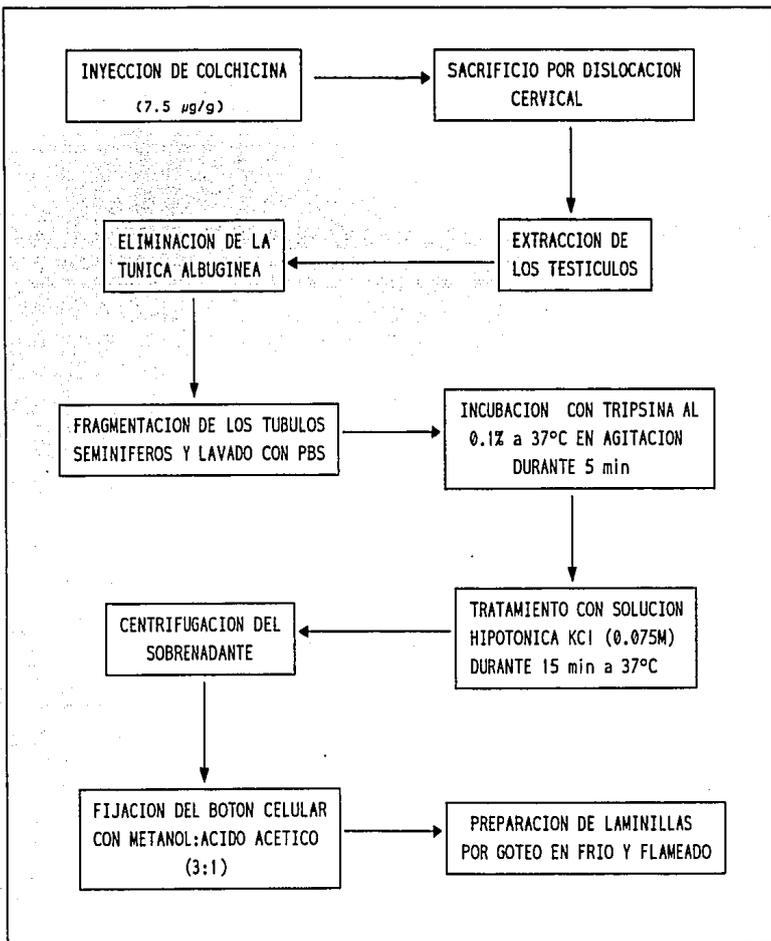


Figura 4.4. Método de Yamamoto y Kikuchi (1978) para la obtención de espermatogonias en metafase

5. RESULTADOS

5.1 EFECTO DE LA RADIACION GAMMA SOBRE LA FRECUENCIA DE ICH EN ESPERMATOGONIAS ANTES DE LA INCORPORACION DE BrdU.

En la Tabla 5.1 se puede apreciar que en los tres grupos de ratones expuestos a diferentes dosis de radiación gamma antes de la incorporación de BrdU, se produjo un incremento en la frecuencia de ICH con relación al testigo. La diferencia entre la frecuencia basal y la inducida por radiación fué estadísticamente significativa con la prueba de Dunnett ($\alpha = 0.01$) tanto con la dosis mayor equivalente a 1.0 Gy, como con las demás dosis de 0.49 y 0.27 Gy.

TABLA 5.1

RADIACION γ (Gy)	ICH/CEL. $\bar{x} \pm D.E.$	INCREMENTO Δ	Δ ICH/Gy	N
0.00	1.4 \pm 0.1	0.0	0.0	11
0.27	1.9 \pm 0.2 *	0.5	1.8	4
0.49	2.0 \pm 0.2 *	0.6	1.2	4
1.00	2.4 \pm 0.2 *	1.0	1.0	3

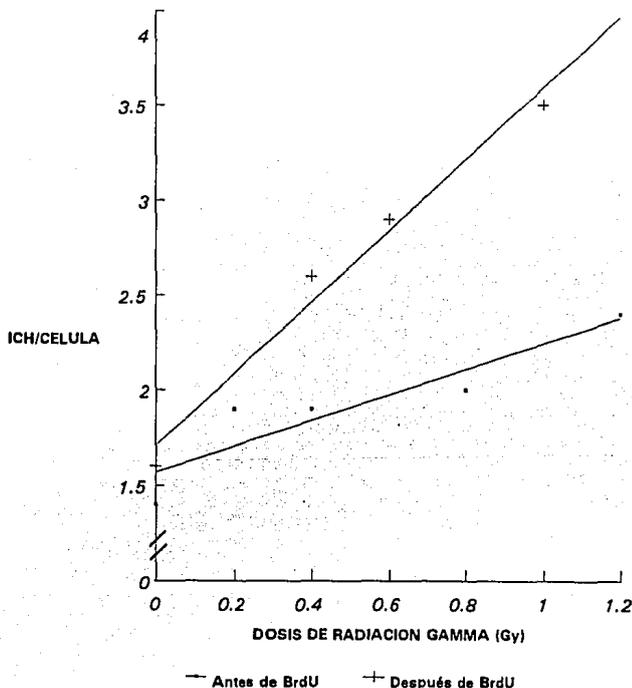
Incremento (Δ) = ICH/célula (experimental) - ICH/célula (testigo)

Δ ICH/Gy = Eficiencia de Inducción. N = Número de ratones por grupo, 30 células analizadas por ratón.

* Diferencia significativa respecto al testigo ($\alpha = 0.01$), Prueba de Dunnett para comparaciones múltiples con grupos de diferentes tamaños.

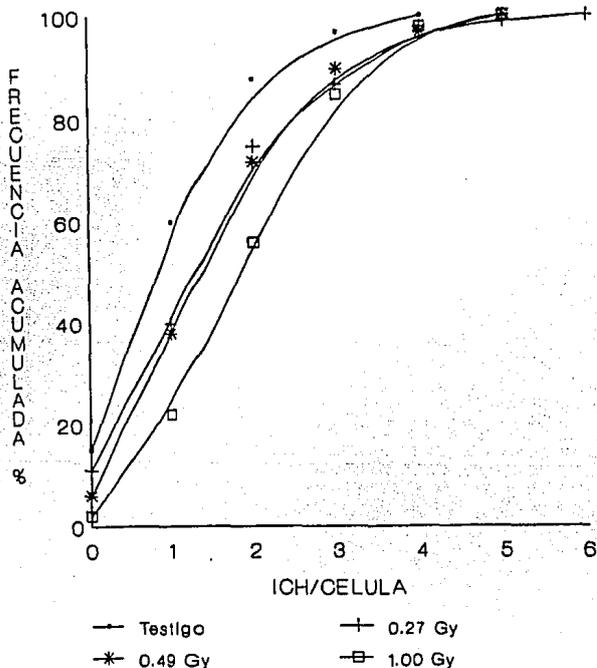
En los grupos irradiados con 0.27, 0.49 ó 1.0 Gy se observaron incrementos de 0.5, 0.6 y 1.0 ICH/célula respectivamente. La eficiencia de inducción en cada caso fue de 1.8, 1.2 y 1.0 ICH/Gy

Estos resultados muestran que la frecuencia de ICH en espermatogonias aumenta en relación a la dosis de radiación. En la Gráfica 5.1 se aprecia la curva dosis respuesta cuya relación es descrita por la ecuación lineal: $y = 0.99x + 1.47$, ajustada por mínimos cuadrados con un coeficiente de correlación $r = 0.93$ según el método de Venega-Carrillo (1989) usando un programa de computación desarrollado por Camps y col. (1993). No obstante que el coeficiente de correlación es aceptable, se observa cierta tendencia de disminución en la eficiencia de inducción conforme se eleva la dosis.



Gráfica 5.1. Inducción de ICH en espermatogonias por exposición a diferentes dosis de radiación gamma in vivo antes o después de la incorporación de BrdU al ADN.

Analizando en la Gráfica 5.2 la respuesta de las poblaciones celulares irradiadas con diferentes dosis respecto al número de ICH/célula, se puede apreciar que las curvas de los grupos irradiados se desplazan hacia valores más altos de ICH con respecto al testigo. Así, el 45% de la población celular testigo presenta frecuencias mayores a 1.0 ICH/célula, mientras que el porcentaje de células que tiene esta misma frecuencia en los grupos irradiados con 0.27, 0.49 ó 1.0 Gy es de 60, 63 y 76% respectivamente. También se observa que el valor máximo de ICH/célula en el grupo testigo fué de 4.0, mientras que en los irradiados algunas células muestran hasta 5.0 ó 6.0 ICH.



Gráfica 5.2. Frecuencia acumulada de espermatogonias respecto al número de ICH inducidos por radiación gamma antes de la incorporación de BrdU al ADN.

5.2. EFECTO DE LA RADIACION GAMMA SOBRE LA FRECUENCIA DE ICH EN ESPERMATOGONIAS DESPUES DE LA INCORPORACION DE BrdU.

En la Tabla 5.2 se puede observar que la frecuencia basal obtenida de 1.6 ICH/célula es prácticamente igual a la del protocolo anterior. En los grupos irradiados se determinaron incrementos en la frecuencia de ICH con relación al control que van desde 0.3 hasta 1.9 ICH/célula, dependiendo de la dosis de radiación.

TABLA 5.2

RADIACION γ (Gy)	ICH/CEL. $\bar{x} \pm D.E.$	INCREMENTO Δ	Δ ICH/Gy	N
0.00	1.6 \pm 0.2	0.0	0.0	19
0.15	1.9 \pm 0.3	0.3	2.0	6
0.27	2.6 \pm 0.5 *	1.0	3.7	4
0.41	2.9 \pm 0.3 *	1.3	3.2	8
0.83	3.5 \pm 0.7 *	1.9	2.3	4

Incremento (Δ) = ICH/célula (experimental) - ICH/célula (testigo).

Δ ICH/Gy = Eficiencia de Inducción.

N = Número de ratones por grupo, 30 células analizadas por ratón.

* Diferencia significativa respecto al testigo ($\alpha = 0.01$), Prueba de Dunnett para comparaciones múltiples con grupos de diferentes tamaños.

En el grupo irradiado con 0.15 Gy el aumento es ligero y la diferencia respecto a la frecuencia basal es significativa con la prueba de Dunnett. La eficiencia de inducción en este grupo fue de 2.0 ICH/Gy. La dosis de 0.27 Gy causó una elevación de 1.0 ICH/célula con referencia al testigo, la cual resultó ser estadísticamente significativa con una $\alpha = 0.01$. En este grupo se observó una eficiencia de inducción de 3.7 ICH/Gy que representó la mayor eficiencia alcanzada dentro de los grupos irradiados.

En los siguientes grupos irradiados con 0.41 ó 0.83 Gy se encontraron frecuencias de 2.9 y 3.5 ICH/célula respectivamente, que representan incrementos de 1.3 y 1.9 ICH en relación a la frecuencia basal. Las eficiencias de inducción en estos grupos fueron de 3.2 y 2.3 ICH/Gy.

Al comparar estos resultados con los obtenidos irradiando antes de la incorporación de BrdU en la Gráfica 5.1, resulta evidente que la frecuencia de ICH radioinducida fue mayor cuando el ADN se encontraba sustituido con BrdU. En esta figura comparativa también se puede estimar que al igual que en el protocolo anterior la respuesta es lineal. En este caso la relación es descrita por la ecuación: $y = 2.5 x + 1.65$ con un coeficiente de correlación $r = 0.92$. Sin embargo también con este protocolo se observa cierta tendencia de disminución en la eficiencia de inducción conforme aumenta la dosis.

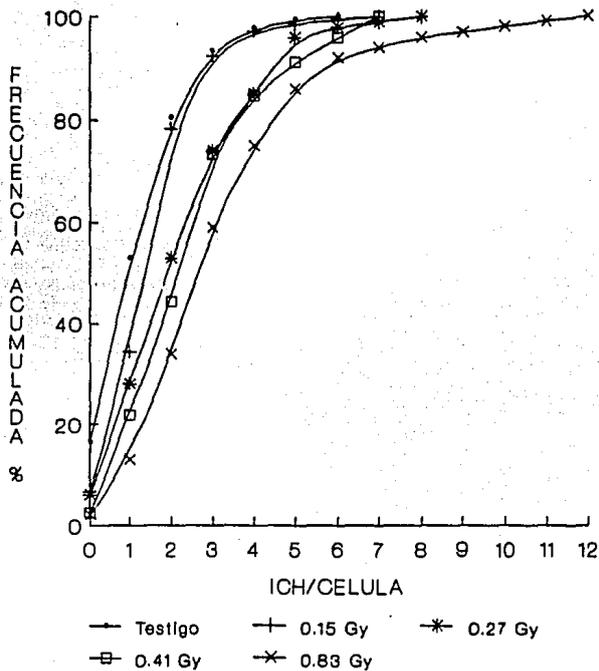
Del análisis de poblaciones celulares expuestas a las distintas dosis de radiación gamma, graficando el porcentaje de la frecuencia acumulada de células contra el número de ICH/célula (Gráfica 5.3), se aprecia que las curvas de los grupos irradiados se desplazan hacia frecuencias mayores de ICH/célula en relación al testigo conforme aumenta la dosis de radiación. En este protocolo se observaron células hasta con 12.0 ICH, mientras que en las células expuestas antes de la incorporación de BrdU, el valor máximo fue de 6.0 ICH.

El 50% de la población celular testigo presentó una frecuencia igual o mayor a 1.0 ICH/célula y en los grupos irradiados este porcentaje de la población mostró frecuencias que van desde 1.3 hasta 2.7 ICH/célula.

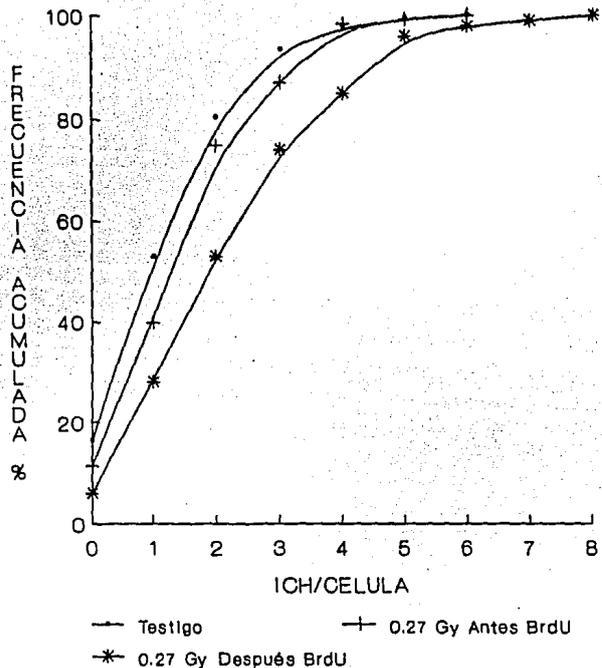
En la Gráfica 5.4 se compara la respuesta de las poblaciones celulares expuestas a una misma dosis de radiación (0.27 Gy) antes o después de la incorporación de BrdU.

Es evidente que menos del 20% de la población celular testigo tiene 2.0 o más ICH/célula. En el grupo irradiado antes de la incorporación de BrdU solo el 25% de la población celular presenta frecuencias de ICH mayores a 2.0, mientras que en el grupo irradiado con su ADN sustituido con BrdU el 50% de la población celular muestra frecuencias de 2.0 o más ICH/célula.

El valor máximo de ICH obtenido en las células irradiadas con 0.27 Gy antes de la administración de BrdU fue de 6.0 ICH/célula, mientras que en el grupo irradiado con la misma dosis después de la incorporación de BrdU se observaron células hasta con 8.0 ICH.



Gráfica 5.3. Frecuencia acumulada de espermatogonias respecto al número de ICH inducidos por radiación gamma después de la incorporación de BrdU al ADN.



Gráfica 5.4. Comparación de la frecuencia acumulada de espermatogonias respecto al número de ICH inducidos por radiación gamma antes o después de la incorporación de BrdU al ADN.

5.3. EFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE LA INDUCCION DE ICH POR RADIACION GAMMA ANTES DE LA INCORPORACION DE BrdU.

En la Tabla 5.3 se pueden observar los resultados obtenidos en el grupo testigo, en los grupos irradiados con 0.75 Gy antes de la incorporación de BrdU, en los grupos tratados con 100 o 200 µg de clorofilina/ g de peso y en los grupos experimentales tratados con las mismas dosis de clorofilina antes de la irradiación.

La frecuencia basal fue igual a las obtenidas anteriormente. La clorofilina *per se* no indujo incrementos en la frecuencia de ICH con ninguna dosis. La exposición a 0.75 Gy de radiación gamma produjo un aumento estadísticamente significativo ($\alpha = 0.01$) en la frecuencia de ICH respecto al testigo. El incremento obtenido fué de 0.9 ICH/célula y la tasa de inducción equivalente a 1.2 ICH/Gy.

TABLA 5.3

CLOROFILINA (µg/g)	RADIACION γ (Gy)	ICH/CEL. $\bar{x} \pm D.E.$	INCREMENTO Δ	Δ ICH/Gy	N
0.0	0.00	1.5 ± 0.1	0.0	0.0	10
100.0	0.00	1.5 ± 0.3	0.0	0.0	4
200.0	0.00	1.7 ± 0.2	0.2	0.0	7
0.0	0.75	2.4 ± 0.3 *	0.9	1.2	10
100.0	0.75	1.9 ± 0.2 ⁺ *	0.4	0.5	10
200.0	0.75	1.5 ± 0.2 ⁺	0.0	0.0	9

Incremento (Δ) = ICH/célula (experimental) - ICH/célula (testigo).

Δ ICH/Gy = Eficiencia de Inducción.

N = Número de ratones por grupo, 30 células analizadas por ratón.

* Diferencia significativa respecto al testigo ($\alpha = 0.01$), Prueba de Dunnett para comparaciones múltiples con muestras de diferente tamaño.

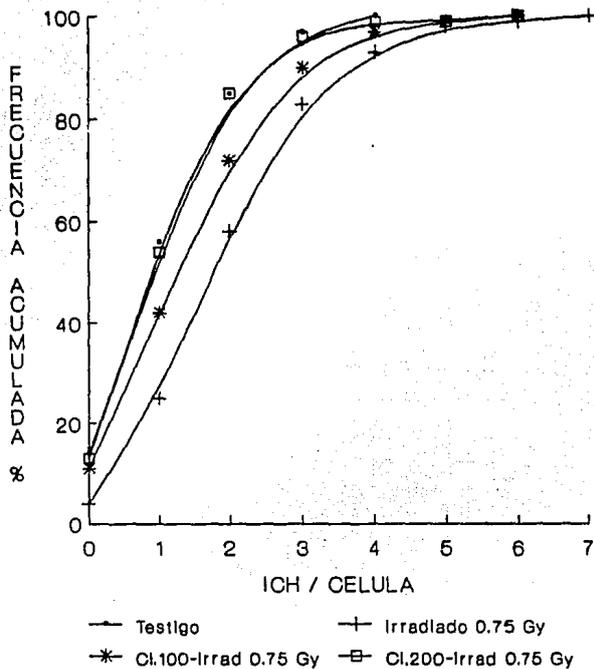
+ Diferencia significativa respecto al irradiado ($p < 0.01$), Prueba t de Student.

Asimismo, se puede observar que en el grupo tratado con 100µg de clorofilina/g de peso previo a la irradiación con 0.75 Gy, la frecuencia inducida disminuyó de 2.4 a 1.9 ICH/célula siendo significativa la diferencia con una $p < 0.01$ (t de Student) y el incremento detectado respecto al testigo bajó de 0.9 a 0.4 ICH/célula. De igual forma, la tasa de inducción disminuyó de 1.2 a 0.5 ICH/Gy. No obstante, la diferencia entre la frecuencia de ICH de este grupo y la basal resultó significativa con una $\alpha = 0.01$ (Dunnett).

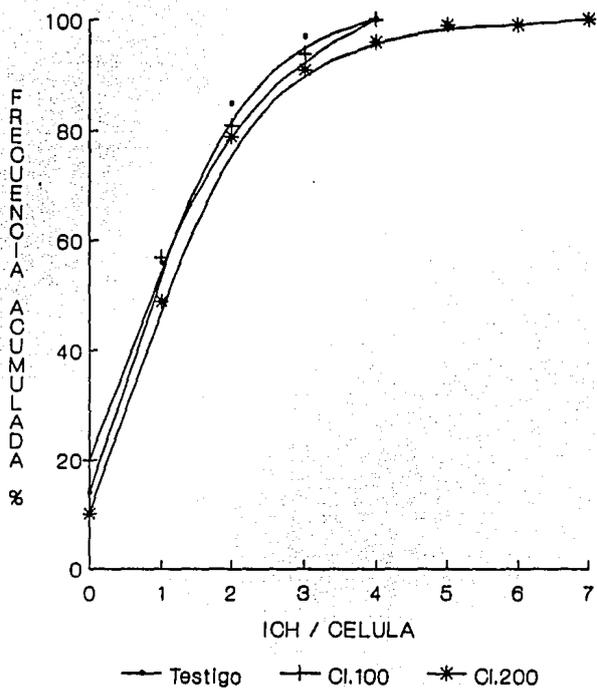
Al duplicar la dosis de clorofilina bajo las mismas condiciones, se evitó 100% la inducción de ICH por radiación. La frecuencia de ICH obtenida en este grupo fue igual a la basal.

En la Gráfica 5.5 se puede analizar la respuesta de las poblaciones celulares tanto irradiadas como pretratadas con clorofilina a diversas dosis. En esta figura se grafica la relación entre la frecuencia acumulativa de células respecto al número de ICH/célula y se aprecia que el 50% de la población celular testigo muestra frecuencias mayores a 1.0 ICH/célula, mientras que en el grupo irradiado este mismo porcentaje de la población presenta casi 2.0 ICH/célula. También es evidente que la gráfica correspondiente al grupo pretratado con 100 µg de clorofilina/g de peso se ubica en valores menores de ICH con relación al irradiado, sin alcanzar los valores de la frecuencia basal. Esta gráfica se localiza entre la del grupo testigo y la del irradiado, es decir que hay una protección intermedia respecto a la inducción de ICH por radiación. En este grupo sólo el 30 % de la población tiene valores de ICH mayores a 2.0. A diferencia de esta respuesta, la obtenida con el pretratamiento de 200 µg de clorofilina/g de peso fue prácticamente igual a la del grupo testigo, con lo cual se corrobora el 100% de radioprotección conferida por esta dosis. El porcentaje de la población celular de este grupo, que presentó frecuencias mayores a 2.0 ICH/célula fue de 15%.

La Gráfica 5.6 hace evidente que no hay efecto *per se* de las dosis de 100 ó 200 µg de clorofilina/g de peso sobre la frecuencia de ICH administrándola 4 h antes de la inyección de BrdU.



Gráfica 5.5. Efecto de la clorofilina sobre la frecuencia acumulada de espermatogonias respecto al número de ICH inducidos por radiación gamma antes de la incorporación de BrdU al ADN.



Gráfica 5.6. Efecto de la clorofilina sobre la frecuencia acumulada de espermatogonias respecto al valor basal de ICH por célula antes de la incorporación de BrdU al ADN.

5.4 EFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE LA INDUCCION DE ICH POR RADIACION GAMMA DESPUES DE LA INCORPORACION DE BrdU.

En el Cuadro 5.4 se observa que la frecuencia basal de ICH obtenida fue equivalente a 1.6 que es prácticamente igual a la observada anteriormente. En los grupos testigos de clorofilina con las dosis de 100 ó 200 µg/g de peso no se detectó diferencia en la frecuencia de ICH con relación a la basal.

TABLA 5.4

CLOROFILINA (µg/g)	RADIACION γ (Gy)	ICH/CEL. $\bar{x} \pm D.E.$	INCREMENTO Δ	Δ ICH/Gy	N
0.0	0.0	1.6 ± 0.1	0.0	0.0	11
100.0	0.0	1.5 ± 0.2	0.0	0.0	4
200.0	0.0	1.6 ± 0.1	0.0	0.0	8
0.0	0.75	3.1 ± 0.2 *	1.5	2.0	10
100.0	0.75	2.1 ± 0.1 ⁺ *	0.5	0.6	9
200.0	0.75	1.6 ± 0.1 ⁺	0.0	0.0	9

Incremento (Δ) = ICH/célula (experimental) - ICH/célula (testigo).

Δ ICH/Gy = Eficiencia de Inducción.

N = Número de ratones por grupo, 30 células analizadas por ratón.

* Diferencia significativa respecto al testigo (α = 0.01), Prueba de Dunnett para comparaciones múltiples con muestras de diferente tamaño.

+ Diferencia significativa respecto al irradiado (p < 0.01), Prueba t de Student.

Al realizar la irradiación bajo las condiciones de este protocolo se obtuvo una frecuencia de 3.1 ICH/célula que representa un incremento de 1.5 ICH respecto a la del grupo testigo, esta diferencia resultó estadísticamente significativa (α = 0.01). La eficiencia de inducción fue de 2.0 ICH/Gy. En el grupo tratado con 100 µg de clorofilina /g de peso

previo a la irradiación la inducción de ICH fue menor que en el irradiado sin pretratamiento alguno y la diferencia resultó estadísticamente significativa ($p < 0.01$, t de Student). La frecuencia obtenida en este caso fue de 2.1 ICH/célula, la cual a pesar de ser menor que la radioinducida sigue siendo estadísticamente diferente a la basal.

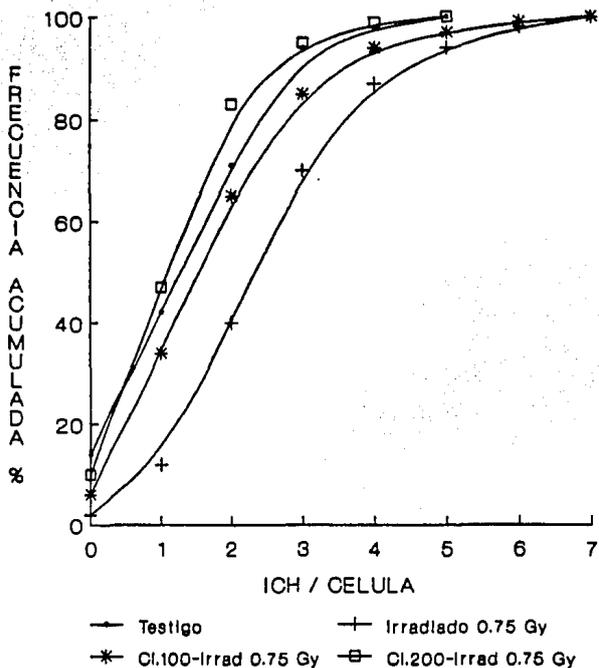
El incremento detectado con referencia al irradiado disminuyó de 1.5 a 0.5 ICH, lo cual representó una radioprotección del 66% aproximadamente.

Con la dosis mayor de clorofilina equivalente a 200 $\mu\text{g/g}$ de peso, la radioprotección conferida fue del 100%, ya que no se detectó diferencia en la frecuencia de ICH obtenida con este pretratamiento y la basal.

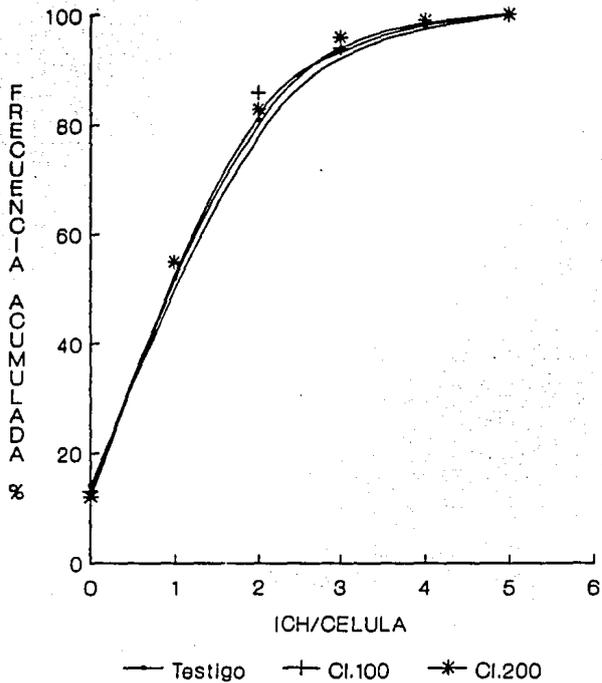
Al analizar el comportamiento de las poblaciones celulares en términos de la relación que existe entre la frecuencia acumulativa de células respecto al número de ICH/célula en la Gráfica 5.7, se puede apreciar que la clorofilina redujo la frecuencia de ICH/célula inducida por rayos gamma aún en las espermatogonias radiosensibilizadas mediante la incorporación de BrdU.

La curva del grupo irradiado se encuentra desplazada hacia valores más altos de ICH/célula que los observados en el grupo testigo. El 50% de la población celular testigo presentó frecuencias iguales o mayores a 1.0 ICH/célula aproximadamente, mientras que en el grupo irradiado este porcentaje de la población mostró 2.4 ICH/célula o más. El pretratamiento con las dosis de clorofilina de 100 y 200 $\mu\text{g/g}$ de peso favoreció que las poblaciones celulares manifestaran frecuencias menores de ICH/célula que las inducidas por radiación. Así por ejemplo, en el grupo pretratado con la dosis de 100 μg de clorofilina/g de peso, el 50% de la población celular tuvo frecuencias de 1.5 ICH, que son menores a las observadas en el 50% de la población irradiada, aunque dicha dosis de clorofilina no fue suficiente como para inhibir totalmente la producción de ICH. No obstante, en el grupo pretratado con 200 μg de clorofilina/g de peso se obtuvo un 100% de protección. En este grupo el 50 % de la población presentó la misma frecuencia de ICH/células que el grupo testigo.

En la Gráfica 5.8 se puede apreciar que la clorofilina no provocó cambios en el comportamiento de las poblaciones celulares en relación al número de ICH/célula. Al comparar ésta con la Gráfica 5.7 es evidente que la clorofilina administrada antes o después de la incorporación de BrdU no induce modificaciones en la frecuencia basal en espermatogonias de ratón *in vivo*.

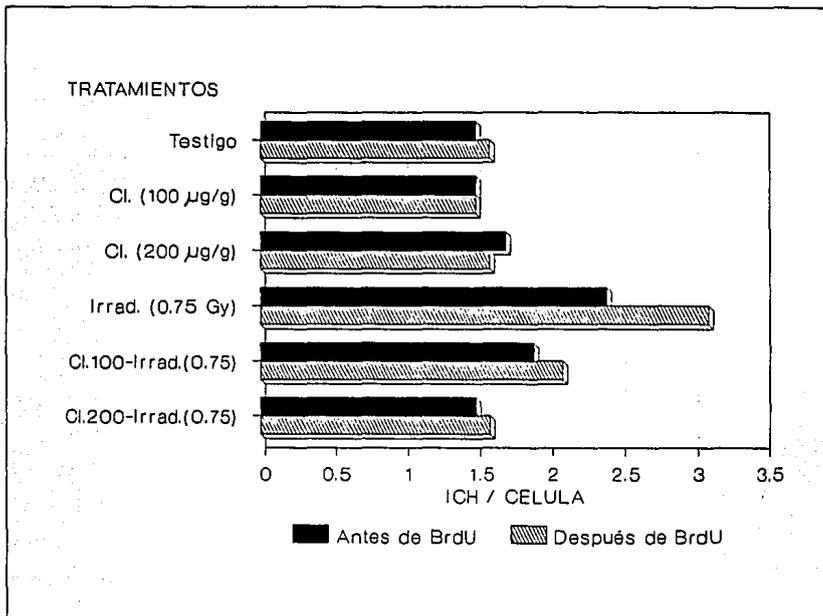


Gráfica 5.7. Efecto de la clorofilina sobre la frecuencia acumulada de espermatogonias respecto al número de ICH inducidos por radiación gamma después de la incorporación de BrdU al ADN



Gráfica 5.8. Efecto de la clorofilina sobre la frecuencia acumulada de espermatogonias respecto al valor basal de ICH por célula después de la incorporación de BrdU al ADN.

En la Gráfica 5.9 se pueden comparar los resultados obtenidos con el tratamiento de clorofilina previo a la irradiación tanto antes como después de la incorporación de BrdU.



Gráfica 5.9. Efecto de la clorofilina sobre la inducción de ICH por radiación gamma en espermatogonias antes o después de la incorporación de BrdU al ADN.

Por un lado, se aprecia claramente que la exposición a radiación incrementó la frecuencia de ICH/célula en ambos protocolos, aunque es más notoria la inducción cuando las células irradiadas han incorporado previamente BrdU en su ADN. Y por otro lado, es evidente que el pretratamiento con clorofilina redujo la frecuencia de ICH radioinducidos antes o después de la incorporación de BrdU y se obtuvo el 100% de protección con la dosis de 200 µg de clorofilina/g de peso en ambos protocolos.

6. DISCUSION

6.1 EFECTO DE LA RADIACION GAMMA SOBRE LA FRECUENCIA DE ICH EN ESPERMATOGONIAS ANTES O DESPUES DE LA INCORPORACION DE BrdU.

Desde que Perry y Evans en 1975 describen que la radiación ionizante induce incrementos mínimos en la frecuencia de ICH en células CHO en comparación con la incidencia de aberraciones cromosómicas y proponen que la lesión inducida por los rayos X es ineficiente para provocar ICH o se repara rápidamente, se ha cuestionado la conveniencia de utilizar la inducción de ICH como índice de daño por radiación.

Sin embargo, Morales-Ramírez y col. en 1983 detectan incrementos significativos en la frecuencia de ICH de células de la médula ósea de ratones expuestos a dosis de radiación gamma tan bajas como 0.12 Gy y determinan que la dosis que duplica la frecuencia basal de ICH (dosis de doblaje) es 10 veces menor que la de 4.0 Gy reportada por Perry y Evans en 1975. Esta diferencia puede ser atribuida a los valores tan diversos en las frecuencias basales de ICH entre las células que se utilizaron como modelo experimental en esos trabajos. Debido a que la frecuencia basal de ICH es relativamente alta como en el caso de las células CHO (12.0 ICH/célula), la dosis de doblaje que se determina mediante este índice es mucho mayor que para otros parámetros cuya frecuencia basal es muy baja como las aberraciones cromosómicas (0.05ac/célula). Por estas razones se ha considerado que no es adecuado emplear la dosis de doblaje como base de comparación de inducción de daño en células cuyas frecuencias basales de ICH son tan distintas y menos aconsejable aún se considera para la determinación de la sensibilidad de ciertos parámetros cuyas frecuencias basales pueden ser totalmente diferentes, como por ejemplo ICH y aberraciones cromosómicas (Morales-Ramírez y col., 1983).

Dentro de los trabajos que se han realizado analizando el efecto de la radiación ionizante sobre la frecuencia de ICH, existen varios que evidencian la capacidad de dicho agente mutágeno para incrementar la frecuencia de ICH en diferentes tipos celulares *in vitro* como células de criceto chino (Perry y Evans, 1975), linfocitos humanos (Abramovsky y col.,

1978), células de *Vicia faba* (Andersson y col., 1981); células de mamífero V 79 (Renault, 1982), células CHO (Ugglá y Natarajan, 1983), células de rana ICR 2A (Chao y Rosenstein, 1984), y en algunos sistemas *in vivo* como células de la médula ósea de ratones de la cepa C-57B1/6 (Nakanishi y Schneider, 1979) y Balb C (Morales-Ramírez y col., 1983; 1984a; 1988; 1994).

En general, se ha observado que en los experimentos en los que la irradiación se lleva a cabo antes de la incorporación de BrdU al ADN (Nakanishi y Schneider, 1979; Chao y Rosenstein, 1984; Morales-Ramírez y col., 1984a), las frecuencias inducidas de ICH son menores que las obtenidas cuando las células se irradian después de dicha incorporación (Abramovsky y col., 1978; Andersson y col., 1981; Morales-Ramírez y col., 1983; 1984a). En estudios comparativos realizados en el mismo sistema, la radiosensibilización producida por la BrdU resulta más evidente (Renault y col., 1982; Painter y Morgan, 1983; Ugglá y Natarajan, 1983; Morales-Ramírez y col., 1984a).

Los datos aquí descritos indican que la exposición *in vivo* a radiación gamma induce incrementos significativos en la frecuencia de ICH en espermatogonias tanto antes como después de la incorporación de BrdU al ADN, necesaria para lograr la tinción diferencial de las cromátidas hermanas. Estas diferencias significativas ($\alpha = 0.01$) con relación a la frecuencia basal se pueden detectar desde dosis tan bajas como 0.27 Gy en ambos protocolos. Las frecuencias de ICH observadas con el protocolo de irradiación con distintas dosis después de la incorporación de BrdU son mayores que las registradas irradiando antes de ésta. Los resultados concuerdan con los reportados por Renault y col. (1982); Ugglá y Natarajan (1983) y Morales-Ramírez y col. (1984a).

El incremento de 0.5 ICH/célula obtenido con 0.27 Gy antes de la incorporación de BrdU equivale a la mitad del detectado cuando se irradió con la misma dosis en células con su ADN sustituido con BrdU. A pesar de que las demás dosis de radiación utilizadas en ambos protocolos no son exactamente iguales, se puede apreciar que irradiando después de la incorporación de BrdU se siguen registrando incrementos aproximadamente equivalentes al doble de los determinados con el protocolo de irradiación sin sustitución con BrdU.

Estas diferencias se pueden observar más claramente en la Gráfica 5.1, en la que se comparan las respuestas obtenidas en función de la dosis en ambos protocolos.

Comparando las pendientes de ambas rectas resulta evidente que la inducción de ICH es mayor cuando las células se irradian una vez que la BrdU se ha incorporado en el

ADN.

La curva dosis-respuesta de las células irradiadas antes de la incorporación de BrdU muestra un incremento progresivo en la frecuencia de ICH hasta la dosis de 1.0 Gy. Este tipo de respuesta lineal fue ajustada por mínimos cuadrados con un coeficiente $r = 0.93$ y resulta similar a la reportada por algunos investigadores que realizan experimentos semejantes tanto *in vivo* como *in vitro*.

Nakanishi y Schneider en 1979 encuentran una respuesta lineal en células de la médula ósea de la cepa C57BL/6 irradiadas *in vivo* con rayos X a dosis desde 3.0 hasta 15 Gy, que son mucho más altas que las utilizadas en los experimentos con espermatozonias.

Asimismo, Renault y col. en 1982 observan este mismo comportamiento en células de criceto chino irradiadas *in vitro* con rayos X justo antes de la adición de BrdU al medio. Aunque la gráfica evidentemente es lineal de 1.0 Gy en adelante hasta 8.0 Gy, la respuesta obtenida con las dosis entre 0.5 y 1.0 Gy, que son comparables con las aplicadas en estos experimentos, no tiene una definición claramente lineal.

La respuesta observada en espermatozonias es similar a la descrita por Morales-Ramírez y col. (1984a) en células de la médula ósea de ratón irradiadas *in vivo* en el intervalo de 0 a 0.6 Gy de radiación gamma antes de la administración de BrdU. Sin embargo, ellos observan que con dosis por arriba de 0.6 Gy hasta 2.0 Gy hay una reducción en la pendiente de la gráfica, la cual ha sido explicada en función de que probablemente a dosis altas se producen ciertos tipos de lesiones en el ADN que inhiben la formación de ICH por bloqueo de la progresión en la síntesis de ADN.

Aunque en espermatozonias se mantiene una respuesta lineal hasta 1.0 Gy, no es posible seguir el comportamiento de la curva a dosis mayores para detectar cambios en la pendiente dado que la población celular se reduce significativamente al aumentar la dosis, dificultando así el análisis.

También utilizando radiación gamma, Chao y Rosenstein en 1984, observan una respuesta lineal en células de rana ICR-2A irradiadas *in vitro* con dosis desde 0.5 hasta 5.0 Gy, aunque la comparación con nuestros resultados se dificulta al no haber datos de la frecuencia de ICH en las células de rana con dosis menores de 0.5 Gy.

La curva dosis-respuesta obtenida irradiando a las espermatozonias después de la incorporación de BrdU, también muestra una respuesta lineal ajustada por mínimos cuadrados con un coeficiente de correlación $r = 0.92$ aunque con una pendiente mayor que

en el protocolo anterior (Gráfica 5.1).

Este tipo de respuesta concuerda con la reportada por Morales-Ramírez y col. en 1983 en células de la médula ósea de ratón, en linfocitos humanos (Abramovsky y col., 1978; Solomon y Bobrow, 1975) y en células de *Vicia faba* (Andersson y col., 1981) irradiadas después de la administración de BrdU.

También en la Gráfica 5.4 se puede observar que la respuesta de las poblaciones celulares se modifica por el efecto de la radiación y ésta depende de las condiciones en las que se realice la exposición. Resulta evidente que en el grupo irradiado con su ADN sustituido con BrdU se detectan células con frecuencias más altas de ICH.

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen la primera evidencia de inducción de ICH en espermatogonias de ratón *in vivo* por exposición a radiación gamma tanto antes como después de la incorporación de BrdU. Asimismo, confirman el efecto radiosensibilizador producido por la incorporación de BrdU al ADN, como había sido propuesto anteriormente por Littlefield y col. en 1979 y Morales-Ramírez y col. en 1983.

Este efecto radiosensibilizador ha sido atribuido en parte a la acción del radical uracilil y del átomo de Br que se forman por ruptura del puente C-Br durante la radiólisis del BrUra.

El radical uracilil capta electrones eficientemente y puede reaccionar fácilmente con la molécula 2-desoxi-D-ribosa (del esqueleto azúcar-fosfato del ADN) con una tasa alta y constante. Asimismo, el átomo de Br que sustituye al metilo de la timidina, juega un papel muy importante en la radiosensibilización. Aunque no se sabe exactamente cual es su destino durante la radiólisis, se ha propuesto que posiblemente ataca a las moléculas de azúcar de las cadenas vecinas (Krasin y Hutchinson, 1978).

Estas reacciones pueden dar origen a la producción de rupturas sencillas y dobles y a la formación de sitios alcali-lábiles (Lion, 1972).

Se ha observado que durante la fotólisis del ADN sustituido con BrUra, el 95% de las rupturas se producen en la cadena con BrUra y el 5% en la cadena sin BrUra (Köhnlein, 1974). Esta observación apoya la hipótesis de que el radical uracilil ataca a su propia cadena.

Los complejos del átomo de Br como Br₂ y Br₃, que se forman por su reacción con los radicales libres OH, aunque son menos reactivos que Br, también actúan preferentemente con el C(1) de la 2-desoxi-D-ribosa por abstracción del átomo de H, con

una tasa constante de $3\text{-}7 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Parson y col., 1978) y el producto resultante es la 2-desoxi-D-ribonolactona. Similarmente esta reacción da origen a un sitio álcali-lábil.

También se ha reportado que dada la naturaleza electrofílica de algunos radicales libres como el OH, éstos atacan preferentemente a los sitios de alta densidad electrónica como el C(5) del uracilo (Fujita y Steenken, 1981).

Estas reacciones explican en parte el efecto que causa la incorporación de la BrdU en el ADN que incrementa la producción de daños por radiación y que en un momento dado se pueden expresar como ICH.

Por otro lado, resulta interesante que tanto en los datos aquí reportados, como en los de algunos investigadores mencionados anteriormente (Abramovsky y col., 1978; Morales-Ramírez y col., 1983 y 1984a;), se aprecia que la eficiencia de inducción tiende a disminuir conforme aumenta la dosis de radiación. Esta tendencia puede deberse en parte a que la reducción en la viabilidad celular provocada por la radiación va disminuyendo la posibilidad de detectar lesiones en el ADN causadas por dosis más altas de radiación que se manifiesten como ICH. En estudios preliminares se observa que por arriba de 0.8 Gy se reduce de manera importante el índice mitótico de espermatogonias lo cual dificulta el análisis de ICH. Se ha propuesto que la reducción en la eficiencia de la radiación gamma para inducir ICH a dosis mayores de 0.5 Gy probablemente se debe a la presencia de un mayor número de ciertos tipos de lesiones que bloquean la progresión en la síntesis de ADN (Morales-Ramírez y col., 1984a).

Por otro lado, Chao y Rosenstein en 1984, detectan que la radiación gamma disminuye los niveles de ICH inducidos por UV y que dicho efecto va decreciendo durante las primeras 6 horas postirradiación. Es posible que durante este período se reparen las rupturas dobles provocadas por radiación gamma, que pueden ser las responsables de la inhibición de la formación de ICH.

Cabe resaltar que las tasas de inducción de ICH obtenidas en espermatogonia son menores que las registradas en otros tejidos con protocolos similares.

En los datos de este estudio se manifiestan eficiencias de inducción de 2.0 - 3.7 ICH/Gy (Tabla 5.2) irradiando después de la incorporación de BrdU; mientras que Perry y Evans en 1975, utilizando también el protocolo de irradiación después de BrdU, determinan una eficiencia de inducción de 4.0 ICH/Gy en células de criceto chino irradiadas con rayos X; Abramovsky y col. en 1978 observaron que cada Gy produce 6 ICH en linfocitos humanos irradiados con rayos gamma y Morales-Ramírez y col. en 1983 detectaron una

eficiencia de inducción de 8.4 ICH/Gy en células de la médula ósea de ratones irradiados.

También irradiando antes de la incorporación de BrdU se obtuvieron eficiencias menores de inducción en espermatogonia en relación a otros tejidos. La eficiencia obtenida en espermatogonia fue de 1.0 a 1.8 ICH/Gy, mientras que Morales-Ramírez y col. en 1984a determinaron una inducción de 2.5 ICH/Gy en células de la médula ósea irradiadas *in vivo* con 0. - 0.60 Gy de rayos gamma.

Estas diferencias pueden deberse en parte a las distintas características intrínsecas entre los tipos celulares, o bien a las diferentes condiciones experimentales, dentro de las cuales la energía de la fuente de irradiación puede jugar un papel muy importante.

Otro dato interesante obtenido en espermatogonias es la frecuencia basal que presentan con respecto a otros tipos celulares.

La frecuencia basal que se observa en estos experimentos con espermatogonia es de 1.4 - 1.6 ICH/célula, la cual concuerda con la reportada por otros investigadores (Allen y Latt, 1976a; Palitti y col., 1982; Morales-Ramírez y col., 1984b). Esta frecuencia basal tan baja permite detectar incrementos pequeños de ICH inducidos por dosis bajas de radiación. Así, con una dosis de 0.27 Gy se nota un incremento significativo de 0.5 ICH/célula en espermatogonia, incluso antes de la incorporación de BrdU; un aumento similar en médula ósea difícilmente sería significativo.

Asimismo, la frecuencia basal en espermatogonia es menor que la detectada en otros tejidos. En bazo, médula ósea y glándula salival, se han reportado frecuencias basales de 1.9, 3.5 y 5.6 ICH/célula respectivamente (Palitti y col., 1982; King y col., 1982; Morales-Ramírez y col., 1984b).

También se ha observado que la inducción de ICH por agentes químicos como la ciclofosfamida es menor en espermatogonia que en médula ósea (King col., 1982). Al comparar la frecuencia de ICH inducida por mitomicina C y ciclofosfamida en espermatogonias de ratón de la cepa C 57B1/6 (Abraham y Fränz, 1983) con la obtenida con los mismos mutágenos en células de la médula ósea de ratones de la misma cepa (Nakanishi y Schneider, 1979), se aprecia que ésta es menor en espermatogonias que en células de la médula ósea.

Palitti y col. en 1982 también observan que las espermatogonias son menos sensibles a la producción de ICH por algunos agentes químicos como ciclofosfamida, mitomicina C, metil metanosulfonato, 4-nitroquinolina-1-óxido y bleomicina, que otros tipos

celulares como médula ósea y bazo.

Estas diferencias encontradas tanto en la frecuencia basal como en la causada por agentes químicos podría ser atribuida a la protección conferida a las espermatogonias por las distintas barreras celulares que las rodean e impiden el paso de algunos compuestos (Russell, 1991).

De esta manera un menor acceso de la BrdU a las espermatogonias podría ser la causa de una frecuencia basal más baja y el paso limitado de mutágenos químicos reduciría la producción de daño en el ADN que trae como consecuencia la formación de ICH.

Sin embargo, esta misma diferencia también se ha observado con radiaciones ionizantes. Al comparar los resultados de esta tesis en relación a la eficiencia de inducción de ICH en espermatogonia con los observados en médula ósea y glándula salival, obtenidos bajo condiciones similares, resulta evidente que la producción de ICH/Gy es prácticamente igual entre las células somáticas pero significativamente menor en las germinales (Morales-Ramírez y col., 1994).

Considerando que las barreras celulares que protegen a las espermatogonias no pueden evitar el paso de la radiación ionizante, estas diferencias observadas con relación a otros tejidos deben ser explicadas de otra manera.

Probablemente las espermatogonias además de estar protegidas por barreras celulares especializadas son intrínsecamente menos sensibles a la acción de ciertos mutágenos, lo cual puede deberse a alguna actividad metabólica o a una mayor eficiencia en la reparación de daños en el ADN que estén involucrados en la formación de ICH. Lo anterior posiblemente se relaciona con la importancia de este tipo celular en la producción de gametos masculinos, que serán los responsables de transmitir a la descendencia cualquier daño o alteración que se encuentre en su información. Por lo tanto, la eficiencia de los mecanismos de reparación en las células germinales pueden ser determinantes para asegurar que las siguientes generaciones tengan el menor número de alteraciones posibles.

6.2 EFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE LA INDUCCION DE ICH EN ESPERMATOGONIAS POR RADIACION GAMMA ANTES O DESPUES DE LA INCOPORACION DE BrdU.

Desde que se demostró que la capacidad antimutagénica de ciertos extractos vegetales dependía directamente del contenido de clorofila (Lai y col., 1980), se han realizado numerosos estudios en diversos sistemas respecto a las propiedades antimutagénicas tanto de la clorofila como de algunos compuestos derivados o semejantes a ella.

La clorofilina, siendo un compuesto derivado estable de la clorofila, altamente soluble en agua, de fácil manejo y baja o nula toxicidad, ha demostrado tener propiedades antimutagénicas contra diferentes tipos de compuestos de acción directa o indirecta (Kimm y col., 1982), incluyendo mezclas complejas del ambiente y de la dieta (Ong y col., 1986).

Usando la prueba de SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) en *Drosophila* se obtienen resultados indicativos de que la clorofilina inhibe la capacidad mutagénica del Trp-P-2 (un potente mutágeno-carcinógeno detectado en alimentos cocinados) (Negishi y col., 1989) y reduce el número de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo inducidas por dimetil nitrosamina (Rodríguez-Arnaiz y Zimmering, 1989). Empleando este mismo sistema se obtiene evidencia de que la clorofilina posee también propiedades radioprotectoras, ya que baja la frecuencia de mutaciones somáticas inducidas por radiación gamma (Zimmering y col., 1990).

En un estudio reciente realizado por Morales-Ramírez y García-Rodríguez (1994), se observa que el pretratamiento con clorofilina disminuye la frecuencia de ICH causados por exposición a una fuente de rayos gamma en células de la médula ósea de ratón *in vivo*.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la clorofilina también puede proteger a las espermatogonias de ratón contra la producción de ICH por radiación gamma. Lo cual confirma la capacidad de la clorofilina para actuar como radioprotector *in vivo* en organismos superiores.

El 100% de radioprotección se logra con la dosis de 200 µg de clorofilina/g de peso tanto en los ratones irradiados antes como después de la incorporación de BrdU (Gráfica 5.9). Y aún, la dosis de 100 µg de clorofilina/g de peso confiere un porcentaje considerable de radioprotección en ambos protocolos, equivalente a 55 y 66% respectivamente. Estos datos muestran que la clorofilina protege eficientemente a las células normales y a las

radiosensibilizadas.

El hecho de que la clorofilina sea capaz de proteger tanto a las células de la médula ósea de ratón (Morales-Ramírez y García-Rodríguez, 1994), como a las espermatogonias, por un lado indica que ésta se puede distribuir ampliamente dentro del organismo y penetrar en las células donde ejerce su función como radioprotector y por otro, muestra que la clorofilina a pesar de ser una molécula cuya estructura química es compleja (Newmark, 1987), puede traspasar las posibles barreras celulares que limitan el acceso de ciertos compuestos hacia las espermatogonias (Russell, 1990). Sin embargo, dado que la dosis necesaria para evitar 100% la producción de ICH por radiación en espermatogonias es equivalente al doble de la que impide el mismo porcentaje en células de la médula ósea (Morales-Ramírez y García-Rodríguez, 1994), es factible que parte de la clorofilina sea detenida por las barreras protectoras de las espermatogonias (Russell, 1990).

En relación a la eficiencia de la clorofilina para reducir los daños inducidos por radiación en diferentes tejidos, se puede decir que ésta es comparable a la de otros agentes principalmente del grupo de los aminotioles, que son de los compuestos con mayor poder radioprotector.

Se ha observado que la cisteamina disminuye la inducción de ICH por exposición a 1.0 Gy de radiación gamma en forma dependiente de la dosis en células de la médula ósea de ratón *in vivo*, obteniéndose un 100% de radioprotección con una dosis de 150 µg/g de peso (Mendiola-Cruz y Morales-Ramírez, 1989). Dado que la cisteamina es una sustancia que captura radicales libres, estos datos sugieren que la formación de ICH involucra la participación de los radicales libres y por tanto la acción indirecta de la radiación.

El efecto radioprotector de otros agentes altamente efectivos como el WR-2721, se ha llegado a evaluar en espermatogonias de ratón utilizando la frecuencia de translocaciones recíprocas como parámetro de daño. Se ha reportado que una dosis de 400 µg de WR-2721/g de peso confiere un 45% de protección contra la producción de translocaciones recíprocas por 4.0 Gy de rayos X (Benova, 1986a; b).

En el presente trabajo se observa que dosis de 200 µg de clorofilina/g de peso confirieren 100% de protección contra la inducción de ICH en espermatogonias de ratones expuestos a 0.75 Gy de radiación gamma. Estos datos sugieren que la clorofilina resulta ser altamente eficiente para proteger contra los daños inducidos por radiación gamma *in vivo*.

Por otro lado, en los resultados obtenidos no se detecta que la clorofilina *per se*

produzca alteraciones en la frecuencia de ICH en espermatozonias, al igual que lo reportado para médula ósea.

En contraste con algunos datos obtenidos utilizando otros radioprotectores, incluyendo los que se mencionan anteriormente (Meistrich y col., 1982; Nasjleti y Spencer, 1969), resulta especialmente importante considerar la baja citotoxicidad de esta sustancia en ratones, como se ha observado en otros sistemas como *Salmonella* (Lai, 1979; Kimm y col., 1982; Ong y col., 1986; 1993; Warner y col., 1991), células V79 (Kato y col., 1983), células del epitelio colónico de ratas (Robins y Nelson, 1989), *S. cerevisiae* (Bronzetti y col., 1990), y células hepáticas de trucha arcoiris (Dashwood y col., 1991).

Dada la semejanza estructural de la clorofilina con otros pigmentos biológicos como la hemina y la biliverdina (Newmark, 1987), probablemente el organismo la reconoce como propia, sin manifestarse efectos tóxicos secundarios. Este aspecto ofrece la posibilidad de utilizarse en humanos para reducir el riesgo citogenético por acción de ciertos mutágenos, o como medida preventiva en circunstancias en las que se prevea la posibilidad de exposición.

Por otro lado, se han sugerido varias alternativas para explicar el mecanismo de acción de la clorofilina como antimutágeno y/o radioprotector.

Ong y col. en 1986 y 1994 mencionan que la clorofilina tiene propiedades antioxidantes y que puede actuar como capturador de radicales libres, que son en gran parte responsables de los efectos genotóxicos de algunos mutágenos químicos y de la radiación (Hutchinson, 1985; Pryor, 1986). Su capacidad radioprotectora puede explicarse en función de esta propiedad para capturar iones.

Speit y col. en 1980 observan que la inducción de ICH por algunos compuestos formadores de radicales libres como la hidroxilamina, hidrazina e isoniazida, podía ser inhibida por acción de la cisteína. Sugieren que la propiedad reductora de esta sustancia inhibe la actividad de los radicales libres y peróxidos. Esta misma también tiene propiedades radioprotectoras con relación a la inducción de ICH por radiación ionizante en linfocitos humanos (Abramovsky y col., 1979).

Este mecanismo de captura de radicales libres se ha propuesto para explicar el efecto radioprotector tanto de la cisteína, como de la cisteamina que reduce la producción de ICH por radiación gamma en células de la médula ósea de ratón *in vivo* (Mendiola-Cruz y Morales-Ramírez, 1989). De igual forma se explica la reducción que causa la clorofilina en la frecuencia radioinducida de ICH en este mismo sistema (Morales-Ramírez y García-

Rodríguez, 1994).

Previamente, Hadnagy y Seemayer en 1988, reportan que la clorofilina disminuye la formación de ICH provocada por contaminantes ambientales en linfocitos, mediante la inactivación de radicales oxígeno como O_2 , H_2O_2 y OH^* . Esta hipótesis se apoya en las observaciones previas respecto a la reducción de la quimioluminiscencia inducida por forbol-13-acetato en leucocitos PMN por concentraciones crecientes de clorofilina.

Los resultados de esta tesis sustentan las hipótesis anteriores respecto al mecanismo radioprotector de la clorofilina, ya que dadas las características de esta sustancia se debe incorporar en las células y reaccionar en un momento dado con los radicales que pudieran formarse intracelularmente, evitando que éstos viajen e interactúen con las moléculas de ADN formando aductos, enlaces cruzados y en general lesiones que puedan originar ICH.

Bronzetti y col. en 1990 analizando sus resultados respecto a la disminución de la tasa de mutación e incremento en el porcentaje de supervivencia en *S. cerevisiae* expuestas a rayos X en presencia de clorofilina, sugieren que ésta probablemente actúa mediante la captura de radicales libres. También detectan que las mutaciones inducidas por el bromuro de etidio, que es un agente intercalante que en solución acuosa existe como catión, podían ser reducidas por efecto de la clorofilina. Se postula que probablemente la clorofilina forma un complejo con el bromuro de etidio impidiendo su interacción con el ADN.

En general, se puede decir que la clorofilina posiblemente tiene un comportamiento dual, como antimutágeno y/o radioprotector y que seguramente actúa de varias maneras involucrando distintos mecanismos de acción, tal vez dependiendo de las condiciones experimentales como realización *in vivo* o *in vitro*, sistema de prueba, tipo y dosis del mutágeno, etc.

Finalmente, cabe comentar que a pesar de que los organismos poseen mecanismos para protegerse contra los efectos dañinos de la exposición a agentes nocivos, esto no garantiza absoluta protección. Por tal razón, es conveniente reducir al mínimo la exposición a agentes genotóxicos y favorecer la ingesta de alimentos que contengan factores protectores (Morita y col., 1978; 1982; Minakata y col., 1985; Shankel y col., 1987; De Flora, 1988; Hayatsu y col., 1988).

Es de gran importancia la protección de células germinales, ya que al ser las precursoras de los gametos, el daño en el ADN de éstas puede producir alteraciones genéticas en la progenie (Lu y Meistrich; 1979).

7. CONCLUSIONES

El conjunto de resultados obtenidos en espermatogonias de ratón *in vivo* durante el desarrollo de esta tesis permite concluir que:

1. La radiación gamma es capaz de aumentar significativamente la frecuencia de ICH, tanto antes como después de la incorporación de BrdU al ADN.
2. Estos incrementos se pueden detectar con dosis tan bajas como 0.27 Gy en ambos protocolos.
3. La incorporación de BrdU al ADN produce un efecto de radiosensibilización ya que la elevación en la frecuencia de ICH es mayor cuando las células se irradian una vez que han incorporado BrdU.
4. Tanto la frecuencia basal como la eficiencia de inducción de ICH por radiación gamma es menor que la observada en células somáticas, lo cual puede deberse a una menor sensibilidad o mayor protección en células germinales.
5. La clorofilina reduce la producción de ICH por radiación gamma actuando como un radioprotector.
6. El efecto radioprotector de la clorofilina se expresa también en las células sensibilizadas a la radiación con BrdU.
7. El 100% de radioprotección se obtiene con 200 µg de clorofilina/g de peso irradiando antes o después de la incorporación de BrdU.
8. Es posible que la producción de ICH por exposición a rayos gamma sea disminuida por la clorofilina mediante la captura de radicales libres.
9. Al menos bajo las condiciones experimentales de este trabajo, no se detectaron efectos citotóxicos colaterales de la clorofilina *per se*.

8. REFERENCIAS

- Abraham S. y Fränz J. (1983): Induction of sister chromatid exchanges by chemotherapeutic drugs in spermatogonia of mice: effects of procarbazine, adriamycin, cyclophosphamide and mitomycin C. *Mutation Res.* 108: 373-381.
- Abramovsky I., Vorsanger G. y Hirschorn K. (1978): Sister chromatid exchange induced by X-ray in human lymphocytes and the effect of L-cysteine. *Mutation Res.* 50: 93-100.
- Adler I. y Erbelding C. (1988): Radiation-induced translocations in spermatogonial stem cells of *Macaca fascicularis* and *Macaca mulatta*. *Mutation Res.* 198: 337-342.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J. (1989): *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc. Nueva York, EUA. 1219 pp.
- Allen J. y Latt S. (1976a): Analysis of sister chromatid exchange formation *in vivo* in mouse spermatogonia as a new test system for environmental mutagens. *Nature* 260: 449-451.
- Allen J. y Latt S. (1976b): *In vivo* BrdU-33258 Hoechst analysis of DNA replication kinetics and sister chromatid exchange formation in mouse somatic and meiotic cells. *Chromosoma* 58: 325-340.
- Allen J., Shuler C., Mendes R. y Latt S. (1977): A simplified technique for *in vivo* analysis of sister-chromatid exchanges using 5-bromodeoxyuridine tablets. *Cytogenet. Cell. Genet.* 18: 231-237.
- Andersson H., Kihlman B. y Palitti F. (1981): Production of sister-chromatid exchanges by X-rays under aerobic and anaerobic conditions. *Hereditas* 94: 41-44.
- Arimoto S., Ohara Y., Namba T., Negishi T. y Hayatsu H. (1980a): Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 92: 662-668.
- Arimoto S., Negishi T. y Hayatsu H. (1980b): Inhibitory effect of hemin on the mutagenic activities of carcinogens. *Cancer Letters* 11: 29-33.
- Backer L., Sontag M. y Allen J. (1991): Stage-specific damage to synaptonemal complexes and metaphase chromosomes induced by X-rays in male mouse germ cells.

Radiation Res. 125: 187-196.

- Benova D. (1986a): Antimutagenic properties of selected radioprotective drug mixtures with regard to X-ray-induced reciprocal translocations in mouse spermatogonia. *Mutation Res.* 159: 75-81.
- Benova D. (1986b): Antimutagenic properties of WR-2721 and of a radioprotective mixture, ATP-AET-Serotonin, with regard to X ray induced reciprocal translocations in mouse spermatogonia. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 13: 117-119.
- Bronzetti G., Galli A. y Della Croce C. (1990): Antimutagenic effects of chlorophyllin. En: *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanism II.* Kuroda Y., Shankel D. y Waters M. (Eds), Plenum Press. Nueva York, EUA. p. 463-468.
- Brusick D. (1987): *Principles of Genetic Toxicology.* Plenum Press. Nueva York, EUA. 284 pp.
- Buttitta L. (1946): Azione del clorofillinato di sodio sulla coagulazione del sangue. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 22: 593-594.
- Cameron I., Padilla G. y Zimmerman A. (1971): *Developmental aspects of the cell cycle.* Academic Press. Nueva York, EUA. 389 pp.
- Camps E., Anguiano G. y Ondarza R. (1993): Sistema Básico de Estadística (SBE). Reporte Técnico, IB-93-11. ININ.
- Carrano A., Thompson L., Stetka D., Minkler J. Mazrimas J. y Fong S. (1979): DNA crosslinking sister-chromatid exchange induction by 8-methoxy-psoralen in Chinese hamster ovary cells. *Exp. Cell Res.* 128:15-22.
- Casarett G. (1980): *Radiation Histopathology.* CRC Press Inc. Florida, EUA. 87 pp.
- Cawood A. y Breckon G. (1983): Synaptonemal complexes as indicators of induced structural change in chromosomes after irradiation of spermatogonia. *Mutation Res.* 122:149-154.
- Cawood A. y Breckon G. (1985): Induced structural changes in chromosomes of the Syrian hamster after X-irradiation of spermatogonia: comparison of dose-response curves derived from synaptonemal complexes and from air-dried preparations of metaphase I. *Mutation Res.* 144: 19-21.
- Cerda H. y Rosander K. (1983): DNA damage in irradiated endothelial cells of the rat cerebral cortex. Protective action of cysteamine *in vivo.* *Radiation Res.* 95: 317-326.

- Chao Ch. y Rosenstein B. (1984): Inhibition of the U.V. induction of sister-chromatid exchange in ICR-2A frog cells by pretreatment with gamma-rays. *Mutation Res.* 139: 35-39.
- Cheung S. y Holland B. (1992): Extension of Dunnett's multiple comparison procedure with differing sample sizes of the case of several groups. *Comput. Stat. Data Anal.* 14: 165-182.
- Coogan T. y Rosenblum I. (1988): DNA double-strand damage and repair following γ -irradiation in isolated spermatogenic cells: *Mutation Res.* 194: 183-191.
- Cruz-Vallejo V., Morales-Ramírez, P. y Vallarino-Kelly, T. (1991): Simplificación del método de aislamiento de espermatogonias de ratón en metafase para el análisis de ICH. Informe Técnico-Científico ININ. IBDR 07/91. 18 pp.
- Dashwood R., Brinholts V. y Bailey G. (1991): Chemopreventive properties of chlorophyllin: inhibition of aflatoxin B₁(AFB₁)-DNA binding *in vivo* and anti-mutagenic activity against AFB₁ and two heterocyclic amines in the *Salmonella* mutagenicity assay. *Carcinogenesis* 12: 939-942.
- Dashwood R., (1992): Protection by chlorophyllin against the covalent binding of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) to rat liver DNA. *Carcinogenesis* 13: 113-118.
- Dashwood R. y Guo D. (1992): Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)-DNA binding by chlorophyllin: studies of enzyme inhibition and molecular complex formation. *Carcinogenesis* 13: 1121-1126.
- Dashwood R. y Liew Ch. (1992): Chlorophyllin-enhanced excretion of urinary and fecal mutagens in rats given 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Environ. and Mol. Mutagen.* 20: 199-205.
- De Flora S. (1988): Problems and prospects in antimutagenesis and anticarcinogenesis. *Mutation Res.* 202: 279-283.
- Dym M. y Fawcett D. (1970): The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biology of Reproduction* 3: 308-326.
- Ehling U. (1980): Induction of gene mutations in germ cells of the mouse. *Arch. Toxicol.* 46: 123-138.
- Eker P. y Phil A. (1964): Studies on the growth inhibiting and radioprotective effect of

- cysteamine , cystamine and AET on mammalian cells in tissue culture. *Radiation Res.* 21: 165-179.
- El-Nakeeb M. y Yousef R. (1974): Antimicrobial activity of sodium copper chlorophyllin. *Pharmazie* 29, H.1:48-50.
- Fornance A., Nagasawa H. y Little B. (1980): Relation of DNA repair to chromosome aberrations, SCE and survival during liquid-holding recovery in X-irradiated mammalian cells. *Mutation Res.* 70: 323-336.
- Fujita S. y Steenken S. (1981): Pattern of OH radical addition to uracil and methyl-and carboxyl-substituted uracils. *J. Am. Chem. Soc.* 103: 2540-2545.
- Goto K., Akematsu T., Shimazu H. y Sugiyama T. (1975): Simple differential Giemsa staining of sister chromatids after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining. *Chromosoma* 53: 223-230.
- Hacker-Klom U. (1985): Long term effects of ionizing radiation on mouse spermatogenesis. *Acta Radiologica Oncologia* 24: 363-367.
- Hadnagy W. y Seemayer N. (1988): Antimutagenicity of chlorophyllin against airborne pollutants. *Mutation Res.* 203: 205-206.
- Harrison J., Levin S. y Trabin B. (1954): The safety and fate of potassium sodium copper chlorophyllin and other copper compounds. *J. Amer. Pharmaceut. Assoc.* 43:722-737.
- Hayatsu A., Arimoto S. y Negishi T. (1988): Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Res.* 202: 429-446.
- Hutchinson F. (1985): Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Prog. in Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 32: 115-154.
- Imai K., Aimoto T., Sato M., Watanabe K., Kimura R. y Murata T. (1986): Effects of sodium metallochlorophyllins on the activity and components of the microsomal drug-metabolizing enzyme system in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* 34: 4287-4293.
- Ishii Y. y Bender M. (1980): Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light induced sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells. *Mutation Res.* 79:19-32.
- Jaimala H., Bhartiya C. y Pareek P. (1984): Effects of s-2(3-aminopropylamino) ethylphosphorothioic acid (WR-2721) on the sensitivity of mouse spermatogonia A to

- radiation. *Acta Radiologica Oncol.* 23: 65-68.
- Kato H. (1977): Mechanism of sister chromatid exchange and their to the production of chromosomal aberrations. *Chromosoma* 59: 179-191.
- Kato H. (1980): Temperature-dependence of sister chromatid exchange: an implication for its mechanism. *Cancer Gen. and Cytogen.* 2: 61-67.
- Katoh Y., Nemoto N., Tanakata M. y Takayama S. (1983): Inhibition of benzo[a]pyrene induced mutagens in Chinese hamster V79 cells by hemin and related compounds. *Mutation Res.* 121: 153-157.
- Kedar N. (1984): *Handbook of Radiobiology*. CRC Press Inc. Florida, EUA. 296 pp.
- Kephart J. (1955): Chlorophyll derivatives: their chemistry, commercial preparation and uses. *Economic Botany* 9: 3-38.
- Kimm S., Tchai B., Park S. y Jikang S. (1982): Antimutagenic activity of chlorophyll to direct and indirect-acting mutagens and its contents in vegetables. *Korean J. Biochem.* 14: 1-7.
- King M., Wild D., Gocke E. y Eckhardt K. (1982): 5-Bromodeoxyuridine tablets with improved depot effect for analysis *in vivo* of sister chromatid exchanges in bone-marrow and spermatogonial cells. *Mutation Res.* 97: 117-129.
- Kirk K. y Lyon M. (1984): Induction of congenital malformations in the offspring of male mice treated with X-rays at pre-meiotic and post-meiotic stages. *Mutation Res.* 125: 75-85.
- Kofman-Alfaro S. y Chandley A. (1970): Meiosis in the male mouse. An autoradiographic investigation. *Chromosoma* 31: 404-420.
- Köhnlein W. (1974): The influence of hydrogen donors on breakage of parental DNA strands and on biological activity of transforming BrU-DNA of *B. subtilis* after 302/313 nm radiation. *Z. Naturforsch.* 29:66-71.
- Krasin F. y Hutchinson F. (1978): Strand breaks and alkali-labile bonds induced by ultraviolet light in DNA with 5-bromouracil. *Biophys. J.* 24: 657-664.
- Krasnikova, N. (1973): Proliferation of epithelium surrounding a skin wound in hairless mice treated with sodium chlorophyllin. *Byulleten Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny* 76: 99-102.
- Kurk O. (1962): Composición química y propiedades de la clorofila. *Enciclopedia de*

- Lafleur M., Woldhouis J. y Loman H. (1980): Effects of sulphhydryl compounds on the radiation damage in biologically active DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 37: 493-498.
- Lai C. (1979): Chlorophyll: The active factor in wheat sprout extract inhibiting the metabolic activation of carcinogens *in vitro*. *Nutrition and Cancer* 1: 19-21.
- Lai C., Butler M. y Matney T. (1980): Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutation Res.* 77: 245-250.
- Latt A. (1973): Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70: 3395-3399.
- Liebeskind D., Bases R., Méndez F., Elequin F. y Koeninsberg M. (1979): Sister chromatid exchanges in human lymphocytes after exposure to diagnostic ultrasound. *Science.* 205: 1273-1275.
- Lion M. (1972): Mechanism of sensitization to uv radiation by 5-Br-uracil substituted DNA. *Israel J. Chem.* 10: 1151-1163.
- Littlefield L., Colyer S., Jower E. y DuFrain R. (1979): Sister chromatid exchanges in human lymphocytes exposed to ionizing radiation during G₀. *Radiation Res.* 78: 514-521.
- Lu Ch. y Meistrich M. (1979): Cytotoxic effects of chemotherapeutic drugs on mouse testis cells. *Cancer Res.* 39: 3575-3582.
- Lüning K. y Frolen H. (1961): The protective effect of cysteamine against genetic damage by X-rays in spermatozoa from mice. *Radiation Res.* 14: 813-818.
- Madrigal-Bujaidar E. y Sánchez-Sánchez M. (1991): Sister chromatid exchange analysis *in vivo* using different 5-Bromo-2-deoxyuridine-labeling system. *Mutation Res.* 262: 15-19.
- Manyaka A. y Schleiermacher E. (1973): Action of mitomycin C on mouse spermatogonia. *Mutation Res.* 19: 99-108.
- Matsuda Y., Tobari I., Yamagiwa J., Utsugi T., Kitazume M. y Nakai S. (1984): γ -ray-induced reciprocal translocation in spermatogonia of the crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*). *Mutation Res.* 129: 373-380.
- Matsuda Y., Tobari I. y Yamada T. (1985a): *In vitro* fertilization rate of mouse eggs with sperm after X-irradiation at various spermatogenetic stages. *Mutation Res.* 142: 59-

- Matsuda Y., Tobari I., Yamagiwa J., Utsugi T., Masanori O. y Nakai S. (1985b): Dose-response relationship of γ -ray-induced reciprocal translocations at low doses in spermatogonia of the crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*). *Mutation Res.* 151: 121-127.
- McRae W. y Stich H. (1979): Induction of sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells by thiol and hydrazine compounds. *Mutation Res.* 68: 351-365.
- Meistrich M., Finch M., da Cunha M., Hacker U. y Au W. (1982): Damaging effects of fourteen chemotherapeutic drugs on mouse testis. *Cancer Res.* 42: 122-131.
- Mendiola-Cruz M. y Morales-Ramírez P. (1989): Effect of pretreatment with cysteamine on γ -radiation-induced sister chromatid exchanges in mouse bone marrow cells *in vivo*. *Radiation Res.* 118: 131-138.
- Miltenburger H., Engelhardt G. y Röhrborn G. (1981): Differential chromosomal damage in Chinese hamster bone-marrow cells and in spermatogonia after mutagenic treatment. *Mutation Res.* 81: 117-122.
- Minakata H., Komura H., Tamura S., Ohfune Y., Nakanishi K. y Kada T. (1985): Antimutagenic unusual aminoacids from plants. *Experientia* 41: 1622-1623.
- Mitzneg P. y Säbel M. (1973): On the mechanism of radioprotection by cysteamine. I. Relationship between cysteamine-induced mitotic inhibition and radioprotective effects in the liver of young and senile white mice. *Int. J. Radiat. Biol.* 24: 329-337.
- Momoki H. y van Buul P. (1982): Serial analysis of chromosomal aberrations and proliferation kinetics of mouse spermatogonial after single or fractionated X-ray exposures. *Mutation Res.* 93: 419-437.
- Monesi V. (1962): Autoradiographic study DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine. *J. of Cell Biol.* 14: 1-17.
- Morales-Ramírez P., Vallarino-Kelly T. y Rodríguez-Reyes R. (1980): Analysis *in vivo* of sister chromatid exchange in mouse bone marrow and salivary gland cells. *Mutation Res.* 74: 61-69.
- Morales Ramírez P., Vallarino-Kelly, T. y Rodríguez-Reyes, R. (1983): Effect of BrdU and low doses of gamma radiation on sister chromatid exchange, chromosome breaks and

- mitotic delay in mouse bone-marrow cells *in vivo*. Environ. Mutagen. 5: 589-602.
- Morales-Ramírez P., Vallarino-Kelly T. y Rodríguez-Reyes R. (1984a): *In vivo* persistence of sister chromatid exchange (SCE) induced by gamma rays in mouse bone marrow cells. Environ. Mutagen. 6: 529-537.
- Morales-Ramírez P., Vallarino-Kelly T. y Rodríguez-Reyes, R. (1984b): Detection of SCE in rodent cells using the activated charcoal bromodeoxyuridine system. Basic Life Sci. 29: 599-611.
- Morales-Ramírez P., Rodríguez-Reyes R. y Vallarino-Kelly T. (1987): Analysis of spontaneous sister-chromatid exchanges *in vivo* by three way differentiation. Mutation Res. 178:49-56.
- Morales-Ramírez P., Vallarino-Kelly T. y Rodríguez-Reyes R. (1988): Occurrence *in vivo* of sister chromatid exchanges at the same locus in successive cell divisions caused by non-repairable lesions induced by gamma rays. Environ. Molec. Mutagen. 11: 183-193.
- Morales-Ramírez P., Mendiola-Cruz, M.T. y Vallarino-Kelly T. (1989): Optimización de la técnica para el análisis de intercambios en las cromátidas hermanas en espermatogonias de ratón *in vivo*. Informe Técnico-Científico ININ. Radiobiol. 89-06. 17pp.
- Morales-Ramírez P. y García-Rodríguez M.C. (1994): *In vivo* effect of chlorophyllin on gamma ray-induced sister chromatid exchange in murine bone marrow cells. Mutation Res. 320: 329-334.
- Morales-Ramírez P., Mendiola-Cruz M.T., Vallarino-Kelly T. y Rodríguez-Reyes R. (1994): Comparison of sister chromatid exchange induction in murine germinal and somatic cells by gamma radiation exposure *in vivo*. Environ. Molec. Mutagen. (En prensa).
- Morita K., Hara M. y Kada T. (1978): Studies on natural desmutagens screening for vegetables and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from amino acids. Agric. Biol. Chem. 42: 1235-1238.
- Murray D., Altshuler E., Kerr M., vanAnkeren S., Meyn R. y Milas L. (1988a): Radioprotection of cultured Chinese hamster ovary cells by WR-255591. Int. J. Radiat. Biol. 54(2): 269-283.
- Murray D., vanAnkeren C., Milas L. y Meyn R. (1988b): Radioprotective action of WR-1065

on radiation-induced DNA strand breaks in cultured Chinese hamster ovary cells. *Radiation Res.* 113: 155-170.

- Murray D., Prager A., vanAnkeren S., Altschuler E., Kerr M., Terry N. y Milas L. (1990): Comparative effect of the thiols dithiothreitol, cysteamine and WR-151326 on survival and on the induction of DNA damage in cultured Chinese hamster ovary cells exposed to γ -radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 58(1): 71-91.
- Nakanishi Y. y Schneider E. (1979): *In vivo* sister chromatid exchange: a sensitive measure of DNA damage. *Mutation Res.* 60: 329-337.
- Nasjleti E. y Spencer H. (1969): Chromosome damage after treatment with cysteamine in non irradiated human leukocytes. *J. Nucl. Med.* 10: 495-500.
- Negishi T., Arimoto S., Nishizaki Ch. y Hayatsu H. (1989): Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2). *Carcinogenesis* 10: 145-149.
- Newmark H. (1987): Plant phenolics as inhibitors of mutational and precarcinogenic events. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65: 461-466.
- Nomura T. (1988): X-ray and chemical induced germ-line mutation causing phenotypical anomalies in mice. *Mutation Res.* 198: 309-320.
- Oda T., Yokono O., Yoshida A., Miyake K. e Iino, A. (1971): On the successful treatment of pancreatitis with chlorophyll-a and inhibitory effects of its derivatives on trypsin and other protease activities *in vitro*. *Gastroenterol. Japonica* 6: 49-54.
- Ong T., Whong W., Stewart J. y Brockman H. (1986): Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. *Mutation Res.* 173: 111-115.
- Ong T., Whong W., Stewart J. y Brockman H. (1989): Comparative antimutagenicity of 5 compounds against 5 mutagenic complex mixtures in *Salmonella typhimurium* strain TA98. *Mutation Res.* 222: 19-25.
- Ong T., Brockman H. y Whong W. (1994): Chlorophyllin: An antigenotoxic agent.(en prensa).
- Oster G., Broyde S. y Bellin J. (1964): Spectral properties of chlorophyllin a. *J. Am. Chem. Soc.* 86: 1309-1313.
- Painter R. y Morgan W. (1983): SCE induced by ionizing radiation are not the result of exchanges between homologous chromosomes. *Mutation Res.* 121: 205-210.

- Palitti F., Tanzarella C., Cozzi R., Ricordy R., Vitagliano E. y Fiore M. (1982): Comparison of the frequencies of SCE induced by chemical mutagens in mouse bone-marrow, spleen and spermatogonial cells of mice. *Mutation Res.* 103: 191-195.
- Parson B., Schulte-Frohlinde, D. y von Sonntag C. (1978): Reaction of Br₃ with 2-deoxy-d-ribose. A preferred attack at C-1. *Z. Naturforsch* 33b: 666-668.
- Pera F. y Mattias P. (1976): Labelling of DNA and differential sister chromatid staining after BrdU treatment *in vivo*. *Chromosoma* 37: 13-18.
- Perry P. y Wolff S. (1974): A new Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251: 156-158.
- Perry P. y Evans H. (1975): Cytological detection of mutagen carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 258: 121-125.
- Pinon-Lataillade G., Viguier-Martinez M., Touzalin A., Maas J. y Jégou B. (1991): Effect of an acute exposure of rat testes to gamma rays on germ cells and on Sertoli and Leydig cell functions. *Reprod. Nutr. Dev.* 31: 617-629.
- Pitra C., Hartwing M. y Korner J. (1977): Radioprotective action of cysteamine: primary DNA lesions, cell survival and mutation frequency. *Stud. Biophys.* 62: 31-43.
- Pizzarello D. (1982): *Radiation Biology*. CRC Press. Florida, EUA. 298 pp.
- Pomerantseva M. y Vilkina G. (1974): Influence of cysteamine on the yield of dominant lethal mutations and reciprocal translocations in germ cells of mice subjected to gamma irradiation at various doses. *Genetika* 10: 55-61.
- Pomerantseva M., Goloshchapov P., Vilkina G. y Shevchenko V. (1984): Genetic effect of chronic exposure of male mice to γ -rays. *Mutation Res.* 141: 195-200.
- Pomerantseva M. y Ramaija L. (1984): Chemical protection against genetic effect of radiation in male mice. *Mutation Res.* 140: 131-135.
- Pryor W. (1986): Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Ann. Rev. Physiol.* 48: 657-667.
- Rathenberg R. (1975): Cytogenetic effects of cyclophosphamide on mouse spermatogonia. *Humangenetik* 29: 135-140.
- Renault G., Gentil A. y Chouroulinkov I. (1982): Kinetics of induction of sister-chromatid exchanges by X-rays through two cell cycles. *Mutation Res.* 94: 359-368.

- Ren-Li W., Yong-bu T. y Zhong-shu Z. (1988): Gossypol acetate-induced SCEs in spermatogonia and bone marrow cells of mice: dose-response relationships. *Contraception* 37: 191-195.
- Renner H. (1985): Anticlastogenic effect of β -carotene in Chinese hamsters: time and dose response studies with different mutagens. *Mutation Res.* 144: 251-256.
- Renner H. (1990): *In vivo* effects of single or combined dietary antimutagens on mutagen-induced chromosomal aberrations. *Mutation Res.* 244: 185-188.
- Robins E. y Nelson R. (1989): Inhibition of 1,2-Dimethylhydrazine-induced nuclear damage in rat colonic epithelium by chlorophyllin. *Anticancer* 9: 981-986.
- Rodríguez-Arnaiz R. y Zimmering S. (1989): Chlorophyllin is an antimutagen in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 14 (suppl. 15): 165.
- Roots R. y Okada S. (1972): Protection of DNA molecules of cultured mammalian cells from radiation-induced single-strand scissions by various alcohols and SH compounds. *Int. J. Radiat. Biol.* 21: 329-342.
- Rugh R. y Wolff J. (1957): Evidence of some chemical protection of the mouse ovary against X-irradiation sterilization. *Radiat. Res.* 7: 184-189.
- Russell L. (1990): Barriers to entry of substances into seminiferous tubules: compatibility of morphological and physiological evidence. En: Allen W., Bridges B., Lyon M., Moses M. and Russell L. (eds) "Biology of Mammalian Germ Cell Mutagenesis" Cold Spring Harbor Lab. Press. 3-17.
- Sanders Ch. y Kathren R. (1983): Ionizing Radiation. Tumorigenic and Tumoricidal Effects. Battelle Press. Nueva York, EUA. 335 pp.
- Sarkovic N. y Pecevski J. (1974): The effects of cysteamine and AET Cl HCl on the induction of meiotic chromosome rearrangements in irradiated male mice. *Can. J. Genet. Cytol.* 16: 85-89.
- Sasaki M. y Matsubara S. (1977): Free radical scavenging in protection of human lymphocytes against chromosome aberration formation by gamma ray-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 32: 439-445.
- Sato F., Shikita M. y Terosima F. (1970): Gradual development of radioprotection in HeLa S₃ cells during treatment with mercapto ethylguanidine. *Radiation Res.* 44: 660-669.
- Sato M., Imai K., Kimura R. y Murata T. (1984): Effects of sodium copper chlorophyllin on

- lipid peroxidation. VI. Effect of its administration on mitochondrial and microsomal lipid peroxidation in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* 32: 716-722.
- Schneider E., Chaillet J. y Tice R. (1976): In vivo BrdU labelling of mammalian chromosomes. *Exp. Cell Res.* 100: 396-399.
- Schvartzman J. y Gutiérrez C. (1980): The relationship between the cell time available for repair and the effectiveness of a damaging treatment in provoking the formation of sister-chromatid exchanges. *Mutation Res.* 72: 483-489.
- Searle A., Beechey C., Evans E., Ford C. y Papworth D. (1971): Studies on the induction of translocations in mouse spermatogonia. IV: Effects of acute gamma-irradiation. *Mutat. Res.* 12: 411-416.
- Selman J. (1983): *Elements of Radiobiology.* Charles C. Thomas Publisher. Springfield, EUA. 311 p.
- Shankel D, Hartman P., Kada T. y Hollaender A. (1987): Synopsis of the first international conference on antimutagenesis and anticarcinogenesis: Mechanisms. 9: 87-103.
- Simic M. (1988): Mechanism of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Res.* 202: 377-386.
- Smith L. y Sano M. (1944): Chlorophyll: an experimental study of its water-soluble derivatives. IV. The effect of water-soluble chlorophyll derivatives and other agents upon the growth of fibroblast in tissue culture. *J. Lab. Clin. Med.* 29: 241-246.
- Solomon E. y Bobrow M. (1975): Sister chromatid exchanges: a sensitive assay of agents damaging human chromosomes. *Mutation Res.* 30: 273-278.
- Speit G. y Vogel W. (1982): The effect of sulphhydryl compounds on sister-chromatid exchanges. II. The question of cell specificity and the role of H₂O₂. *Mutation Res.* 93: 175-183.
- Tates A. y Natarajan A. (1976): A correlative study on the genetic damage induced by chemical mutagens in bone marrow and spermatogonia of mice. I. CNU-ethanol. *Mutation Res.* 37: 267-278.
- Taylor H. (1958): Sister chromatid exchange in tritium labelled chromosomes. *Genetics* 43: 515-529.
- Terwel L. y van der Hoeven J. (1985): Antimutagenic activity of some naturally occurring compounds towards cigarette-smoke condensate and benzo[a]pyrene in the

Salmonella microsome assay. Mutation Res. 152: 1-4.

Tobari I., Matsuda Y., Xiaohung G., Yamagiwa J., Utsugi T., Kitazume M. y Okamoto M. (1988): Dose-response relationship for translocation induction in spermatogonia of the crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*) by chronic γ -ray-irradiation. Mutation Res. 201: 81-87.

Troll W. y Weisner R. (1985): The role of oxygen radicals as a possible mechanism of tumor promotion. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 25: 509-528.

Ugla A. y Natarajan A. (1983): X-ray-induced and chromosomal aberrations in CHO cells. Influence of nitrogen and air during irradiation in different stages of the cell cycle. Mutation Res. 122: 192-200.

van Alphen M. y De Rooij D. (1986): Depletion of the seminiferous epithelium of the rhesus monkey, *Macaca mulatta*, after X-irradiation. Br. J. Cancer 53 (suppl. VII): 102-104.

van Alphen M., van de Kant H. y De Rooij D. (1988): Depletion of the spermatogonia from the seminiferous epithelium of the rhesus monkey after X irradiation. Radiation Res. 113: 473-486.

van Alphen M., van de Kant H. y De Rooij D. (1989a): Protection from radiation-induced damage of spermatogenesis in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) by follicle-stimulating hormone. Cancer Res. 49: 533-536.

van Alphen M., van de Kant H., Davids J., Warmer C., Bootsma A. y De Rooij, D. (1989b): Dose-response studies on the spermatogonial stem cells of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) after X irradiation. Radiation Res. 119: 443-451.

van Buul P. (1976): A comparative study of the frequencies of radiation-induced chromosome aberrations in somatic and germ cells of the rhesus monkey. Mutation Res. 36: 223-236.

van Buul P. y Léonard A. (1984): Effects of unequally fractionated X-ray exposures on the induction of chromosomal rearrangements in mouse spermatogonia. Mutation Res. 127: 65-72.

van Buul P., Richardson J. y Goudzwaard J. (1986): The induction of reciprocal translocations in rhesus monkey stem-cell spermatogonia: effects of low doses and low dose rates. Radiation Res. 105: 1-7.

van Buul P. (1991): X-ray induced translocations in premeiotic germ cells of monkeys.

- Venega-Carrillo H. (1989): Least squares for different experimental cases. Rev. Mex. Fis. 35: 597-602.
- Vergroesen A., Budke L. y Vos O. (1967): Protection against X-irradiation by sulphhydryl compounds. II. Studies on the relation between chemical structure and activity for tissue culture cells. Int. J. Radiat. Res. 13(1): 77-92.
- von Sonntag C. (1987): The Chemical Basis of Radiation Biology. Taylor & Francis Printers. Londres, Gran Bretaña. 515 pp.
- Warner J., Nath J. y Ong, T. (1991): Antimutagenicity studies of chlorophyllin using the *Salmonella* arabinose-resistant assay system. Mutation Res. 242: 25-30.
- Wolff S., Bodycote J. y Painter R. (1974): Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by UV irradiation of different stages of the cell cycle: The necessity for cells to pass through S. Mutation Res. 25: 73-81.
- Yamamoto K. y Kikuchi Y. (1978): A new method for the preparation of mammalian chromosomes. Mutation Res. 52: 207-209.
- Young R. y Beregi J. (1980): Use of chlorophyllin in the care of geriatric patients. J. Am. Geriatrics Soc. 28: 46-47.
- Yu K. y Sinclair K. (1970): Protection by cysteamine against mitotic delay and chromosomal aberrations by X-ray in synchronized Chinese hamster cells. Radiation Res. 43:357-371.
- Yuhas M. y Yurconic M. (1977): Combined use of radioprotective and radiosensitizing drugs in experimental radiotherapy. Radiation Res. 70: 433-443.
- Zimmering S., Olvera O., Hernández M., Cruces M., Arceo M. y Pimentel P. (1990): Evidence for a radioprotective effect of chlorophyllin in *Drosophila*. Mutation Res. 245: 47-49.

Comparison of Sister Chromatid Exchange Induction in Murine Germinal and Somatic Cells by Gamma Radiation Exposure *In Vivo*

P. Morales-Ramírez, M.T. Mendiola-Cruz, T. Vallarino-Kelly, and R. Rodríguez-Reyes

Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Lomas Barrilaco, México, D.F., México

Sister chromatid exchange (SCE) induction by gamma rays was determined in spermatogonia irradiated before or after BrdU incorporation. Furthermore, the comparison of responses obtained in spermatogonia, bone marrow and salivary gland cells was carried out in the cells irradiated after BrdU incorporation, a condition which permits a higher SCE induction. Results indicate that gamma ray exposure of spermatogonia could induce a significant increase in SCE frequency with doses as low as 0.27 Gy,

either before or after BrdU incorporation. However, the increase caused by radiation exposure after BrdU incorporation in spermatogonia was nearly three times lower than that obtained in both bone marrow and salivary gland cells. These data suggest that spermatogonia are either more efficient in repairing the gamma ray-induced lesions involved in SCE production or that these cells are less prone to the induction of such lesions. © 1994 Wiley-Liss, Inc.

Key words: SCE, gamma ray, spermatogonia, bone marrow cell, salivary gland cell

AU: SEE QUERY
MS, PG. 708

INTRODUCTION

The mechanism of formation and the biological significance of sister chromatid exchange (SCE) have not been established; however, experimental evidence indicates that this phenomenon occurs during DNA duplication [Wolff et al., 1974; Kato, 1980], and that it is stimulated by agents that damage DNA [MacRae et al., 1979; Schwartzman and Gutiérrez, 1980; Nagasawa et al., 1982], or by agents that inhibit DNA synthesis [Ishii and Bender, 1980; Nishi et al., 1982]. The DNA damage eliciting SCE is not known, but different possible causes have been proposed [Carrano et al., 1979; Cassel and Latt, 1980; Kano and Fujiwara, 1982; Ishii, 1981]. However, many lines of evidence also suggest that DNA breaks are not involved [Fornace et al., 1980; Kinsella and Radman, 1980; MacRae et al., 1979; Morales-Ramírez et al., 1983; Shimaiishi and Sandberg, 1979].

There is consistent evidence demonstrating that spermatogonia show a lower response to SCE induction by chemical mutagens [Allen et al., 1978; King et al., 1982; Palfitt et al., 1982], a fact which may be explained by the presence of physiological barriers that limit the movement of substances toward the germinal cells [Russell, 1990], by a higher efficiency in repair, or by lower cell-specific zones in the genome in which SCE could occur.

Ionizing radiation efficiently induces SCE in cells irradiated after BrdU incorporation [Abramovsky et al., 1978; Anderson et al., 1981; Morales-Ramírez et al., 1983, 1984; Perry and Evans, 1975]; nevertheless, many results indicate that ionizing radiation also induces SCE in BrdU-unsaturated cells [Chao and Rosenstein, 1984; Fornace

et al., 1980; Morales-Ramírez et al., 1984a; Nakanishi and Schneider, 1979; Renault et al., 1982; Uggla and Natarajan, 1983].

Because physiological barriers cannot shield spermatogonia from gamma ray exposure, the aim of the present study was to discern the role of these barriers on the lower sensitivity of spermatogonia to chemical SCE induction by: (1) determining the effect of gamma rays on the induction of SCE in murine spermatogonia, and (2) comparing this response with that obtained in bone marrow and salivary gland cells under similar conditions.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Two- to three-month-old BALB/c male mice, weighing about 30 g, were used in the experiment. The animals, bred in our laboratory, were kept in plastic cages under controlled temperature and dark-light conditions, and fed Purina Laboratory Chow and water ad libitum.

Protocols

Spermatogonia

Animals were injected intraperitoneally (i.p.) with a BrdU-clarcoal aqueous suspension (0.4 mg of BrdU/g of body weight) at the beginning of the experiment [Morales-Ramírez et al., 1984b]. Fifty-two hours later they

Received November 6, 1993; revised and accepted February 21, 1994.

Address reprint requests to Dr. P. Morales-Ramírez, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Sierra Mojada 447 2° Piso, Lomas Barrilaco, CP 11010, México, D.F., México.

2 Morales-Ramirez et al.

were injected i.p. with colchicine (7.5 µg/g of body weight) and sacrificed by cervical dislocation 3 hr later.

Salivary Gland Cells

Timing of the protocol was based on previous studies of sister chromatid exchange determination in salivary gland cells in vivo [Morales-Ramirez, 1980; Morales-Ramirez et al., 1984b]. The protocol begins with the stimulation of salivary gland cell division in vivo by injecting the animals either i.p. with 0.3 mg/g of body weight, or locally with 0.15 mg/g of body weight of isoproterenol (Sigma, St. Louis, MO) [Barka, 1965; Biscera, 1970]. Fourteen hours later, when the cells were undergoing DNA synthesis [Morales-Ramirez, 1980; Morales-Ramirez et al., 1984b], the animals were injected i.p. with an aqueous suspension of BrdU adsorbed to activated charcoal of 200 mesh [Morales-Ramirez et al., 1988] at a dose of 0.5 mg BrdU/g of body weight [Morales-Ramirez, 1980]. Forty-eight hours after the first isoproterenol injection (following the first cell division), a second injection was administered. Finally, the animals were injected i.p. with an aqueous solution of colchicine (1.5 µg/g of body weight) 28 hr after the second stimulation with isoproterenol, and sacrificed 3 hr later by cervical dislocation.

Bone Marrow Cells

For differential staining of sister chromatids in bone marrow cells, mice were injected i.p. with 1.0 mg BrdU/g of body weight adsorbed to charcoal at the beginning of the experiment, irradiated 12 hr later, injected with colchicine 22 hr after BrdU administration, and sacrificed by cervical dislocation 2 hr later.

For all cell types, harvest times represent the times in which a higher frequency of differentially stained second division metaphases can be obtained, in accordance with previous studies [Morales-Ramirez, 1980; Morales-Ramirez et al., 1984b; Kanda and Kato, 1979].

BrdU Administration

Considering the difficulties in measuring the actual BrdU incorporation in the cells in which the SCE was measured, and that BrdU could cause SCE, the BrdU dose and timing were first standardized in each cell system to allow clear differential staining of most of the cells and the lower SCE frequency. Under such conditions, BrdU is assumed to have no effect on cell cycle or SCE frequency. Besides, there is evidence in bone marrow cells of a long range of BrdU doses in which the basal SCE frequency is constant [Tice et al., 1976]. In murine spermatogonia, Kanda and Kato [1979] reported no differences in SCE/basal frequency after using different doses of BrdU (adsorbed to charcoal) that were lower and higher than used in the present study.

Irradiation

All cell types were irradiated in vivo after one cell division in the presence of BrdU. Spermatogonia were also irradiated before BrdU administration. Irradiation was performed using gamma rays (⁶⁰Co Vack Rad).

Salivary Gland Cells

The animals were irradiated at a dose rate of approximately 5.4 Gy/min, 14 hr after the second injection of isoproterenol; this time corresponds to late G1 of the second division [Morales-Ramirez et al., 1984b]. During irradiation, the animals were introduced up to the neck in a Pb cylinder to immobilize them and to control the salivary gland exposure.

Bone Marrow Cell

For measuring SCE induction in bone marrow, the mice were whole-body irradiated 12 hr after the BrdU injection.

Spermatogonia

Experimental animals were whole-body irradiated either 1 hr before, or 26 hr after BrdU administration. The dose rate was approximately 2.6 Gy/min.

Metaphase Preparations

Salivary Gland Cells

The salivary glands were dissected, cleaned of ganglia and adipose tissue, and minced with scissors in phosphate-buffered saline (PBS). The fragments were subjected to hypotonic treatment with 0.075 M KCl, 15 min, at 37°C; fixed with three 15 min changes each in a 3:1 methanol-acetic acid solution; and stored at 4°C for at least 18 hr. The tissue fragments were dissociated in a drop of 60% acetic acid on a slide, and briefly heated on a hot plate. The cells were dispersed on the slide by moving and beating the drop along the slide until it was completely dry.

Bone Marrow Cells

Cells were harvested and the slides were prepared following previously reported methods [Morales-Ramirez et al., 1984b].

Spermatogonia

The chromosome preparations were obtained through tissue dispersion with trypsin (Difco) as reported by Yamamoto and Kikuchi [1978].

Differential Staining of Sister Chromatids

The differential staining of sister chromatids was achieved by the fluorescence plus Giemsa method [Perry and Wolff, 1974], slightly modified [Goto et al., 1975].

SCE Scoring

The method used to obtain the metaphase figures in salivary gland cells does not always allow conservation of the full chromosome complement, and furthermore, approximately 10% of the cells are tetraploid [Morales-Ramirez et al., 1984b]. Therefore the SCEs were scored by analyzing 1,200 chromosomes per mouse, equivalent to 30 cells. The lowest number of chromosomes scored per cell was fifteen.

In bone marrow cells and spermatogonia, 30 well-differentially stained metaphases were scored per animal in at least 3 mice.

Each experiment in spermatogonia was repeated once, with at least 2 control and 3 experimental mice. Bone marrow results represent two experiments with 5 control and 5 experimental mice. Salivary gland data are from two experiments. Because radiation has some inhibitory effect on the induction of cell division by isoproterenol [Sasaki and Toda, 1972], only experimental mice that did show enough material for easy SCE scoring were considered. The results of the repeat tests were grouped because there were no statistical differences between them ($P < 0.05$, Student's *t* test).

To establish the statistical significance between control and experimental groups, the Student's *t* test was applied. The titling of data to a straight line was made by a weighted least squares method that takes variance into account [Vega-Carmillo, 1987].

RESULTS

SCE Induction by Gamma Rays in Spermatogonia

As shown in Table I, gamma radiation induced SCE in a dose-dependent way before BrdU incorporation. At the lower dose (0.27 Gy), a significant increase in SCE/cell was observed; the relationship to dosage is proportional as

AU: SEE QUERY
 MS. PG. 7/3

AU: SEE QUERY
 MS. PG. 7/3

TABLE I. In Vivo Effect of Gamma Ray Dose on SCE Frequency in Murine Spermatogonia Exposed Before BrdU Incorporation

Dose (Gy)	SCE/cell $\bar{x} \pm SD$	Increase T-C ^a	SCE/Gy	N ^b
0.00	1.4 ± 0.1	—	—	11
0.27	1.9 ± 0.2*	0.5	1.9	4
0.49	2.0 ± 0.2*	0.6	1.2	4
1.00	2.4 ± 0.2*	1.0	1.0	3

^aT-C, treated minus control.

^bN, number of animals per group. Thirty cells scored per animal.

*Significant increase with respect to the control; $P < 0.01$ Student's *t* test.

TABLE II. In Vivo Effect of Gamma Ray Dose on SCE Frequency in Murine Spermatogonia Exposed After BrdU Incorporation

Dose (Gy)	SCE/cell $\bar{x} \pm SD$	Increase (T-C) ^a	SCE/Gy	N ^b
0.00	1.6 ± 0.2	0.0	—	19
0.15	1.9 ± 0.3*	0.3	2.0	6
0.27	2.6 ± 0.5*	1.0	3.7	4
0.41	2.9 ± 0.4*	1.3	3.1	8
0.83	3.5 ± 0.7*	1.9	2.2	4

^aT-C, treated minus control.

^bN, number of animals per group. Thirty cells scored per animal.

*Significant increase with respect to the control; $P < 0.01$ Student's *t* test.

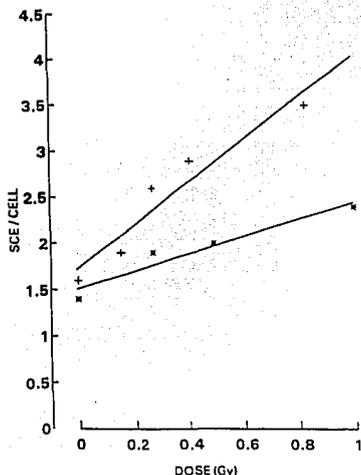


Fig. 1. Induction of SCE by different doses of gamma rays in murine spermatogonia in vivo before (*) and after (+) BrdU incorporation to DNA.

shown in Figure 1. This relationship is described by the linear equation $Y = 0.99x + 1.47$ obtained by least squares, which has a correlation coefficient $r = 0.93$.

The SCE induction by radiation increased substantially when spermatogonia were exposed after BrdU incorporation, as shown in Table II. The dose response curve obtained by least squares is described by $Y = 2.5x + 1.65$, and fits a correlation coefficient of 0.92 (Fig. 1).

The response observed by analyzing the SCE frequency per cell in each animal is also reflected in the pooled cell populations when the cumulative frequency in percentage versus SCE/cell is plotted. The curves have a behavior similar to that previously reported for radiation and other muta-

gens; also, as the dose increases the curves displace toward higher SCE values (Fig. 2A and B). The sensitization to SCE induction by gamma rays due to BrdU incorporation can be analyzed comparing these curves. For example, the cells of the group irradiated with 1.0 Gy before BrdU administration (Fig. 2A) showed that approximately 50% of the cells have SCE frequencies greater than 2.0, while 70% of the cells have the same SCE frequencies in the curve of animals exposed to 0.8 Gy after BrdU incorporation (Fig. 2B).

Comparison of SCE Induction in Spermatogonia, Bone Marrow and Salivary Gland Cells

Table III shows the results obtained by radiation exposure of spermatogonia, bone marrow, or salivary gland cells with BrdU-unifilarly substituted DNA. The latter condition determines a higher response to radiation as was observed earlier (Fig. 1). Both the basal and the induced SCE frequencies are substantially lower in spermatogonia. The frequency of SCEs induced per Gy in spermatogonia is almost three times lower than that attained in bone marrow and salivary gland cells. However, the rates of the radiation-induced SCE in relation to their respective basal frequencies are similar in all the cell types.

DISCUSSION

SCE is an interesting index of ionizing-radiation-induced damage, because it seems to represent a different kind of DNA damage from that expressed as chromosome breaks or micronuclei, i.e., base damage, adducts or cross-links [Carrano et al., 1979; Cassel and Latt, 1980; Ishii, 1981; Kano and Fujiwara, 1981; Sahar et al., 1981; Uggla and Natanson, 1983]. It was initially postulated that the ability of ionizing radiation to induce SCE was related to whether or not the cells were irradiated after BrdU incorporation [Morales-Ramirez et al., 1984a; Painter and Morgan, 1983]; nevertheless, results in the present study as well as in others, indicate that ionizing radiation induces SCE in BrdU-unsubstituted cells [Chao and Resenstein, 1984; Fornace et al.,

4 Morales-Ramirez et al.

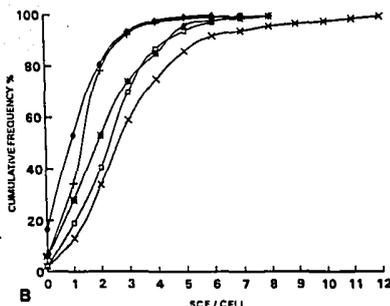
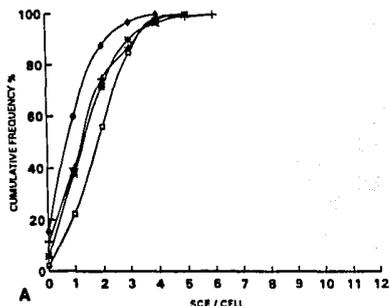


Fig. 2. Cumulative frequency of cells with respect to the number of SCE per cell in spermatogonia from mice irradiated with 0 (●), 0.27 (+), 0.49 (*) y 1.0 (□) Gy of gamma rays before (A), or with 0 (●), 0.15 (+), 0.27 (*), 0.41 (□) y 0.83 (x) Gy of gamma rays after (B) BrdU incorporation to DNA.

TABLE III. In Vivo SCE Induction by Gamma Rays (⁶⁰Co) in Murine Spermatogonia, Bone Marrow and Salivary Gland Cells Irradiated After BrdU Incorporation

Cells	Dose (Gy)	SCE/cell x ± SD	SCEB/SCEc ^a	SCE/Gy	SCEB/SCEc	N
SP.	0.00	1.6 ± 0.3				5
	0.41	2.9 ± 0.3*	1.3	3.2	1.8	8
B.M.	0.00	4.1 ± 0.5				10
	0.36	7.3 ± 0.7*	3.2	8.8	1.8	10
S.G.	0.00	5.4 ± 0.8				12
	0.38	8.6 ± 1.5*	3.2	8.4	1.6	5

*Significant difference with respect to their nonirradiated controls, P < 0.01 Student's t test.

^aSCE_B: Induced SCE; SCE_c: control SCE.

1980; Morales-Ramirez et al., 1984a; Nakanishi and Schneider, 1979; Renault et al., 1982; Ugglia and Natarajan, 1983].

Although the efficiency of radiation to induce SCEs has been considered to be low, it seems that two different concepts confound this affirmation. One is the capacity of radiation to induce SCE, and the other is the possibility of determining such induction. With regard to the first concept, it must be mentioned that the lesion involved in SCE production is more efficiently induced by ionizing radiation than that involved in chromosome aberrations, compared in terms of events per cell [Morales-Ramirez et al., 1983]. In a previous study, the authors reached the opposite conclusion, but this was done comparing SCE/cell versus CA/100 cells [Ugglia and Natarajan, 1983]. In relation to the SCE determination, the increase induced by 0.27 Gy of gamma rays in spermatogonia (Table I) with respect to the basal value is relatively small (30%), but significant and reproducible. The difficulty in detecting small increases in SCE per cell lies in its relative high basal frequency (3.4 SCE/cell) as

compared to that of micronuclei and chromosome aberrations (equal to or less than 0.01/cell). An additional problem is that high radiation doses (more than 1.0 Gy) cause side effects such as cell cycle delay, cell death, etc., which reduce the number of scorable cells for SCE.

There is consistent evidence demonstrating that spermatogonia show lower response to SCE induction by chemical mutagens [Allen et al., 1978; King et al., 1982; Palitti et al., 1982]. This could be explained by a higher repair capacity, by a lower cell-specific inducibility of damage involved in SCE, or by the presence of physiological barriers that limit the movement of substances toward the germinal cells [Russell, 1990]. Because these barriers cannot shield spermatogonia from gamma ray exposure, it was possible to infer the role of such barriers on the low sensitivity of these cells to SCE induction by determining the effect in murine spermatogonia, and comparing this response with that obtained in bone marrow and salivary gland cells. This was done under conditions that permit a higher SCE induction, namely BrdU-substituted DNA.

The rate of SCE induction attained in spermatogonia in the present work was lower than that obtained both before [Morales-Ramirez et al., 1984a] and after [Morales-Ramirez et al., 1983] BrdU incorporation in murine bone marrow cells under similar experimental conditions. The rates of SCE induction in spermatogonia before and after BrdU incorporation were approximately 1.0 and 2.5 SCE/Gy, respectively, compared with the 2.5 and 8.4 SCE/Gy obtained previously in bone marrow cells [Morales-Ramirez et al., 1984a].

A lower SCE induction by exposure to ionizing radiation in spermatogonia with respect to bone marrow cells could be attributable to differences not necessarily related to the direct induction of damage eliciting SCE such as: BrdU incorporation, cell viability, or replication rate. Regarding the

AU: SEE QUERY
 MS. PG. 1740

SCE Induction In Vivo by gamma rays in Murine Cell Types 5

effect of BrdU incorporation, it is pertinent to mention that the SCE effect was also observed in spermatogonia irradiated before BrdU incorporation, indicating that cell type and not BrdU incorporation is responsible for the lower SCE induction. Lower SCE induction in spermatogonia might also be explained by a higher sensitivity of these cells in terms of viability, thus not permitting cells with greater numbers of lesions eliciting SCE to proliferate. However, the relationship between SCE induction and dose seems to be directly proportional (Fig. 1). This indicates that the rate of SCE induction was the same at high doses, in which the cell viability was substantially diminished. It was also suggested that the cell replication rate could cause differences in SCE frequencies; however, there is evidence that cell delay is not related to SCE frequency. Using the same protocol in bone marrow cells, it has previously been observed that a higher dose of radiation than used in the present study causes a 1.4 hr delay. When the cells are harvested 6 hr later, the delay increases 1.0 hr more; nevertheless, the SCE induction is the same at both harvest times [Morales-Ramirez et al., 1983]. This suggests that the cell cycle delay is not related to the SCE frequency.

The differences in SCE induction, in different cell types, could be explained by cell repair capacity or by the time available for repair, because the cell cycle duration in spermatogonia is approximately twice as long as that in bone marrow cells. However, in murine salivary gland cells and bone marrow cells in vivo, the responses were similar, even though the salivary gland cells have a cell cycle duration similar to that of spermatogonia. These SCE rates were estimated as a net increase above their respective basal SCE frequencies, which in spermatogonia is as low as 1.6 SCE/cell, compared with the 4.1 and the 5.4 SCE/cell in bone marrow cells and salivary gland cells, respectively.

The results obtained in the present study are consistent with earlier results indicating a lower response of spermatogonia to SCE induction by some chemical mutagens [Allen et al., 1978; King et al., 1982; Palitti et al., 1982], and a very low basal SCE frequency [Allen and Latt, 1976; King et al., 1982; Morales-Ramirez et al., 1984b]. These responses could be explained by the presence of barriers which restrict the movement of substances toward the microtubular lumen [Russell, 1990]. However, because the presence of such cell barriers did not shield spermatogonia from gamma ray exposure, the lower induction of SCE by gamma ray in spermatogonia could be due to a much higher efficiency in DNA damage repair.

The fact that SCE induction by gamma rays in terms of respective basal SCE frequencies is almost the same for bone marrow, spermatogonia and salivary gland cells (Table III), implies that under these circumstances a relationship may exist between basal and induced SCE frequencies. A possible explanation for this is that spermatogonia are less prone to SCE induction because of a smaller zone in the genome in which SCEs could occur, e.g., difference in the

size of euchromatic zones [Bostock and Christie, 1976; Carrano and Wolff, 1975; Carrano and Johnston, 1977; Crossen, 1983; Hsu and Pathak, 1976], or of zones which are actively transcribed. The latter is similar to the previously reported results which imply that zones of the genetic material that are being transcribed are preferentially repaired [Bohr et al., 1985]. Perhaps some condition could determine that basal and induced SCE frequencies depend on the length of DNA that is actively expressed in the different cell types.

Based on the evidence indicating that SCE occurs at the site of a lesion [Morales-Ramirez et al., 1990; Raitt et al., 1984], the previously mentioned alternative could explain the fact that rates of SCE per lesion are disproportionate. They vary from 1:200 for the treatment with Psoralen plus near UV [Sahar et al., 1981] to 1:20,000 for UV light [Reynolds et al., 1979], nitroxyprync, N-hydroxy-N'-acetylbenzidine and N-hydroxy-2-aminofluorene [Heflich et al., 1986], because only lesions induced in specific sites, such as euchromatic DNA [Bostock and Christie, 1976; Carrano and Wolff, 1975, 1977; Crossen, 1983; Hsu and Pathak, 1976] or in transcription zones, could result in SCE.

The results in the present work indicate that (1) gamma rays induce SCE in spermatogonia, (2) this induction was increased by BrdU incorporation prior to irradiation, and (3) spermatogonia are less prone to SCE induction by ionizing radiation than bone marrow and salivary gland cells under similar experimental conditions. The last result suggests that physiological barriers are not necessarily responsible for the lower sensitivity of spermatogonia to SCE induction by chemicals. This lower sensitivity may be due, instead, to a higher efficiency in repairing lesions which induce SCEs, or to a lower number of specific sites in which the SCEs could occur.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jorge Mercader Martínez, Angel Reyes Pozos, Perfecto Aguilar Vargas, Felipe Beltrán Bibiana, and Enrique Fernández Villavicencio for their excellent technical assistance; Dr. Enrique Camps, Ricardo Ondaar and Gerardo Anguiano for developing software with the statistics tests used in this article, Dr. Juan Azorín for dosimetry, and Rosa María Noriega for English correction.

REFERENCES

- Abramovsky I, Vossanger G, Hirschorn K (1978): Sister chromatid exchange induced by X-ray on human lymphocytes and the effect of L-cysteine. *Mutat Res* 50:93-100.
- Allen JW, Latt SA (1976): Analysis of sister chromatid exchange formation in vivo in mouse spermatogonia as a new test system for environmental mutagens. *Nature (London)* 260:449-451.
- Allen JW, Shuler CE, Latt SA (1978): Bromodeoxyuridine label methodology for in vivo studies and DNA synthesis. *Somat Cell Genet* 4:393-405.
- Andersson HC, Kihlman BA, Palitti F (1981): Production of sister-chrom-

AU: SEE QUERY MS. PG. 7/14

6 Morales-Ramirez et al.

- mutic exchanges by X-rays under aerobic and anaerobic conditions. *Hereditas* 94:41-44.
- Harka T (1965): Induced cell proliferation: The effect of isoproterenol. *Exp Cell Res* 37:662-679.
- Hasegawa R (1970): Induction of DNA synthesis by purified chemical compound. *Fed Proc* 29:1443-1446.
- Ikhr VA, Smith CA, Okumoto DS, Inanwalli PC (1985): DNA repair in an active gene: Removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* 40:359-369.
- Istock CJ, Christie S (1976): Analysis of the frequency of sister chromatid exchange in different regions of chromosome of the kangaroo rat (*Dipodomys ordii*). *Chromosoma* 56:275-287.
- Carrano AV, Johnston GK (1977): The distribution of mitomycin C induced sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of the Indian muntjac. *Chromosoma* 64:97-107.
- Carrano AV, Wolff S (1975): Distribution of sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of Indian muntjac. *Chromosoma* 53:361-369.
- Carrano AV, Thompson LH, Stelka DG, Minkler JL, Muzumdar JA, Fong S (1979): DNA crosslinking, sister-chromatid exchange and specific locus mutations. *Mutat Res* 63:175-188.
- Cassel DM, Litt SA (1980): Relationship between DNA adduct formation and sister chromatid exchange induction by 8-methoxy-psoralen in Chinese hamster ovary cells. *Exp Cell Res* 128:15-22.
- Chan CH-C, Rosenstein BS (1984): Inhibition of the U.V. induction of sister-chromatid exchanges in ICR-2A frog cells by pretreatment with γ -rays. *Mutat Res* 139:35-39.
- Crossen PE (1983): DNA replication and sister chromatid exchange in 9 qH⁺. *Cytogenet Cell Genet* 35:152-155.
- Fornace AJ Jr, Nagasawa H, Little JB (1980): Relationship of DNA repair in chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges and survival during liquid holding recovery in X-irradiated mammalian cells. *Mutat Res* 70:323-336.
- Goto K, Akematsu T, Shimazu S, Sugiyama T (1975): Simple differential Giemsa staining of sister chromatids after treatment with photoactive dyes and exposure to light and the mechanism of staining. *Chromosoma* 53:223-230.
- Heflich RH, Morris SM, Beranek DT, McCarthy J.J., Chen JJ, Beland FA (1986): Relationship between the DNA adducts and the mutations and sister-chromatid exchanges produced in Chinese hamster ovary cells by N-hydroxy-2-aminofluorene, N-hydroxy-N'-acetylbenzidine and 1-nitropyrene. *Mutagenesis* 1:201-206.
- Hsu TC, Pathak S (1976): Differential rates of sister chromatid exchanges between euchromatin and heterochromatin. *Chromosoma* 58:269-273.
- Ishi Y, Bender MA (1980): Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light-induced sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells. *Mutat Res* 79:19-32.
- Ishii Y (1981): Nature of the mitomycin C induced lesion causing sister chromatid exchange. *Mutat Res* 91:51-55.
- Kanda N, Kato H (1979): A simple technique for in vivo observation of SCE in mouse ascites tumor and spermatogonial cells. *Exp Cell Res* 118:431-434.
- Kano Y, Fujiwara Y (1981): Rates of DNA interstrand crosslinking and its repair in the induction of sister chromatid exchange and a higher induction in Fanconi's anemia cells. *Mutat Res* 81:365-375.
- Kano Y, Fujiwara Y (1982): Dyskeratosis congenita: Survival, sister-chromatid exchange and repair following treatments with crosslinking agents. *Mutat Res* 103:327-332.
- Kato H (1980): Evidence that the replication point is the site of sister chromatid exchange. *Cancer Genet Cytogenet* 2:69-77.
- King MT, Wild D, Gecke K, Eckhardt K (1982): 5-Fluorouracil tablets with improved depot effect for analysis in vivo of sister chromatid exchanges in bone-marrow and spermatogonial cells. *Mutat Res* 97:117-129.
- Kinsella AR, Hyman M (1980): Inhibition of carcinogen induced chromosome aberrations by an anticarcinogenic process inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:3544-3547.
- Litt SA (1973): Microfluorimetric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3395-3399.
- MacIne WP, Machinon FA, Stich HF (1979): The fate of U.V. induced lesions affecting SCEs, chromosome aberrations and survival of CHO cells arrested by deprivation of arginine. *Chromosoma* 72:15-22.
- Morales-Ramirez P (1980): Analysis in vivo of sister chromatid exchange in mouse bone marrow and salivary gland cells. *Mutat Res* 74:61-69.
- Morales-Ramirez P, Vallarino-Kelly T, Rodriguez-Reyes R (1983): Effects of BrdU and low doses of gamma radiation on sister chromatid exchange, chromosome breaks and mitotic delay in mouse bone-marrow cells in vivo. *Environ Mutagen* 5:589-602.
- Moniles-Lemirez P, Vallarino-Kelly T, Rodriguez-Reyes R (1984a): In vivo persistence of sister chromatid exchange (SCE) induced by gamma rays in mouse bone marrow cells. *Environ Mutagen* 6:529-537.
- Moniles-Lemirez P, Vallarino-Kelly T, Rodriguez-Reyes R (1984b): Detection of SCEs in rodent cells using the activated charcoal bromodeoxyuridine system. *Basic Life Sci* 29:599-611.
- Morales-Ramirez P, Vallarino-Kelly T, Rodriguez-Reyes R (1986): Occurrence in vivo of sister chromatid exchanges at the same locus in successive cell divisions caused by non-repairable lesions induced by gamma rays. *Environ Molec Mutagen* 11:183-193.
- Morales-Ramirez P, Rodriguez-Reyes R, Vallarino-Kelly T (1990): Fate of DNA lesions that elicit sister-chromatid exchanges. *Mutat Res* 232:77-88.
- Nagasawa H, Fornace MA, Ritter MA, Little JB (1982): Relationship of enhanced survival during confluent holding recovery in ultraviolet-irradiated human and mouse cells to chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, and DNA repair. *Radiat Res* 92:483-496.
- Nakanishi Y, Schneider EL (1979): In vivo sister chromatid exchange: A sensitive measure of DNA damage. *Mutat Res* 60:329-337.
- Nishi Y, Hasegawa MM, Inui M, Ikegami S, Yamada M-A (1982): Effect of post-treatment with aphidicolin: a specific inhibitor of DNA polymerase α —on sister-chromatid exchange induced by ethyl methanesulfonate. *Mutat Res* 103:155-159.
- Painter RB, Morgan WF (1983): SCEs induced by ionizing radiation are not the result of exchanges between homologous chromosomes. *Mutat Res* 121:205-210.
- Pallini E, Tinanzelli C, Casati R, Ricceri R, Viagliano E, Fiore M (1982): Comparison of the frequencies of SCEs induced by chemical mutagens in mouse bone-marrow, spleen and spermatogonial cells of mice. *Mutat Res* 103:191-195.
- Perry P, Swins HJ (1975): Cytological detection of mutagen carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 258:121-125.
- Perry P, Wolff S (1974): A new Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251:156-158.
- Reith M, Cremer T, Cremer C, Speit G (1984): Sister chromatid exchange (SCE) induced by laser-FW-microirradiation: Correlation between the distribution of photolabels and the distribution of SCEs. In: *The Rik I. Kollender A (eds): "Sister Chromatid Exchange."* New York: Plenum Press, pp 181-197.
- Renault G, Gentil A, Choumoulinow I (1982): Kinetics of induction of sister-chromatid exchanges by x rays during two cell cycles. *Mutat Res* 94:359-368.
- Reynolds RL, Natarajan AE, Ishman PM (1979): *Mycroascus luteus* U.V. endonuclease sensitive sites and sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 64:353-356.

SCE Induction In Vivo by gamma rays in Murine Cell Types 7

- Russell LB (1990): Barriers to entry of substances into seminiferous tubules: Compatibility of morphological and physiological evidence. In Allen JW, Bridges BA, Lyon MF, Moses MJ, Russell LB (eds): "Biology of Mammalian Germ Cell Mutagenesis." Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press, pp 3-17.
- Sahar E, Kittrel C, Fulghum S, Feld M, Jatt SA (1981): Sister chromatid exchange induction in Chinese hamster ovary cells by 8-methoxypsoralen and brief pulses of laser light. *Mutat Res* 83:91-105.
- Sasaki T, Ueda M (1972): Effect of irradiation on mouse salivary gland during the preproliferative phase of isoproterenol-stimulated DNA synthesis. *Cancer Res* 32:2807-2812.
- Schwartzman JB, Gutierrez C (1980): The relationship between the cell time available for repair and the effectiveness of a damaging treatment in provoking the formation of sister-chromatid exchanges. *Mutat Res* 72:483-489.
- Shiraishi Y, Sandberg AA (1979): Effects of various chemical agents on sister-chromatid exchanges, chromosome aberrations and DNA repair in normal and abnormal human lymphoid cell lines. *J Natl Cancer Inst* 62:27-35.
- Tice R (1983): Demonstration of spontaneous sister chromatid exchange in vivo. *Exp Cell Res* 102:426-429.
- Ugla AJ, Natarajan AT (1983): X-ray-induced SCEs and chromosomal aberrations in CHO cells. Influence of nitrogen and air during irradiation in different stages of the cell cycle. *Mutat Res* 122:193-200.
- Vega-Carrillo HR (1989): Least squares for different experimental cases. *Rev Mex Fisica* 35:597-602.
- Wolff S, Bodycote J, Painter RB (1974): Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by UV irradiation of different stages of cell cycle: The necessity for cells to pass through S. *Mutat Res* 25:73-81.
- Yamamoto K, Kikuchi Y (1978): A new method for the preparation of mammalian chromosomes. *Mutat Res* 52:207-209.

Accepted by—
V. Dellarco