

00381



Universidad Nacional Autónoma de México

2
1 ef.
31

FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

EFFECTO DE LOS RAYOS GAMMA SOBRE LA INDUCCION Y
PERSISTENCIA DE INTERCAMBIOS ENTRE CROMATIDAS HER-
MANAS (ICH) Y OTROS EVENTOS CITOGENETICOS EN CELULAS
DE MEDULA OSEA DE RATON *in vivo*.

EJEMPLAR UNICO

T E S I S

Que para optar por el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P r e s e n t a

PEDRO ROSENDO MORALES RAMIREZ

~~2002~~
2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EXPRESO MI AGRADECIMIENTO AL DR. HORACIO MERCHANT -
LARIOS POR SU GUIA Y ESTIMULO PARA EL DESARROLLO DE ESTA TE-
SIS. A MI COLEGA BIOL. TERESITA VALLARINO KELLY POR SU IM-
PRESCINDIBLE COLABORACION; ASI COMO A LA AYUDA DESINTERESA-
DA DE MI COLEGA BIOL. REGINA RODRIGUEZ R.

DE IGUAL FORMA QUIERO HACER PATENTE MI AGRADECIMIENTO -
POR LA EXCELENTE Y ESFORZADA ASISTENCIA TECNICA DE MI AMIGO
JORGE MERCADER MARTINEZ.

MANIFIESTO MI GRATITUD A MIS COMPAÑEROS ANGEL REYES, -
PERFECTO AGUILAR, FELIPE BELTRÁN Y ENRIQUE FERNÁNDEZ POR SU
APOYO TECNICO EN DIFERENTES ASPECTOS.

AGRADEZCO LA REVISION DE ESTA TESIS A LOS PROFESORES:

DR. RODOLFO FELIX ESTRADA

DR. RAFAEL VILLALOBOS PIETRINI

DR. JESUS MANUEL LEON CAZARES

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE

DRA. SANDRA LUZ GOMEZ ARROYO

DR. FAUSTINO RODRIGUEZ ROMERO

A MIS MAESTROS

A LUZ ELENA

A LUCY Y LORE

A LA MEMORIA DE MI PADRE

A MI MADRE

A MIS HERMANAS Y HERMANOS

AGRADEZCO A LAS AUTORIDADES DEL INSTITUTO NACIONAL
DE INVESTIGACIONES NUCLEARES, LAS FACILIDADES PARA
EL DESARROLLO Y LA IMPRESION DE ESTA TESIS.

I N D I C E

| | PAG. |
|--|-------|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCION | 3-38 |
| Significado Biológico | 4 |
| ICH como Indicador de Daño | 10 |
| Distribución Topográfica de Daño | 19 |
| Síndromes e ICH | 20 |
| Modelos de Formación de ICH | 22 |
| ICH y Radiación Ionizante | 35 |
| OBJETIVOS | 39 |
| MATERIALES Y METODOS | 39-50 |
| Animales | 43 |
| Incorporación de BrdUrd | 44 |
| Cosecha y Obtención de Preparaciones de Cromosomas | 44 |
| Tinción Diferencial de las Cromátidas Hermanas | 45 |
| Análisis (ICH y Rupturas Cromosómicas) | 46 |
| Indice Mitótico (IM) | 47 |
| Tiempo de Generación Promedio (TGP) | 47 |
| Estadística | 48 |
| Irradiación | 49 |
| Protocolos | 49 |
| RESULTADOS | 51-60 |

| | PAG. |
|---|----------------|
| I.- Inducción de ICH por Radiación Gamma y Efecto de la Incorporación de la BrdUrd al ADN. | 51 |
| II.- Comparación de las Frecuencias de Inducción de ICH y Rupturas Cromosómicas Inducidas por Radiación y su Correlación entre sí y con el IM y el TGP. | 53 |
| III.- Persistencia del Daño Radioinducido Generador de ICH | 57 |
| DISCUSION | 61-80 |
| I.- Inducción de ICH por Radiación Gamma y Efecto de la Incorporación de la BrdUrd al ADN. | 61 |
| II.- Comparación de las Frecuencias de Inducción de ICH y Rupturas Cromosómicas Inducidas por Radiación y su Correlación entre sí y con el IM y el TGP. | 67 |
| III.- Persistencia del Daño Radioinducido Generador de ICH | 79 |
| CONCLUSIONES | 81-82 |
| TABLAS | 83-90 |
| FIGURAS | 91-118 |
| BIBLIOGRAFIA | 119-143 |

R E S U M E N

En células de la médula ósea de ratón *in vivo*, se determinó: i) la eficiencia de las radiaciones para inducir intercambios entre cromátidas hermanas (ICH), así como el efecto de la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdUrd) al ADN, - ii) la eficiencia de 0.36 Gy de radiación gamma para generar ICH y rupturas cromosómicas en ADN unifilarmente substituído con BrdUrd y la correlación de estos eventos citogenéticos - con variaciones en el índice mitótico y en el tiempo de generación promedio (TGP) y iii) la frecuencia de ICH a varios TGP después de la irradiación con 1.9 Gy de rayos gamma como índice de persistencia y reparabilidad de la lesión radioinducida involucrada en la producción de ICH.

Se observó que la radiación gamma es capaz de inducir ICH en células de la médula ósea de ratón *in vivo* y que la incorporación de BrdUrd al ADN incrementó dicha inducción.

Se obtuvo evidencia de que la frecuencia de ICH es mucho mayor que la de rupturas cromosómicas después de la irradiación con rayos gamma y que no hay una relación aparente entre los eventos citogenéticos antes mencionados y las variaciones de índice mitótico y TGP producidas por la radiación ionizante. Algunos datos sugieren que las células con rupturas cromosómicas dobles (dicéntrico y/o 2 fragmentos cromosómicos) tiene un mayor retardo mitótico que las células con rupturas cromosómicas sencillas (fragmento cromosómico).

Finalmente se observó que la frecuencia promedio de ICH es significativamente mayor en las células irradiadas que en los testigos aún 96 horas después de la exposición, sugiriendo que la lesión radioinducida generadora de ICH es persistente y no fácilmente reparable.

I N T R O D U C C I O N

Los intercambios entre cromátidas hermanas (ICH) son transposiciones simétricas equivalentes entre las cromátidas de un mismo cromosoma. La primera evidencia de dicho fenómeno fue reportada por Taylor (1958) usando métodos autorradiográficos. Sus experimentos consistieron en la incorporación de la timidina tritiada en la primera de dos divisiones subsecuentes, al final de las cuales en las células en metafase observó que los cromosomas tenían una cromátida marcada y otra sin marcar. Siendo esto evidencia de la duplicación semiconservadora y de la presencia de una sola banda de ácido desoxiribonucleico (ADN) por cromátida. Además reportó que con cierta frecuencia se intercambiaban segmentos de cromátida marcada con segmentos no marcados de la cromátida hermana, lo que constituyó la primera evidencia directa de intercambio entre cromátidas hermanas, evento que había sido propuesto previamente al observar que los cromosomas en anillo en células de maíz, formaban eventualmente anillos dicéntricos del doble del tamaño inicial (McClintock, 1938).

Recientemente han sido desarrolladas una serie de técnicas basadas en la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdUrd) durante dos ciclos celulares o en el primero de dos subsecuentes, después de lo cual las preparaciones de cromosomas son sometidas a diversos tratamientos (Korenberg y Freedlender, 1974; Scheres et al., 1977; Takayama y Nakanishi, 1977), te-

ñidos con Giemsa o analizados en el microscopio de fluorescencia usando tinciones específicas (Latt, 1973).

Estas metodologías que han permitido una excelente tinción diferencial de las cromátidas hermanas, así como la detección inequívoca del intercambio entre cromátidas hermanas de segmentos tan pequeños como lo permite la resolución del microscopio de luz.

El advenimiento de dichas técnicas de tinción diferencial de las cromátidas hermanas ha permitido el desarrollo de múltiples sistemas, tanto *in vivo* (Bloomy Hsu, 1975; Kligerman y Bloom, 1976; Schreck, et al, 1979) como *in vitro* (Latt, 1974; Vogel y Bauknecht, 1976; Rafetto et al., 1979; Guerrero et al, 1979; Ikeuchi y Sasaki, 1981; Abe y Sasaki, 1982), para el estudio del fenómeno ICH.

En términos generales, en la actualidad se está realizando una intensa investigación relativa al posible significado biológico de los ICH y a su uso como indicador de daño sobre el ADN por agentes mutágenos carcinógenos físicos y químicos.

Significado Biológico

No obstante que el significado biológico de los ICH no ha sido establecido, hay actualmente una gran cantidad de información pertinente que indudablemente será la base del esclarecimiento de dicho problema.

Se ha demostrado que el proceso de intercambio entre

cromátidas hermanas requiere el paso de la célula por la etapa de síntesis (S) del AND (Wolff, 1974) aún más, se ha obtenido evidencia sugestiva de que es durante o inmediatamente después de que se ha formado la bifurcación en la síntesis de ADN, cuando se lleva a cabo el intercambio de doble banda entre las cadenas de ADN (Kato, 1980b). Recientemente Anderson (1983) ha obtenido evidencia sugestiva de la inducción de ICH en la etapa G₂. Dichos datos de ser corroborados tienen importantes implicaciones, tanto en relación con la formación de ICH, como con respecto al proceso de condensación de los cromosomas.

El hecho de que la duplicación del ADN fuera el momento más apropiado para que se lleven a cabo los intercambios entre cromátidas hermanas, podía predecirse con base en que durante la duplicación del ADN es cuando las cadenas se encuentran lo suficientemente unidas en las zonas homólogas, para permitir que se realice dicho intercambio de una manera que también parece ser simétrica y equivalente a nivel molecular. Por lo que es el momento en que dicho proceso resulta menos "costoso" energéticamente para la célula, ya que después de la síntesis se requeriría de sistemas de reconocimiento y de asociación de las moléculas de ADN ya duplicadas.

Aunque parece ser concluyente la evidencia de que es durante la fase "S" el momento en que se lleva a cabo el intercambio entre cromátidas hermanas, el mecanismo por el cual éste se lleva a cabo no ha sido establecido, parece haber di

versas causas que desencadenan el proceso; es decir, que el ICH puede ser inducido por múltiples circunstancias como: - daño al ADN (Perry y Evans, 1975; Abe y Sasaki, 1977; Nakaniishi y Schneider, 1979) por inhibición del proceso de síntesis de ADN (Ishii y Bender, 1980; Rainaldi y Mariani, 1982), por inhibición de las enzimas involucradas en dicho proceso (Ishii y Bender 1980), por enzimas involucradas en la reparación (Oikawa et al., 1980; Morgan y Cleaver, 1982) o por un agente promotor de cáncer, no involucrado en la producción de lesiones sobre el ADN (Kinsella y Radman, 1978; Schwarts, 1982).

Por otro lado, este proceso parece producirse de manera "espontánea" como se sugirió por la formación de anillos dicéntricos (McClintock, 1938), en células que no fueron tratadas o cuando menos no de una manera intencional con algún agente conocido ahora como inductor de ICH. Por otro lado, con las técnicas basadas en la incorporación de BrdUrd se ha puesto en duda si este compuesto pudiera jugar un papel importante en la frecuencia basal de ICH, aunque se ha observado tanto *in vivo* (Tice et al., 1976), como *in vitro* (Kato, 1974) que por debajo de determinada dosis de BrdUrd, que permite aún la detección de ICH, la frecuencia de éstos permanece constante. Por otro lado, ha sido descartada la idea de que las zonas ricas en AT y potencialmente más susceptibles de incorporar BrdUrd, sean más sensibles a la inducción de ICH (Thust y Ronne, 1982). También se ha propuesto que la

BrdUrd que no se incorpora al ADN, pueda jugar un papel más importante en la inducción de ICH, alterando las pozas metabólicas de nucleótidos (Davidson et al., 1980).

Los estudios previos en que se utilizaron métodos autorradiográficos (Taylor, 1958), o la segregación de anillos dicéntricos (McClintock, 1938), permitieron inferir la existencia de una frecuencia basal o espontánea de ICH. Posteriormente a estos estudios se ha demostrado que existe la posibilidad de que los agentes externos usados en la detección de ICH como sería el tritio incorporado en los métodos autorradiográficos (Brewen y Peacock, 1969; Gibsen y Prescott, 1972) e incluso las condiciones de cultivo, como el tipo de medio y otros pueden alterar la frecuencia basal (Kato y Sandberg, 1977; Morgan y Crossen, 1981). Con relación a esto se ha observado una frecuencia basal de ICH menor *in vivo* que *in vitro* (Kram et al., 1979).

Crossen et al., (1977), en una revisión de frecuencias de ICH basales de linfocitos humanos reportados por varios autores, concluye que dichas frecuencias varían de 5.3 a 27.3 ICH/Célula, observándose dos valores modales, uno alrededor de 6 y otro alrededor de 14. *In vivo* en diversos tejidos de ratón, rata y criseto (Takehisa, 1982) el valor basal es entre 3.0 y 5.0 y siendo la excepción las espermatogonias en las cuales se han encontrado consistentemente valores basales más bajos, de alrededor de 1.7 ICH/célula (Morales et al., 1984, Takehisa, 1982). Estos son los valores basales por

dos ciclos de división en presencia de BrdUrd.

Recientemente Schwartzman y Goyanes (1980) mediante la técnica de tinción diferencial de las cromátidas en "tres vías de diferenciación" desarrollada por ellos mismos, la cual permite determinar el número de ICH que se han producido en una célula en cada una de tres divisiones subsecuentes, han observado que la frecuencia basal de ICH se incrementa en las tres divisiones sucesivas en células de criseto chino *in vitro*. Morales et al., (datos no publicados), usando la adaptación para condiciones *in vivo* de la técnica de tinción diferencial de cromátidas en "tres tonos" han observado que las frecuencias de ICH para las 1^a, 2^a y 3^a divisiones en presencia de BrdUrd son de alrededor de 0.5, 1.7 y 2.6 ICH/célula/ciclo de división en células de la médula ósea de ratón. Considerando que la metodología implica la incorporación de cantidades crecientes de BrdUrd al ADN, se puede concluir que la BrdUrd sí influye de manera importante en el valor basal de ICH. Incluso observaron que alrededor del 60% de las células en primera división no tenían ICH, lo que sugiere que la frecuencia de ICH en ausencia de BrdUrd puede ser mucho menor que 0.5 ICH/célula/ciclo de división.

El problema de la existencia de ICH "espontáneos" o basales no es de ninguna manera trivial, ya que si estos ICH son producidos por un mecanismo distinto a los antes mencionados es decir, bajo condiciones más naturales, tal vez esta vía esté más relacionada con el significado biológico real

del proceso, tomando en cuenta que la frecuencia espontánea es más o menos constante y persistente. Incluso ha sido postulado que pudiera ser una característica heredable y ligada al sexo (Cohen et al., 1982).

Kato (1980a) ha propuesto que la presencia de ICH espontáneos o basales está ligada con el proceso de síntesis de ADN, basándose en el efecto que tiene la temperatura del cultivo sobre la inducción de ICH, como el mismo menciona, el efecto de inducción de ICH por la temperatura fue analizado basándose en una gráfica de Arrhenius en la cual observó la presencia de dos pendientes, una en el intervalo de 31 y 39 °C y otra en el de 39 a 42 °C, sugiriendo la existencia de dos procesos que relacionan la inducción de ICH con la temperatura. Sin embargo, al estudiar el efecto de la temperatura en diferentes etapas del ciclo celular sobre la inducción de ICH, usa 41 °C, temperatura que no está comprendida en el primer intervalo que incluye la temperatura considerada como fisiológica, es decir, que a 41 °C se está favoreciendo la inducción de ICH mediante otro mecanismo que no es el "espontáneo", por lo que sus observaciones y otras consideraciones que hace sobre datos obtenidos a temperaturas mayores de 39 °C no son válidos. Como por ejemplo la acumulación de fragmentos de ADN naciente a temperaturas de 40 °C.

Por otro lado, considera la posibilidad de daño espontáneo como las depurinaciones, el cual se ha demostrado es temperatura-dependiente (Verly et al., 1973), sin embargo es

to implicaría que dicho proceso de inducción de ICH por la temperatura sería equivalente en cierta forma con el inducido por agentes que dañan al ADN causando depuración.

El ICH como Indicador de Daño

La inducción de ICH por agentes mutágenos-carcinógenos, ha sido ampliamente demostrada, tanto en sistemas *in vivo* - (Morales-Ramírez et al., 1980; Nakanishi y Scheneider, 1979; Schreck et al., 1979; Stetka y Wolff, 1976a), como *in vitro* (Abe y Sasaki, 1977; Perry y Evans, 1975; Popescu et al., - 1977; Stetka y Wolff, 1976) y tanto por agentes químicos de acción directa (Perry y Evans, 1975; Morales-Ramírez et al., en prensa; Nakanishi y Schneider, 1979) o indirecta (Morales Ramírez, 1980; Schreck et al., 1979, Stetka y Wolff, 1976 a y b) como por agentes físicos como calor (Kato, 1980), luz - U.V. (Wolff et al., 1974; Mac Rae et al., 1979), ultrasonido (Liebeskind et al., 1979) y radiación ionizante. Existe cierta divergencia con respecto a esta última, ya que algunos autores reportan una considerable inducción (Abramovsky et al., 1978; Morales et al., 1983) y otros una nula inducción (Littlefield, et al., 1979).

Se ha demostrado usando metil metano sulfonato (MMS) - que los sistemas de detección de mutágenos basados en el análisis de ICH son con mucho más sensibles que otros sistemas de detección en mamíferos (Marquard y Bayer, 1977), teniendo

además ventajas en cuanto a reproducibilidad y facilidad de manipulación.

Se ha propuesto por el grupo sobre ICH del Programa GENE-TOX de los Estados Unidos de América (Latt et al., 1981) que la metodología de ICH tiene tal reproducibilidad que basta el análisis de 25 células por dosis en los sistemas *in vitro*. Para los sistemas *in vivo* recomiendan un mínimo de 3 animales y 25 células por animal y tres dosis diferentes.

El mismo grupo hace las siguientes consideraciones sobre el uso del análisis de ICH como método de detección de mutágenos:

- a) Es excelente para detectar agentes que producen aductos en el ADN.
- b) Es mucho más sensible para detectar mutágenos químicos que el método basado en el análisis de aberraciones cromosómicas.
- c) Hay ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* para detectar tanto mutágenos directos o indirectos, es decir que requieran o no activación metabólica.
- d) Es un método relativamente rápido.
- e) Los sistemas *in vivo* permiten el análisis en tejidos diversos incluyendo células germinales.
- f) Existen sistemas en organismos diversos incluyendo plantas y animales no mamíferos, los cuales pueden ser usados como monitores ambientales de agentes genotóxicos.

- g) Este ensayo puede ser usado en poblaciones humanas.
- h) Existen pocos falsos positivos.

En cuanto a las principales desventajas que ellos con
si
deran son:

- a) Poco sensible para mutágenos que inducen rupturas do
bles
- b) El desconocimiento de su significado biológico.
- c) El desconocimiento de la correlación de ICH con el -
número de lesiones.
- d) El efecto sinérgico o aditivo que puede tener la -
BrdUrd respecto al mutágeno.

Se conocen entre los agentes químicos los denominados -
dependientes y no dependientes de la fase de "S", denominación
que se basa en el hecho de que se requiera o no que la célu-
la pase por la fase "S" para que su efecto se exprese como -
aberraciones cromosómicas; se sabe que los agentes "S" depen
dientes son los más efectivos para inducir ICH (Latt, 1974;
Perry y Evans, 1975; Nakanishi, 1979).

Hay evidencias importantes que sugieren que la inducción
de ICH mediante el daño sobre el ADN inducido por agentes mu
tá
genos-carcinógenos, implica daño persistente al momento de
llegar a la etapa de "S", lo cual fue evidenciado por el he-
cho de que dando una mayor oportunidad para la reparación de
daño sobre el ADN, ampliando el tiempo entre la inducción del
daño y la etapa de S, ya sea por confluencia (Nagasawa y Li
t
tle, 1981; Nagasawa et al., 1982), o por privación de argini

na (Mac Rae et al., 1979) o por la disminución de temperatura en cultivos vegetales (Schvartzman y Gutiérrez, 1980) trae como consecuencia que la frecuencia de ICH disminuya. De igual forma si se permite la fotorreactivación de los dímeros de pirimidina inducida por la luz U.V., el número de ICH decrece (Kato, 1974; Natarajan et al., 1980).

El tipo de daño involucrado en la inducción de ICH no ha sido establecido, aunque dada la variedad de agentes que provocan ICH, se puede postular que las lesiones son de índole diversa, aunque como los agentes en general producen diversos tipos de daño, pudiera ser que el daño generador de ICH fuera común para algunos agentes.

Se han hecho intentos con algunos agentes para establecer qué tipo de daño es el que está involucrado en la inducción de ICH.

La mitomicina C, la cual es un agente capaz de unirse al ADN por uno o dos extremos, ya que es bifuncional, se ha comparado con decarbamoil Mitomicina C (DCMC), la cual tiene una estructura química similar, pero sólo produce monoadductos y no enlaces cruzados. En dicho estudio se determinó que la DCMC es más eficiente, lo cual indica que los monoadductos son el principal daño inductor de ICH (Carrano et al., 1979). Por otro lado en un experimento en el que usaron mitomicina C en células de pacientes con Xeroderma pigmentosum (XP) o con Anemia de Fanconi (AF), las cuales son deficientes para reparar monoadductos y enlaces cruzados, respectivamente, con

cluyen que ninguna de esas lesiones son importantes en la generación de ICH y proponen los enlaces ADN-Proteína como los candidatos más probables (Ishii, 1981). En una investigación similar los autores analizaron la frecuencia de ICH producidos por Mitomicina C y DCMC en células de XP y AF y concluyeron que la inducción de enlaces cruzados es la lesión más - eficiente (Kano y Fujiwara, 1981).

Con respecto a la inducción de ICH por el tratamiento - con 8-metoxypsoralen seguido de exposición a luz U.V. cercano de 313 nm de longitud de onda, el cual también puede producir aductos y enlaces cruzados, se ha hecho un experimento para definir cuál de los dos es el responsable de la inducción de ICH, en dicho estudio concluyen que ambos tipos de lesión pueden ser los causantes (Cassel y Latt, 1980); el mismo grupo, usando rayos laser en vez de U.V. cercano, los cuales - producen básicamente monoadductos, concluyen que los ICH son causados principalmente por monoadductos, aunque no descartan del todo los enlaces cruzados, observando una eficiencia de un ICH por cada 200 monoadductos (Sahar et al., 1981).

Otra dificultad que se ha presentado para establecer el tipo de daño involucrado en la inducción del ICH es el hecho de no haber una correspondencia entre el número de lesiones sobre el ADN y la cantidad de ICH, lo cual se ha observado - para el tratamiento con psoralen mas luz U.V. cercano, (Sahar et al., 1981) y luz U.V. lejano (Reynolds et al., 1979).

El número de lesiones por ICH va de 200 para psoralen -

mas luz U.V. cercano (Sahar et al., 1981), hasta 20,000 para luz U.V. lejano (Reynolds et al., 1979), aunque no se descarta que pudiera estar involucrado otro tipo de lesión no detectada, la cual se produzca con una frecuencia menor.

Otro aspecto interesante con respecto a las lesiones involucradas en la inducción de ICH, es la posibilidad de que en algunos casos éstas persisten por varias generaciones celulares, sugerido por la presencia de niveles altos de ICH en divisiones subsecuentes, lo cual se ha observado para tratamiento con Acetoxiacetylaminofluoreno, Etil metano sulfonato (EMS) y metilmetano sulfonato (MMS) (Tice y Schwartzman, 1982), 9 metoxypsoralen plus U.V. cercano (Latt y Loveday, 1978), Mitomicina C (Ishii y Bender, 1978).

En otros casos sí ha sido observada la desaparición de los ICH como los provocados inducidos con cafeína (Tice y Schwartzman, 1982) con BrdUrd plus luz visible (Schwartzman, et al, 1979). La persistencia de los ICH ha sido interpretada como falta de competencia para reparar el daño involucrado en su origen (Tice y Schwartzman, 1982).

La técnica de diferenciación de cromátidas en tres tonos, además de permitir el análisis del número de ICH producidos en divisiones subsecuentes como se mencionó previamente, permite detectar la posibilidad de que una misma lesión produzca ICH en divisiones subsecuentes. Con dicha técnica se ha demostrado que si bien el tratamiento con luz ultravioleta o Mitomicina C producen lesiones persistentes, una misma lesión no produce ICH en divisiones subsecuentes o cuando

menos no en la mayoría de los casos (Schvartzman et al., 1984; Schvartzman et al., manuscrito en preparación).

Otra vía de producción de ICH independiente de la inducción de daño sobre el ADN, es la inhibición de la progresión de la síntesis del ADN. Esta propuesta se basa en el efecto de la cafeína sobre la frecuencia de ICH generados por agentes químicos (Shiraishi y Sandberg, 1980), que a semejanza con el síndrome de Bloom en que se asocia a la alta frecuencia de ICH (Chaganti et al., 1974) con una mayor duración del ciclo celular y en particular de la duplicación del ADN (Hand y German, 1975). Sin embargo no es factible discriminar cuál es la causa y cuál el efecto, es decir, podría ser que el proceso de formación de los ICH aumentará la duración del ciclo celular en general y de la etapa de síntesis del ADN en particular o que efectivamente el aumento de la duración de la etapa S indujera mayor número de ICH.

Por otro lado, se ha obtenido evidencia de que es posible aumentar la frecuencia de ICH mediante tratamiento con calor durante la fase "S"; asociándose a su vez con un retardo en el curso de la síntesis de ADN (Kato, 1980).

La evidencia más directa ha sido obtenida mediante el uso de inhibidores específicos de la síntesis de ADN como hidroxurea (inhibidor de la ribonucleotidoreductasa), 1 β D-arabinofuronasil-citocina y Aphidicolin (inhibidores de la polimerasa α) los cuales incrementan los ICH tanto basales como inducidos por etil metano sulfanato (Ishii y Bender,

1980; Rainaldi y Mariani, 1982; Nishi et al., 1982).

Un rasgo característico con respecto a la generación de ICH mediante inhibidores de la síntesis de ADN, ha sido descrito recientemente, este se basa en la comparación de la distribución de frecuencias de ICH/célula; la que para inductores de ICH por daño en el ADN se comportan como una distribución de Poisson tendiendo a la normalidad (Rainaldi y Mariani, 1982) en cambio la observada para inhibidores de la síntesis de ADN presentan una subpoblación que se distribuye de una forma similar a la de células no tratadas y una subpoblación con un intervalo muy amplio de frecuencias y con índices muy altos de ICH (Rainaldi y Mariani, 1982).

Se ha observado que los agentes que bloquean la síntesis de la poly-(adenosina difosfato ribosa) polimerasa (enzima que se sintetiza en respuesta a extremos de banda sencilla o doble caudadas por duplicación, daño o reparación) producen un incremento en la frecuencia de ICH basal (Oikawa et al., 1980; Natarajan et al., 1981) o inducida por MMS (Morgan y Cleaver, 1982). Otros agentes que inhiben la síntesis de proteína inhiben los ICH generados por luz U.V., EMS y MMS (Sono y Sakaguchi, 1981). En ambos casos el mecanismo está lejos de ser conocido, aunque se propone que para el primero la falta de reparación causa los ICH y que para el segundo se puede explicar con base en que se requiere la síntesis de proteínas para que el proceso de ICH se lleve a cabo.

Recientemente se ha aislado una cepa celular mutante de ovario de criseto chino (CHO) que entre otras características como deficiencia en reparación, presenta una frecuencia basal de ICH similar a la observada en el síndrome de Bloom (Thompson et al., 1982). Es posible que el estudio de dicha cepa pueda arrojar alguna luz sobre el mecanismo de producción de ICH.

Aunque es poco claro y también poco reproducible el efecto que el promotor de cáncer 12-0-tetradecanoil forbol-13-acetato (TPA) tiene sobre la inducción de ICH (Gentil et al., 1980; Kinsella y Radman, 1978; Loveday y Latt, 1979; Popescu et al., 1980, Schwartz et al., 1982), ha creado gran interés y controversia por las implicaciones que tendría el relacionar la promoción de cáncer y la producción de ICH. Se ha observado además, que algunos antagonistas del promotor como la antipafina y la leupeptina, inhiben el incremento de ICH causados por TPA (Nagasawa y Little, 1979). Por otro lado algunos grupos no han observado inducción, (Fichman et al., 1979; Fujiwara et al., 1980; Thompson et al., 1980) e incluso han demostrado impureza del agente promotor (Schwartz et al., 1982). Sin embargo es posible que la frecuencia basal de los diferentes sistemas, así como el pequeño incremento inducido por el TPA, jueguen un papel importante en la controversia. Una observación interesante es que en un reporte se menciona la inducción de células con "demasiados ICH para contarlos" (Kinsella y Radman, 1978), en caso de que fuera un efecto del

TPA, implicaría a la luz de la característica antes mencionada de la distribución de frecuencia de ICH por célula, que el TPA está inhibiendo la síntesis de ADN.

Distribución topográfica de los ICH

Utilizando bandeo cromosómico, se ha sugerido que la inducción de ICH no es homogénea a lo largo del cromosoma, sino que hay zonas preferenciales. Latt (1974) ha demostrado usando bandeo con quinacrina que las uniones entre las bandas positivas y negativas presentan una mayor frecuencia de ICH. Se ha observado que la frecuencia de ICH en la heterocromatina constitutiva del cuello del cromosoma X es menor que en la eucromatina, en células de muntjac hindú, tanto para los ICH espontáneos (Carrano, 1975), como para los inducidos por Mitomicina C (Carrano, 1977). Se hicieron observaciones similares en los cromosomas de la rata canguro (Bostock y Christie, 1976); Criseto chino y *Microtus montanus* (Hsu y Pathak, 1976) y linfocitos humanos (Crossen, 1983). Sin embargo Natarajan y Klaterska, (1975) observan una frecuencia mayor de ICH en la heterocromatina constitutiva de los cromosomas X de *Microstus agrestis*. La diferencia puede ser debida a las limitaciones de resolución del microscopio de luz, la cual no permite de una manera absoluta establecer la correlación entre las bandas y los ICH. No obstante si parece haber consenso en que las zonas entre la eucromatina y la heterocromatina ocurren ICHs con mayor frecuencia.

Una posibilidad que se exploró y que explicaría la distribución no azarosa de los ICH debido a la presencia de

agrupamientos de adenina-timina, en los cuales habría una mayor incorporación de BrdUrd. Thust y Ronne, (1982) usando neropsina para determinar los agrupamientos de A-T concluyen que no obstante que los ICH no se distribuyen al azar, no hay una correlación entre su localización y los agrupamientos de A-T.

ICH en Padecimientos Genéticos

Se ha estudiado la frecuencia basal o la sensibilidad a la inducción de ICH por diferentes agentes en células con síndromes diversos, relacionados con desarrollo de neoplasmas, inestabilidad cromosómica o deficiencias en la reparación, como Progeria, síndrome de Werner (Darlington et al., 1981), Dyskeratosis congénita (Kano y Fujiwara, 1982) Anemia de Fanconi (Latt et al., 1975) y Ataxia telangiectasia (Galloway, 1977), observando que sus frecuencias basales son similares a las normales, al igual que la respuesta a los agentes que son especialmente sensibles en términos de viabilidad o inducción de aberraciones cromosómicas. Por otro lado se ha observado en células de pacientes con Xeroderma pigmentosum que tienen una frecuencia basal de ICH equivalente a las células normales (Wolff et al., 1975), sin embargo son más sensibles a la inducción de ICH por luz ultravioleta (de Weerd-Kastelein et al., 1977) y mutágenos químicos (Wolff, 1977), lo cual se explica por su deficiencia en la reparación por escisión.

Sin embargo el caso más interesante es sin duda el sín

drome de Bloom en el cual se ha demostrado que la frecuencia basal de ICH es de aproximadamente 90 (Chaganti et al., 1974). No obstante que la inducción por Mitomicina C 1×10^{-9} M es de aproximadamente de 8 ICH/célula en células normales y de 48 ICH/célula en células de Bloom. Los autores basándose en el incremento relativo (Shiraishi y Sandberg, 1978) concluyen que las células de pacientes con síndrome de Bloom no son más sensibles. El incremento relativo (No. de veces el valor basal) para las células normales es de 2.2, para células con Bloom de 1.6. Si se considera la diferencia tan grande en los valores basales, es claro que la comparación de la inducción por incremento relativo no es pertinente. Además habría que considerar que es posible que en el caso de las células con síndrome de Bloom se pudiera estar llegando a la saturación o al límite de cuantificación de los ICH. Por lo que se puede concluir que las células con síndrome de Bloom no sólo tienen una basal de ICH aumentada, sino que también son más sensibles a la inducción de ICH por Mitomicina C.

Tice (1978) reportó que la cocultivación de fibroblastos normales y fibroblastos de pacientes con síndrome de Bloom produce un aumento en la frecuencia de ICH en las células normales. Sin embargo, estudios similares con células de criseto chino (Van Buul, P.P.W. et al., 1978), fibroblastos humanos (Rudiger et al., 1980) y células HPGRT (Hipoxantina-ribosil transferasa deficientes) (Schonberg y German, 1980) concluyen que el co-cultivo de estos tipos celulares -

con células de pacientes con síndrome de Bloom disminuye, al menos parcialmente las frecuencias elevadas de estas últimas. Lo que indica que las células de pacientes con síndrome de Bloom no segregan ningún "factor" que induzca ICH; sino que al contrario, la cocultivación permite reducir este efecto. Esto último fue confirmado mediante la fusión de células de individuos normales y con síndrome de Bloom, obteniéndose frecuencias normales en los dos tipos celulares (Bryant et al., 1979). De lo cual se desprende que existe alguna enzima o agente que no es sintetizado por las células de pacientes con síndrome de Bloom y que trae como consecuencia la producción de múltiples ICH.

Por otro lado se han reportado frecuencias elevadas en diversos estados patológicos como hepatitis (Ghosh, 1982) y anemia megaloblástica (Knuutila, 1978). En otros no se ha observado como en leucemia y proleucemia (Knuutila, 1978).

En relación con la edad se ha visto que los ratones jóvenes tienen una mayor sensibilidad a la inducción de ICH por diversos agentes mutágenos (Nakanishi et al., 1979 y 1980).

Modelos de Formación de ICH

Dado que toda la evidencia obtenida al respecto indica que los ICH son producidos durante la etapa de síntesis del ADN resulta pertinente hacer una breve descripción de lo que en la actualidad se sabe respecto al proceso de duplicación

y respecto a la compleja estructura en la cual el ADN se encuentra integrado dentro del núcleo de organismos eucariontes.

En base a la combinación de análisis bioquímico, de difracción de rayos X y de microscopía electrónica de cromatina aislada y reconstituida, se han obtenido logros importantes en relación a la estructura y composición de la cromatina en general y al nucleosoma en particular (Kornberg, 1977; Fisher y Williams, 1979; Mc Ghee y Felsenfeld, 1980; Igo-Kemenes et al., 1982; Champoux, 1978).

La unidad estructural de la cromatina es el nucleosoma - que es una partícula aproximadamente esférica, con un diámetro de aproximadamente 10 nm y constituido por alrededor de 200 pares de nucleótidos y dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Se ha sugerido que los nucleosomas se encuentran enlazados por un cierto número de nucleótidos, a los cuales se asocia otro tipo de histona la H1, una subfracción de la H1 denominada H1°, la cual al igual que la H5 substituye a la H1 cuando no hay síntesis de ADN. Esta composición general del nucleosoma ha sido demostrada en diversos tejidos de múltiples especies de eucariontes incluyendo mamíferos.

Se ha demostrado recientemente la presencia de una serie de proteínas asociadas a mononucleosomas (aisladas por nucleasas) como las HMG14 y HMG17 equivalentes a la H6, las cuales se unen al nucleosoma en proporción de 2 moléculas por nucleosoma. Se ha demostrado que las histonas como H2A y H2B

al conjugarse con la Ubiquitina dando lugar a la proteína A24. Esta proteína pudiera ser un buen candidato para regulación de transcripción, ya que la transcripción de la cromatina nucleolar es acompañada por una disminución del contenido de A24. Se ha propuesto además que dado que los cromosomas metafásicos no contienen proteína A24, la remoción de dicha proteína puede disparar la mitosis.

Hay evidencias de que en las células es posible encontrar variedades menores de las histonas, las cuales se distinguen en algunos aminoácidos. En algunos casos se han asociado cambios en la frecuencia de dichas variedades relacionados con el desarrollo o con el tipo de tejido.

No obstante que el nucleosoma se puede considerar la unidad estructural de la cromatina y que parece ser independiente del estado fisiológico de la célula o de la etapa del ciclo celular, existen otros niveles de organización o condensación, hasta llegar a la estructura de mayor orden: el cromosoma metafásico.

Los primeros niveles de organización superiores a los nucleosomas lo constituyen las fibrillas de 10 nm y las fibras de cromatina de 25 a 30 nm, las cuales han sido evidenciadas por microscopía electrónica, y pueden interconvertirse variando la fuerza iónica. Sin embargo hay que tener en cuenta que la reproducibilidad de la información acerca de estos niveles de organización no es adecuada, debido a los diferentes métodos de aislamiento de cromatina.

No se ha establecido la forma como los nucleosomas están organizados en la fibra de 25 nm, si en forma globular - supranucleosomal o siguiendo un patrón helicoidal denominado selenoide incluyendo de seis a siete nucleosomas por giro. - Se han demostrado las fibras de 25 nm en asas o zonas discretas, tanto en cromosomas metafásicos y núcleos interfásicos y en las cuales la histona H1 juega aparentemente un papel primordial.

Es posible que estas zonas discretas no solo representen niveles estructurales, sino también tengan importancia funcional en transcripción o duplicación.

El análisis comparativo de la estructura y composición de la eucromatina y la heterocromatina permitirá en un futuro obtener información respecto a la regulación de la expresión de la cromatina.

La relación del ADN con las proteínas, se ha establecido en la subpartícula central del nucleosoma y en la cual debida a su estabilidad ha sido posible hacer estudios físicos y químicos.

Esta subpartícula está constituida por las histonas H2A, H2B, H3, H4 y aproximadamente 140 pares de bases. Esta partícula es cilíndrica con aproximadamente 10 nm de diámetro y 6 nm de altura. El ADN se encuentra enrollado alrededor del agregado de las histonas dando cerca de dos giros. Se considera que debido a esta estructura el ADN está formando una superhélice.

Mediante la hidrólisis con nucleasas se ha determinado que el ADN en el nucleosoma tiene determinados sitios susceptibles, lo cual se ha interpretado que existen aproximadamente 80 pares de nucleótidos por giro, suponiéndose que la deformación para formar la superhélice estaría uniformemente distribuida a lo largo de la cadena, sin necesidad de rupturas.

Si la deformación está distribuida a lo largo de la cadena, se piensa que el plegamiento sobre el eje de la cadena no fuera de muchos grados y por lo tanto, se requiriera (aproximadamente 0.1 kcal/mole) menos de la energía térmica a temperatura ambiente. Habría que considerar además la energía de enlace entre los grupos amino de las lisinas y los fosfatos del ADN, con los que el ADN se asocia a las histonas.

Se ha sugerido que otro origen de la superhélice además del producido por asociación ADN-proteína, es una propiedad intrínseca de ADN circulares o de zonas discretas del ADN que tienen algún impedimento para el libre desenvolvimiento.

Se considera que hay una energía libre positiva asociada con los giros de la superhélice, la cual predispone a la molécula al desenrollamiento de la hélice, por lo que esta energía libre puede favorecer la separación de las cadenas complementarias del ADN.

El origen de las superhélices independientes de la asociación permanente del ADN con proteínas, es debido a ciclos

de rupturas de una sola banda giro y reasociación de las rupturas mediante nucleasas más ligasas o algunas enzimas que específicamente pueden llevar a cabo esta reacción aumentando o disminuyendo la superhélice como lo son las girasas o las swivelasas.

En relación con el conocimiento del proceso de duplicación del ADN en particular y de la compleja estructura antes mencionada en general, se han obtenido también notables avances (Weissbach, 1977; Cozzarelli, 1977; Sheining y Humbert, 1978; Pardee et al., 1978; Champoux, 1978; Ogawa y Okasaki, 1980; De Pamphilis y Wassarman, 1980; Geider y Hoffman-Berling, 1981; Gellert, 1981; Loeb y Kunkel, 1982; Challbery y Kelly, 1982).

Como es bien sabido, la duplicación del ADN en eucariotes se lleva a cabo en el núcleo de una forma controlada en el tiempo y en el espacio. La duplicación del ADN que como se sabe es semiconservativo, se inicia, progresa y termina simultáneamente en diferentes unidades replicativas denominadas duplicones.

Estas unidades varían de tamaño y van de 4 micras (1.3×10^4 pares de bases) hasta 280 micras (9.0×10^5 pares de nucleótidos) habiendo una mayoría entre 10 y 100 micras.

La velocidad de desplazamiento del punto de crecimiento durante la síntesis de ADN varía de especie a especie, incluso puede haber variaciones entre diferentes tejidos. Se ha calculado que la velocidad de desplazamiento de la hor_

quilla es entre 0.1 a 2.0 micras (300 a 6000 residuos) por minuto. No obstante que la velocidad de duplicación es relativamente constante, una importante excepción son las células embrionarias en las cuales procede hasta 100 veces más rápido que en los adultos. La razón de este fenómeno es la existencia de una gran cantidad de pequeños duplicones que funcionan simultáneamente.

Se ha obtenido evidencia en el sentido de que los duplicones pueden agruparse en "racimos" que varían de 2 a 250 duplicones y cuya duplicación se regula de una manera coordinada. Esto parece ser el caso de las unidades repetitivas de los genes para histonas y para ARN ribosomal.

La duplicación de la doble banda se realiza bidireccionalmente es decir para ambos lados del sitio de iniciación.

El proceso de síntesis de ADN se puede dividir en tres etapas: iniciación, alargamiento y terminación.

La iniciación se lleva a cabo en lugares específicos del genoma, según evidencias obtenidas. Dichas zonas presentan secuencias repetitivas muy peculiares denominadas palíndromes, en analogía con los enunciados que se pueden leer en ambas direcciones. Estos palíndromes son regiones de ADN de doble banda que en cadenas opuestas tienen la misma secuencia de bases, pero en sentido contrario y con un eje transversal de simetría que podría permitir teóricamente la complementación intracadena.

Se ha propuesto que estos palíndromes podrían generar -

asas al producirse enlaces intracadena, dichas asas pudieran por un lado constituir zonas de reconocimiento para duplicación o transcripción, particularmente considerando que se formarían zonas de una sola banda en el centro del palíndromo que pudieran ser los precursores para el desenrollamiento de la doble banda

La duplicación del ADN se lleva a cabo de una manera semidiscontinua, ya que debido a que la ADN polimerasa alfa, que es la enzima que encadena los nucleótidos en base a un patrón, sólo es capaz de unir residuos en la dirección de 5' a 3', una de las cadenas debe crecer en sentido opuesto al movimiento de la bifurcación; por lo que requiere la iniciación continua de pequeños segmentos de aproximadamente 135 nucleótidos. Estos fragmentos se les denomina fragmentos de Okasaki.

La polimerasa alfa requiere además de un patrón, un extremo 3 - OH para iniciar la síntesis, éste extremo es aportado por un ARN "primer", el cual no tiene una secuencia constante, pero si un tamaño regular de 10 nucleótidos. Después de que la polimerasa ha aumentado el tamaño de la cadena, el RNA "primer" es removido por otra actividad enzimática. Se sabe poco de las enzimas encargadas de la síntesis del "primer" y de su remoción. El segmento unifilar producto de la remoción es llenado por la polimerasa y finalmente los fragmentos de Okasaki son unidos por una ligasa.

Se ha propuesto el concurso de otras proteínas que son

capaces de aumentar la eficiencia de la ADN polimerasa y que reciben el nombre genérico de proteínas "enlazables" al ADN. Entre estos estarían las proteínas "desestabilizadora de la hélice" y la enzima "desenrolladora" del ADN. Se piensa - que éstas y otras proteínas son necesarias para la síntesis del ADN.

Las ADN polimerasas son las enzimas mejor conocidas del proceso de síntesis de ADN y en el caso de mamíferos se han aislado tres tipos denominados alfa, beta y gamma. Estas enzimas se distinguen en su localización dentro de la célula, la correlación entre su mayor actividad con la etapa S y por su sensibilidad a diferentes inhibidores que por lo tanto inhiben la síntesis de ADN.

Mediante estos parámetros se ha establecido que la ADN polimerasa alfa es la que está involucrada en la síntesis del ADN celular, ya que además de estar localizada en el núcleo, su actividad aumenta en la etapa "S" y a que inhibidores específicos de su actividad inhiben la duplicación del ADN celular.

Respecto a la ADN polimerasa beta, no ha sido establecido claramente su función, aunque pudiera estar relacionada con reparación, ya que aunque es una enzima nuclear no aumenta en la etapa "S".

La ADN polimerasa gamma es una enzima citoplásmica y su actividad se ha relacionado con la síntesis de ADN mitocondrial.

Se ha propuesto que la iniciación de la síntesis en los fragmentos de Okasaki se realiza en sitios específicos, sin embargo considerando que estos fragmentos tienen tamaño similar al contenido de ADN por nucleosoma, se ha postulado que el nucleosoma pudiera actuar como espaciador de las zonas de iniciación de la síntesis de los fragmentos de Okasaki, lo cual estaría de acuerdo con el hecho de que los ARN "primer" no tengan secuencias específicas.

Es bien sabido que la síntesis de histonas se lleva a cabo en la etapa de "S", de ahí que se haya sugerido que la cromatina y en particular los nucleosomas se van formando a medida que el ADN se va duplicando. Otra evidencia en el mismo sentido es el hecho de que el ADN se encuentra asociado a los nucleosomas en cualquier etapa del ciclo celular, incluyendo la etapa de síntesis.

Existe evidencia de que las histonas se van ensamblando para formar los nucleosomas de una manera conservativa, es decir que los segmentos de las cadenas que se duplican continuamente mantienen las histonas "viejas" y que las histonas "nuevas" se ensamblan en los segmentos de la cadena sintetizada discontinuamente, es decir mediante los fragmentos de Okasaki.

Se puede considerar que la terminación de la síntesis consistiría en la reunión de los extremos de replicones subsecuentes y la reparación de las dobles cadenas mediante el concurso de alguna de las topoisomerasas conocidas en célu-

las de mamífero, la topoisomerasa I que produce rupturas simples y la Topoisomerasa II que induce rupturas y reasociación de cadena doble.

Considerando la complejidad de la estructura de la cromatina y del proceso de la síntesis del ADN, así como el desconocimiento de muchos aspectos de la estructura y la duplicación del ADN en eucariontes, resulta aventurado proponer un modelo formal del mecanismo mediante el cual se lleva a cabo el ICH; sin embargo resulta conveniente proponer modelos operacionales, los cuales puedan ser descartados o modificados en base a las evidencias que al respecto se vayan obteniendo.

Con respecto al mecanismo involucrado en la formación de ICH hay varios modelos, en los que se realciona el tipo de evento generador principalmente a daño, retraso en el ciclo, eventos espontáneos o al mecanismo propiamente dicho.

Uno de los mecanismos considera: a) presencia de las rupturas al mismo nivel generadas por reparación o duplicación, b) formación de la estructura de Holliday, la cual ha sido propuesta para recombinación bacteriana (Holliday, 1964), en la cual se contempla la posibilidad de intercambio de doble banda (Fig. 1), y c) ruptura de las bandas no involucradas con el daño. De hecho este modelo se basa en el mecanismo de recombinación bacteriana de Holliday, ampliado con la explicación del posible origen de las rupturas necesarias para generar la estructura de Holliday (Kato, 1977).

Otro modelo propuesto (Painter, 1980) implica: a) la producción de daño que retarda la duplicación, aquí se podría agregar con base en los datos recientes los eventos que se ha visto que también inhiben la síntesis de ADN, b) lo anterior trae como consecuencia que los duplicones terminen la síntesis a muy diferente tiempo a nivel de los agrupamientos de duplicones que separan a duplicones subsecuentes y permite c) la ruptura en la continuidad de la banda parental a nivel del "cluster" y d) que cuando el duplicón retrasado termine de duplicarse, la asociación sea aleatoria entre bandas parentales e hijas, es decir que puede haber reasociaciones entre las bandas parentales e hijas, produciéndose con esto el intercambio de doble banda (fig. 2).

Este modelo se basa en: a) que los agentes cuyo daño retarda la progresión de la síntesis de ADN inducen un mayor número de ICH como lo hace la Mitomicina C, b) en el hecho de que el número de lesiones sobre el ADN es mucho mayor que el número de ICH (Sahar et al., 1981; Reynolds et al., 1979) pero que pudiera corresponder con el número de replicones, c) en el hecho de que en el síndrome de Bloom la síntesis de ADN procede más lentamente y hay un número basal muy alto de ICH (Chaganti et al., 1974; Hand y German, 1975), y finalmente, d) en la existencia de una topoisomerasa en *Drosophila* que es capaz de producir y reunir rupturas dobles (Liu et al., 1980).

Se puede considerar que hay dos diferencias fundamenta

les entre estos modelos:

- a) El lugar en el ADN donde se lleva a cabo la recombinación de doble banda. Así uno propone que es cerca ó donde se producen las lesiones y el otro propone que es en los agrupamientos que separan replicones subsecuentes.
- b) El mecanismo intrínseco. Uno sugiere un proceso de recombinación mediante una estructura tipo Holliday, producida por rupturas generadas por daño y/o duplicación y el otro propone un proceso de ruptura y reasociación aleatoria de la doble banda a nivel de los agrupamientos de duplicones, condicionado por el retraso relativo de la progresión de la síntesis de ADN entre replicones contiguos.

Con base en los hallazgos recientes se puede decir que los dos modelos no son excluyentes, ya que como se mencionó anteriormente no parece haber un mecanismo único de producción de ICH e incluso se pueden distinguir cuando menos dos vías basándose en las curvas de distribución de frecuencias de ICH/célula (Rainaldi y Mariani, 1982).

Hay otros modelos (Bender, et al, 1974; Comings, 1975) que difieren sólo en matices del modelo por recombinación.

Un modelo denominado de la "desviación duplicativa" (Ishii y Bender, 1980) propone que los ICH espontáneos son el resultado de una ruptura ocasional de las bandas parentales a nivel de la bifurcación del ADN durante la síntesis y

su reasociación con las bandas hijas de igual polaridad; por otro lado sugieren que los ICH causados por daño son debidos a que el daño sobre una de las bandas parentales hace que ésta sea rota a nivel del daño en la bifurcación del ADN durante su síntesis y que pudiera reasociarse con la banda hija recién sintetizada y de la misma polaridad. Después la banda parental no dañada podría romperse cerca del extremo terminal de la banda hija que es complementaria a la banda parental que tenía el daño y continuarse con ella, complementándose con la banda que tenía el daño (fig. 3), es decir, que sería como un cambio de vía durante la duplicación que permite llenar el espacio opuesto al daño.

El modelo se basa en los datos obtenidos por Ishii y Bender (1980), con inhibidores de la síntesis de ADN, los cuales incrementan de una manera proporcional los ICH basales e inducidos con luz U.V. a una misma concentración. Proponen además que el fenómeno espontáneo se incrementa en el síndrome de Bloom, porque en estas células la síntesis del ADN cursa más lentamente (Hand y German, 1975).

Lo interesante de este modelo es que además de proponer una explicación al mecanismo, le da un significado biológico importante, el cual es el de permitir el progreso de la síntesis de ADN a pesar de la presencia de lesiones.

ICH y Radiación Ionizante

Ha quedado bien establecida la inducción de ICH Por mu-

tágenos - carcinógenos químicos (Schreck et al., 1979; Stetka y Wolff, 1976 a y b) y luz U.V. (White y Hesketh, 1980; Mac Rae et al., 1979), sin embargo se han reportado datos contradictorios con respecto a las radiaciones ionizantes. Desde la publicación del trabajo realizado por Perry y Evans en 1975, en el cual probaron además del efecto de varios mutágenos químicos el efecto de los rayos X, han aparecido una serie de publicaciones relacionadas con el efecto de la radiación ionizante sobre la inducción de ICH (Abramovsky et al., 1978; Littlefield et al., 1979; Nakanishi y Schñeider, 1979; Renault et al., 1982; Solomon y Bobrow, 1975) en cuyos resultados se observa desde una inducción considerable a dosis tan bajas como 0.15 o 0.25 Gray (Gy) (Abramovsky et al., 1978; Morales et al., 1983), hasta ausencia total de inducción (Littlefield et al., 1979; Nakanishi y Schneider, 1979).

Basándose en experimentos con linfocitos humanos irradiados antes de la estimulación con fitohemaglutinina y por lo tanto, sin haber incorporado BrdUrd en ningún ciclo, se concluyó que la inducción de ICH por radiaciones observada por algunos autores, se debe a la sensibilización producida por la incorporación de BrdUrd al ADN (Littlefield et al., 1979).

En el trabajo de Perry y Evans (1975) usando rayos X en cultivo de células CHO con su ADN unifilarmente sustituido con BrdUrd, concluye que la inducción de la clase de lesión que produce ICH por rayos X, es relativamente ineficiente con respecto a los eventos que resultan en aberraciones cromosómicas, o bien que las lesiones que producen ICH son repa

radas en su mayoría; a esta conclusión llegan después de la comparación de la dosis de doblaje para ambos eventos, es decir, a las dosis en que se duplica la frecuencia basal (Perry y Evans, 1975).

Por otro lado, se ha obtenido cierta evidencia acerca del tipo de daño producido por algunos agentes químicos que pudiera estar relacionada con la inducción de ICH, como el caso de Mitomicina C (Ishii, 1981) u 8 methoxy psoralen mas U.V. (Sahar et al., 1981), pero no para radiación ionizante, además se ha propuesto que los ICH observados después de irradiación ionizante, en realidad representan translocaciones e inversiones, aparentando ICH sencillos y dobles, respectivamente, basándose en la baja frecuencia radioinducida de ICH y en una posible relación cuantitativa entre translocaciones e inversiones con la frecuencia observada de ICH (Wolff et al., 1974).

Hay una serie de evidencias que sugieren que el daño inducido por diversos agentes sobre el ADN es persistente no sólo a lo largo de un ciclo celular, sino incluso después de la división celular. Un tipo de evidencia se deriva de la persistencia de frecuencias altas de ICH en las células mucho tiempo después de haber sido tratadas *in vivo*, tanto experimentalmente con agentes mutágenos como Mitomicina C (Stetka et al., 1978) y Ciclofosfamida (Huff et al., 1982), como por tratamiento contra el cáncer con ciclofosfamida (Raposa, 1978). No obstante que la persistencia pudiera estar relacio

nada con la velocidad de recambio de los linfocitos, implica también que el daño no es reparado y permanece hasta que las células entran en etapa de síntesis y se forman los ICH (Schvartzman y Gutiérrez, 1980). Otro tipo de evidencia de la persistencia se puede obtener mediante el análisis de los ICH que ocurren en la 1a., 2a, y 3a. divisiones después de la inducción del daño mediante el análisis de células endoduplicadas, por la comparación de la frecuencia de ICH en 3a. división y por el protocolo de las "3 vías de diferenciación" recientemente desarrollado (Schvartzman y Goyanes, 1980).

Con el método de las células endorreduplicadas se ha demostrado persistencia del daño generador de ICH por Acetoxyacetil amino fluoreno, Etilmetano sulfonato (EMS), metilmetano sulfonato (MMS) y 4-Nitroquinolin 1 ± Oxido (Wolff, 1978).

Con el método de células de 3 divisiones se observa persistencia del daño inducido por 8-Methoxypsoralen mas U.V. cercano (Latt y Loveday, 1978) y Mitomicina C (Ishii y BENDER, 1978).

Con el método de "3 formas de tinción" se ha demostrado la persistencia del daño inductor de ICH por luz Ultravioleta (Schvartzman et al., en prensa).

Sin embargo, no hay evidencia disponible en relación con la persistencia de la lesión generada en el ADN por radiación ionizante, que es capaz de producir ICH.

O B J E T I V O S

Con este trabajo en células de la médula ósea de ratón *in vivo*, se pretende obtener información en relación con los siguientes aspectos del fenómeno de ICH:

- a) Probar si la radiación gamma induce ICH y si la incorporación de BrdUrd al ADN tiene algún efecto.
- b) Comparar la respuesta a la radioinducción de ICH y aberraciones en las mismas células *in vivo* y su correlación entre sí, y con la duración del ciclo celular y el índice mitótico.
- c) Analizar la estabilidad de la lesión radioinducida que genera ICH, como evidencia indirecta de la posibilidad de que ésta sea reparada.

El interés por realizar los experimentos *in vivo* radica por un lado, en comparar los resultados con modelos experimentales *in vitro* y por otro lado, en poner las bases para el desarrollo de modelos *in vivo*, en los que se pueda estudiar las consecuencias que tiene el daño inducido por radiaciones y otros agentes mutagénicos sobre las células o poblaciones celulares dentro de un organismo.

MATERIALES Y METODOS

El desarrollo de técnicas de tinción diferencial de cromátidas hermanas utilizando la incorporación de BrdUrd (Ko-

O B J E T I V O S

Con este trabajo en células de la médula ósea de ratón *in vivo*, se pretende obtener información en relación con los siguientes aspectos del fenómeno de ICH:

- a) Probar si la radiación gamma induce ICH y si la incorporación de BrdUrd al ADN tiene algún efecto.
- b) Comparar la respuesta a la radioinducción de ICH y aberraciones en las mismas células *in vivo* y su correlación entre sí, y con la duración del ciclo celular y el índice mitótico.
- c) Analizar la estabilidad de la lesión radioinducida que genera ICH, como evidencia indirecta de la posibilidad de que ésta sea reparada.

El interés por realizar los experimentos *in vivo* radica por un lado, en comparar los resultados con modelos experimentales *in vitro* y por otro lado, en poner las bases para el desarrollo de modelos *in vivo*, en los que se pueda estudiar las consecuencias que tiene el daño inducido por radiaciones y otros agentes mutagénicos sobre las células o poblaciones celulares dentro de un organismo.

MATERIALES Y METODOS

El desarrollo de técnicas de tinción diferencial de cromátidas hermanas utilizando la incorporación de BrdUrd (Ko-

renberg y Freedlender, 1974; Latt, 1973) descrita inicialmente por Zakharov y Egolina, 1972, y la posibilidad de analizar de esta manera la existencia de ICH, ha permitido el desarrollo de múltiples sistemas de detección de ICH, tanto *in vivo* (Bloom y Hsu, 1975; Kligerman y Bloom, 1976; Schreck *et al.*, 1979), como *in vitro* (Abey Sasaki, 1982); Guerrero *et al.*, 1979; Ikeuchi y Sasaki, 1981; Latt, 1974; Raffetto *et al.*, 1979; Vogel y Bauknecht, 1976).

Estas técnicas al igual que el método autorradiográfico se basan en la duplicación semiconservadora y la segregación diferencial de la BrdUrd incorporada al ADN, por lo que se requiere que dicha incorporación sea por cuando menos durante la primera de dos divisiones subsecuentes.

Debido a que cada una de las cromátidas del cromosoma tiene una cadena de ADN de doble banda, después de la primera división celular en presencia de BrdUrd, cada cromátida contiene su cadena unifilarmente sustituida con BrdUrd, después de la segunda división en presencia de BrdUrd, el cromosoma tiene una cromátida unifilarmente sustituida y otra bifilarmente sustituida; en divisiones subsecuentes en presencia de BrdUrd, la frecuencia de cromátidas unifilarmente sustituidas, es decir, las que contienen la cadena con timidina, se van diluyendo, de tal manera que en las células la proporción de cromosomas con una cromátida unifilarmente sustituida, va disminuyendo geométricamente, así es de 1/2 en la tercera división, 1/4 para la cuarta, 1/8 en la quinta, etc.

(fig. 4).

Estas diferencias en incorporación pueden ser analizadas por tinciones específicas que discriminan entre cromátidas unifilar y bifilarmente sustituidas con BrdUrd. Hay varias técnicas, algunas de las cuales usan tinciones para el microscopio de fluorescencia, siendo la más usual la que utiliza bibenzimida H 33258 mejor conocida como Hoechst 33258, con esta tinción las cromátidas unifilarmente sustituidas brillan intensamente al igual que las que no han incorporado BrdUrd, sin embargo las cromátidas bifilarmente sustituidas se observan muy opacas (Latt, 1973). Otra técnica que es una variante de ésta, mediante la cual después de ser teñidos los cromosomas con Hoechst 33258, se tratan las preparaciones con luz negra fluorescente o solar (Goto et al., 1975; Perry y Wolf, 1974; Wolff y Perry, 1974) por diferentes períodos dependiendo de la incorporación de BrdUrd y finalmente son teñidos con Giemsa; con esta técnica la cromátida bifilarmente sustituida con BrdUrd se tiñe muy levemente con Giemsa, en cambio la cromátida unifilarmente sustituida se tiñe normalmente, esta última técnica permite tener laminillas permanentes (Fig. 5).

Hay otra técnica sencilla que en vez de tratamiento con luz, usa amortiguador de fosfatos 1.0 pH 8.1 a 89°C por 15 min. y después tinción con Giemsa (Korenberg y Freedlender, 1974).

El principal problema para el desarrollo de sistemas *in vivo* para el análisis de ICH, consistió en el suministro de

BrdUrd, ya que la duración de los ciclos celulares es de varias horas y se requiere de esta substancia cuando menos durante el primero de los ciclos subsecuentes, lo cual implica un suministro de alrededor de 7 horas. Este problema fue resuelto de varias formas como: la aplicación de inyecciones intraperitoneales múltiples de solución de BrdUrd (Allen y Latt, 1976) y por infusiones subcutáneas (Pera y Mattias, 1976), o intravenosas (Schneider et al., 1976) o por la implantación de una tableta con BrdUrd pura (Allen et al., 1977), cubierta con parafina (McFee et al., 1983) o con agar (King et al., 1982).

En esta tesis se usó un método desarrollado por Morales-Ramírez (1980), el cual está basado en la inyección intraperitoneal de BrdUrd adsorbida a carbón activado de acuerdo con un método desarrollado por Russev y Tsanev, (1973).

El sistema de suministro de BrdUrd adsorbida a carbón activado además de ser sencillo, permite una clara diferenciación entre las cromátidas hermanas, habiéndose obtenido evidencia de que permite el aporte de BrdUrd por cuando menos 24 horas, lo cual fue sugerido por haberse observado células de 3a. división para períodos de 24 horas después de la inyección con BrdUrd-carbón activado (Morales et al., 1983).

Un método similar fue desarrollado simultáneamente por Kanda y Kato (1979), en cuyo reporte indican que no fue factible bajo sus condiciones, diferenciar células de la médula ósea, observando diferenciación sólo en espermatozonias y en

células inyectadas en la cavidad peritoneal de ratones. Concluyen que la incorporación de BrdUrd en las células se realizaba por difusión directa del carbón a las células. No obstante como fue demostrado por Morales-Ramírez (1980) es posible mediante este proceso no sólo marcar células de la médula ósea, sino otras tan alejadas de la cavidad peritoneal como lo son las células de la glándula salival de ratones, por lo que es factible que pueda usarse para cualquier tejido en proliferación. Además en el mismo trabajo se demostró que se puede observar el efecto de la Ciclofosfamida, conocido agente mutágeno indirecto, es decir que requiere activación metabólica, tiene en la inducción de ICH tanto en células de la médula ósea como de la glándula salival de ratón y de igual manera se ha observado producción de ICH por otros mutágenos químicos (Morales-Ramírez et al., 1980; Morales-Ramírez et al., en prensa), así como por rayos gamma en células de la médula ósea de ratón (Morales et al., 1980; Morales-Ramírez et al., 1983). Con este método se obtienen consistentemente valores basales de ICH relativamente bajos de alrededor de 3.5 (Fig. 6).

Animales

Se usaron ratones machos de la cepa Balb C reproducidos en el bioterio del laboratorio de Radiobiología Humana y de Mamíferos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), alimentados con comprimidos Purina *ad libitum* y bajo condiciones controladas de temperatura y de circulación

de aire.

Incorporación de BrdUrd

A ratones machos de entre 30 y 40 g de peso y de entre 3 y 4 meses de edad, se les suministró intraperitonealmente una suspensión acuosa de BrdUrd (Sigma Chemical) adsorbida a Carbón activado (Merck) en una dosis de 1.0 mg/g de peso.

La adsorción de BrdUrd al carbón activado se lleva a cabo mediante la agitación de una solución acuosa de BrdUrd (20 mg/ml) con 100 mg de carbón activado por ml de solución de BrdUrd, durante 2 horas.

Mediante este procedimiento se observa que hay una adsorción de más del 95% de la BrdUrd de las marcas utilizadas (tabla I), lo cual se demostró midiendo la adsorción a 280 nm que corresponde a la longitud de onda de máxima adsorción de la BrdUrd (fig. 7), en el sobrenadante de la suspensión. La adsorción se realiza bajo condiciones estériles; el carbón es esterilizado por calor a 150 °C por 2 horas y vuelto a esterilizar y desecar al mechero antes de preparar la suspensión. La solución acuosa de BrdUrd se esteriliza por filtración en filtro Millipore de 0.2 micrometros.

Cosecha y obtención de preparaciones de cromosomas

Después de 19 a 24 horas de la inyección intraperitoneal de la suspensión de BrdUrd-carbón activado a los rato-

nes, los animales fueron inyectados con una solución acuosa de colchicina (σ) a una dosis de 15 $\mu\text{g/g}$ de peso y 2 horas más tarde sacrificados por narcosis con éter o por dislocación cervical. Se extrajeron ambos fémures en cada ratón, los que fueron cortados por ambos extremos y se les inyectó medio Basal Eagle por un extremo, el contenido se recuperó en un tubo de centrífuga. La suspensión celular se centrifugó a aproximadamente 1000 G en una centrífuga clínica por 5 min, el precipitado se resuspendió en 0.5 ml de medio basal de Eagle, se le agregó 7.0 ml de solución hipotónica de cloruro de potasio (KCl 0.075 M) y se incubó a 37 °C por 15 minutos. Después de la incubación se centrifugó la suspensión celular a \pm 1000 G por 5 minutos, se quitó la solución hipotónica, las células se resuspendieron en 5 ml de fijador Carnoy (ácido acético:metanol, 1:3) y se les incubó por 10 min. El fijador se cambió 3 veces por centrifugación, después del último cambio las células fueron resuspendidas en aproximadamente 0.5 ml de fijador.

La suspensión celular en fijador, es goteada sobre portaobjetos muy limpios y fríos. Finalmente estas preparaciones se dejan secar al aire en la oscuridad.

Tinción Diferencial de las cromátidas hermanas

Se usaron dos técnicas de tinción diferencial, una basada en el método reportado por Goto et al (1975) usando Tionina y el otro basado en el método de Wolff y Perry (1974) -

usando bibencimida 33258 de Hoechst.

Para diferenciar las cromátidas por el método de Tionina, se trató a las laminillas con una solución acuosa 10^{-3} M de este colorante durante 10 minutos, se lavaron con agua, se montaron con amortiguador de Fosfato monobásico 0.16 M y Citrato tribásico 0.04 M pH 7.0. Se expusieron a la luz de una lámpara Fluoromeric de 750 watts durante 40 minutos a 6 cm de distancia y finalmente se tiñeron con colorante Giemsa al 3% en amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 6.8.

Para la diferenciación con Bibenzamida 33258 de Hoechst, se montaron las laminillas con el colorante a una concentración de 5 microgramos/ml en el mismo amortiguador fosfato-citrato antes mencionado y se expusieron a una lámpara de luz negra General Electric de 25 watts a un centímetro de distancia durante 60 a 90 minutos.

Después de la exposición a la luz, las laminillas se incubaron a 60 °C en 0.3 M NaCl-0.03M citrato trisódico (SSC 2X) en baño maría durante 20 minutos. Finalmente se lavaron con agua y se tiñeron con Giemsa como se mencionó para el método anterior.

Análisis

ICH. Los intercambios entre cromátidas hermanas se analizaron en al menos 30 células en metafase, que tuvieran sus cromátidas hermanas claramente diferenciadas y con su número

cromosómico completo (40 cromosomas). En ocasiones se realizaron conteos por más de un observador, o se les tomó una fotomicrografía a cada célula para análisis posterior y corroboración. A menos que se mencione en las tablas o figuras, se analizaron cinco animales por grupo.

Los ICH dudosos no fueron tomados en cuenta. Las fotomicrografías se tomaron en fotomicroscopios Zeiss usando película "High Contrast" o "Technical Pan" de Kodak.

Rupturas cromosómicas. Las rupturas cromosómicas fueron analizadas en las mismas células en que se hizo el conteo de ICH. En caso de duda se solicitó la opinión de otro observador y al igual que para el análisis de ICH se tomaron fotos para análisis posteriores. En caso de no haber consenso se descartaba la célula. Se consideró que la presencia de un dicéntrico y/o dos fragmentos cromosómicos representan 2 rupturas y el caso de un fragmento cromosómico representa una ruptura.

Indice Mitótico (IM)

Se hicieron dos conteos independientes de cuando menos 1,000 células en cada uno de cinco animales y se consideró en división mitótica únicamente a las células en metafase.

Tiempo de generación promedio (TGP)

Como se mencionó anteriormente es posible distinguir me

diante la tinción diferencial de las cromátidas hermanas, - las células que han pasado por uno, dos o tres ciclos de división; Ivett y Tice (1982) desarrollaron una ecuación que permite establecer la duración promedio del ciclo celular en la forma siguiente:

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

Donde:

T = Tiempo de administración de la BrdUrd

TGP = Tiempo de generación promedio

Por lo que para calcular el TGP se contaron los porcentajes de células en 1a., 2a. o 3a. división, en cuando menos 500 células. Los datos obtenidos se sustituyeron en la fórmula anterior.

Estadística

Los datos se expresan como el promedio más o menos la desviación estándar o el error estándar, según el caso, y en las tablas o gráficas se hace mención de esto.

Para el análisis de significación se usó la prueba de t "Student" o la prueba de Chi cuadrada (χ^2) con la corrección de Yates en el caso de comparar proporciones. En ambos casos se usó un programa incorporado en una calculadora Texas Instruments 59.

Irradiación

La irradiación de los animales a los tiempos descritos en los protocolos se efectuó en una fuente Vick Rad de ^{60}Co de exposición geométrica. Esta fuente presenta una razón de dosis de aproximadamente 6.9 Gy/min. Las dosis de exposición fueron corroboradas por termoluminiscencia, en el laboratorio de actinometría del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ). La irradiación fue individual y los dosímetros dentro de cápsulas de gelatina fueron colocados con tela adhesiva, uno en cada pata del ratón. No se hicieron correcciones para atenuación, ya que era de esperarse que ésta fuera mínima.

Protocolos

Protocolo I

Para determinar el efecto de las radiaciones sobre la inducción de ICH se irradiaron cuando menos 5 animales antes del suministro de BrdUrd (Fig. 8A) y para establecer el efecto de la BrdUrd incorporada al ADN sobre la producción de ICH por radiación, número similar de animales se irradiaron después de 9 horas de haber sido suministrada la BrdUrd (Fig. 8B). En ambos casos se inyectó colchicina a los animales, 19 horas después del suministro de BrdUrd y se les sacrificó 2 horas más tarde. Se hicieron testigos paralelos. Este protocolo se basó en estudios previos (Morales et al., 1980).

Protocolo II

Para comparar la frecuencia de ICH y de aberraciones radioinducidas en células con su ADN unifilarmente sustituido con BrdUrd, se irradió a dos grupos de cinco animales 9 horas después de haberse suministrado la BrdUrd y se sacrificaron 12 (Fig. 9A) y 18 (Fig. 9B) horas después de irradiar. La colchicina se les inyectó 2 horas antes del sacrificio. Los testigos no irradiados fueron sacrificados a los mismos tiempos (fig. 9). Considerando que el tiempo de generación promedio en las células de la médula ósea es de alrededor de 13 hs, se supuso que en el grupo sacrificado a las 12 h postirradiación, la mayoría de las células serían irradiadas en la etapa G₁; respecto al grupo sacrificado a las 18 h postirradiación se intentó compensar el retardo mitótico debido a la irradiación, el cual afectaría principalmente a la segunda división.

Protocolo III

Para determinar la estabilidad del daño radioinducido - generador de ICH, se irradiaron varios grupos de animales antes del suministro de BrdUrd, sacrificándose un grupo cada 24 horas hasta las 168 horas después de irradiación.

En todos los casos se suministró BrdUrd 24 horas antes y la colchicina 2 horas antes del sacrificio. Los grupos testigo se corrieron en paralelo con los lotes irradiados.

R E S U L T A D O S

1.- Inducción de ICH por radiación gamma y efecto de la incorporación de BrdUrd al ADN

Como se observa en la figura 11 y tabla 11, la radiación gamma es capaz de inducir ICH antes o después de la incorporación de BrdUrd al ADN (Protocolo I, A y B), no obstante se nota claramente que la BrdUrd aumenta de manera notable la frecuencia de ICH₅ radioinducidos. El comportamiento de las curvas de inducción de ICH por radiación antes o después de la incorporación de BrdUrd es completamente diferente, en el caso de inducción de ICH por radiación gamma después de la incorporación de BrdUrd la respuesta es lineal cuando menos en el intervalo probado. Con una relación dosis-efecto de 8.4 ICH₅/Gy. En cambio la inducción de ICH por radiación gamma antes de la incorporación de BrdUrd, además de ser bastante menor aparentemente tiene dos pendientes, una entre 0 - 0.6 Gy con una relación de 2.5 ICH/Gy y otra entre 0.6 y 1.9 Gy con una relación de 0.62 ICH/Gy.

La distribución de frecuencias de ICH/célula (Figs. 12) se comporta como tipo Poisson tanto para las células irradiadas antes de la incorporación de BrdUrd como para las irradiadas después de esta, no obstante debido al número de células analizadas esto se ve más claramente en las células irradiadas después de la incorporación. Aparentemente se requie_

ren alrededor de 200 células para un buen ajuste entre la -
distribución teórica y la observada, para un incremento de -
hasta 6 ICH/célula respecto al control.

Por otro lado, parece ser común la presencia de células
con una frecuencia alta de ICH, que se salen completamente -
de la distribución teórica y las cuales representan menos -
del 1%. Es posible que el origen de los ICH_s en dichas célu-
las no sea daño radioinducido, sino por ejemplo inhibición -
de las síntesis de ADN por la BrdUrd.

II. Comparación de las frecuencias de inducción por radiación de ICH y rupturas cromosómicas y su correlación entre sí y con el IM y el TGP

Como se describió en los protocolos el efecto de las radiaciones sobre ICH y las rupturas cromosómicas fue analizado a las 12 y 18 hs y después de la irradiación en células de 2a. división, es decir que fueron irradiadas después de haber incorporado BrdUrd por un ciclo.

En la tabla III se puede observar que la inducción de ICH, para las células cosechadas a las 12 o 18 hs después de la irradiación es prácticamente igual y en ambos casos fue altamente significativa ($p < 0.001$ t de student) respecto a sus testigos. Con relación a las aberraciones se nota una clara inducción para ambos períodos postirradiación, siendo mayor a las 18 horas, no obstante la diferencia entre ambos períodos no fue significativa debido a la variación, la cual se explica por el tamaño de la muestra por animal. Con respecto a los índices mitóticos, éstos fueron significativamente diferentes en ambos períodos postirradiación en relación a sus controles ($t_1, p < 0.02$, $t_2, p < 0.05$ t de student) aunque la diferencia neta es de sólo 7 y 1.5 metafases por 1000 células, respectivamente.

De lo anterior se desprende que los ICH_s y las rupturas cromosómicas constituyen una respuesta clara a la exposición a las radiaciones.

Al comparar la inducción de ICH con la de rupturas cromosómicas, se puede observar que la frecuencia de ICH/célula es hasta 2 órdenes de magnitud mayor que las rupturas cromosómicas/célula comparadas bajo las mismas condiciones y en las mismas células siendo similar dicha respuesta para los dos períodos postirradiación.

Es importante tomar en cuenta que si bien el número de células analizado no es el más apropiado para establecer de una manera precisa el número de aberraciones radioinducidas sí es suficiente para establecer el orden de magnitud de la respuesta.

Dado que la frecuencia de ICH es igual en ambos períodos postirradiación, a diferencia del TGP que es mayor en el segundo período, se puede proponer que no hay una correlación entre la variación del TGP y la frecuencia de ICH.

Para establecer la existencia de alguna correlación entre la inducción de ICH y de aberraciones, se comparó la frecuencia de ICH en células con o sin rupturas (Tabla IV). De dicha comparación se desprende que las células con o sin rupturas presentan prácticamente la misma frecuencia de ICH, lo que sugiere que los fenómenos operan de una manera independiente.

Del análisis de las frecuencias acumulativas de ICH en los dos períodos postirradiación (fig. 13) se desprende que la respuesta a nivel de poblaciones celulares es prácticamente la misma.

Con respecto a las rupturas cromosómicas se observó un dato interesante, dado que se obtuvo una frecuencia más alta de rupturas dobles en el segundo período postirradiación que en el primero (Tabla V). Sin embargo, debido al número de células analizadas y a la variación entre los ratones no es posible determinar la importancia de dicha observación. No obstante es posible que *in vivo* las células con dos rupturas tengan un mayor retardo mitótico que las células con rupturas sencillas.

En la figura 14 se puede observar las frecuencias de células en 1a., 2a. y 3a. divisiones a los dos tiempos postirradiación. Con relación a los testigos se nota una disminución de las células de la 1a. división (37%, $p < 0.005$ t student) y un incremento en las células de 2a. (12%, $p < 0.03$ t student) y 3a. división (19%, $p < 0.02$ t de student), dichos cambios son de esperarse, debido a la proliferación continua de las células en la médula ósea.

Por otro lado, las células irradiadas en t_1 demuestran una acumulación de metafases de 1a. división (35%, $p < 0.08$ t de student) y una disminución en el número de metafases en 2a. división (26%, $p < 0.03$ t de student) con respecto a su testigo. Por otro lado las células con 18 h postirradiación tienen una importante disminución de las células de 3a. división (92%, $p < 0.001$) con relación al testigo correspondiente.

Dichos cambios se reflejan en el TGP, (Tabla III), ha-

biendo una diferencia altamente significativa ($p < 0.001$ t - de student) de dos horas y media para el período de 18 h post irradiación.

III. Persistencia del daño radioinducido generador de ICH

Usando el protocolo III (Fig. 10) en el cual los animales son irradiados con 1.9 Gy al tiempo cero y se analiza la frecuencia de ICH/célula a las 24, 48, 72, 96 y 168 postirradiación. Se suministró la BrdUrd necesaria para el análisis de ICH 24 h antes del sacrificio del animal. Para el primer periodo (24 h) la BrdUrd se inyectó inmediatamente después de la irradiación.

En la figura 15 se observan los resultados en 2 diferentes experimentos para cada tiempo postirradiación (a excepción de 168 h postirradiación), en los cuales se observa una buena reproducibilidad de los cambios de frecuencia en función del tiempo, de igual forma que en los testigos simultáneos.

En la Tabla VI que es un resumen de los datos de la figura 15, se observa que la frecuencia de ICH sufre variaciones importantes en el tiempo postirradiación. A las 24 h postirradiación la frecuencia de ICH se incrementa al doble del valor basal ($p < 0.0001$, t de student). Dicho incremento disminuye significativamente a las 48 h con respecto al observado a las 24 h ($p < 0.03$, t de student). Sin embargo a las 72 h hay un incremento inesperado a una frecuencia igual a la observada a 24 h. A las 96 h una nueva e importante disminución que (24 vs 96 $p < 0.0002$ t de student) sin embargo sigue siendo significativamente mayor que el valor basal

(p. < 0.001 t de student).

A las 168 h postirradiación hay una clara disminución - en la frecuencia de ICH radioinducidos, no habiendo ya diferencia significativa con el valor basal.

Es importante hacer notar que la presencia de algunas - células con una frecuencia muy alta de ICH especialmente a - las 72 y 96 hs postirradiación (fig. 16) influye de una manera importante en la frecuencia de ICH/célula en algunos animales, lo que repercute de cierta forma en el promedio pero de una manera más importante en la desviación estándar y en los rangos (Tabla VI).

En la figura 16 se observan las distribuciones de frecuencias de ICH/célula para los diferentes tiempos postirradiación, así como su comparación con las distribuciones de - Poisson teóricas. Se puede observar que para el testigo y 24 h postirradiación el ajuste con la distribución teórica es muy bueno. Para 48, 72 y 96 h no obstante que el número de células analizado es suficiente para obtener un buen ajuste con la distribución teórica, éste no es tan bueno. A las 48 h hay una aparente tendencia hacia los valores basales siendo la moda entre 3 y 4, en el ajuste la moda es entre 4 y 5. A las 72 h aunque la moda es de alrededor de 6.0 ICH/célula persiste un número relativamente alto de células con frecuencias entre 2 y 4 ICH. Esto sugiere la presencia de 2 subpoblaciones. A 96 h hay una clara tendencia a distribuirse de una manera similar al testigo, pero en una frecuencia al-

go mayor de células de más de 3 ICH/célula.

Para calcular la distribución teórica para 72 y 96 hs - no se tomó en cuenta las células con frecuencia muy alta (Fig. 16 en negro), ya que afectan de manera importante el ajuste de la curva. Se supuso que en dichas células la frecuencia alta de ICH es debido a mecanismos o eventos diferentes del daño radioinducido, con base en dos datos previamente reportados (Rainaldi y Mariani, 1982).

La proporción de células con 1 a 3 y 6 a 8 ICH_s para cada período postirradiación fueron comparadas con el testigo usando la prueba de Chi cuadrada con modificación de Yates - (Tabla VII). De esta comparación se puede concluir, que la diferencia importante observada a las 24 hs es claramente disminuida en 48 hs (40.4 - 24.2 y 29.1 - 16.1) notándose además que la proporción de células con 3 y 8 ICH no fueron significativamente diferentes al testigo. Por otro lado las diferencias observadas a 72 h postirradiación son similares a las obtenidas a 24 h tanto para 1-3 como para 6-8 ICH. A las 96 h no se obtuvo diferencia significativa respecto al testigo, con excepción de la observada para 6 ICH en la cual sí hubo significatividad ($p < 0.002$).

Para descartar la posibilidad de que las diferencias observadas en los diferentes tiempos postirradiación fueran debidas a diferencias entre los animales, las proporciones de células con 1 a 3 y 6 a 8 ICH_s fueron comparadas entre los animales para cada tiempo postirradiación, las diferencias -

de dicha comparación no fueron significativas (Chi χ^2).

D I S C U S I O N

I. Inducción de ICH por radiación gamma y efecto de la Incorporación de BrdUrd al ADN

Existen en la literatura varios trabajos relacionados con la generación de ICH por radiación ionizante, realizados en sistemas y condiciones muy diversas. Los resultados ahí reportados, como se mencionó anteriormente, van desde una considerable inducción de ICH a dosis tan bajas como 0.15 Gy (Abramovsky et al., 1978; Anderson et al., 1981; Morales et al., 1983) hasta una nula inducción (Nakanishi y Schneider, 1979; Littlefield et al., 1979).

Littlefield et al., (1979) basándose en la ausencia de respuesta a la generación de ICH por rayos gamma en linfocitos humanos irradiados en G_0 , propone que la BrdUrd sensibiliza al ADN para la producción de ICH por radiación ionizante. Por otro lado Morales et al., (1983), observaron un incremento significativo de ICH en células irradiadas con 0.36 Gy después de incorporación de BrdUrd en comparación con las irradiadas antes del suministro de BrdUrd. La propuesta de Littlefield et al., coincide con los resultados obtenidos previamente por diferentes autores, ya que en general los trabajos en los cuales la irradiación se efectúa antes de la incorporación de BrdUrd al ADN obtienen frecuencias menores de ICH (Bornace et al., 1980; Littlefield et al., 1979; Nagasawa y Little, 1979; Nakanishi y Schneider, 1979), que los -

que irradian después de la incorporación de BrdUrd durante - un ciclo de división (Abramovsky et al., 1978; Anderson et al., 1981; Perry y Evans, 1975; Solomon y Bobrow, 1975; Morales et al., 1983).

Los resultados obtenidos en esta tesis concuerdan claramente con el hecho de que la BrdUrd sensibiliza al ADN para inducir ICH por radiación gamma, así cuando los animales son irradiados después de la incorporación de BrdUrd, la respuesta es lineal en el rango de 0 a 0.6 Gy con una eficiencia de 8.4 ICH/célula/Gy; en cambio cuando las células son irradiadas antes de la incorporación del BrdUrd la curva dosis-ICH no es lineal con aparentemente dos pendientes, una en el rango de 0 a 0.6 Gy con una eficiencia de 2.5 ICH/célula/Gy y otra en el rango de 0.6 a 1.9 Gy con una eficiencia de 0.62 ICH/célula/Gy, lo que implica que la BrdUrd incorporada al ADN aumenta de 3 a 13 veces la inducción de ICH.

El comportamiento lineal de la curva de dosis respuesta para la irradiación después de la incorporación de BrdUrd está de acuerdo con los datos de Perry y Evans, 1975, en células de criseto chino (hamster).

Por otro lado el comportamiento no lineal de la curva de dosis ICH en células irradiadas antes de la incorporación de BrdUrd no está de acuerdo con los reportes previos obtenidos en células de la médula ósea de ratón *in vivo* (Nakanishi y Schneider, 1979) y en células de criseto chino *in vitro* (Renault et al., 1982), en los cuales reportan un comportamiento

lineal. Sin embargo, el primer reporte no incluye datos para dosis menores de 2.0 Gy y el segundo no obtiene un comportamiento claro entre 0.5 y 2.0 Gy. En linfocitos humanos estimulados con fitohemaglutinina *in vitro*, Tice (comunicación personal) ha obtenido una respuesta no lineal irradiando en G_0 .

Recientemente Chao y Rosenstein (1984), han obtenido datos con radiación gamma (^{60}Co) de los que se desprende la presencia de dos pendientes, una hasta 0.5 Gy y otra de 0.5 hasta 5.0 Gy, con pendientes muy similares a las presentadas en esta tesis.

La presencia de dos pendientes pudiera estar de acuerdo con el modelo de Painter (1980) en el cual postula que las radiaciones ionizantes inducen pocos ICH, porque el daño que produce este tipo de radiación inhibe la iniciación de la síntesis de ADN a diferencia de los buenos inductores que inhiben la progresión, por ejemplo luz U.V. En el caso de esta tesis, el efecto del daño producido a dosis bajas que es capaz de generar ICH con relativa eficiencia es inhibido a dosis más altas por otros tipos de daño, por ejemplo: rupturas dobles y rupturas simples cercanas en la misma o en diferente banda del ADN, las cuales aumentan su probabilidad de ocurrencia con la dosis. Chao y Rosenstein (1984) han obtenido evidencia de que la radiación gamma si es capaz de inhibir la inducción de ICH producidos por luz U.V.

Con respecto a la eficiencia de inducción de ICH por la

irradiación con rayos gamma antes de la incorporación de ^{32}P -BrdUrd, en esta tesis los resultados indican que es mayor que la de aproximadamente 1.0 ICH/célula observada por otros autores (Fornace et al., 1980; Nakanishi y Schneider, 1979; Popescu, 1979; Renault et al., 1982) usando rayos X. Es posible que las discrepancias en respuesta sean debidas a las diferencias en energía de la fuente de radiación; Fornace y colaboradores (1980) y Renault y colaboradores (1982) usan fuentes de rayos X de aproximadamente 200 KeV y en esta tesis se usaron rayos gamma de 1.3 MeV han sido propuestos argumentos similares para explicar diferencias en los resultados obtenidos, respecto a la radioinducción de rupturas cromatídicas (Ludmik et al., 1981) Chao y Rosenstein (1984) han reportado datos muy similares usando rayos gamma (^{60}Co). Por otro lado nuestros resultados no coinciden con los obtenidos por (Littlefield et al., (1979) en linfocitos irradiados con rayos gamma antes de ser estimulados por fitohemaglutinina, ya que no observaron diferencias significativas en ICH a dosis de 1.5 y 3.0 Gy con respecto al testigo. Esta discordancia en los resultados tal vez sea debida a las diferencias fisiológicas entre los linfocitos en G_0 y las células de la médula ósea que está en proliferación continua o bien a la disponibilidad de tiempo para reparar el daño involucrado en la producción de ICH (Schvartzman y Gutiérrez, 1980). Otra posibilidad pudiera ser la dificultad de distinguir diferencias pequeñas en los valores basales de 7 a 9 ICH/célula obteni-

dos en su trabajo.

Con relación a la eficiencia en la inducción de ICH por radiación gamma en células que han incorporado previamente - BrdUrd al ADN, Perry y Evans (1975), reportan alrededor de - 4 ICH/Gy, para rayos X en célula de criseto chino *in vitro*; por otro lado Abramovsky et al., (1978), observan una eficiencia de alrededor de 6.0 ICH/Gy para rayos gamma en linfocitos humanos. Las diferencias con los datos de esta tesis, en los cuales se obtuvo una eficiencia de 8.4 ICH/Gy pueden explicarse por las diferencias en los tipos celulares, aunque parece ser que también la energía de la fuente pudiera estar jugando un papel importante, en particular con respecto a - las eficiencias obtenidas en esta tesis y por Perry y Evans (1975).

Las diferencias entre las curvas de dosis-respuesta sugieren que la BrdUrd sensibiliza al ADN en la inducción de - ICH por radiación ionizante como fue propuesto previamente - (Littlefield, et al., 1979; Morales-Ramírez et al., 1983). - Ya que la diferencia entre la timidina y la bromodeoxyuridina es el átomo de Bromo que sustituye al metilo de la timidina, resulta interesante investigar el papel que juega este - átomo en la sensibilización. En particular como un modelo para el estudio de la clase(s) de lesión(es) involucrada(s) en la producción de ICH.

El análisis de las poblaciones celulares permite observar que la distribución de frecuencia de ICH/célula se ajusta

ta de una manera muy aproximada a la distribución de Poisson como ha sido previamente descrito (Rainaldi y Mariani, 1982; Morales et al., 1983) tanto para las poblaciones testigo como para las irradiadas, antes o después de la incorporación de BrdUrd al ADN. Resulta más aparente en la población irradiada después de la incorporación de BrdUrd, lo cual puede ser debido al tamaño de la muestra.

Es interesante el hecho de encontrar algunas células (1%) que tienen frecuencias extremadamente altas de ICH y con una probabilidad muy baja de que sus ICH hayan sido inducidas o al menos directamente por la radiación, lo cual es apoyado por el hecho de que también se presentan en los testigos no irradiados. En estos casos los ICH son aparentemente inducidos por el efecto inhibitor de la BrdUrd sobre la síntesis de ADN ya que en las células los ICH así inducidos se presentan en frecuencias muy altas y no se ajustan a la distribución de Poisson (Rainaldi y Mariani, 192; Morales et al., 1983).

II. Comparación de las frecuencias de ICH y rupturas cromosómicas inducidas por radiación y correlación de estos eventos entre sí y con el IM y el T.G.P

La radiación ionizante produce principalmente 3 tipos - de lesión sobre el ADN, rupturas de una sola banda, rupturas dobles y daño sobre las bases.

La proporción de estas lesiones se ha estimado de 10 a 20 rupturas sencillas por una doble. El daño sobre las bases es aproximadamente igual al de lesiones sencillas. Debido a que el ADN se encuentra estrechamente asociado a proteínas - en la cromatina de células eucariontes, existe la posibilidad de que la radiación produzca enlaces ADN - proteína o incluso con algunas otras moléculas.

La relación de estas lesiones radioinducidas con la producción de los diferentes tipos de aberraciones tiene un interés especial tanto para el establecimiento del significado biológico de dichos eventos citogenéticos, como para establecer las consecuencias que tienen para las células y los organismos en las cuales suceden.

Se ha propuesto que las rupturas cromosómicas son producidas por rupturas dobles, por rupturas sencillas muy cercanas en cadenas opuestas e incluso por daño en las bases del ADN. De igual forma se ha propuesto que dichas rupturas son el producto de la lesión más la actividad de reparación o por la falta de la misma. Sin embargo la mayoría de las evi-

dencias apoyan el que las rupturas dobles son la principal, sino es que la única causa de las rupturas cromosómicas (Natarajan, 1976).

Entre las evidencias más significativas se pueden citar las siguientes:

- 1) Ha sido establecido que las radiaciones inducen aberraciones de tipo cromosómico cuando las células son expuestas en la etapa G_1 , es decir antes de la duplicación del ADN, en cambio las células irradiadas en G_2 presentan aberraciones de tipo cromatídico (Evans y Savage, 1963).
- 2) En estudios utilizando uridina tritiada con actividad específica muy alta induce únicamente aberraciones cromatídicas en células en etapa G_1 . Lo cual es in-terpretado como que en las zonas de transcripción - las partículas beta producen rupturas, las cuales solo afectan a la banda que se transcribe y que dicha lesión se puede expresar como ruptura cromatídica en la siguiente metafase (Kiessling et al., 1971 y Natarajan y Sharma, 1971).
- 3) Natarajan y colaboradores (1980, 1982) han realizado una serie de experimentos utilizando la Endonucleasa de Neurospora (E.C.J.I.4.), enzima cuyo sustrato es el ADN de una sola banda, transformando rupturas de banda simple en rupturas dobles. Dicha enzima es in-troducida en células de ovario de criseto chino (CHO)

mediante el uso de virus sendai en células irradiadas con rayos X. Usando este protocolo se demostró que la endonucleasa aumenta las frecuencias de aberraciones cromosómicas radioinducidas cuando las células son irradiadas y tratadas con la enzima en la etapa G₁ y de aberraciones cromatídicas cuando las células son irradiadas y tratadas con la endonucleasa en G₂.

Una cuantificación apropiada de las rupturas inducidas por radiaciones es entorpecida por la reparabilidad de lesiones, tanto en una banda como en las dos bandas, así como otros eventos como sensibilidad o muerte celular que van a alterar el número de rupturas observables en metafase. Recientemente Cornforth y Bedford (1983) han desarrollado un elegante sistema para establecer el número de rupturas inducidas en la etapa G₁ por rayos X. Dicho método consiste en inducir la condensación prematura inmediatamente después de la irradiación de los cromosomas de fibroblastos humanos en etapa G₁ mediante la fusión con células HeLa en mitosis marcadas con BrdUrd.

En este protocolo analizan los cromosomas prematuramente condensados después de teñirlos con la técnica de FPG evitando la interferencia de los cromosomas que inducen la condensación, los cuales van a estar pobremente teñidos. Mediante este protocolo determinan que la eficiencia de inducción de rupturas cromosómicas es de 0.063 rupturas por célula por 0.01 Gy.

Sin embargo se ha estimado que las radiaciones ionizantes producen aproximadamente de 10 a 20 rupturas sencillas en el ADN por célula por 0.01 Gy, es decir del orden de 1 a 2 rupturas dobles por célula por 0.01 Gy, asumiendo que la relación de rupturas simples a dobles es de diez a una (Rydberg, 1980).

Si estas estimaciones son apropiadas implicaría que una de cada 15 o 30 rupturas dobles no se expresan como rupturas cromosómicas o que las estimaciones del número de rupturas sobre el ADN por métodos bioquímicos introduce algún error, tal vez produciendo rupturas en algunos sitios frágiles durante el proceso de cuantificación.

En el mismo trabajo Cornforth y Bedford, verifican que bajo sus condiciones de exposición a las radiaciones en la etapa G_1 , estas células presentan sólo aberraciones de tipo cromosómico cuando son analizadas en metafase.

La eficiencia de las radiaciones ionizantes para inducir rupturas cromosómicas, analizadas en metafase, es de aproximadamente 0.0032 ± 0.0017 ($\bar{X} \pm S$) rupturas/célula por 0.01 Gy. Estimada a partir de los resultados obtenidos por diversos autores, en diferentes sistemas y para el rango de entre 0.5 y 3.0 Gy (Brewen y Luippold, 1971; Lloyd et al., 1973; Moore, 1980; Natarajan et al., 1980; Tremp, 1981; Wyszynska y Liniecki, 1980).

Es interesante considerar que de las rupturas cromosómicas por radiación en etapa G_1 (0.063/célula/0.01 Gy solamente el 5% (0.003/célula/0.01 Gy) permanecen, se expresan o

son detectables en metafase. Esto puede ser explicado en base a la posibilidad de que estas lesiones sean reparadas.

Conforth y Bedford (1983) observaron que las rupturas cromosómicas inducidas por radiación son reparadas muy eficientemente en las primeras 6 hr. después la eficiencia disminuye aunque continua la reparación. Esto resulta relevante en relación con el tiempo de que dispone una célula para reparar dicho daño antes de que la célula entre en división, especialmente en células en proliferación continua.

Los datos anteriores coinciden con los experimentos de Chao y Rosenstein (1984) en los cuales observan que la inhibición por radiación gamma de la inducción de ICH por Luz Ultravioleta va disminuyendo de una manera importante en las primeras 6 horas después de la irradiación. Si esta correlación es pertinente implicaría que en ambos sistemas las rupturas dobles son reparadas y que dichas rupturas son responsables de la inhibición de la formación de ICH.

No habiendo evidencia experimental previa, Perry y Evans (1975) partiendo de los resultados obtenidos de la exposición con rayos X de células con su ADN unifilarmente sustituido con BrdUrd concluyen que la radiación induce un incremento mínimo de ICH comparado con la incidencia de aberraciones cromosómicas y cromatídicas sugiriendo que la inducción de ICH por rayos X es muy ineficiente o que la lesión involucrada es rápidamente reparada. Para comparar las eficiencias se basaron en la dosis de doblaje (incremento relativo), es de-

cir, la dosis en que se duplica el valor basal de ICH y que en su caso fue de 4.0 Gy. Estimando que a esta dosis la frecuencia basal de aberraciones se incrementa aproximadamente veinte veces, sin precisar la fuente de dicha estimación.

En la literatura con frecuencia se utiliza indistintamente dos índices de la sensibilidad de métodos o de células frente a agentes: el incremento relativo y el incremento neto. El incremento relativo definido en términos del número de veces que se aumenta el valor basal y el incremento neto definido como la diferencia con respecto al valor basal.

Es importante tener en consideración que si bien el incremento relativo es un buen índice de la eficiencia, no lo es para comparar eficiencias de eventos con valores basales muy diferentes, ya que en sí las diferencias en los valores basales hacen que la comparación se pueda llevar a cabo entre diferentes ordenes de magnitud e incluso la aplicación de los criterios de incremento relativo e incremento neto sobre los mismos datos se pueden llegar a conclusiones contradictorias.

Un ejemplo lo constituyen las conclusiones obtenidas por Shiraishi y Sandberg (1978) en relación con la sensibilidad a la inducción de ICH por Mitomicina C en células de pacientes con síndrome de Bloom. En dicho estudio compararon el incremento relativo de ICH inducido por Mitomicina C en células de pacientes con síndrome de Bloom y el obtenido en células de individuos normales.

Sus datos indican que la frecuencia de ICH a una concentración de mitomicina C 1×10^{-9} M para células normales aumenta 2.2 veces el valor basal (6.4 ICH/célula) y para células de pacientes con síndrome de Bloom aumentan 1.6 veces su valor basal (80 ICH/célula) concluyendo que las células de pacientes con síndrome de Bloom no son sensibles a Mitomicina C. respecto a la inducción de ICH.

Si se comparan los mismos datos por incremento neto se tendría que a la misma concentración de mitomicina en las células normales se producen 7.8 ICH/célula sobre el valor basal y en las células de pacientes con síndrome de Bloom se producen 48 ICH/célula; de lo cual se puede concluir que las células de pacientes con Bloom sí son más sensibles a la inducción de ICH por Mitomicina C.

En los resultados reportados en esta tesis se observó un incremento significativo de ICH a dosis tan bajas como 0.12 Gy, siendo la dosis de doblaje de 0.4 Gy, es decir, 10 veces menor que la obtenida por Perry y Evans (1975). Esta discrepancia se puede explicar con base en la diferencia de frecuencias espontáneas, las cuales son tres veces mayores en las células CHO usadas por Perry y Evans (1975) que las obtenidas en células de médula ósea *in vivo*. Esta situación permite poner en duda la utilidad de la dosis de doblaje para comparar resultados de sistemas con diferentes valores basales de ICH. Siendo esta objeción más pertinente en la comparación de eventos con valores basales tan diferentes como

lo son los ICH y las aberraciones cromosómicas (Morales et al., 1983). En este trabajo con base en los incrementos netos de ICHs y rupturas cromosómicas por célula, inducidos por la radiación, se puede concluir que los daños observados como ICH son aproximadamente 80 veces más frecuentes que los expresados como rupturas cromosómicas. Aunque pudiera argumentarse que el número de células analizadas no permite una estimación muy precisa de las rupturas, sí es evidencia suficiente dada la magnitud de la diferencia en respuesta. De igual forma, los resultados de Anderson et al., (1981) indican que hay una eficiencia 30 veces mayor en la inducción de ICH por radiación ionizante que de rupturas cromosómicas, en condiciones similares de sustitución de BrdUrd en el ADN, que en el trabajo de Perry y Evans (1975) y en la presente tesis.

Estos resultados no son sorprendentes, ya incluso comparando la eficiencia neta de ICH obtenida por Perry y Evans (1975) con la de rupturas cromosómicas reportada aquí, resulta una relación de 20 a 60 veces.

Otro aspecto que tiene que ser considerado, es el hecho de que las células en médula ósea no están sincronizadas, por lo que no es posible definir de una forma precisa la etapa del ciclo celular en que las células fueron irradiadas. Sin embargo, si consideramos el tiempo de generación promedio y analizamos solo células en metafase de la segunda división se tiene una mayor posibilidad de predecir o establecer

en qué etapa del ciclo se encontraban la mayoría de las células al ser irradiadas.

Es por lo que en el protocolo (II A) se consideró que - siendo el tiempo de generación promedio para las células de médula ósea de alrededor de 13 hs., si se irradian las células 12 hs antes del sacrificio (mitosis), las células se encontrarían en "G₁" del segundo ciclo y en caso de retardo mitótico en "G₁" o principios de la etapa "S".

Sin embargo, debido a que el retardo mitótico puede - afectar en mayor o menor grado a las diferentes células, se decidió analizar células (II B) en metafase de 4 a 6 horas más tarde que para el primer grupo. Se supuso que al analizar células de segunda división se descartaba en cierto grado a las células que estuvieran en etapas previas a "G₁" o "S" del segundo ciclo, las cuales tenían la posibilidad de haber pasado por 3 ciclos de división. Por lo que se consideró que analizando células en segunda división en el segundo tiempo post-irradiación se tendría una población compuesta por células con ciclos de división mayores, tanto por condiciones naturales, por efecto de la irradiación o la combinación de ambos, habiendo por lo tanto la posibilidad de que hubieran sido irradiados en G₁ o S del segundo ciclo de división.

Dos datos apoyan lo anterior; la frecuencia de ICH en los 2 períodos es igual y la presencia en nuestra muestra de únicamente aberraciones de tipo cromosómico.

En el caso de células con su ADN no substituído con BrdUrd existe una dificultad técnica para analizar en las mismas células las rupturas cromosómicas y los ICH inducidos por radiaciones, puesto que los ICH solo pueden analizarse en la segunda de dos divisiones subsecuentes, en cambio las aberraciones, lo más conveniente es analizarlas en la primera mitosis después de irradiación. Sin embargo, de los datos de la literatura se obtiene que la frecuencia de rupturas por célula por 0.01 Gy es de 0.003 en el rango de 0 - 3.0 Gy (Lloyd et al., 1973; Moore, 1980; Wyszynska y Liniecki, 1980; Natarajan et al., 1980; Tremp, 1981), en cambio la frecuencia de ICH/célula por 0.01 Gy obtenida por Chao y Rosenstein (1984) y en los datos presentados aquí, es de 0.025 ICH/célula/0.01 Gy en la 1a. pendiente (de 0 a 0.6 Gy) y de 0.006 ICH/célula/0.01 Gy en la segunda, de tal forma que la diferencia entre las frecuencias de ambos eventos es de 8 veces más ICH que rupturas para la primera pendiente y de 2 veces para la segunda pendiente. Es conveniente recalcar que dado que se ha obtenido evidencia muy sugestiva de que las rupturas dobles en el ADN pueden inhibir la formación de ICH y dado que las rupturas dobles van a producir las rupturas cromosómicas, es factible pensar que la disminución en la eficiencia de las radiaciones para inducir ICH a dosis mayores de 0.5 Gy sea debida a la presencia de un mayor número de rupturas dobles.

Se puede inferir de lo anterior que la eficiencia de

un agente para inducir ICH es inversamente proporcional a su eficiencia para inducir rupturas cromosómicas, es decir rupturas de doble banda. Es importante tener en cuenta que las radiaciones producen una importante reducción en la viabilidad aún a dosis alrededor de 0.5 Gy por lo que la viabilidad en sí puede ser otra limitante para que las radiaciones puedan expresar su capacidad de inducir la lesión involucrada en la producción de ICH. La frecuencia de rupturas por célula a dicha dosis sería 3.15, en células inmediatamente después de la irradiación (Cornforth y Bedford, 1983) y de aproximadamente 0.15 en células en metafase.

Con respecto al origen de las rupturas cromosómicas y los ICHs, el hecho de que la frecuencia de ICH en células con o sin rupturas cromosómicas sea igual, sugiere que los dos eventos son independientes, es decir, que el daño o evento radioinducido que produce rupturas cromosómicas parece ser independiente del que induce ICH. Hay otra serie de observaciones, además de las ya mencionadas que apoyan la diferencia de origen de las rupturas cromosómicas y los ICH, por ejemplo:

- a) la recuperación postirradiación de las aberraciones cromosómicas, pero no de ICH al tratamiento con rayos X y luz U.V. (Fornace et al., 1980; Mac Rae et al., 1979);
- b) la inhibición por antipafna de las aberraciones cromosómicas, pero no de los ICH inducidos por N-metil-N-

nitro-N-nitroso guanidina (Kinsella y Radman, 1980) y

- c) la inducción por daunomicina de una alta frecuencia de aberraciones, pero no de ICH (Shiraishi y Sandberg, 1979).

Una observación interesante es la presencia de una frecuencia mayor de rupturas dobles en el segundo tiempo post-irradiación, lo cual sugiere que las células con daños dobles pudieran retardarse más en entrar en división.

Finalmente, el hecho de no haber diferencia en la frecuencia de ICH en los distintos tiempos postirradiación, sugiere que no hay relación entre la inducción de ICH y el retardo mitótico; ni tampoco con la disminución del índice mitótico.

III.- Persistencia del daño radioinducido generador de ICH

Los datos obtenidos en los experimentos relativos a persistencia del daño generador de ICH (Fig. 15 y Tabla VI), sugieren que la lesión o evento que induce ICH por radiación es sorprendentemente estable, ya que si correlacionamos el tiempo postirradiación al cual aún se encuentran diferencias significativas con el testigo (96 h) con el tiempo de generación promedio (TGP) que es de alrededor de 12 h, se puede concluir que el daño persiste hasta por 8 ciclos de división.

Sin embargo, el cambio encontrado a las 48 h en el cual hay una aparente tendencia a que la frecuencia de ICH disminuya con respecto al observado a 24 h (6.1 a 5.0) y a las 72 h a las cuales hay un incremento de la frecuencia a niveles similares a los observados a las 24 h (6.4 ICH/célula); sugieren que algún otro factor está interviniendo.

Del análisis de las distribuciones de frecuencia de ICH por célula (Fig. 16) se desprende que sólo las poblaciones testigo y la analizada 24 h después de la irradiación se ajustan adecuadamente a la distribución de Poisson, como era de esperarse (Rainaldi y Mariani, 1982; Morales et al., 1983). A las 48 h la distribución tiene tendencia a retornar a los valores testigo, pero manteniendo un cierto número de células con frecuencias de ICH altas, a las 72 horas aumenta el número de células con una frecuencia elevada de ICH hasta ser equivalente a la observada 24 h postirradiación; sin embargo

persiste una frecuencia relativamente alta de células con ICH bajas como las observadas a 48 h; esto da a la distribución la apariencia de bimodal, en particular si se compara con la distribución teórica de Poisson. A las 96 hs el comportamiento es semejante al obtenido a las 48 h postirradiación.

El incremento de células con frecuencias altas de ICH observadas a las 72 h postirradiación pudiera explicarse por la presencia de una población celular no proliferativa que entra en división entre las 48 y 72 h postirradiación, para compensar la pérdida de células producida por la radiación. Por otro lado el hecho de que el TGP (Tabla VI) disminuya una hora para las células analizadas a las 48 h postirradiación (12.4 vs 11.3 p. < 0.0001) y dos horas en las células analizadas a las 72 horas (12.4 vs 10.3 p. < 0.0001), apoya la existencia de un mecanismo homeostático para compensar la muerte celular radioinducida. El hecho de que las células que no proliferan fueran las responsables del incremento en la frecuencia de ICH observado a las 72 horas, implicaría que el daño radioinducido generador de ICH es estable y no reparado por dichas células.

CONCLUSIONES

De los resultados antes analizados en células de la médula ósea de ratón *in vivo*, se puede concluir que:

- 1) La radiación gamma es capaz de inducir ICH de una manera significativa a dosis tan bajas como 0.4 Gy.
- 2) La BrdUrd incorporada al ADN sensibiliza cuando menos 3 veces a la célula para la inducción de ICH por radiación gamma.
- 3) Las frecuencias de ICH/célula en células irradiadas y no irradiadas se comporta como una distribución de Poisson, sugiriendo que la inducción de ICH es mediante daño y no mediante inhibición de la síntesis de ADN.
- 4) La frecuencia de ICH por célula provocada por radiación es mucho mayor que la de rupturas cromosómicas en células con su ADN unifilarmente sustituido con BrdUrd, lo cual es aparentemente válido también para células con su ADN no sustituido con BrdUrd. Lo cual indica que el daño radioinducido generador de ICH es más frecuente que el que causa rupturas cromosómicas.
- 5) No hay relación entre el daño, evento o mecanismo inductor de ICH y el inductor de rupturas cromosómicas.
- 6) Probablemente *in vivo*, las células con rupturas dobles sufran un mayor retardo mitótico.
- 7) El daño radioinducido generador de ICH es aparentemente

te persistente tanto en células no proliferativas como en células en proliferación continua.

T A B L A S

T A B L A II

INDUCCION DE ICH POR RADIACION GAMMA, EFECTO DE LA INCORPORACION DE
BRDUrd AL ADN (ICH/CELULA/RATON)

| DOSIS (GY) | ANTES INCORPORACION | | DESPUES INCORPORACION | | |
|---------------|----------------------------|----|--------------------------|----------------------------|----|
| | ICH/CELULA/RATON X ± ES | N | DOSIS (GY) | ICH/CELULA/RATON X ± ES | N |
| 0 | 3,6 ± 0,18 | 16 | 0 | 3,6 ± 0,12 | 10 |
| 0,36 | 4,4 ± 0,13 | 5 | 0,12 | 4,9 ± 0,24 | 5 |
| 0,60 | 5,1 ± 0,14 | 5 | 0,26 | 6,2 ± 0,27 | 5 |
| 1,00 | 5,4 ± 0,30 | 5 | 0,44 | 7,9 ± 0,32 | 5 |
| 1,90 | 5,9 ± 0,20 | 8 | 0,62 | 9,4 ± 0,26 | 5 |

TABLA III

EFFECTO DE LA RADIACION GAMMA (0.36 Gy) SOBRE LA INDUCCION DE ICH, RUPTURAS CROMOSOMICAS Y ALTERACIONES EN EL INDICE MITOTICO Y T.G.P.

| TIEMPO POST-IRRADIACION (h) | ICH/CELULA/RATON $\bar{X} \pm S$ | CROMOSOMICAS/CELULA/RATON $\bar{X} \pm S$ | RUPTURAS CROMOSOMICAS/CELULA/RATON $\bar{X} \pm S$ | INDICE MITOTICO (METAFASES/1000 CELULAS) $\bar{X} \pm S$ | TGP (h) $\bar{X} \pm SE$ |
|--------------------------------|----------------------------------|---|--|--|--------------------------|
| 12 (T ₁) TESTIGO | 4.0 ± 0.5 | | 0 | 32.2 ± 3.4 | 13.0 ± 0.83 |
| 12 (T ₁) IRRADIADO | 7.1 ± 0.8 *** | 0.036 ± | 0.038 | 32.1 ± 3.7 ** | 14.4 ± 1.76 |
| 18 (T ₂) TESTIGO | 4.2 ± 0.3 | | 0 | 37.1 ± 0.4 | 14.4 ± 0.83 |
| 18 (T ₂) IRRADIADO | 6.9 ± 0.3 *** | 0.088 ± | 0.055 | 35.6 ± 1.2 * | 16.8 ± 0.48*** |

*, p < 0.05; **, p < 0.02; ***, p < 0.001 respecto al testigo t 'student'

TGP = Tiempo de Generación Promedio

ICH y Rupturas analizadas en 50 células/animal y 5 animales.

T A B L A IV

FRECUENCIA DE ICH EN CELULAS CON Y SIN RUPTURAS CROMOSOMICAS

TIEMPO POST-IRRADIACION ICH/CELULA $\bar{X} \pm S$

| HORAS | <u>CON RUPTURAS</u> | | | <u>SIN RUPTURAS</u> |
|--------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | SENCILLAS | DOBLES | TOTAL | |
| 12 (T_1) | 7.7 \pm 3.6 n = 7* | 5.0 n = 1 | 7.3 \pm 3.5 n = 8 | 7.4 \pm 4.1 n = 242 |
| 18 (T_2) | 7.0 \pm 4.8 n = 8 | 7.0 \pm 3.5 n = 7 | 7.0 \pm 4.1 n = 15 | 7.1 \pm 3.5 n = 325 |

* n = número de células.

T A B L A V

NUMERO DE CELULAS CON RUPTURAS CROMOSOMICAS RADIOINDUCIDAS
(0.36 Gy)

| | <u>12 h (T₁) POST-IRRADIACION</u> | | | <u>18 h (T₂) POST-IRRADIACION^a</u> | | |
|-------|--|---------------------------|--------------|--|---------------------------|--------------|
| | <u>SENCILLAS^b</u> | <u>DOBLES^c</u> | <u>TOTAL</u> | <u>SENCILLAS^b</u> | <u>DOBLES^c</u> | <u>TOTAL</u> |
| | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| | 2 | 0 | 2 | 1 | 2 | 5 |
| | 3 | 1 | 5 | 3 | 3 | 9 |
| TOTAL | 7 | 1 | 9 | 8 | 7 | 22 |

^a VALORES EXPRESADOS POR CADA UNO DE 5 RATONES EN CADA GRUPO
(50 CELULAS CONTADAS/RATON)

^b RUPTURA SENCILLA = 1 FRAGMENTO CROMOSOMICO

^c RUPTURA DOBLE = 2 FRAGMENTOS CROMOSOMICOS Y/O 1 DICENTRICO.

T A B L A VI

FRECUENCIA DE ICH Y TIEMPO DE GENERACION PROMEDIO (TGP) DESPUES DE 1.9 Gy DE RAYOS GAMMA

| POST-IRRADIACION TESTIGO (NO IRRADIADO) | ICH/CELULA/RATON | | TGP (h) | | N |
|---|------------------|-------------|-------------|---------------|----|
| | \bar{X} | S (RANGO) | \bar{X} | S (RANGO) | |
| 24 | 3.3 ± 0.47 | (2.6 - 3.9) | 12.4 ± 0.32 | (11.9 - 12.9) | 16 |
| 48 | 6.1 ± 0.69 | (5.4 - 7.2) | 14.1 ± 1.7 | (12.3 - 16.4) | 8 |
| 72 | 5.0 ± 0.75 | (4.3 - 6.5) | 11.3 ± 0.3 | (11.0 - 11.8) | 7 |
| 96 | 6.4 ± 1.10 | (5.0 - 8.2) | 10.3 ± 0.75 | (9.2 - 11.3) | 8 |
| 168 | 4.7 ± 0.98 | (4.0 - 6.4) | 11.8 ± 0.81 | (10.9 - 12.6) | 6 |
| | 3.6 ± 0.7 | (3.0 - 4.4) | 12.0 ± 0.86 | (11.2 - 12.9) | 3 |

ICH/CELULA: test. vs 24 h, $p < 0.0001$; 24 h vs 48 h, $p < 0.02$; test. vs 48 h, $p < 0.0001$;
24 h vs 72 h. NS;

test. vs 96 h, $p < 0.0001$; test. vs 168 h, NS.

TGP: test. vs 24 h, $p < 0.005$; test. vs 48 h, $p < 0.0001$; test. vs 72 h, $p < 0.0001$;
test. vs 96 h, $p < 0.05$; test vs 68 h, NS.

T A B L A VII

DIFERENCIAS PORCENTUALES DE LAS FRECUENCIAS DE CELULAS CON 1 A 3 Y 6 A 8 ICH RESPECTO
AL TESTIGO A DIFERENTES TIEMPOS POSTIRRADIACION (1.9 Gy RAYOS GAMMA)

| ICH/CELULA | 24 h | | 48 h | | 72 h | | 96 h | |
|------------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|
| | % | p* | % | p* | % | p* | % | p* |
| 1 | - 10.9 | 0.0010 | - 8.8 | 0.005 | - 10.7 | 0.0001 | - 4.1 | NS** |
| 2 | - 14.2 | 0.0001 | - 7.6 | 0.05 | - 11.6 | 0.0010 | - 6.0 | NS |
| 3 | - 15.3 | 0.0001 | - 7.8 | NS | - 13.4 | 0.0001 | - 5.9 | NS |
| 4 | - 40.4 | | -24.2 | | - 35.7 | | -16.0 | |
| 6 | 12.6 | 0.0001 | 7.5 | 0.001 | 11.2 | 0.0001 | 5.8 | 0.002 |
| 7 | 8.0 | 0.0003 | 7.2 | 0.001 | 10.2 | 0.0001 | 3.0 | NS |
| 8 | 8.5 | 0.0001 | 1.4 | NS | 5.7 | 0.0020 | 0.0 | NS |
| 9 | 29.1 | | 16.1 | | 27.1 | | 8.8 | |

* USANDO CHI CUADRADA CON CORRECCION DE YATES (PROPORCION)

** NS, NO SIGNIFICATIVO

F I G U R A S

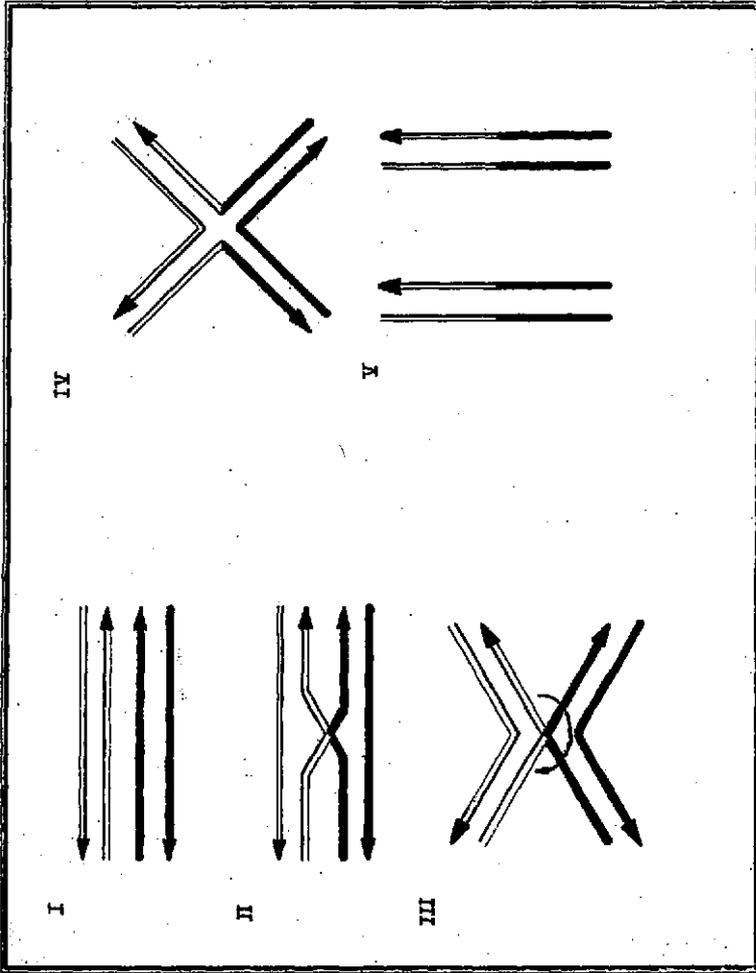


Fig. 1 MODELO DE RECOMBINACION DE HOLLIDAY, 1964
(Alternativa de recombinacion de doble banda)

FIGURA 1.- MODELO DE RECOMBINACION DE HOLLIDAY (1964)

- I) CADENAS APAREADAS CON LAS BANDAS HOMOLOGAS.
- II) INTERCAMIBO DE BANDA SENCILLA ENTRE BANDAS DEL MISMO SENTIDO.
- III) PLEGAMIENTO Y ROTACION DE LAS DOS CADENAS EN LA ZONA DE LA RECOMBINACION.
- IV) FORMACION DE LA ESTRUCTURA DE HOLLIDAY EQUIVALENTE A LA ESTRUCTURA CHI OBSERVADA RECIEN TEMENTE AL MICROSCOPIO ELECTRONICO.
- V) SEPARACION DE LAS CADENAS DESPUES DE LA RECOMBINACION DE DOBLE BANDA.

Fig. 2 MODELO DE PAINTER (1980) PARA LA INDUCCION DE ICH

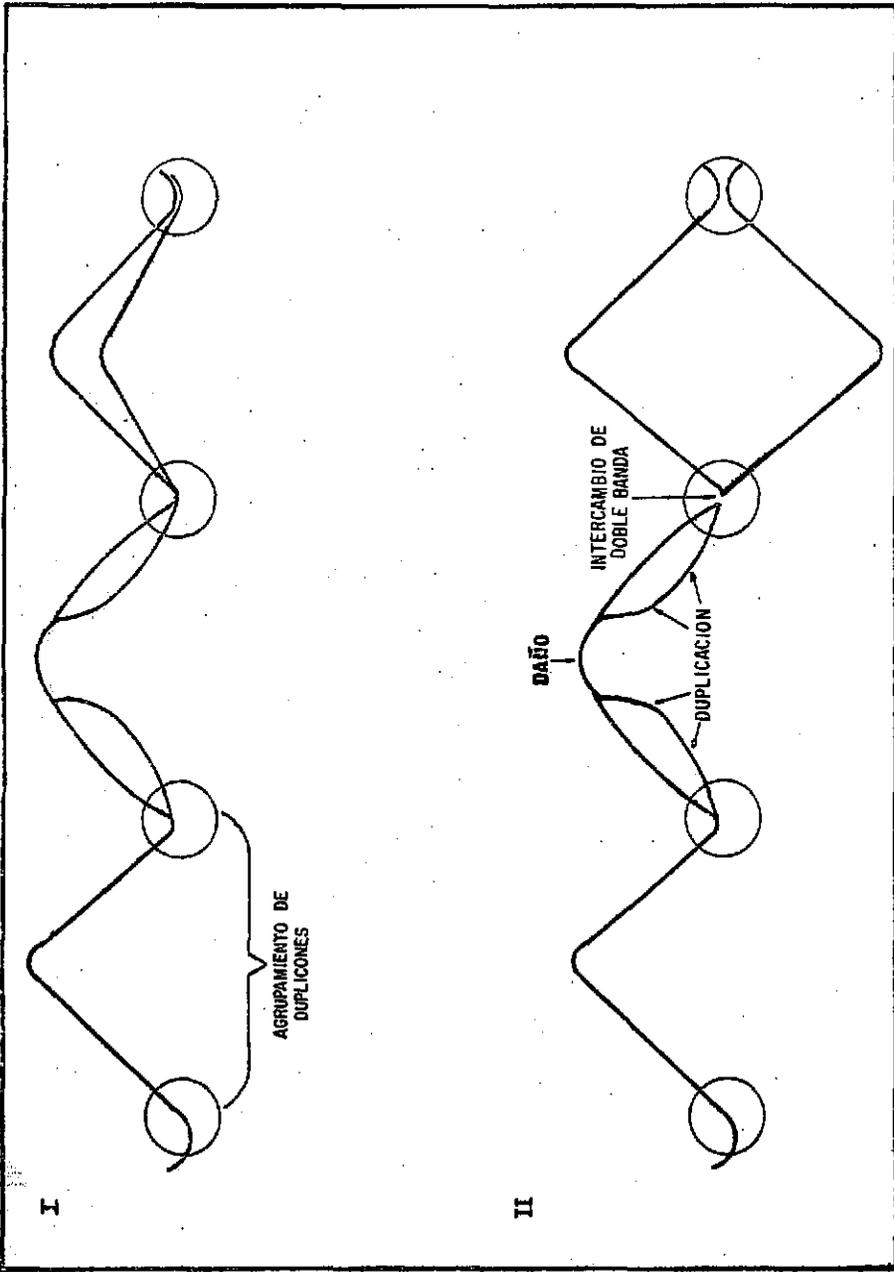
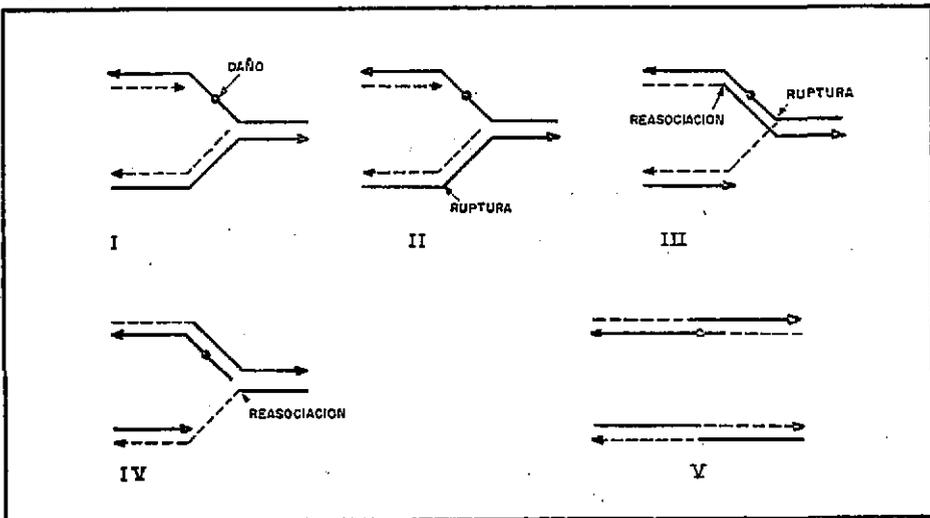


FIGURA 2.- MODELO DE PAINTER (1980) PARA LA INDUCCION DE ICH.

- I) PROGRESION DE LA DUPLICACION DEL ADN ENTRE
LOS AGRUPAMIENTOS DE REPLICONES (CIRCULOS)
QUE SEPARAN REPLICONES SUBSECUENTES.

- II) RETARDO EN LA DUPLICACION DEBIDO A DAÑO E
INCREMENTO DE LA POSIBILIDAD DE INTERCAMBIO
DE DOBLE BANDA.

FIG.3 MODELO DE DESVIACION REPLICATIVA (ISHII Y BENDER, 1980)

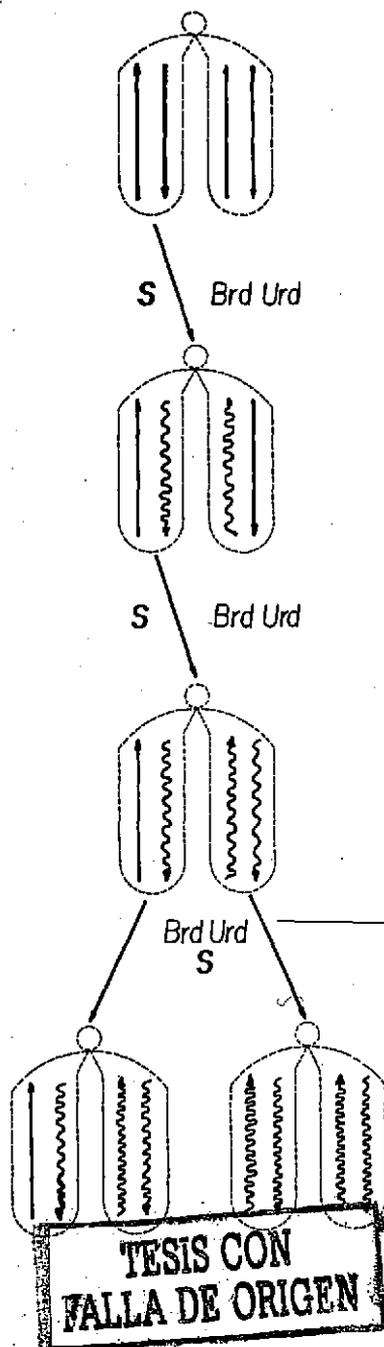


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 3.- MODELO DE DESVIACION REPLICATIVA (ISHII Y BENDER, 1980).

- I) BIFURCACION DEL ADN DURANTE LA SINTESIS DEL ADN A NIVEL DE UNA PORCION DAÑADA.
- II) RUPTURA DE LA BANDA PARENTAL NO DAÑADA DESPUES DE SER COPIADA A NIVEL DEL SITIO DEL DAÑO.
- III) REASOCIACION DE LA BANDA PARENTAL QUE NO COMPRENDE EL DAÑO, PRODUCIENDO INTERCAMBIO DE UNA BANDA Y RUPTURA DE LA BANDA PARENTAL QUE CONTIENE LA LESION.
- IV) REASOCIACION DE LA BANDA CON EL DAÑO CON LA BANDA EQUIVALENTE RECIENTEMENTE SINTETIZADA.
- V) SEPARACION DE LAS CADENAS DESPUES DEL INTERCAMBIO DE DOBLE BANDA.

DIFERENCIACION ENTRE CROMATIDAS HERMANAS



FLUORESCENCIA MAS GIEMSA

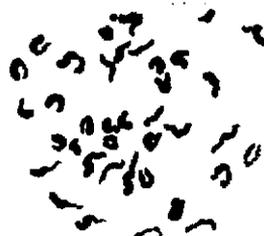
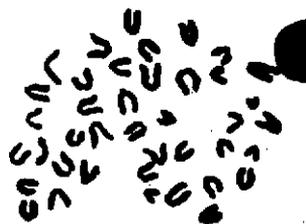


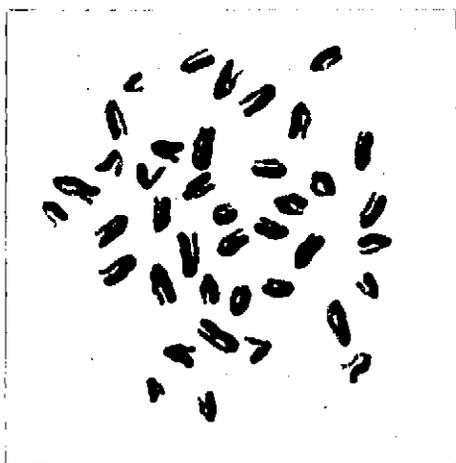
FIG. 5 INDUCCION DE INTERCAMBIOS ENTRE CROMATIDAS
HERMANAS ICH



- ICH



+ ICH



TESTIGO



TRATADO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

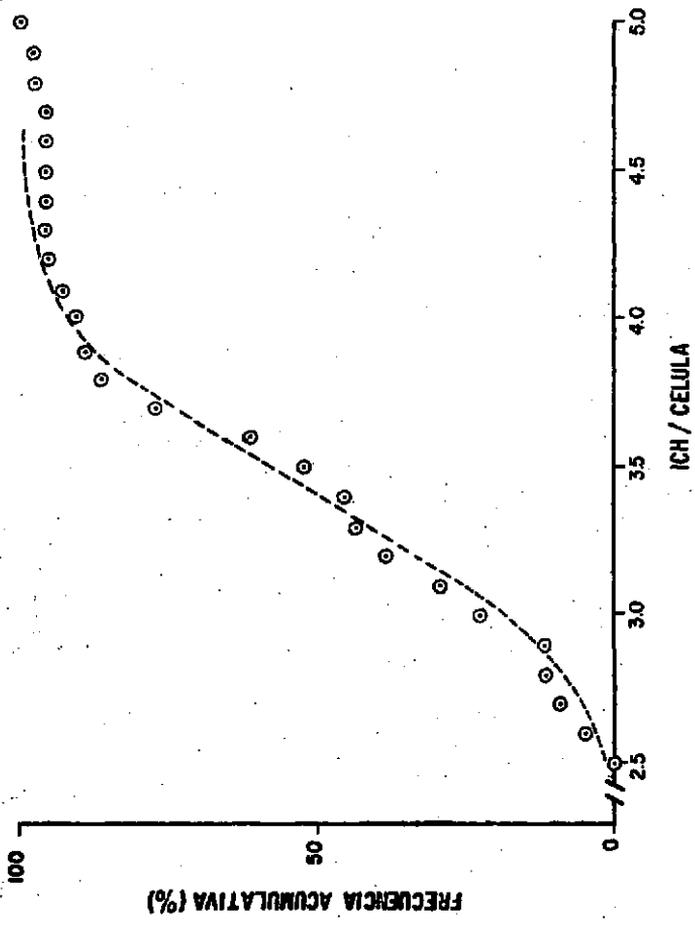


Fig. 6

FIGURA 6.- FRECUENCIA ACUMULADA DE ICH/CELULA PARA LOS VALORES BASALES DE ICH, OBTENIDOS A PARTIR DE 44 TESTIGOS. LA LINEA REPRESENTA LA CURVA PARA UNA DISTRIBUCION NORMAL.

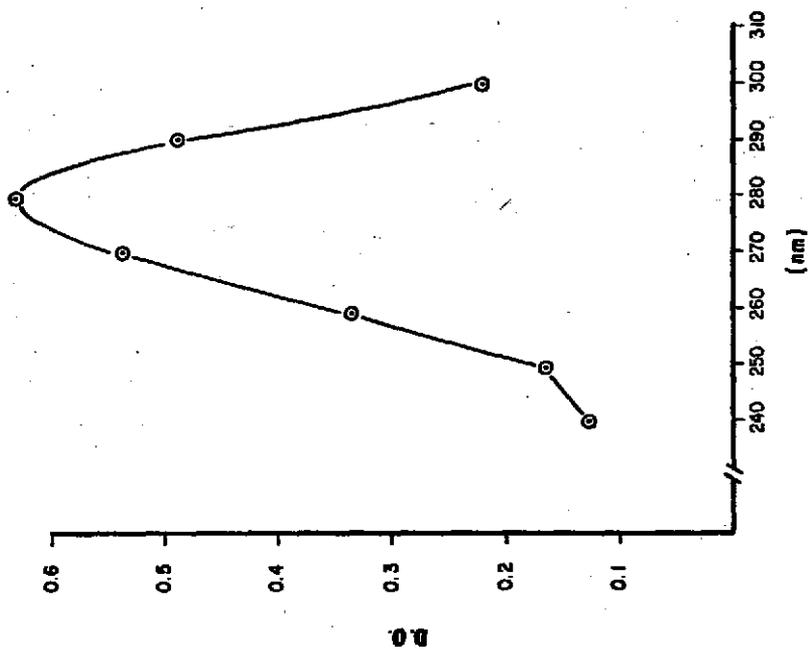
Fig. 7 ESPECTRO DE ABSORCION DE Brd Urd (H₂O)

FIG. 8 PROTOCOLO I

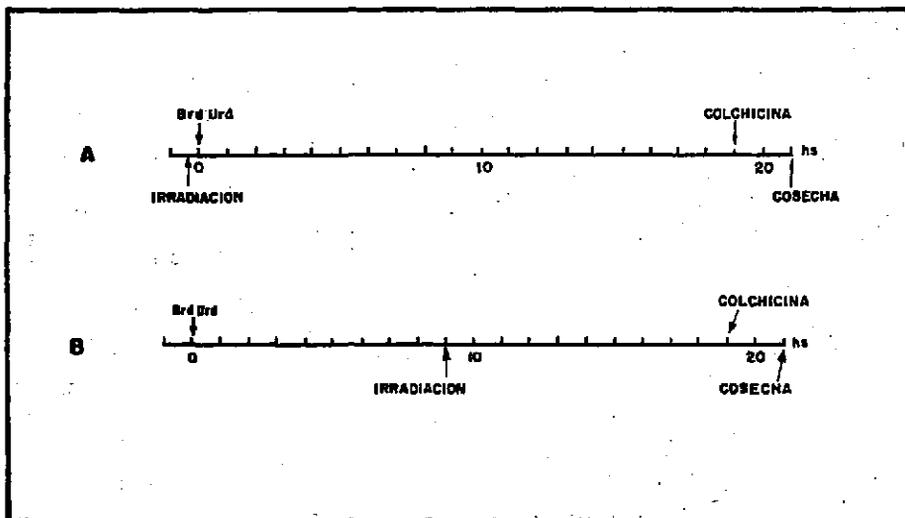


FIG. 9 PROTOCOLO II

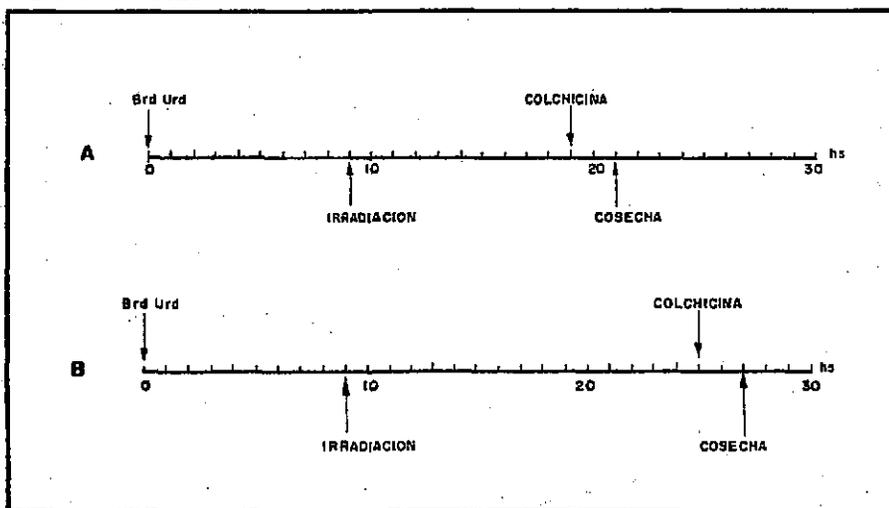


FIG.10 PROTOCOLO III

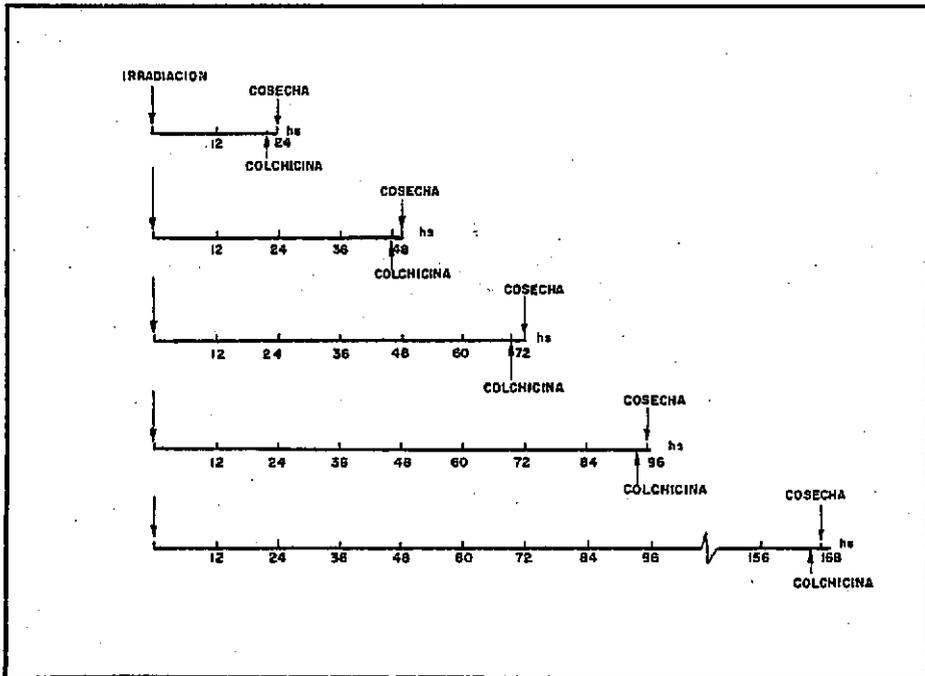


FIG. II CURVAS DOSIS RESPUESTA

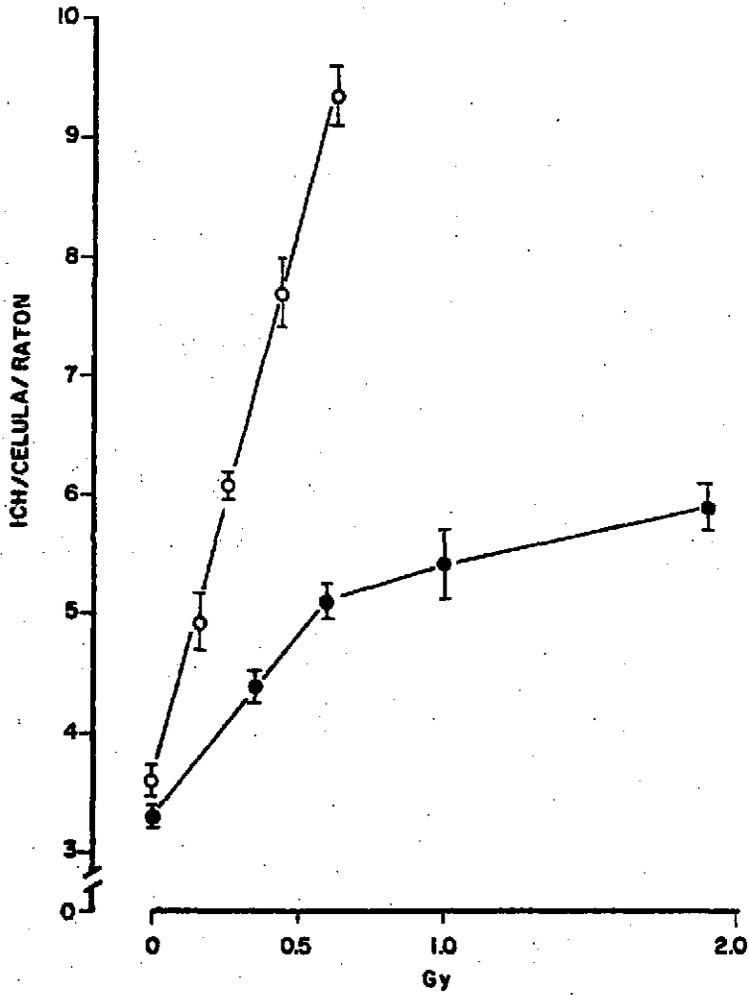


FIGURA 11.- CURVA DE ICH RADIOINDUCIDOS A DIFERENTES DOSIS ANTES (●) Y DESPUES (○) DE LA INCORPORACION DE BRDÜRD CADA PUNTO REPRESENTA EL PROMEDIO DE - CUANDO MENOS 5 ANIMALES, MAS O MENOS EL ERROR ESTANDAR, CUANDO MENOS FUERON ANALIZADAS 30 - CELULAS POR ANIMAL.

Fig. 12A DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS (ICH/Celula) RADIOINDUCIDAS ANTES DE LA INCORPORACION DE BrdUrd

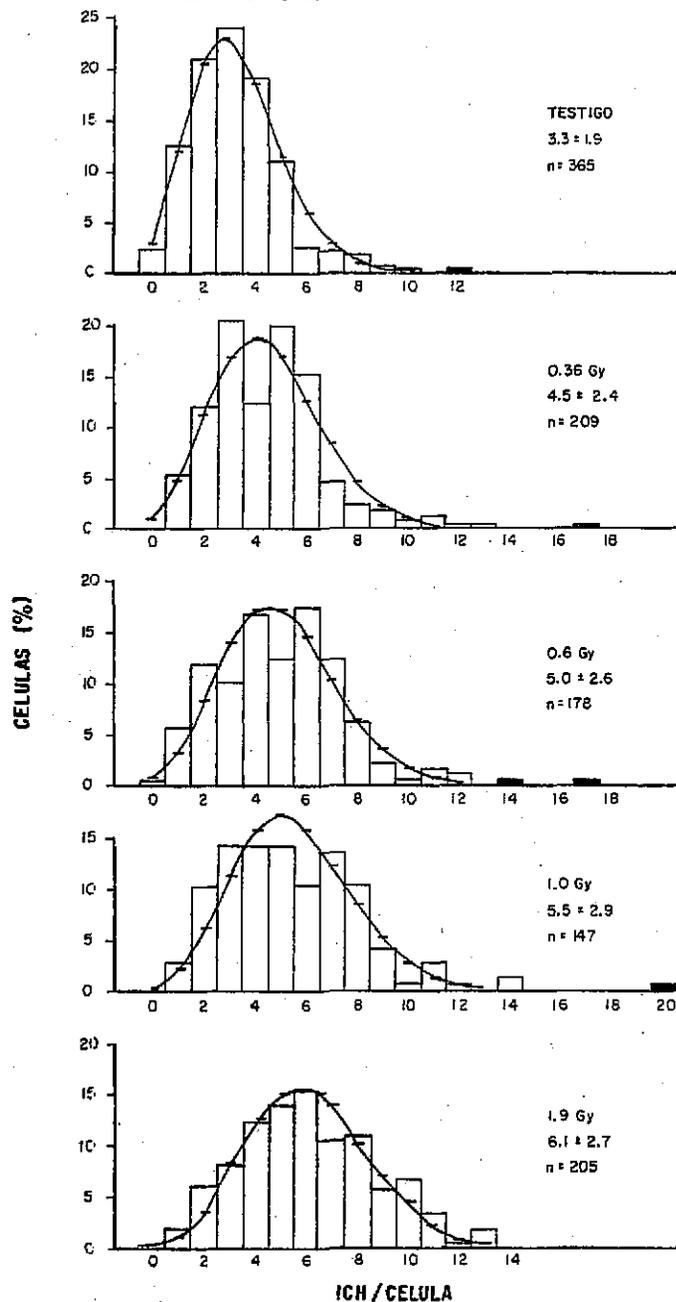
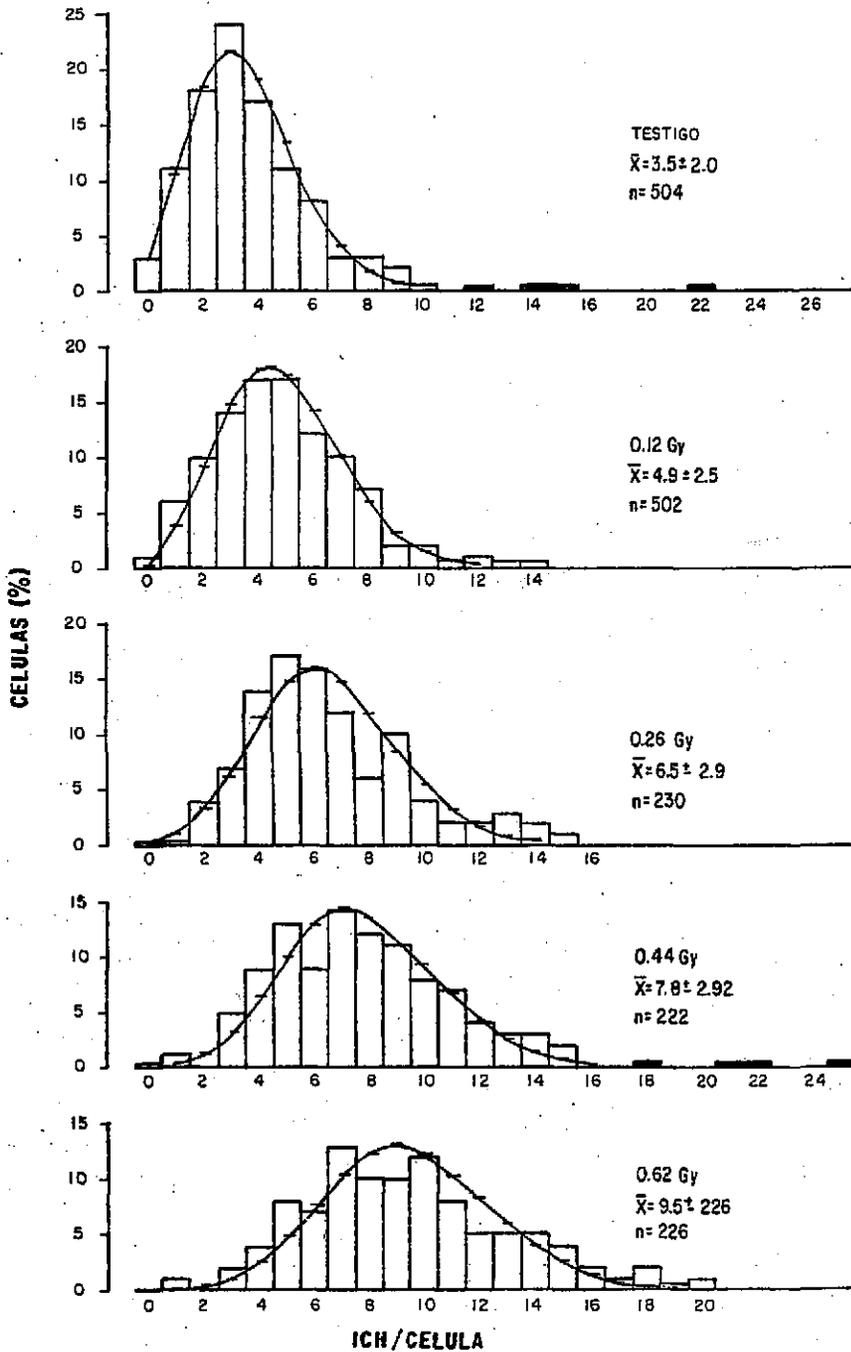


Fig. 128 DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS (ICH/celula) RADIOINDUCIDAS DESPUES DE LA INCORPORACION DE Brd Urd



FIGURAS 12 A Y B.

A. REPRESENTA LA DISTRIBUCION DE LAS FRECUENCIAS DE CELULAS CON DIFERENTE NUMERO DE ICH RADIO-INDUCIDOS ANTES DE LA INCORPORACION DE BRDURD. LA LINEA CONTINUA REPRESENTA LA DISTRIBUCION DE POISSON TEORICA EN CADA CASO. SE INDICA LA DOSIS, EL PROMEDIO MAS O MENOS DESVIACION ESTANDAR DE ICH/CELULA Y EL NUMERO DE CELULAS.

B. REPRESENTA LA DISTRIBUCION DE LAS FRECUENCIAS DE CELULAS CON DIFERENTE NUMERO DE ICH RADIO-INDUCIDOS DESPUES DE LA INCORPORACION DE BRDURD.

LA DESCRIPCION ES IGUAL QUE PARA A.

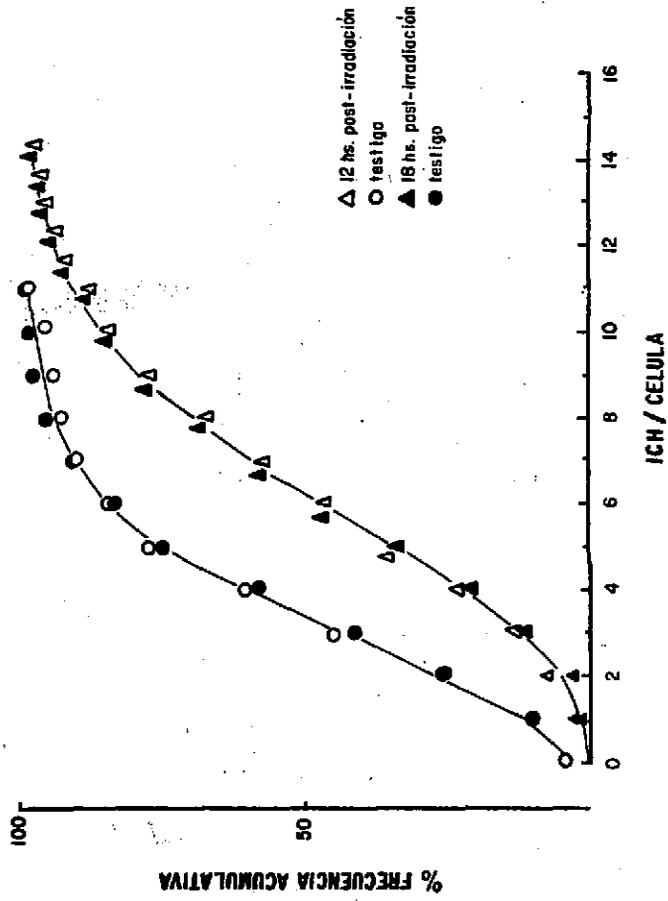


Fig. 13 FRECUENCIA ACUMULATIVA ICH / CELULA 12 y 18 hs. POSTIRRADIACION

FIGURA 13.- FRECUENCIA ACUMULATIVA ICH/CELULA A 12 Y 18 h
POST-IRRADIACION, LOS DATOS DE CADA CURVA PRO
VIENEN DE CUANDO MENOS 30 CELULAS ANALIZADAS
PARA C/U DE 5 RATONES.

FIG. 14 PORCENTAJE DE CELULAS EN 1^o, 2^o y 3^o DIVISION

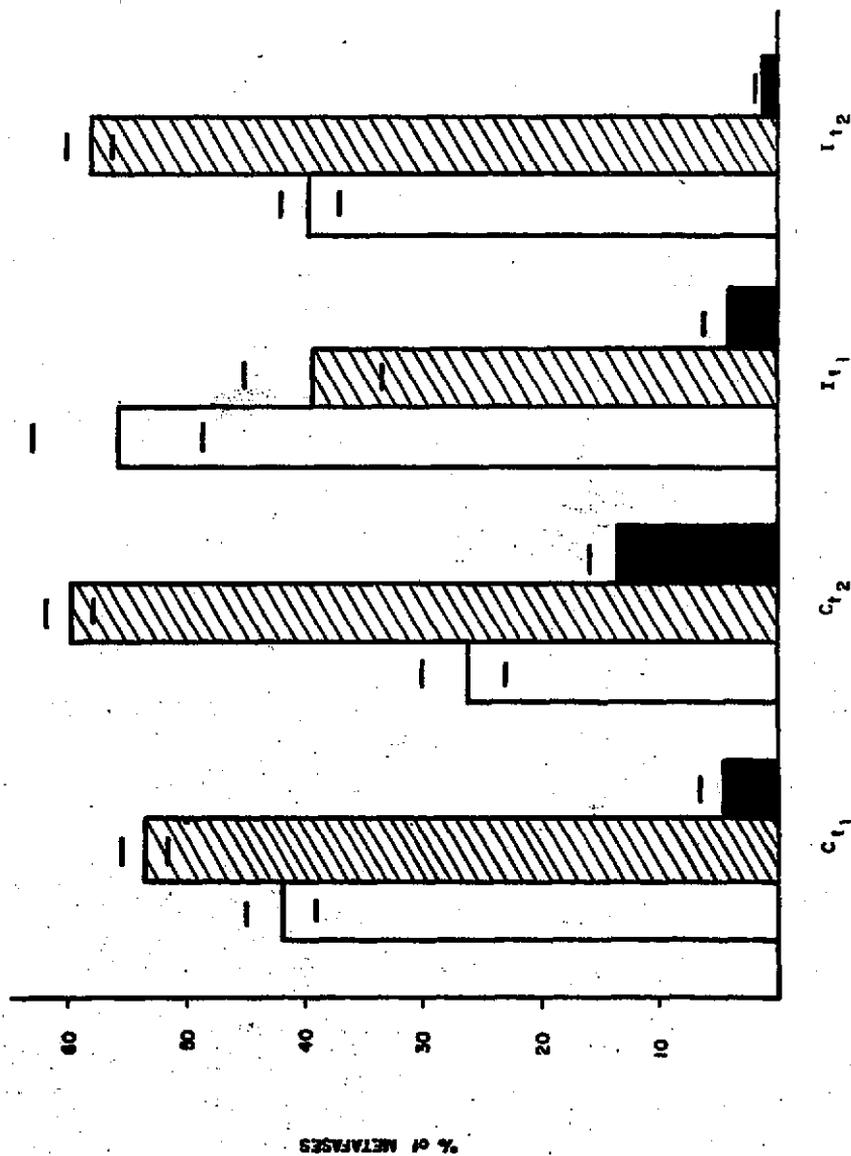
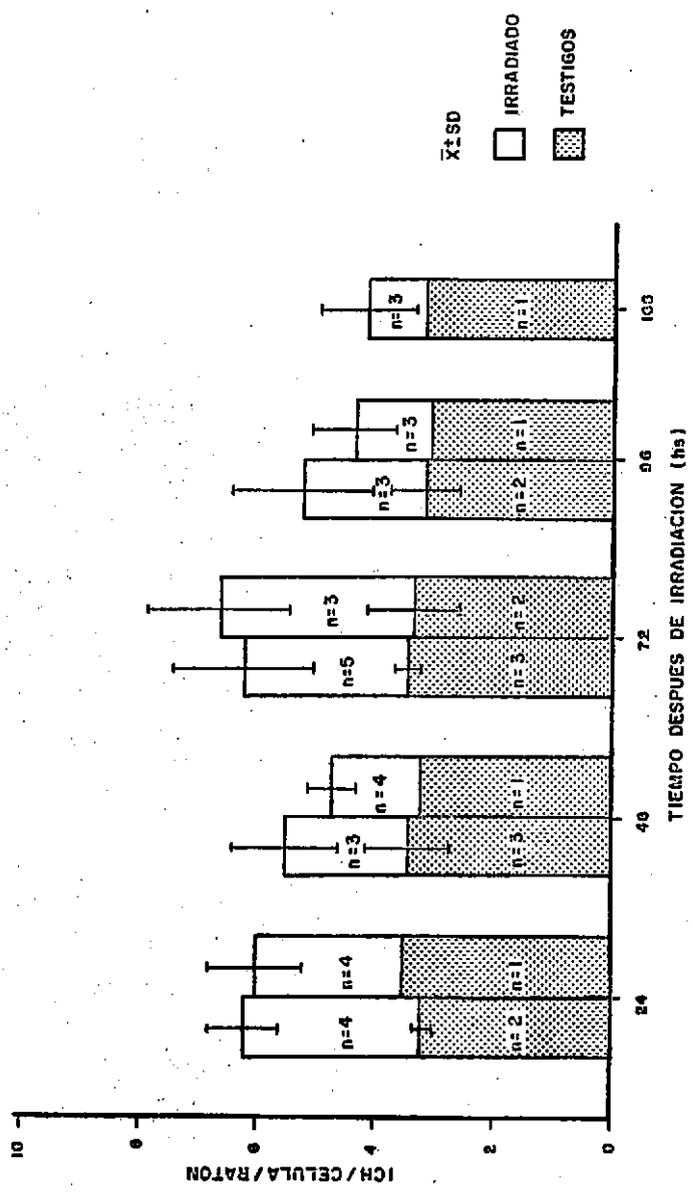


FIGURA 14.- PORCENTAJE DE CELULAS EN 1A.  , 2A. 
Y 3A.  DIVISIONES, 12 (I_{T_1}) Y 18 h (I_{T_2})
DESPUES DE IRRADIACION ASI COMO DE SUS TESTIGOS
CORRESPONDIENTES (C_{T_1} Y C_{T_2}). LAS LINEAS REPRESENTAN EL ERROR ESTANDAR, DE 5 RATONES, ANALIZANDOSE CUANDO MENOS 500 CELULAS POR RATON.

FIG. 15 PERSISTENCIA DE ICH RADIOINDUCIDOS



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

FIGURA 15.- PERSISTENCIA DE LOS ICH RADIOINDUCIDOS RESULTADO DE DOS EXPERIMENTOS DIFERENTES. PARA MAYORES DATOS VER TABLA VI.

Fig. 16 DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS (ICH/celula) POSTIRRADIACION

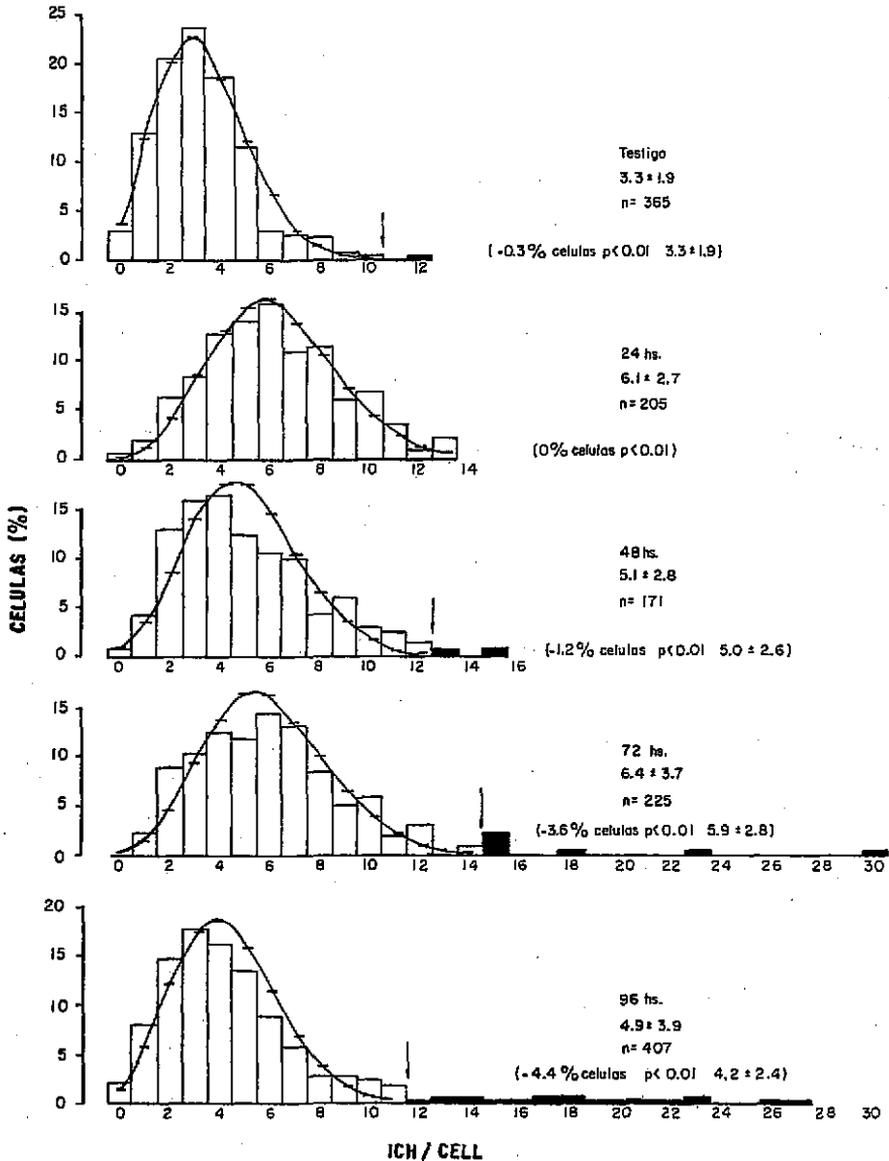


FIGURA 16.- DISTRIBUCION DE LAS FRECUENCIAS DE CELULAS CON DIFERENTE NUMERO DE ICH PARA DIVERSOS TIEMPOS POST-IRRADIACION. LOS DATOS SE DERIVAN DE LAS CELULAS ANALIZADAS PARA LOS DATOS DE LA TABLA VI. LA LINEA CONTINUA REPRESENTA LA DISTRIBUCION DE POISSON TEORICA, SE INDICA EL TIEMPO POST-IRRADIACION, EL PROMEDIO MAS MENOS DESVIACION ESTAN- DAR, ASI COMO EL NUMERO DE CELULAS TOTAL. LAS BARRAS NEGRAS REPRESENTAN LAS CELULAS CON UNA $P < 0.01$ DE PERTENECER A LA POBLACION, ENTRE PARENTESIS SE INDICA EL PORCENTAJE DE ESTAS CELULAS, ASUMIENDO COMO PARECE QUE SUS ICH NO SON EL RESULTADO O CUANDO MENOS NO DIRECTO DEL DAÑO RADIOINDUCIDO.

- Abe, S. y Sasaki, M.- Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in chinese hamster cells exposed to various chemicals. J. Natl. Cancer Inst. 58 (1977) 1635-1641.
- Abe, S. y Sasaki, M.- Induction of sister-chromatid exchanges by indirect mutagens/carcinogens in cultured - rat hepatoma and esophageal tumor cells and in chinese hamster DON cells co-cultivated with rat cells. Mutation Res. 93 (1982) 409-418.
- Abramovsky, I., Vorsanger, G. y Hirschorn, K.- Sister chromatid exchange induced by X ray of human lymphocytes and the effect of L-cysteine. Mutation Res. 50 (1978) 93-100.
- Allen, J. W. y Latt, S.A.- Analysis of sister chromatid exchange formation *in vivo* in mouse spermatogonia as a new test system for environmental mutagens. Nature (London) 260. (1976) 449-451.
- Allen, J. W., Shuler, C. F., Mendes, R. W. y Latt, S. A.- A simplified technique for *in vivo* analysis of sister-chromatid exchanges using 5-bromodeoxyuridine tablets. Cytogen. Cell Genet. 18 (1977) 231-237.
- Anderson, H. C., Kihlman, B. A. y Palitti, F.- Production of sister chromatid exchanges by X-rays under aerobic and anerobic conditions. Hereditas 94 (1981) 41-44.
- Anderson, H.C. Hydroxyurea induces sister chromatid exchanges in G₂: Implications for the formation of chromoso-

- mal aberrations. *Hereditas* 98 (1983) 61-64.
- Bender, M. A., Griggs, H. G. y Bedford, J. S.- Recombinational DNA repair and sister-chromatid exchanges. *Mutation Res.* 24 (1974) 117-123.
- Bloom, S. E. y Hsu, T. C.- Differential Fluorescence of sister chromatids in chicken embryos exposed to 5-bromodeoxyuridine. *Chromosoma* 51 (1975) 261-267.
- Bostock, C.J. y Christie, S. Analysis of the frequency of sister chromatid exchange in different regions of chromosome of the kangaroo rat (*Dipodomys ordii*). *Chromosoma* 56 (1976) 275-287.
- Brewen, J.G. y Peacock, W. J.- The effect of tritiated Thymidine on sister chromatid exchange in a ring chromosome. *Mutation Res.* 7 (1969) 433-440.
- Brewen, J. G. y Luippold, H. E.- Radiation -induced human chromosome aberrations: *in vitro* dose rate studies. *Mutation Res.* 12 (1971) 305-314.
- Bryant, E. M., Hoehn, H. y Martin, G.M. Normalisation of sister chromatid exchange frequencies in Bloom's syndrome by euploid cell hybridisation. *Nature* 279 (1979) 795-796.
- Carrano, A. V. y Wolff, S. Distribution of sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of the Indian Muntjac. *Chromosoma* 53 (1975) 361-369.
- Carrano, A. V. y Johnston, G. R. The distribution of Mitomycin C induced sister chromatid exchanges in the

- euchromatin and heterocromatin of the Indian Muntjac. *Chromosoma* 64 (1977) 97-107.
- Carrano, A. V., Thompson, L. H., Stetka, D. G., Minkler, J. L., Mazrimas, J. A. y Fong, S.- DNA crosslinking, sister-chromatid exchange and specific-locus mutations. *Mutation Res.* 63 (1979) 175-188.
- Cassel, D. M. y Latt, S. A.- Relationship between DNA adduct formation and sister chromatid exchange induction by 8-methoxy-psoralen in Chinese hamster ovary cells. *Exptl. Cell Res.* 128 (1980) 15-22.
- Chaganti, R. S. K., Schonberg, S. y German, J.- A manifold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 71 (1974) 4508-4512.
- Challbery, M. D. y Kelly, T. J.- Eukaryotic DNA replication: viral and plasmid model systems. *Ann. Rev. Biochem.* 51 (1982) 901-934.
- Champoux, J. J. Proteins that affect DNA conformation. *Ann. Rev. Biochem.* 47 (1978) 449-479.
- Chao, C. C. K., y Rosenstein, B. S.- Inhibition of the UV induction of sister-chromatid exchanges in ICR-2A frog cells by pretreatment with gamma-rays. *Mutation Res.* 139 (1984) 35-39.
- Cohen, M. M., Martin, S. O., Ober, C. y Limpson, S. J.- A family study of spontaneous sister chromatid exchange frequency, *Ann. J. Hum. Genet.* 34 (1982) 294-306.
- Comings, D.F.- Implications of somatic recombination and sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome and

- cells treated with mitomycin C. *Humangenetik* 28 -
(1975) 191-196.
- Cooner, M. K., Boggs, S. S. and Turner, J. H.- Comparisons of
in vivo BrdU Labeling methods and spontaneous sister
chromatid exchange frequencies in regenerating
murine liver and bone marrow cells. *Chromosoma* 68
(1978) 303-311.
- Cornforth, M. N. y Bedford, J. S.- X-ray-induced breakage -
and rejoining of human interphase chromosomes. *Sci
ence* 222 (1983) 1141-1143.
- Cozzarelli, N. R.- The mechanism of action of inhibitors of
DNA synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 46 (1977) 641-668.
- Crossen, P. E., Drets, M. E., Arrighi, F.E. y Johnston, D. A.
Analysis of the frequency and distribution of sister
chromatid exchanges in cultured human lymphocytes.
Hum. Genet. 35 (1977) 345-352.
- Crossen, P. E.- DNA replication and sister chromatid exchange
in 9 qh⁺. *Cytogenet. Cell Genet.* 35 (1983) 152-
155.
- Darlington, G. J., Dutkowski, R. y Brown, W.T.- Sister chroma-
tid exchange frequencies in Progenia and Werner
syndrome patients. *Am. J. Hum. Genet.* 33 (1981) -
762-766.
- Davidson, R. L., Kaufman, E. R., Dougherty, G. P., Ovellette,
A. M., Difolca, C. M. y Latt, S. A.- Induction of
sister chromatid exchanges by BudR is largely inde

pendent of the BudR content of DNA. Nature 284
(1980) 74-76.

DePhamphilis, M. L. y Wassarman, P. M.- Replication of eukaryotic chromosomes: A close-up of the replication fork. Ann. Rev. Biochem. 49 (1980) 627-666.

DeWeerd - Kastelein, E. A., Keijzer, W., Rainaldi, G. y Bootsma, D.- Induction of sister chromatid exchanges in Xeroderma pigmentosum cells after exposure to ultraviolet light. Mutation Res. 45 (1977) 253-261.

Evans, H. J. y Savage, J. R. K.- The relation between DNA synthesis and chromosome structure as revealed by X-ray damage. J. Cell. Biol. 18 (1963) 535-540.

Fichman, H. K., Fisher, P. B., Ramer, J. D. y Weinstein, I.B. Effect of a phorbol ester tumor promoter on sister chromatid exchanges and other chromosomal alterations in adenovirus-transformed cells. J. Cell Biol. 83 (1979) 165.

Fisher, H. W. y Williams, R. C. Electron Microscopos visualization of nucleic acids and of their complexes with proteins. Ann. Rev. Biochem. 48 (1979) 649 - 679.

Fornace Jr., A. J., Nagasawa, H. y Little, J.B.- Relationship of DNA repair to chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and survival during liquid holding recovery in X-irradiated mammalian cells. Mutation Res. 70 (1980) 323-336.

- Fujiwara, Y. Kano, Y. Tatsumi, M. y Paul, P.- Effects of a - tumor promoter and anti-promoter on spontaneous - and U.V. induced 6-Thioguanine resistant mutations and sister-chromatid exchanges in V-79 Chinese - hamster cells. *Int. J. Cancer* 26 (1980) 517-521.
- Galloway, S.M. Ataxia telangiectasia: The effects of chemical mutagens and X rays on sister chromatid exchanges in blood lymphocytes. *Mutation Res.* 45 (1977) 343-349.
- Geider, K. y Hoffmann-Berling, H. Proteins controlling the - helical structure of DNA. *Ann. Rev. Biochem.* 50 - (1981) 233-260.
- Gellert, M.- DNA topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.* 50 (1981) 879-910.
- Gentil, A., Renault, G. y Margot, A.- The effect of the tu- mor promoter 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) on U. V. and MNNG-induced sister chromatid - exchanges in mammalian cells. *Int. J. Cancer* 26 - (1980) 517-521.
- Ghosh, P. K. Sister chromatid exchange in patients with hepa- titis. *Mutation Res.* 103 (1982) 303-306.
- Gibson, D. A. y Prescott, D. M.- Induction of sister chroma- tid exchanges in chromosome of rat Kangaroo cells by tritium incorporated into DNA, *Exptl. Cell Res.* - 74 (1972) 397-402.
- Goto, K., Akematsu, T., Shimazu, H. y Sugiyama.- To simple differential Giemsa staining of sister chromaties

- after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining. *Chromosoma* 53 (1975) 223-230.
- Guerrero, R. R., Rounds, D. E. y Hall, T. C.- Bioassay procedure for the detection of mutagenic metabolites in human urine with the use of sister-chromatid exchange analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* 62 (1979) 805-809.
- Hand, R. y German, J., A retarded rate of DNA chain growth - in Bloom's syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 72 (1975) 758-762.
- Holliday, R.- A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* 5 (1964) 282-304.
- Hsu, T. C. y Pathak, S. Differential rates of sister chromatid exchanges between euchromatin and heterochromatin. *Chromosoma* 58 (1976) 269-273.
- Huff, V., Du Frain, R. J. y Littlefield, L. G.- SCE frequencies in rabbit lymphocytes as a function of time - after an acute dose of cyclophosphamide. *Mutation Res.* 94 (1982) 349-357.
- Igo - Kemenes, T., Horz, W. y Zachau, H. G. Chromatin. *Ann. Rev. Biochem.* 51 (1982) 89 - 121.
- Ikeuchi, T. y Sasaki, M.- Differential inducibility of chromosome aberrations and sister-chromatid exchanges by indirect mutagens in various mammalian cell lines. *Mutation Res.* 90 (1981) 149-161.

- Ishii, Y. y Bender, M. A.- Factors influencing the frequency of Mytomycin C-induced sister-chromatid exchanges in 5-bromodeoxyuridine substituted human lymphocytes in culture. Mutation Res. 51 (1978) 411.
- Ishii, Y. y Bender, M. A.- Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light induced sister-chromatid exchanges in chinese hamster cells. Mutation Res. 79 (1980) 19-32.
- Ishii, Y.- Nature of the mytomycin C induced lesion causing sister chromatid exchange. Mutation Res. 91 (1981) 51-55.
- Ivett, J. L. y Tice, R. R.- Average generation time: A new Method of analysis and quantitation of cellular proliferation kinetics. Environ. Mutagen, 4 (1982) 358 (Abstract).
- Kanda, N. y Kato H.- A simple technique for *in vivo* observation of SCE in mouse ascites tumor and spermatogonial cells. Exp. Cell Res. 118 (1979) 431-434.
- Kano, Y. y Fujiwara, Y.- Roles of DNA interstrand crosslinking and its repair in the induction of sister chromatid exchange and a higher induction in Fanconi's anemia cells. Mutation Res. 81 (1981) 365-375.
- Kano, Y. y Fujiwara, Y. Dyskerotosis congenita: survival, sister chromatid exchange and repair following treatments with crosslinking agents. Mutation Res. 103 (1982) 327 - 332.

- Kato, H. - Photoreactivation of sister chromatid exchange induced by ultraviolet irradiation. *Nature* 249 (1974) 552-553.
- Kato, H. - Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a Burd-labelling method. *Nature* 251 (1974) 70-72.
- Kato, H. - Mechanism for sister chromatid exchanges and their relation to the production of chromosomal aberrations. *Chromosoma (Berl.)* 59 (1977) 179-191.
- Kato, H. y Sandberg, A. A. - The effect of sera on sister chromatid exchanges *in vitro*. *Exptl. Cell. Res.* 109 (1977) 445-448.
- Kato, H. - Temperature-dependence of sister chromatid exchange: An implication for its mechanism. *Cancer Genet. and Cytogenet.* 2 (1980) 61-67.
- Kato, H. - Evidence that the replication point is the site of sister chromatid exchange. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2 (1980) 69-77.
- Kiessling, L., Santesson, B. y Book, J.A. - Chromosome and chromatid type aberrations induced by Cobalt⁶⁰ irradiation and tritiated uridine in human leukocyte cultures. *Chromosoma* 31 (1970) 280-284.
- King, M. T., Wild, D., Gocke, E. y Eckhardt, K. - 5-Bromodeoxyuridine tablets with improved depot effect for analysis *in vivo* of sister chromatid exchanges in bone-marrow and spermatogonial cells. *Mutation Res.* 97 (1982) 117 - 129.

- Kinsella, A. R. y Radman, M.- Tumor promoter induces sister chromatid exchanges: Relevance to mechanism of carcinogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 75 (1978) 6149-6153.
- Kinsella, A. R. y Radman, M. Inhibition of carcinogen induced chromosomal aberrations by an anticarcinogenic protease inhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci. 77 (1980) 3544-3547.
- Kligerman, A. D. y Bloom, S. E.- Sister chromatid differentiation and exchanges in adult mudminnows (*Umbra limi*) after *in vivo* exposure to 5-bromodeoxyuridine. Chromosoma 56 (1976) 101-109.
- Knuutila, S., Helminen, E., Vuopio, P. y De la Chapelle, A.- Sister chromatid exchanges in human bone marrow cells. I Control subjects and patients with leukemia. Hereditas 88 (1978) 189 - 196.
- Knuutila, S., Helminen, E., Vuopio, P. y De la Chapelle, A. Increased sister chromatid exchange in megaloblastic anemia.- Studies on bone marrow cells and lymphocytes. Hereditas 89 (1978) 171-181.
- Körnberg, R. D. Structure of chromatin. Ann. Rev. Biochem. 46 (1977) 931-954.
- Korenberg, J. R. y Freedlender, E. F.- Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. Chromosoma 48 (1974) 355-360.
- Kram, A., Schneider, E.L., Senula, G. C. y Nakanishi, Y.- Spontaneous and Mitomycin-C induced sister-chromatid exchanges. Comparison of *in vivo* and *in vitro*

- systems. Mutation Res. 60 (1979) 339-347.
- Latt, S. A.- Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 (1973) 3395-3399.
- Latt, S.A.- Localization of sister chromatid exchanges in human chromosomes. Science 185 (1974) 75 - 76.
- Latt, S. A.- Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin-C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 (1974) 3162-3166.
- Latt, S.A., Stethen, G., Juergens, L. A., Buchanam, G. R. y Gerald P.S. Induction by alkylating agents of sister chromatid exchanges and chromatid breaks in Fanconi's anemia. Proc. Natl. Acad. Sci. 72 (1975) 4066-4070.
- Latt, S. A. y Loveday, K. S.- Characterization of sister chromatid exchange induction by 8 methoxypsoralen plus near U.V. light. Cytogenet. Cell Genet. 21 (1978) 184-200.
- Latt, S.A., Allen, J., Bloom, S.E., Carrano, A., Falke, E., Kram, D., Schneider, E., Schreck, R., Tice, R., Whitfield, B. y Wolff S.- Sister Chromatid Exchanges: a report of the Gene-Tox program. Mutation Res. 87 (1981) 17 - 62.
- Liebeskind, D., Bases, R., Méndez, F., Elequin, F. y Koenigsberg, M.- Sister chromatid exchanges in human lymphocytes after exposure to diagnostic ultrasound.-

- Science 205 (1979) 1273-1275.
- Littlefield, L. G., Colyer, S. P., Jower, E. C. y Dufrain, R. J.- Sister chromatid exchanges in human lymphocytes exposed to ionizing radiation during Go. Radiat Res. 78 (1979) 514-521.
- Liu, L. F., Liu, C. C. y Alberts, B. M.- Type II DNA topoisomerases: Enzymes which unknot a topological knotted DNA molecule via a reversible double strand break. Cell 19 (1980) 697-708.
- Lloyd, D. C., Purrot, R.J. y Dolphin, G.W. Chromosome aberrations dosimetry using human lymphocytes in simulated partial body irradiation. Phys. Med. Biol. 18 (1973) 421-431.
- Loeb, L.A. y Kinkel, T.A. Fidelity of DNA synthesis. Ann. Rev. Biochem. 52 (1982) 429-457.
- Loveday, K. S. y Latt, S.A._ The effect of a tumor promoter 12-O-Tetradecanoylphorbol - 13-acetate (TPA) on sister chromatid exchanges formation in cultured chinese hamster cells. Mutation Res. 67 (1979) 343-348.
- Luchnik, N. V., Antoshchina, M. M. y Porjadkova, N. A.- On the radiosensitivity of uni and bi-filiary BrdUrd substituted chromatids. Mutation Res. 91 (1981) 463-465.
- Mac Rae, W. D., Machinnon, E. A. y Stich, H. F.- The fate of U. V. induced lesions affecting SCEs, chromosome aberrations and survival of CHO cells arrested by

- deprivation of arginine. Chromosome 72 (1979) 15-22.
- Marquard, H. y Bayer, V.- The induction *in vivo* of sister chromatid exchanges in the bone marrow of the Chinese hamster, I. The sensitivity of the system (methyl methanesulphonate). Mutation Res. 56 (1977) - 169-176.
- McClintock, B.- The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes. Genetics 23 (1938) 315-376.
- McFee, A.F., Lowe, K.W. y San Sebastian, J.R. Improved sister-chromatid differentiation using paraffin-coated bromo-deoxyuridine tablets in mice. Mutation Res. 119 (1983) 83 - 88.
- McGhee, J.D. y Felsenfeld, F. Nucleosome structure. Ann. Rev. Biochem. 49 (1980) 1115 - 1156.
- Moore, R.C. Alteration in frequencies of different classes of chromosome aberrations throughout the first cell cycle following X irradiation. Radiation Res. 81 (1980) 267-281.
- Morales-Ramírez, P.- Analysis *in vivo* of sister chromatid exchange in mouse bone marrow and salivary gland cells. Mutation Res. 74 (1980) 61-69.
- Morales, R.P., Vallarino K. T. y Rodríguez, R. R.- Detección de Mutágenos+carcinógenos por intercambios entre cromátidas hermanas *in vivo*. En Manual de Métodos para la identificación de Mutágenos y Carcinógenos Químicos Ambientales. Edit. IIBM - UNAM, México, -

- DzF. (1980) 133-139.
- Morales, R. P., Vallarino, K. T. y Rodríguez, R. R.- Effect of BrdUrd and low doses of gamma radiation on sister chromatid exchange, chromosome breaks, and mitotic delay in mouse bone marrow cells *in vivo*. Environ. Mut. 5 (1983) 589-602.
- Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T. y Rodríguez-Reyes, R.- Detection of SCE in rodent cells using the activated charcoal bromodeoxyuridine system. Proceedings of International Symposium on sister chromatid exchange. Brookhaven Ntl. Lab. New York, (1984) En prensa.
- Morgan, W. F. y Cleaver, J.E. 3-Amino benzamide synergistically increases sister-chromatid exchanges in cells exposed to methane sulfonate but not to ultraviolet light. Mutation Res. 104 (1982) 361-366.
- Morgan, W. F. y Crossen, P.E.- Factors influencing sister-chromatid exchange rate in cultured human lymphocytes. Mutation Res. 81 (1981) 395-402.
- Nagasawa, H. y Little, J. B.- Effect of tumor promoters, protease inhibitors, and repair processes on X-ray-induced sister chromatid exchanges in mouse cells. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 1943-1947.
- Nagasawa, H. y Little, J.B.- Induction of chromosome aberrations and sister chromatid exchanges by X rays in density - inhibited - cultures of mouse 10 T 1/2 - cells. Radiation Res. 87 (1981) 538-551.

- Nagasawa, H., Fornace, A. J., Ritter, M. A. y Little, J. B. - Relationship of enhanced survival during confluent holding recovery in Ultraviolet-irradiated human - and mouse cells to chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and DNA repair. *Radiation Res.* 92 (1982) 483-496.
- Nakanishi, y Kram, D. y Schenider, E. L. - Aging and sister - chromatid exchange IV. Reduced frequencies of mutagen-induced sister chromatid exchanges *in vivo* in mouse bone marrow cells with aging. *Cytogenet. Cell Genet.* 24 (1979) 61 - 67.
- Nakanishi, Y. y Schneider, E. L. - *In vivo* sister chromatid - exchange: a sensitive measure of DNA damage. *Mutation Res.* 60 (1979) 329-337.
- Nakanishi, Y. Dein, R. A. y Schneider, E. L. Aging and sister chromatid exchange V. The effect of post-embryonic development on mutagen induced sister chromatid exchanges in mouse and rat bone marrow cells. *Cytogenet. Cell Genet.* 27 (1980) 82 - 87.
- Natarajan, A. T. y Klusterska, I. - Heterochromatin and sister chromatid exchanges in the chromosomes of *Microtus agrestis*. *Hereditas* 79 (1975) 150 - 154.
- Natarajan, A.T. y Sharma, R.P. Tritiated uridine induced - chromosome aberrations in relation to heterochromatin and nucleolar organization in *Microtus agrestis* L. *Chromosoma* 34 (1971) 168-182.

- Natarajan, A. T.- Molecular aspects of the origin of chromosome structural changes. Biol. Zbl. 95 (1976) 139-156.
- Natarajan, A. T., Van Zeeland, A. A., Verdegaal-Immerzell, E. A. M. y Filon, A. R.- Studies on the influence of photoreactivation on the frequencies of U.V. - induced chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges and pyrimidine dimers in chicken embryonic fibroblasts. Mutation Res. 69 (1980a) 307-317.
- Natarajan, A. T., Obe, G., van Zeeland, A.A., Palitti, F., Maijers, M. y Verdegaal-Immerzeel, E.A.M., Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. Mutation Res. 69 (1980b). 293-305.
- Natarajan, A. T., Csukas, I. y Van Zeeland, A. A.- Contribution of incorporated 5-bromodeoxyuridine in DNA to the frequencies of sister-chromatid exchanges induced by inhibitors of poly- (ADP- ribose) polymerase. Mutation Res. 84 (1981) 125-132.
- Natarajan, A.T. y Zwanenburg, T.S.B. Mechanisms for chromosomal aberrations in mammalian cells. Mutation Res. 95 (1982) 1-6.
- Nishi, Y., Hasegawa, M. M., Inui, N., Ikegami, S. y Yamada, M. A.- Effect of post-treatment with aphidicolin a specific inhibitor of DNA Polymerase on sister-chromatid exchanges induced by ethyl metanesulfonate. Mutation Res. 103 (1982) 155-159.
- Ogawa, T. y Okasaki, T.- Discontinuous DNA replication.

- Ann. Rev. Biochem. 49 (1980) 421 - 457.
- Oikawa, A., Thoda, H., Kanai, M., Miwa, M. y Sugimura, T.-
Inhibitors of poli, (adenosine diphosphate ribose)
polymerase induce sister chromatid exchanges. Bio-
chem. Biophys. Res. Comm. 97 (1980) 1311-1316.
- Painter, R. B.- A replication model for sister-chromatid ex-
change. Mutation Res. 70 (1980) 337-341.
- Pardee, A. B., Dubrow, R., Hamlin, J.L. y Kletzien, R. F.- -
Animal cell Cycle. Ann. Rev. Biochem. 47 (1978) -
715-750.
- Pera, F. y Mattias, P.- Labelling of DNA and differential sis-
ter chromatid staining after BrdU treatment *in vivo*.
Chromosoma 57 (1976) 13-18.
- Perry, P. y Wolff, S.- New Giemsa method for the differential
staining of sister chromatids. Nature (London) 251
(1974) 156-158.
- Perry, P. y Evans, H. J.- Cytological detection of mutagen -
carcinogen exposure by sister chromatid exchange.-
Nature (London) 258 (1975) 121-125.
- Popescu, N. C., Turnbull, D. y DiPaolo, J. A.- Sister Chroma-
tid exchange and chromosome aberration analysis -
with the use of several carcinogens and non carcino-
gens. J. Natl. Cancer Inst. 59 (1977) 289-293.
- Popescu, N.C., Amsbaugh, S. C. y DiPaolo, J. A.- The relevan-
ce of caffeine post-treatment to SCE incidence in-
duced in chinese hamster cells. Mutation Res. 60 -

(1979) 313-320.

- Rainaldi, R. y Mariani, T. The distribution of induced sister-chromatid exchanges: a tool for identifying agents directly interacting with DNA. *Mutation Res.* 103 (1982) 333-337.
- Raffetto, G., Parodi, S., Faggin, P. y Maconi, A.- Relationship between cytotoxicity and induction of sister chromatid exchanges in mouse foetal cells exposed to several doses of carcinogenic and noncarcinogenic chemicals. *Mutation Res.* 63 (1979) 335-343.
- Raposa, T.- Sister chromatid exchange studies for monitoring DNA damage and repair capacity after cytostatics *in vitro* and in lymphocytes of leukaemic patients under cytostatic therapy. *Mutation Res.* 57 (1978) 241-251.
- Renault, G., Gentil, A. y Chorounlinkov, I.- Kinetics of induction of sister-chromatid exchanges by X-rays through two cell cycles. *Mutation Res.* 94 (1982) 359-368.
- Reynolds, R. J., Natarajan, A. F. y Lohman, P. H. M.- *Micrococcus luteus* U. V. endonuclease sensitive sister and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Res.* 64 (1979) 353-356.
- Rudiger, H. W., Bartram, C. R., Harder, W. y Passarge, E.- Rate of sister chromatid exchanges in Bloom syndrome fibroblasts reduced by Co-cultivation with nor-

- mal fibroblasts. Am. J. Hum. Genet. 32 (1980) 150-157.
- Rydberg, B. Detection of induced DNA strand breaks with improved sensitivity in human cells. Radiation Res. 81 (1980) 492-495.
- Russev, G. C. y Tsanev, R. G.- Continuous labeling of mammalian DNA *in vivo*. Anal. Biochem. 54 (1973) 115-119.
- Sahar, E., Kittrel, C., Fulghum, S., Feld, M. y Latt, S.- - Sister chromatid exchange induction in chinese hamster ovary cells by 8-Methoxypsoralen and brief pulses of laser light. Mutation Res. 83 (1981) 91-105.
- Scheres, J. M. J. C., Hustinx, Th. W. J., Rutten, F. J. y - Merckx, G. F. M.- "Reverse" differential staining of sister chromatids. Exp. Cell Res. 109 (1977) - 466-468.
- Schneider, E. L., Chaillet, J. R. y Tice, R. R.- *In vivo* BUdR Labeling of mammalian chromosomes. Exp. Cell. Res. 100 (1976) 396-399.
- Schonberg, S. y German, J.- Sister chromatid exchange in cells metabolically coupled to Bloom's syndrome cells. Nature 284 (1980) 72-74.
- Schreck, R. R., Paika, I. J. y Latt, S.A.- *In vivo* induction of sister-chromatid exchanges in liver and marrow cells by drugs requiring metabolic activation. Mutation Res. 64 (1979) 315-328.

- Schvartzman, J. B., Postigo, R. y Gutiérrez, C.- Analysis of visible light-induced sister chromatid exchanges - in 5-bromodeoxyuridine-substituted chromosomes. - Chromosome 74 (1979) 317.
- Schvartzman, J. B. y Gutiérrez, C.- The relationship between the cell time available for repair and the effectiveness of a damaging treatment in provoking the formation of sister-chromatid exchanges. Mutation Res. 72 (1980) 483-489.
- Schvartzman, J. B. y Goyanes, V.- A new method for identification of SCEs per cell cycle in BrdUrd-substituted chromosomes. Cell. Biol. Int. Rep. 4 (1980) 415.
- Schvartzman, J. B., Goyanes, V. J. y Tice, R. R.- DNA damage persistence and site-specificity in SCE-formation. Proceedings of International Symposium on Sister - Chromatid Exchange. Brookhaven Natl. Lab. New York (1984) En prensa.
- Schvartzman, J. B., Goyanes, V. J., Campos, A., Lage, A.M., Veiras, C. Silva, M. C. y Ramos, S.- Persistence of DNA lesions and the cytological cancelation of sister -chromatid exchanges. Manuscrito en preparación.
- Schwartz, J. L., Banda, M. J. y Wolff, S.- 12-O-Tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) induces sister-chromatid exchanges and delays in cell progression in Chinese hamster ovary and human cell lines. Muta-

- tion Res. 92 (1982) 393-409.
- Sheinin, R., Humbert, J. y Pearlman, R. E.- Some aspects of eukaryotic DNA replication. Ann. Rev. Biochem. 47 (1978) 277-316.
- Shiraishi, Y. y Sandberg, A. A. Effects of Mitomicin C on - sister chromatid exchange in normal and Bloom's - syndrome cells. Mutation Res. 49 (1978) 233-238.
- Shiraishi, Y. y Sandberg, A. A.- 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 (1979) 27-35.
- Shiraishi, Y. y Sandberg, A. A.- Effects of caffeine induced defective DNA replication and SCE and chromosome aberrations produced by alkilating agents. Mutation Res. 72 (1980) 251-256.
- Solomon, E. y Bobrow, M.- Sister chromatid exchanges - a sen- sitive assay of agents damaging human chromosomes. Mutation Res. 30 (1975) 273-278.
- Sono, A. y Sakaguchi, K.- Inhibition of protein synthesis an- tagonizes induction of sister-chromatid exchanges by exogenous agentes. Mutation Res. 80 (1981) 121-131.
- Stetka, D. G. y Wolff, S.- Sister chromatid exchange as an - assay for genetic damage by mutagen-carcinogens. I. In *in vivo* test for compounds requiring metabolic ac- tivation. Mutation Res. 41 (1976) 333-342.

- Stetka, D. G. y Wolff, S.- Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens. II. *In vitro* test for compounds requiring metabolic activation. *Mutation Res.* 41 (1976) 343-350.
- Stetka, D. G., Minkler, J. y Carrano, A. V.- Induction of long-lived chromosome damage, as manifested by sister-chromatid exchange in lymphocytes of animals exposed to mitomicin-C. *Mutation Res.* 51 (1978) 383-396.
- Takayama, S. y Nakanishi, S.- Differential Giemsa staining of sister chromatids after extraction with acids. *Chromosoma* 64 (1977) 109-115.
- Takehisa, S.- Induction of sister chromatid exchanges by chemical agents. en "Sister Chromatid Exchanges". -- Wolff, S. John Wiley and Sons. (1982) 87-147.
- Taylor, J. H.- Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes. *Genetics* 43 (1958) 515-529.
- Thompson, L. H., Baker, R. M., Carrano, A. V. y Brookman, K. W.- Failure of the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate to enhance sister chromatid exchange, mitotic segregation, or expression of mutations in Chinese hamster cells. *Cancer Res.* 40 (1980) 3245-3251.
- Thompson, L. H., Brookman, K. W., Dillehay, L.E., Carrano, A. V., Mazrimas, J. A., Mooney, C. L. y Minkler, -

- J. L.- A CHO-cell strain having hipersensitivity - to mutagens, a defect in DNA strand-break repair, and an extraordinary baseline frequency of sister-chromatid exchange. *Mutation Res.* 95 (1982) 427-440.
- Thust, R. y Ronne, M.- Localization of SCEs and their possible relationship to dA-dT of dG-dC clusters, respectively, in Chinese hamster V79-E chromosomes. *Hereditas* 96 (1982) 295-298.
- Tice, R., Chaillet, J. y Schneider, E. L.- Demonstration of spontaneous sister chromatid exchanges *in vivo*. *Exp. Cell Res.* 102 (1976) 426-429.
- Tice, R., Windler, G. y Rary, J. M.- Effect of cocultivation on sister chromatid exchange frequencies in Bloom's syndrome and normal fibroblasts cells. *Nature* 273 (1978) 539-540.
- Tice, R. R. y Schwartzman, J. B.- Sister Chromatid exchange: A measure of DNA lesion persistence in Sister Chromatid Exchange. Alan R. Liss, Inc. New York (1982) 33-45.
- Tremp, J.- Chromosome aberrations and cell survival in irradiated mammalian cells. *Radiation Res.* 85 (1981) 554-566.
- Van Buul, P.P.W., Natarajan, A.T. y Verdegaal-Immerzeel, E. A.M.- Suppression of the frequencies of sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome fibroblasts by co-cultivation with chinese hamster cells. *Hum. Genet.* 44 (1978) 187-189.

- Verly, W. G., Paquette, Y. y Tobodeau, C.- Nuclease for DNA Apurinic site may be involved in the maintenance of DNA in normal cells. Nature (London) New Biol. 244 (1973) 67-69.
- Vogel, W. Y Bauknecht, T.- Differential chromatid staining by *in vivo* treatment as a mutagenicity test system. Nature (London) 260 (1976) 448-449.
- Weissbach, A.- Eukaryotic DNA polymerases. Ann. Rev. Biochem. 46 (1977) 25-47.
- White, A. D. y Hesketch, L. C.- A method utilizing human lymphocytes with *in vitro* metabolic activation for assessing chemical mutagenicity by sister chromatid exchange analysis. Mutation Res. 69 (1980) 283-291.
- Wolff, S., Bodycote, J. y Painter, R. B.- Sister chromatid exchanges induced in chinese hamster cells by U.V. irradiation at different stages of the cell cycle: the necessity for cells to pass through S. Mutation Res. 25 (1974) 73-81.
- Wolff, S. y Perry, P.- Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography. Chromosoma (Brl.) 48 (1974) 341-353.
- Wolff, S., Bodycote, J., Thomas, G. H. y Cleaver, J. E.- Sister chromatid exchange in *Xeroderma pigmentosum* cells that are defective in DNA excision repair or

- post replication repair. *Genetics* 81 (1975) 349-355.
- Wolff, S., Rodin, B. y Cleaver, J. E.-Sister chromatid exchanges induced by mutagenic carcinogens in normal and *Xeroderma pigmentosum* cells. *Nature* 265 (1977) 347-349.
- Wolff, S.- Chromosomes effects of mutagenic carcinogens and - the nature of the lesions leading to sister chromatid exchange. En Evans, H.J. y Lloyd, D. C. "Mutagen Induced Chromosome Damage in Man". New Haven: Yale University Press, (1978) 208.
- Wyzynska, K. y Lipiecki, J.- The yield of radiation-induced - chromosomal aberrations in lymphocytes as related to the time of arrival at first post-stimulation - mitosis. *Mutation Res.* 73 (1980) 101-114.
- Zakharov, A. F. y Egolina, N. A.- Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. I BrdU-revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes. *Chromosoma (Berl.)* 38 (1972) 341-365.