



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**DESTINO IN VIVO DE LAS LESIONES CAUSADAS AL ADN
POR AGENTES ALQUILANTES E INVOLUCRADAS EN LA
PRODUCCION DE ICH**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS

(BIOLOGIA)

P R E S E N T A

REGINA GUADALUPE RODRIGUEZ REYES

DIRECTOR DE TESIS: DR. PEDRO R. MORALES RAMIREZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

00361

24
24

1996



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.

Dedico esta tesis al Dr. Pedro Morales Ramírez. Su ejemplo de entusiasmo y dedicación a la ciencia ha sido decisivo en la consolidación del grupo de trabajo del cual me enorgullece formar parte. Le agradezco infinitamente su amistad, así como la enorme paciencia y solidaridad que me brindó durante el desarrollo de la misma.

Agradezco de manera especial la colaboración de la Bióloga Teresita Vallarino Kelly y del Arq. Jorge Mercader Martínez, ha sido de vital importancia en el desarrollo de este trabajo.

A las M. en C. Mary Tere Mendiola y Vicky Cruz por su constante disposición a colaborar y a dar siempre lo mejor.

El apoyo invaluable de los técnicos del laboratorio: Angel Reyes, Perfecto Aguilar, Felipe Beltrán y Enrique Fernández.

A las autoridades del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares por la ayuda prestada para llevar a cabo la realización e impresión de esta tesis.

Agradezco a los miembros del jurado sus comentarios y sugerencias a este trabajo. Ellos contribuyeron positivamente a enriquecerlo.

Dr. Pedro Morales Ramírez.

Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz.

Dr. Miguel Betancourt Rule.

Dra. Sandra Gómez Arroyo.

Dr. Mario Altamirano Lozano.

Dra Sara Frías Vázquez.

Dra. Rocío Ortiz Muñiz

A MIS MAESTROS

A MIS AMIGAS DE SIEMPRE

**Con entrañable amor y mi más sincero agradecimiento
a mis padres:**

Sra. Catalina Reyes Milán y

Sr. Sóstenes Rodríguez López.

Y a mi tía:

Sra. Severina. Reyes Milán.

Con todo mi amor a mis hijos: Leonardo y Horacio

A mis hermanos :

Virginia, Cutberto,

Juanita y Antonio.

A mis sobrinos. :

Jorge, Lore, Vicky, Paty,

Evita, Carlita, Nancy y

Juanita.

INDICE

	PAGINA
LISTA DE ABREVIATURAS	5
RESUMEN	8
INTRODUCCION	10
1. Interacción de agentes con el ADN	10
2. Consecuencias del daño genético	11
3. Intercambios en las cromátidas hermanas	13
4. Inducción de ICH por los AA	16
5. Características generales de los AA	17
6. Actividad genotóxica de los AA	18
7. Lesión (es) involucradas en la producción de ICH	30
8. Persistencia de las lesiones que dan lugar a ICH	34
9. Otras vías para la producción de ICH	39
OBJETIVOS	42
MATERIALES Y METODOS	43
1. Animales	43
2. Protocolo	43
3. Colección y procesamiento de las células de la médula ósea	47

4. Tinción diferencial de las cromátidas hermanas	48
5. Análisis e interpretación de los ICH	48
6. Marco Teórico	54
7. Métodos estadísticos	56
RESULTADOS	57
1. Inducción de ICH por los AA	57
2. Frecuencias relativas de ICH por los AA	59
3. Análisis de la inducción de ICH a nivel de poblaciones celulares	62
4. Efecto de la BrdU sobre la inducción de ICH causada por los AA	75
DISCUSION	79
1. Protocolo DLI-ICH	79
2. Marco Teórico	81
3. Eficiencia para la inducción de ICH por los AA	82
4. Destino de las lesiones causadas por los AA	83
5. Análisis poblacional de la respuesta al efecto de la DMN	92
6. Relación entre las lesiones causadas por los AA al ADN y el destino de las lesiones inductoras de ICH	95

**7. Efecto de la BrdU sobre la inducción de ICH por
los AA**

4

97

CONCLUSIONES

101

REFERENCIAS

104

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Agentes Alquilantes.
AC	Aberraciones cromosómicas.
ADN	Acido desoxiribonucleico.
AFC	Afidicolin.
AA 7-MeGua	Anillo abierto en el nitrógeno 7 de la guanina producido por la alquilación en ese sitio.
AGT	Enzima O ⁶ alquilguanina -ADN- alquiltransferasa.
alq N-3 A	Alquilación en el nitrógeno 3 de la adenina en el ADN.
alq N-7 G	Alquilación en el nitrógeno 7 de la guanina en el ADN.
alq O ⁶ G	Alquilación en el oxígeno 6 de la guanina en el ADN.
BCNU	1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea.
BrdU	5-Bromo-2-desoxiuridina.
Cromosomas G-B	Cromosomas de células en 3 ^{er} ciclo de división que tienen una cromátida gris y la otra pálida.
Cromosomas N-B	Cromosomas de células en 3 ^{er} ciclo de división, que tienen una cromátida negra y la otra pálida.
CP	Ciclofosfamida.
CHO	Células de ovario de criceto chino.

DCMC	Decarbamoil mitomicina C.
DLI-ICH	Destino de las lesiones al ADN inductoras de ICH.
DMN	Dimetil nitrosamina.
EMS	Etil metanosulfonato.
G ₁	Etapas del ciclo celular anterior a la de la síntesis.
G ₂	Etapas del ciclo celular posterior a la de la síntesis.
h	Horas.
ICH	Intercambios en las cromátidas hermanas.
ICH-1	Intercambio en las cromátidas hermanas que ocurrió en el primer ciclo postratamiento.
ICH-2	Intercambio en las cromátidas hermanas que ocurrió en el segundo ciclo postratamiento.
ICH-1,2	Intercambios en las cromátidas hermanas en el mismo locus en ambos ciclos de división.
LD ₅₀	Dosis letal al 50%
ENU	Etil nitrosourea.
8-MeOP	8-Metoxipsoralén.
min	Minutos.
MMC	Mitomicina C.
MMS	Metil metanosulfonato.
MNNG	N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

MNU	Metil nitrosourea.
MPG	N-metilpurina-DNA glicosilasa.
MPG-cDNA	Gene humano para la MPG.
n	Valor de la fuerza nucleofílica.
4-NQO	4-nitroquinoleína 1-óxido.
POR	Porfiromicina.
S	Etapas del ciclo celular en la que se duplica el ADN.
s	Valor de selectividad nucleofílica.
SH	Grupo sulfhidrilo.
SN2	Sustitución nucleofílica bimolecular.
SN1	Sustitución nucleofílica unimolecular.
TDDT	Tinción diferencial de las cromátidas hermanas en dos tonos.
TDTT	Tinción diferencial de las cromátidas hermanas en tres tonos.
UV	Luz ultravioleta.

RESUMEN

Mediante el empleo del protocolo *in vivo* del destino de las lesiones al ADN inductoras de ICH (DLI-ICH) en células de la médula ósea de ratón, se estudió el destino de las lesiones causadas por tres agentes alquilantes(AA); dos directos: metil metanosulfonato (MMS) y etil metanosulfonato (EMS); y uno indirecto: dimetilnitrosamina (DMN).

El protocolo DLI-ICH permite determinar la inducción de ICH en la primera (ICH-1), en la segunda (ICH-2) y en el mismo locus en ambas divisiones después del tratamiento con los mutágenos. La determinación se lleva a cabo en metafases de células que se han dividido tres veces y que presentan la tinción diferencial en tres tonos (TDTT) de sus cromátidas hermanas.

A 6 grupos integrados por 6 a 8 ratones machos de la cepa Balb-C se les administraron intraperitonealmente dos dosis de bromodesoxiuridina (BrdU) adsorbida a carbón activado, una, de 0.2 mg/g de peso al inicio de los experimentos y la otra, de 2.0 mg/g de peso 12 h. después. El MMS, el EMS y la DMN en solución acuosa fueron administrados 30 minutos antes de la segunda dosis de BrdU mediante una inyección intraperitoneal, a dosis de 30, 300 y 50 μ g/g de peso respectivamente. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical a las 36 h, dos h después de haber recibido 3.75 μ g de colchicina /g de peso.

La interpretación del destino de las lesiones causadas por los mencionados AA e involucradas en la formación de ICH, se hizo a partir

de la comparación entre las frecuencias relativas obtenidas, tomando como base lo establecido en el marco teórico previamente reportado.

La comparación entre las frecuencias relativas de ICH-1 e ICH-2 mostró que el MMS y el EMS tuvieron un comportamiento similar e indicó que estos agentes producen lesiones persistentes e incluso lesiones secundarias. La DMN parece inducir ICH preferentemente por inhibición de la síntesis del ADN en particular en la segunda división, probablemente a través de lesiones secundarias.

Las frecuencias relativas de ICH-1 vs ICH-1,2 indican que las lesiones inducidas por MMS son persistentes, las inducidas por EMS son 50% reparables y las producidas por DMN causan ICH por una vía similar a la de los inhibidores de la síntesis del ADN.

El protocolo DLI-ICH también permitió realizar el análisis del efecto de la BrdU incorporada al ADN sobre la inducción de ICH causada por los AA empleados. Se determinó que el análogo causó una fuerte inhibición en la inducción de ICH por MMS, una inhibición leve en el caso de la DMN y no afectó la inducción producida por EMS.

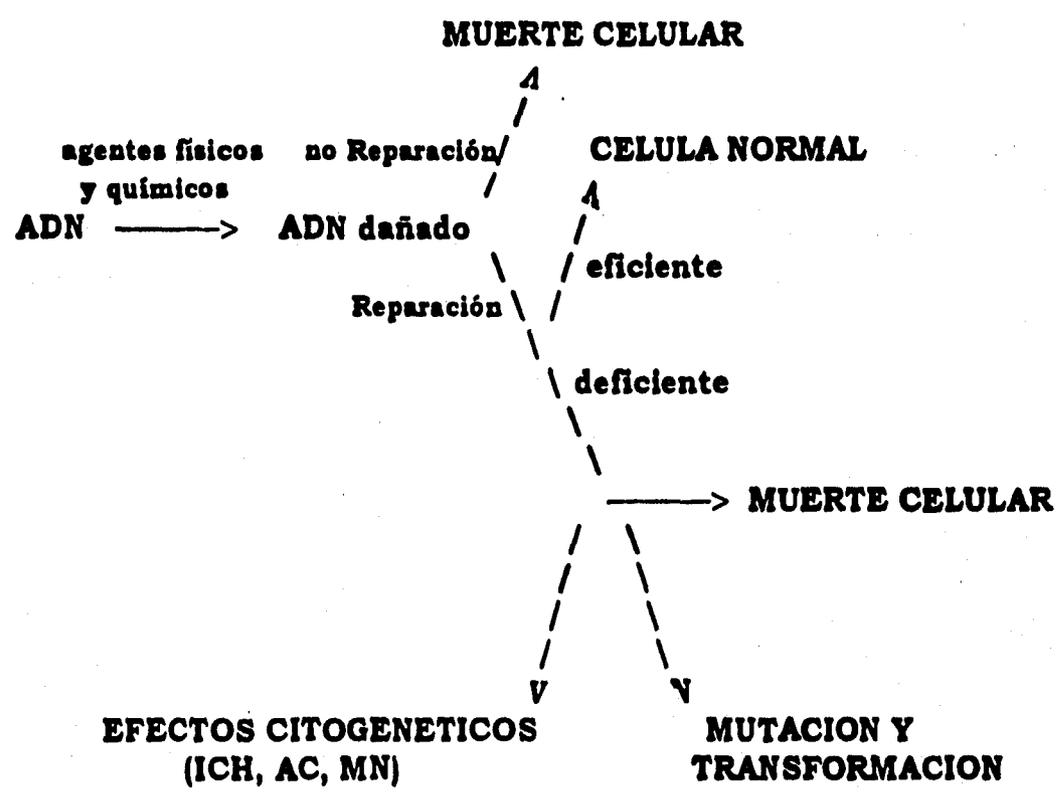
INTRODUCCION

El ácido desoxiribonucleico (ADN), molécula que lleva la información genética de la células, puede ser dañada por diferentes agentes ambientales físicos y químicos. Si el daño no es removido de la molécula, puede ocasionar la muerte de la célula. Cuando este es reparado de manera eficiente, la información original del ADN es restaurada y la célula vuelve a la normalidad. Sin embargo, eventualmente la alteración es reparada en forma deficiente, lo cual tiene diferentes consecuencias tales como: mutaciones, transformación celular o distintos efectos citogenéticos como intercambios en las cromátidas hermanas (ICH), aberraciones cromosómicas y micronúcleos (Fig. 1).

1. Interacción de agentes con el ADN

Los agentes mutagénicos ambientales físicos como por ejemplo radiaciones y químicos como los agentes alquilantes, al interactuar con el ADN, le pueden causar diversos tipos de lesiones primarias, tales como: rompimientos de banda (radiación ionizante, luz ultravioleta), dímeros de pirimidina (luz ultravioleta de onda corta), alquilación de bases (metil metanosulfonato, dimetilnitrosamina), entrecruzamientos intra e interbanda de ADN (cis-platino, luz ultravioleta de onda larga) e intercalaciones (adriamicina, daunomicina) (Fig. 2) Vogel, 1991).

FIGURA 1. SECUENCIA DE EVENTOS CELULARES CAUSADOS POR LA PRODUCCION DE LESIONES EN EL ADN.



2. Consecuencias del daño genético

2.1. Reparación

En todos los organismos existe algún tipo de reparación del ADN; siendo el propósito de tal reparación la salvaguardia del material genético al remover y reemplazar los segmentos dañados del ADN. El riesgo celular de mutagénesis, clastogénesis y de carcinogénesis varía en función del ciclo celular. Por ejemplo, se postula que el daño al ADN causado por

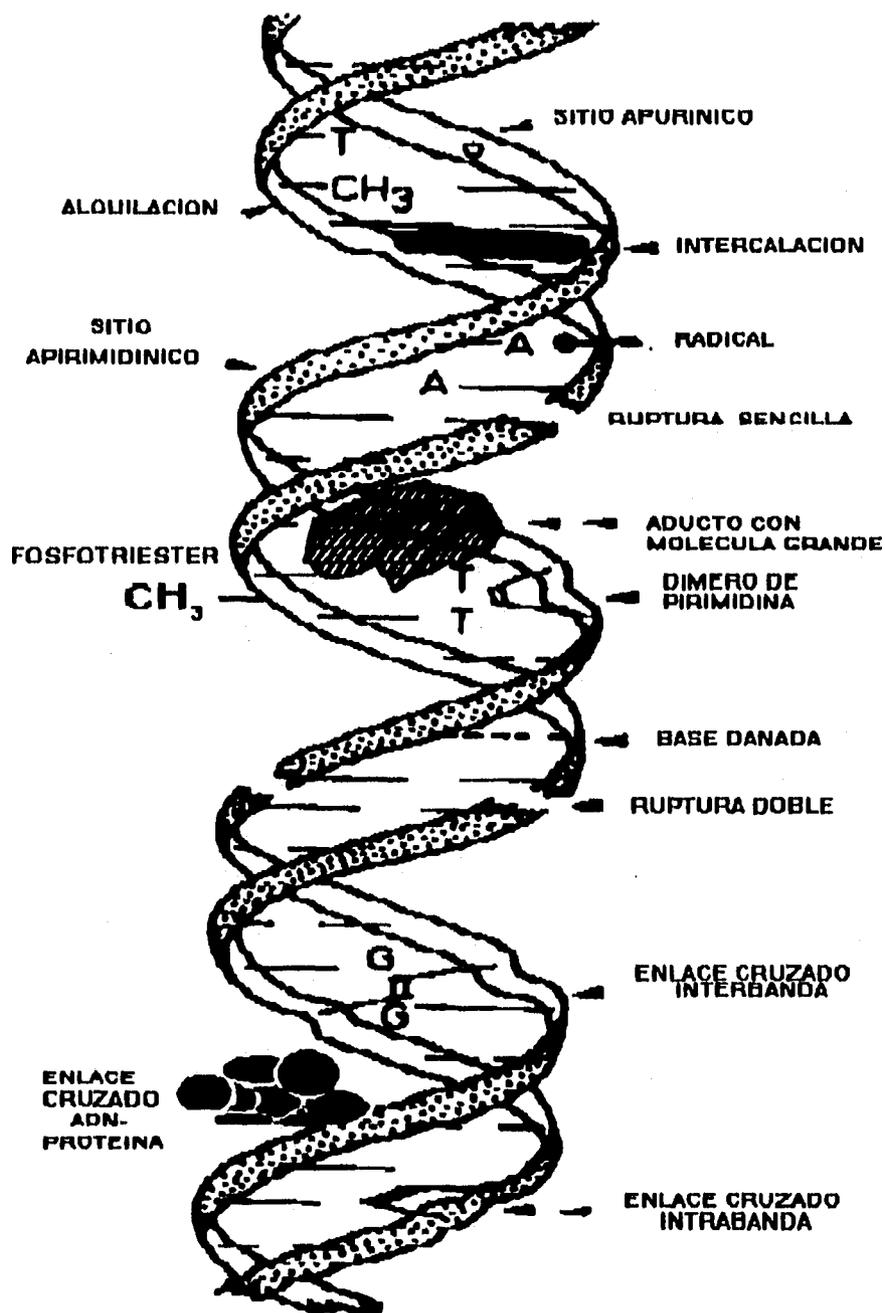


FIGURA 2. LESIONES PRIMARIAS EN EL ADN DESPUES DEL TRATAMIENTO CON MUTAGENOS (Tomada de Vogel, 1991).

agentes químicos produce mutaciones y aberraciones de tipo cromatídicas cuando las células están en la fase de síntesis (S) (Vogel, 1991). Las vías de reparación que operan antes de la duplicación del ADN, reducen el riesgo, al remover el molde dañado antes que sea encontrado por la ADN-polimerasa. Usualmente las alteraciones se fijan antes de S, pero si se remueven previamente a la duplicación, no causarán cambios genéticos. No obstante, las aberraciones cromosómicas estructurales inducidas por radiación ionizante o por bleomicina pueden ser visualizadas antes de que la célula entre en la fase S (Vogel, 1991).

3. Intercambios en las cromátidas hermanas

3.1 Concepto

Los intercambios en las cromátidas hermanas (ICH) son cambios simétricos en las cromátidas de un cromosoma, que a diferencia de las aberraciones cromosómicas, no dan lugar a modificaciones en la morfología de los cromosomas (Vogel, 1991).

Taylor (1958) reportó la primera evidencia experimental de tales intercambios. Empleando métodos autorradiográficos basados en la incorporación de timidina tritiada en la primera de dos divisiones subsecuentes, observó que los cromosomas metafásicos tenían una cromátida marcada y la otra no, así como también los cambios de marcaje de una cromátida a la otra en el mismo sitio.

Actualmente, los intercambios son detectados mediante el empleo de metodologías de tinción diferencial de las cromátidas hermanas, las cuales se basan en la incorporación del análogo de la timina, 5-Bromo-2-

desoxiuridina (BrdU), en el ADN de células que han completado dos ciclos de división celular, de los cuales, al menos el primero en presencia de la BrdU. Dicha incorporación se lleva a cabo cuando el ADN se está duplicando o sintetizando. Para evidenciar los ICH, las preparaciones de cromosomas metafásicos se tratan con alguna de las técnicas de tinción diferencial de las cromátidas hermanas, que emplean colorantes fluorescentes y/o Giemsa (Korenberg y Freedlender, 1974; Scheres et al., 1977; Takayama y Nakanishi, 1977; Perry y Wolff, 1974). Las causas que promueven la tinción diferencial se fundamentan en el hecho de que como las cromátidas de un cromosoma han incorporado diferente cantidad de BrdU, reaccionan de manera distinta ante los reactivos empleados en las técnicas; por ejemplo, se sugiere que hay una represión del colorante fluorescente en la cromátida con más BrdU y por lo tanto esta aparece opaca (Latt, 1973) o que, la fotólisis de componentes de la cromátida bifilarmente sustituida, impide el paso a colorantes azurados como el Giemsa, por lo cual, se ve pálida (Goto et al., 1975)

No obstante el trabajo considerable que se ha hecho acerca del fenómeno de ICH, no han sido bien establecidos ni el proceso que da lugar a este, ni las consecuencias del mismo para las células. Sin embargo, se han acumulado una serie de observaciones acerca de tal fenómeno: los ICH, se manifiestan a nivel cromosómico y son intercambios de doble banda entre moléculas de ADN idénticas. Estos intercambios ocurren espontáneamente en una frecuencia baja (Morales-Ramírez et al., 1990) o pueden ser inducidos por agentes que causan lesiones al ADN. No parecen ser simplemente el resultado de rompimiento y reunión de moléculas de ADN en sitios homólogos, sino que su formación está

asociada con la duplicación del ADN, es decir, es un proceso que depende de la fase de síntesis (Wolff et al., 1974). Además, existen evidencias que indican que el proceso de intercambio de las cromátidas hermanas se puede llevar a cabo a través de dos mecanismos básicamente: mediante daño producido en el ADN (Perry y Evans, 1975; Abe y Sasaki, 1977; Nakanishi y Schneider, 1979) o , como resultado de alteraciones en el proceso de síntesis del ADN, como por ejemplo la inhibición de las enzimas participantes en dicho proceso (Rainaldi y Mariani, 1982; Ishii y Bender 1980).

Numerosos agentes físicos (radiación ionizante, luz ultravioleta) y químicos (metil metanosulfonato, dimetilnitrosamina, mitomicina C) conocidos por su capacidad para inducir directa o indirectamente mutaciones y transformación celular, han sido evaluados como inductores de ICH en diferentes sistemas biológicos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Perry y Evans, 1975; Popescu et al., 1977; Nakanishi y Schneider, 1979; Kram et al., 1979; Morales-Ramírez P., 1980).

El evento de ICH, ha probado ser un criterio para la detección de daño causado por ciertos agentes ambientales más sensible que el de aberraciones cromosómicas (Marquard y Bayer, 1977). Mutágenos conocidos tales como UV de onda corta y agentes alquilantes, los cuales provocan lesiones en el ADN, y que requieren reparación dependiente de la fase de síntesis (S) para dar lugar a la formación de aberraciones cromosómicas, son eficientes productores de ICH (Perry y Evans, 1975; Latt et al., 1981), mientras que mutágenos tales como rayos X, bleomicina, y otros que actúan de manera independiente de la S son menos eficientes (Perry y Evans, 1975).

4. Inducción de intercambios en las cromátidas hermanas por MMS, EMS y DMN.

Tanto MMS como EMS, son agentes alquilantes monofuncionales y eficientes inductores de ICH en diferentes tipos celulares tanto *in vivo* (Marquardt y Bayer, 1977; Todd y Bloom, 1980; Neft y Conner, 1989) como *in vitro* (Perry y Evans, 1975; Mehnert et al., 1984; Miller, 1991); por ello se han empleado como testigos positivos o mutágenos de referencia en pruebas de agentes sospechosos de ser inductores de ICH (Marquardt y Bayer, 1977; Mehnert et al., 1984), aunque su eficiencia *in vitro* es más baja que la de los agentes alquilantes bifuncionales (Perry y Evans, 1975).

Los trabajos con DMN son escasos, lo cual posiblemente se deba a que es un mutágeno que requiere activación metabólica, sin embargo, algunos resultados en células de ratón *in vivo*, indicaron que a dosis menores de la LD fue un inductor pobre de ICH (Neft y Conner, 1989), provocando incluso toxicidad aguda y citotoxicidad. Sin embargo, estudios *in vitro* empleando células de ovario de criceto Chino (CHO) activadas con microsomas de hígado mostraron incrementos de ICH significativamente altos, incluso a la dosis más baja (Natarajan et al., 1976). Por otro lado, en líneas inmortales de hepatocitos de rata y líneas con sistemas enzimáticos de activación integrados mediante ingeniería genética, mostraron respuesta significativa para ICH y aberraciones cromosómicas (Kulka y Bauchinger, 1993; Kulka et al., 1993).

El tratamiento con ciertas sustancias tales como 3 aminobenzamida (Morgan y Cleaver, 1982), BrdU (Natarajan et al., 1983), cafeína (Popescu

et al., 1979) y afidilcolín (AFC) (Nishi et al., 1982) puede potenciar la inducción de ICH causada por MMS y por EMS.

En algunas líneas celulares hipersensibles al efecto letal de agentes alquilantes (AA) como el EMS, la inducción de ICH es bastante elevada (Heddle y Arlett, 1980) mientras que en otras, también sensibles al EMS, el efecto sobre el ICH es menor (Shiraishi y Sandberg, 1979). Existe una línea CHO especialmente hipersensible al EMS y también al MMS en cuanto a la producción de ICH, a la disminución de la supervivencia celular y a la inducción de mutaciones, donde la reparación de rompimientos de banda simple es deficiente; esta línea celular es también sensible a otros agentes alquilantes como etil-nitrosourea (ENU) y N-metil- N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) y a otros no alquilantes como rayos X y luz ultravioleta, aunque en menor grado (Thompson et al., 1982).

Los ICH producidos por MMS no se alteraron por el uso de 3-Aminoharman, un antagonista de la producción de ICH inducida por ciertos agentes, tales como mitomicina C (MMC), o MNNG (Tohda et al., 1984). No obstante, inhibidores de la síntesis de proteínas como cicloheximida y puromicina provocaron una disminución significativa en la frecuencia de ICH causada por MMS y EMS (Sono y Sakaguchi, 1981).

5. Características generales de MMS, EMS y DMN

Los AA simples metilantes y etilantes generalmente no son considerados contaminantes ambientales. Son compuestos modelo de las

formas reactivas de muchos alquil-carcinógenos; entre los cuales se encuentran el MMS y el EMS, que, son agentes mutagénicos y carcinógenos pertenecientes al grupo de los alquil alcanosulfonatos. La DMN, agente mutágeno y carcinógeno en una gran variedad de especies y de tejidos, es el representante más simple del grupo de las nitrosaminas, presentes en alimentos preservados con nitritos y nitratos; así como en humo del tabaco, en tocino, carne cocinada y dentro del organismo por la acción de agentes nitrosantes (Vogel, 1991).

De los tres AA usados en esta tesis, el MMS y el EMS son mutágenos directos, el MMS posee dos grupos metilo, pero solamente alquila biomoléculas donando uno de ellos y el EMS actúa cediendo su etilo (Fig. 3). La DMN es un promutágeno que sufre biotransformación por hidroxilación en el carbono α (Fig. 4) para producir una hidroximetil-metil-nitrosamina inestable, la cual se rompe espontáneamente y da lugar de manera rápida a un ion alquildiazonio y enseguida a un ion carbonio [CH^+], la supuesta especie reactiva que metila al ADN (Vogel, 1991).

6. Actividad Genotóxica de MMS, EMS y DMN

6.1 Interacción con el ADN

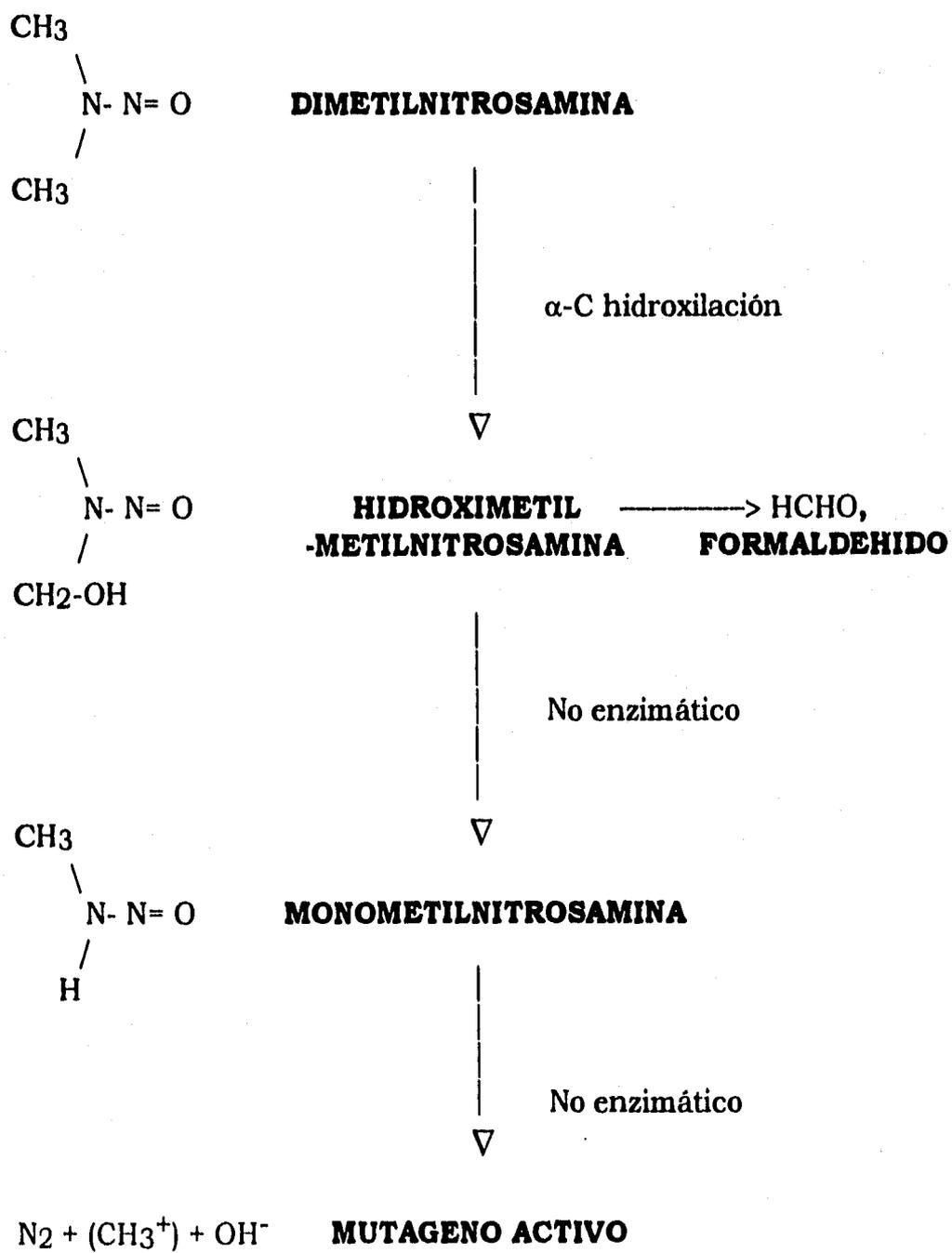
La interacción de estos agentes con el ADN básicamente sigue las reglas de la electrofilicidad y de la nucleofilicidad y muestra características de reactividad específicas para cada uno de ellos (Tabla I), las cuales se explican en términos de su valor de selectividad nucleofílica o valores s , que es una medida de la sensibilidad de los AA respecto a la fuerza n del

nucleófilo con el cual reaccionan (átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre de proteínas y ADN), del mecanismo de reacción que presentan (SN1, sustitución nucleofílica unimolecular o SN2, sustitución nucleofílica

FIGURA 3. ESTRUCTURA QUIMICA DEL METIL METANOSULFONATO (MMS), ETIL METANOSULFONATO (EMS) Y DE LA DIMETILNITROSAMINA (DMN) (TOMADO DE VOGEL, 1991)



FIGURA 4. METABOLISMO DE LA DIMETILNITROSAMINA (TOMADO DE VOGEL, 1991)



bimolecular); de la tasa de alquilación en el oxígeno 6 entre la alquilación en el nitrógeno 7 de la misma base; o de su comportamiento como ácidos intermedios. La alquilación en el ADN puede suceder principalmente en las bases y en los grupos fosfatos, y dado que el nitrógeno 7 de la guanina (alq N-7 G) es un sitio más nucleofílico que el oxígeno 6 de la misma base (alq O⁶ G) y que el oxígeno del fosfato, y considerando los datos de cada uno de los tres AA (Tabla I), es comprensible el hecho de que el MMS reacciona preferentemente con nitrógenos en el ADN y la DMN con oxígenos, quedando en posición intermedia el EMS. Además, el MMS reacciona con proteínas más que el EMS y aún más que la DMN (Vogel, 1991).

Los tres AA reaccionan con las bases del ADN en el orden decreciente: guanina > adenina > citocina > timina. Los grupos fosfato terciarios del esqueleto azúcar-fosfato también son alquilados pero a un grado menor que las bases (Ehling et al., 1968; Beranek, 1990).

Se conocen por lo menos 12 sitios en el ADN, en los que los AA reaccionan. La cantidad relativa de los productos de alquilación que se inducen, depende de la estructura química de los compuestos y de la electrofilicidad de las especies alquilantes.

El resultado de la interacción entre los AA y el ADN, es la formación de aductos en los sitios mencionados, entendiéndose por tales, como los radicales provenientes de dichos agentes, que se agregan o adicionan al ADN y que son las lesiones que ellos le causan.

Los tres AA estudiados en este trabajo causan principalmente aductos alq N-7 G (Tabla II), siendo el MMS el más eficiente. El aducto en el nitrógeno 3 de la adenina (alq N-3 A) también es

TABLA I.- REACTIVIDAD RELATIVA DE MMS, EMS Y DMN CON BASE EN SU VALOR s , SU MECANISMO DE REACCION Y LA PROPORCION DE ADUCTOS alq O⁶ G Y alq N-7 G (TOMADA DE BERANEK, 1990 Y VOGEL, 1991).

AA	s	MECANISMO	O ⁶ G/ N-7 G	REFERENCIAS
MMS	>0.83	S _N 2	0.003-0.004	Lawley, 1974 O' Connor, 1981
EMS	0.67	S _N 1/ S _N 2	0.03	Lawley, 1974 O' Connor, 1981 Swenson, 1983
DMN	0.40	S _N 1*	0.1	O' Connor, 1981

*Ver explicación en el texto. * Este mecanismo se infirió a partir del valor s de la DMN.*

producido en un buen porcentaje por los tres AA y nuevamente el MMS lo provoca en mayor cantidad. La alquilación en el oxígeno 6 de la guanina es el tipo principal de aducto inducido por la DMN y en el caso de MMS tal aducto es producido en la proporción menor. Además de estos aductos, el del anillo abierto de 7-metilguanina (AA 7-MeGua) ha sido identificado en ratas hembras después del tratamiento con metilnitrosourea (MNU) y en hígado de ratas alimentadas con DMN o con 1,2-dimetilhidracina (Beranek, 1990). Se ha considerado que la reactividad específica de estos AA se refleja en la proporción de aductos alq O⁶ G vs aductos alq N-7 G, que para MMS, EMS y DMN es respectivamente : 0.003-0.004, 0.03 y 0.1 (Beranek, 1990) (Tabla I). Por otro lado, la reactividad de los AA con ácidos nucleicos es mayor en derivados metilados que en etilados (Beranek, 1990).

**TABLA II.- PATRONES DE ALQUILACION DEL ADN EXPRESADOS
COMO PORCENTAJE DE ALQUILACION TOTAL PRODUCIDOS POR
MMS, EMS Y DMN *IN VIVO* (TOMADA DE BERANEK, 1990)**

Sitio de Alquilación	MMS	EMS	DMN
Adenina			
N1-	1.0	-	0.8-0.9
N3-	9.4	3.3	2.3-5.0
N7-	0.9	-	0.7-1.7
Citosina			
O ₂ -	-	-	-
N3-	-	-	0.6
Guanina			
N3-	0.7	-	0.6-0.90
O ₆ -	ND	1.5	6.1-7.80
N7-	85.5	70.0	66.8-74.5
AA 7-	-	-	9.7
			0.9-3.1*
Timina			
O ₂ -	-	-	0.2
N3-	-	-	0.2-0.4
Fosfotriésteres	1.0	-	9.0-12

*Las líneas (-) indican valores no reportados, ND indica aducto no detectado o por debajo de los límites de detección. y * son datos de una comunicación personal de O'Connor.*

producido en un buen porcentaje por los tres AA y nuevamente el MMS lo provoca en mayor cantidad. La alquilación en el oxígeno 6 de la guanina es el tipo principal de aducto inducido por la DMN y en el caso de MMS tal aducto es producido en la proporción menor. Además de estos aductos, el del anillo abierto de 7-metilguanina (AA 7-MeGua) ha sido identificado en ratas hembras después del tratamiento con metilnitrosourea (MNU) y en hígado de ratas alimentadas con DMN o con 1,2-dimetilhidracina (Beranek, 1990). Se ha considerado que la

reactividad específica de estos AA se refleja en la proporción de aductos alq O⁶ G vs aductos alq N-7 G, que para MMS, EMS y DMN es respectivamente : 0.003-0.004, 0.03 y 0.1 (Beranek, 1990) (Tabla I). Por otro lado, la reactividad de los AA con ácidos nucleicos es mayor en derivados metilados que en etilados (Beranek, 1990).

6.2. Remoción del daño al ADN causado por MMS, EMS y DMN

El daño inducido por alquilación, es eliminado a través de reparación por escisión de bases, remoción del ADN de los grupos alquilo sin incisión y a través del sistema transmetilasa; lo cual se ha detectado tanto en *Escherichia coli* como en células de mamíferos (Vogel, 1991).

No obstante que se conocen las vidas medias de los aductos generados por los AA, no se han establecido los mecanismos de reparación de ellos, excepto el de la 3-metil-adenina (m N-3 A) y de la metil O⁶ guanina (m O⁶ G) tanto en *E. coli* como en sistemas de mamíferos (Brent et al., 1988).

La reparación de las lesiones causadas por DMN se ha demostrado midiendo la pérdida de m O⁶ G, la cual se lleva a cabo rápidamente en hepatocitos frescos con una cantidad fija de alquilación y a una dosis baja del carcinógeno, ya que a dosis altas el proceso de remoción se satura o se inhibe (Unbenhauer y Pegg, 1981). En cambio, en hígado de rata *in vivo*, el daño causado por DMN a una dosis de 10 mg/kg fue relativamente persistente hasta por 6 días (Engelse y Phylippus, 1977). Por otro lado, la administración crónica de DMN estimula la reparación de daño inducido por ella misma específicamente del aducto m O⁶ G (Montesano, 1979).

Factores tales como la edad y la dieta de los animales afectan la eficiencia de la reparación del daño causado por este AA (Shaddock et al., 1993).

En relación al daño causado por MMS y EMS en el ADN, hay evidencias que indican que no es tan rápidamente reparado. Por ejemplo, se determinó mediante síntesis no programada que ello ocurrió en un período de tiempo mayor (20 h), en comparación con el que transcurrió para la reparación del daño ocasionado por otro tipo de agentes, tales como 2-acetilaminofluoreno, aflatoxina B1 y benzidina (4 h). De esto se infirió que dicha persistencia se debió a la generación de aductos estables tales como alq N-7 G, alq N-3 A y alq O⁶ G por MMS y EMS (Barfknecht et al., 1988). Por otro lado, en espermátidas de ratón en etapas tempranas expuestas a MMS y EMS se evidenció, también mediante autorradiografía, que la reparación del daño causado por ellos ocurrió en tres días, aunque con un rápido decremento en las primeras 12 h y que la reparación del daño inducido por EMS se llevó a cabo más lentamente que la del MMS (Sega et al., 1976). Finalmente, en células de criceto chino, se determinó que las lesiones inducidas por MMS y EMS que están involucradas en la formación de ICH, persisten hasta una segunda división después del tratamiento (Kaina y Aurich, 1985).

6.3. Enzimas O⁶ -alquilguanina-ADN alquiltransferasa y la N-metilpurina-ADN glicosilasa

La enzima O⁶ -alquilguanina-DNA alquiltransferasa (AGT), es una proteína de reparación que remueve el aducto alq O⁶ G, principal lesión mutagénica y carcinogénica generada por los AA y la N-metilpurina-DNA

glicosilasa (MPG) es la enzima que repara los aductos producidos en los nitrógenos 3 y 7 de las alquilpurinas predominantemente involucrados en la formación de aberraciones cromosómicas (Vogel y Natarajan, 1979; Brent et al., 1988; Tano et al., 1990).

La proteína AGT transfiere el grupo alquilo de la base alterada a un sitio aceptor de cisteína y restaura la estructura del ADN en un solo paso. Dado que la molécula de AGT queda bloqueada, debe sintetizarse otra molécula de proteína para remover otro alquilo, de tal forma este hecho puede ser un factor crítico en la capacidad de un tejido para reparar daño promutagénico antes de la duplicación celular. Esta enzima muestra gran afinidad por aductos de cadena corta (metil > etil > butil) y su actividad varía dramáticamente de un órgano a otro (Kaina et al., 1991) e incluso entre los distintos tipos celulares de un mismo órgano (Belinsky et al., 1988).

A partir de una serie de resultados que indicaron una correlación positiva entre actividad AGT y la protección contra la expresión de diferentes eventos genotóxicos tales como muerte celular, mutación, ICH y aberraciones cromosómicas, causados por algunos AA (Day III et al., 1987; Dunn et al., 1991; Kaina et al., 1991; Kaina et al., 1993), se sugirió que el aducto alq O⁶ G fue el responsable de la producción de tales eventos. La estrategia experimental para llegar a estos resultados, consistió en el empleo de líneas celulares con actividad AGT conocida ya sea espontánea o adquirida por transfección con el gen AGT humano, o de E.coli (Mitani et al., 1987; Schwartz et al., 1989; Kaina et al., 1991; Bean et al., 1993). Se encontró una fuerte correlación entre la actividad de reparación AGT del daño inducido por MNNG y muerte celular,

mutaciones e ICH; y débil correlación con aberraciones cromosómicas (Kaina et al., 1991; 1993); aunque con respecto a estas últimas otros autores demostraron lo contrario (Bean et al., 1993). En cambio, la reparación AGT del efecto provocado por ENU no se correlacionó con ningún evento de los mencionados, excepto con mutaciones (Kaina et al., 1991; 1993). Por lo que respecta a MMS y EMS, se detectó una correlación débil de la reparación de la alquilación con muerte celular, aberraciones cromosómicas e ICH y una buena correlación con mutaciones sólo en el caso del MMS (Dunn et al., 1991; Kaina et al., 1991; Kaina et al., 1993)

Por otra parte, los datos de los patrones de alquilación de AA monofuncionales (Beranek, 1990), muestran que el porcentaje del aducto alq O⁶ G varía entre ellos, siendo mayor para DMN (7.0 aprox.) y menor para MMS (0.3 aprox.) y EMS con un valor intermedio (2.0 aprox.), lo cual podría indicar que la lesión en el oxígeno 6 de la guanina está comprometida con la manifestación de los eventos genotóxicos mencionados y que en el caso de MMS y EMS deben intervenir otras lesiones como por ejemplo, las resultantes de la alquilación en el nitrógeno (Kaina et al., 1991; Kaina et al., 1993).

Con respecto a lo anterior, empleando células CHO con sobreexpresión de la enzima MPG por transfección del gene humano MPG-cDNA, la cual remueve aductos del nitrógeno 3 y 7 de alquilpurinas al catalizar la ruptura del enlace azúcar-base, no se observó la protección esperada contra aberraciones cromosómicas e ICH inducidos por MNNG ni por MMS, incluso, ambos eventos se incrementaron, sugiriendo que tal sobreexpresión promueve la formación de muchos sitiosapurínicos que

pueden desencadenar rompimientos y éstos a su vez dar lugar a aberraciones cromosómicas e ICH (Kaina et al., 1993), lo cual está de acuerdo con lo reportado acerca de la relación de los aductos en el nitrógeno de la guanina y la inducción de aberraciones cromosómicas (Vogel y Natarajan, 1979).

No existen trabajos respecto a las lesiones causadas por DMN en relación a las actividades enzimáticas antes mencionadas, lo cual podría deberse a las condiciones experimentales de la metodología y a que el carcinógeno requiere ser metabolizado. No obstante, se describió que las lesiones causadas por DMN y MMS que producen aberraciones cromosómicas persistieron hasta tres ciclos de división después del tratamiento en células CHO sin actividad AGT (Bean y Galloway, 1993; Bean et al., 1993).

6.4. Parámetros de daño al ADN causado por MMS, EMS y DMN

Los tres AA empleados en esta tesis han sido probados por su capacidad para inducir incrementos significativos de diferentes índices de daño al ADN, tales como mutaciones, aberraciones cromosómicas, micronúcleos e ICH (Ehling et al., 1968; Natarajan et al., 1976; Morris et al., 1982; Parida, 1985; Parida et al., 1985; Vogel, 1991; Mirzayans et al., 1992; Bean et al., 1993).

Uno de los parámetros de actividad genotóxica del MMS y del EMS es por ejemplo, la inducción de mutaciones letales dominantes en ratones machos, en que el MMS probó ser mucho más eficiente que el EMS,

explicando que esta mayor eficiencia pudiera relacionarse al hecho de que las metilaciones tienen mayor probabilidad de dar lugar a "gaps" o huecos que las etilaciones, los cuales desencadenan las mutaciones mencionadas (Ehling, et al, 1968). Esto posiblemente se relaciona con el hecho de que el daño por el MMS es reparado más eficientemente que el provocado por el EMS en células germinales (Sega et al., 1976), dando lugar a muchos sitios apurínicos (Kaina et al., 1993). Por otro lado, mediante el ensayo de mutaciones del locus específico en ratones, tanto el MMS como el EMS mostraron respuesta positiva solamente en etapas posteriores a la de espermatogonias, y en este caso, se sugiere que la causa radicó en un eficiente sistema de reparación en estados tempranos de la espermatogénesis (Vogel, 1991)

En cuanto a la DMN, se ha determinado que es capaz de inducir una frecuencia significativa de aberraciones cromosómicas y de ICH (Natarajan et al., 1976; Parida, 1985; Bean y Galloway, 1993) en periodos más largos después de la exposición, en comparación con otros agentes, e incluso dicha frecuencia de aberraciones se mantuvo por tres ciclos de división (Bean y Galloway, 1993).

Un aspecto interesante en el estudio de los efectos genotóxicos causados por los AA, es el de la correlación de estos con la interacción inicial con el ADN, como por ejemplo la preferencia para alquilar el nitrógeno 7 de la guanina y la formación de translocaciones así como la hipermutabilidad en líneas de *Drosophila* tratadas con MMS y EMS y la correlación entre la alquilación en sitios ricos en oxígenos y la mutagénesis relativa o la carcinogénesis generada por los AA (Singer, 1979).

En cuanto a la potencia carcinogénica, algunos datos sugieren la existencia de una correlación inversa entre el valor s (selectividad nucleofílica) de los AA y su potencia carcinogénica. (Vogel, 1991); por ejemplo, el MMS con alto valor s , tiene una baja potencia para producir tumores (Maitra y Frei, 1975). Sin embargo, los resultados con otros agentes indican que la alquilación en el oxígeno 6 de la guanina y sobre todo los enlaces cruzados en el ADN y no la selectividad nucleofílica son la causa predominante de una potencia carcinogénica alta (Vogel, 1991) (Tabla II). Por ejemplo, la DMN, considerada un agente carcinogénico alquilador del oxígeno 6 de la guanina (Magge y Barnes, 1967; Pegg, 1978; D'Ambrosio et al., 1990) tiene una potencia carcinogénica 160 veces mayor que la del MMS (Vogel, 1991).

Los agentes etilantes generalmente son mejores mutágenos y carcinógenos que los correspondientes agentes metilantes, ya que, no obstante que estos últimos son de 10-20 veces más reactivos que los etilantes, inducen aductos que son más eficientemente reparados (Vogel, 1991).

7. Lesiones involucradas en la producción de ICH

Se han realizado varios trabajos con el fin de establecer el daño responsable en la formación de ICH, en ellos se han empleado diversos agentes, los cuales interactúan de manera diferente con el ADN y por lo tanto causan más de un tipo de lesión como el cis-platino; a la fecha, los datos parecen indicar que podrían estar involucradas varias clases de

lesiones o que los agentes producen un daño común que de lugar a los ICH (Morales-Ramírez et al., 1990).

Existe cierta contradicción en cuanto a que si los monoadductos o los enlaces cruzados son las lesiones responsables de la producción de ICH. Unos datos evidenciaron que los monoadductos causados por descarbamoil mitomicina C (DCMC) y los provocados por metoxipsoralén (8-MeOP) más pulsos sencillos y breves de luz laser UV cercana son más eficientes que los enlaces cruzados de ADN causados por MMC y porfiromicina (POR) para la producción de ICH (Carrano et al., 1979; Sahar et al., 1981). Por otro lado, el hecho de que niveles similares de ICH fueron inducidos por MMC tanto en células deficientes para reparar enlaces cruzados o monoadductos como en células normales, permitió concluir que ninguno de estos dos tipos de daño son importantes para la producción de ICH, proponiendo que los enlaces ADN-Proteína son los involucrados (Ishii, 1981). Sin embargo, los datos de frecuencias de ICH y de su cinética de reducción en los tipos celulares antes mencionados, sugirieron que los enlaces cruzados causados por MMC son los que efectivamente inducen ICH, ya que la frecuencia fue mayor en células deficientes en la reparación de dicha lesión (Kano y Fujiwara, 1981).

Varios trabajos con agentes alquilantes monofuncionales sugirieron que el aducto alq O⁶ G es una lesión importante para la producción de ICH (White et al., 1986; Bignami et al., 1987; Kaina et al., 1991), o el enlace cruzado de ADN formado en la posición O de la guanina causado por el agente bifuncional 1,3-bis (2-cloroetil)- 1-nitrosourea (BCNU) (Schwartz et al., 1989).

Por otro lado, no ha sido posible establecer una correlación entre el número de lesiones y la cantidad de ICH; por ejemplo, no hay correspondencia entre el número de ICH y la producción de aductos por laser y 8-MeOP (Sahar et al., 1981), o de dímeros inducidos por luz UV cercano y lejano (Reynolds et al., 1979).

Se estimó que se produjeron 200 lesiones por cada ICH inducido por 8-MeOP más luz UV cercano (Sahar et al., 1981) y hasta 20,000 lesiones/ICH para luz UV lejano (Reynolds et al., 1979).

Los esfuerzos por tratar de encontrar una correlación entre lesiones específicas causadas por AA monofuncionales y la producción de ICH, indican que no es fácil llegar a conclusiones al respecto (Schuartz et al., 1989), no obstante, se ha logrado establecer una especie de caracterización de tales lesiones. Los resultados con MMS, empleando inhibidores de la reparación en G_1 , sugieren que estas se encuentran entre la fracción de lenta reparación (Kishi, 1987). De la comparación indirecta de la frecuencia de ICH respecto a la de aductos en el ADN producidos por EMS, se encontró una correlación más cercana con 3-etiladenina y fosfodiésteres etilados que con otros aductos (Heflich et al., 1982). Para otros AA como MNNG y metil-nitrosourea (MNU), los resultados de trabajos in vitro, en los que se emplean líneas celulares con capacidad diferencial para la reparación del aducto alq O^6 G son muy claros en cuanto a que la producción de ICH se correlaciona de manera casi directa con ese aducto (Kaina et al., 1991; 1993). En cambio, empleando MMS y EMS en el mismo tipo de experimentos se determinó sólo una respuesta escasa indicando que otro(s) aducto(s) diferentes del O^6 G, deben ser responsables de los ICH causados por estos agentes

(Kaina et al., 1991), además, la fracción de dicho aducto en el perfil de alquilación del MMS y del EMS es muy pequeña (Beranek, 1990). Sin embargo, ningún otro aducto guarda una correspondencia directa entre aductos e ICH ocasionados por estos AA, aunque, los niveles de fosfodiésteres alquilados son los que más se aproximan a dicha relación (Heflich et al., 1982; Morris et al., 1983).

Por otro lado, no se descarta la posibilidad de que exista una conexión entre los aductos en el nitrógeno de las purinas (alq N7 G y alq N3 G) y la producción de ICH (Kaina et al., 1993), en particular que su reparación pudiera dar lugar al incremento de la genotoxicidad de MMS y EMS, sobre todo a dosis altas, como fue demostrado en líneas con sobreexpresión de la enzima MPG (Kaina et al., 1993).

Algunos datos con el MMS y el EMS indicaron que los ICH causados por ellos son el resultado de lesiones primarias y secundarias en el ADN; las primarias, son las originadas por la metilación o etilación que le causan a dicha molécula y generan los ICH en el primer ciclo celular después de la exposición, a una frecuencia significativamente menor que las secundarias, las cuales se denominan así, porque se producen durante o después de la duplicación del ADN metilado o etilado; estas se expresan hasta el segundo y tercer ciclos posteriores al tratamiento dando lugar a la mayor proporción de ICH (Kaina y Aurich, 1985; Kaina et al., 1993). Es decir, los ICHs inducidos por AA monofuncionales se producen en su mayoría después de la duplicación del ADN alquilado. Lo cual significa que las lesiones involucradas son persistentes y requieren de la duplicación para manifestarse como ICH.

8. Persistencia de las lesiones que dan lugar a ICH

Existen evidencias de que en algunos casos, las lesiones que dan lugar a la formación de ICH persisten a lo largo de varias generaciones celulares, de tal manera que los ICH son compatibles con la supervivencia celular; tal es el caso de las lesiones causadas por 8-MeOP más luz UV cercana (Latt y Loveday, 1978), EMS y MMS (Tice y Schwartzman, 1982) y MMC. (Ishii y Bender, 1978); sugiriendo que las lesiones que dan lugar a ICH en divisiones celulares sucesivas no son fácilmente reparadas por la célula.

Se ha demostrado que las lesiones inductoras de ICH pueden ser reparadas antes de la división celular, empleando protocolos distintos: i) en experimentos en los que se bloquea la división celular mediante diferentes tratamientos (MacRae et al., 1979; Nagasawa y Little., 1981; Nagasawa et al., 1982), ii) en linfocitos humanos, donde se observó reparación de las lesiones causadas por mostaza nitrogenada, acetato de vinilo y acetaldehído, al comparar las frecuencias de ICH producidas en G₁ temprana y en G₁ tardía (Lambert et al., 1984; He y Lambert, 1985) y iii) en el sistema *in vivo* de células de glándula salival de ratón, en el que se detectó que aproximadamente un 50% de las lesiones inducidas por rayos gamma y generadoras de ICH fueron removidas durante G₁ y el 40% de lo correspondiente a MMC (Morales-Ramírez et al., 1995).

Se ha determinado que la frecuencia de ICH se mantiene alta mucho tiempo después del tratamiento con mutágenos *in vivo* tanto en células no proliferantes (Stetka et al., 1978; Raposa, 1978; Huff et al., 1982) como en células en proliferación (Latt y Loveday, 1978; He y

Lambert, 1985) así, la radiación gamma indujo incrementos de ICH hasta ocho ciclos de división después del tratamiento de células de la médula ósea de ratón *in vivo* (Morales-Ramírez et al., 1984). En cultivo de linfocitos humanos de pacientes tratados con ciclofosfamida (CP) y con MMC se detectaron frecuencias altas de ICH después de varios días del tratamiento (Raposa, 1978; Littlefield et al., 1980) y en linfocitos de conejo, se observaron incrementos sobre la frecuencia basal de ICH inducidos por MMC, por semanas y meses después del tratamiento (Stetka et al., 1978). Por otro lado, se ha observado que las lesiones generadoras de ICH, causadas por mutágenos que interactúan con el ADN de diferentes maneras fueron capaces de persistir por un tiempo equivalente a cuatro ciclos de duplicación, y otros como el benzo[a]pireno, N-acetoxi 2-fluorenil-acetamida y MMC, provocaron una elevación de la frecuencia de ICH por dos ciclos más (Popescu et al., 1985).

Todos los estudios antes mencionados indican que una proporción de las lesiones que causan los agentes mutagénicos al ADN y que están involucradas en la producción de ICH, pueden persistir por períodos muy largos y son capaces de trascender la división celular y por lo tanto, compatibles con la supervivencia de las células.

La relevancia de la persistencia de lesiones generadoras de ICH en relación con otros fenómenos biológicos no se ha esclarecido, sin embargo, es posible que tal persistencia de lugar a alteraciones en el ADN que sean importantes para la transformación celular neoplásica (Raposa, 1978; Popescu et al., 1985) y resulta interesante que la tasa de reparación de lesiones inductoras de ICH es inversamente proporcional a la actividad tumorigena de algunos mutágenos (Takeshita y Conner, 1985).

En otra línea de investigación, se ha tratado de cuantificar la persistencia y reparabilidad de lesiones causadas por diferentes mutágenos, empleando protocolos que permiten comparar las frecuencias de ICH obtenidas cuando por los mutágenos cuando se aplican uno o más ciclos de división antes del suministro de BrdU, contra la ocurrida un ciclo después de la BrdU, en células que se han dividido hasta tres veces en presencia del análogo. Se observó que las lesiones inducidas por diepoxibutano, son rápidamente reparadas sin evidencia de que persistan más allá de un ciclo (Conner et al., 1983), en cambio, las producidas por el etil carbamato así como una fracción de las lesiones inducidas por CP son completamente persistentes (Conner y Cheng, 1983; Takeshita y Conner, 1985).

El empleo de otros protocolos tales como el del análisis de ICH gemelos y sencillos en células tetraploides y el de ICH simétricos y asimétricos en células en tercera división, permiten que la detección de la persistencia y reparabilidad de lesiones se pueda realizar en las mismas células, así, mediante el análisis de ICH simétricos-asimétricos, se determinó que las lesiones inducidas por MMC (Ishii y Bender, 1978) y por 8-MeOP más luz UV cercana (Latt y Loveday, 1978) no son reparadas, sin embargo, analizando la frecuencia de ICHs sencillos y gemelos, se observó lo contrario (Linnainma y Wolff, 1982). Se sugirió que la inconsistencia de los datos con 8-MeOP más UV cercana podría deberse a las diferentes dosis que se emplearon en los trabajos (Linnainma y Wolff, 1982).

El Protocolo del destino de las lesiones inductoras de ICH (DLI-ICH) usando la tinción diferencial de las cromátidas hermanas en tres tonos

(TDTT) permite evaluar la frecuencia de ICH por ciclo celular (Escalza et al., 1989 a,b) y representa una mayor aproximación en el estudio de la persistencia y reparabilidad de las lesiones causadas al ADN que producen ICH (Schvartzman et al., 1985; Morales-Ramírez et al., 1988 a) al resolver el problema de la cancelación (no considerado en los protocolos anteriores), que impide analizar los ICHs que ocurren en el mismo locus en dos divisiones celulares sucesivas debido a lesiones persistentes que no fueron reparadas antes de la siguiente fase S (Stetka, 1979). Este protocolo permite además, determinar la persistencia y reparabilidad de las lesiones causadas por los mutágenos en las poblaciones celulares; así, cada célula se constituye en el registro de los eventos de ICH que ocurrieron en las divisiones celulares que comprende el experimento (Morales-Ramírez et al., 1987, 1988 a, b).

Mediante el empleo *in vitro* del protocolo DLI-ICH, se demostró que ni las lesiones causadas por luz UV, ni por MMC, ni las que causa la radiación ionizante, dan lugar a un número significativo de ICH en el mismo locus en dos generaciones celulares sucesivas de linfocitos humanos (Schvartzman et al., 1985). No obstante, los resultados de un estudio *in vivo* en ratón, usando el mismo protocolo con dosis bajas de radiación gamma demostraron lo contrario y además, que las lesiones inducidas por este agente generadoras de ICH mostraron el compromiso máximo para dar lugar a tal evento, es decir, tuvieron una expresividad del 100% (Morales-Ramírez et al., 1988a). En el mismo sistema *in vivo*, observaron que las lesiones causadas por CP y MMC fueron persistentes pero con un compromiso menor para producir ICH que las ocasionadas por radiación gamma. Por otra parte, sus datos sugieren que una porción

de tales lesiones son propensas a ser reparadas durante la formación del ICH, o como consecuencia del mismo (Morales-Ramírez et al., 1990).

Empleando el protocolo DLI-ICH en células de ovario de criceto chino, expuestas 4-NQO, MMC y EMS durante tres ciclos de división celular, los autores concluyeron que sólo las lesiones inducidas por EMS persistieron hasta el tercer ciclo, que las causadas por MMC son parcialmente reparadas después de un ciclo, sobre todo a dosis bajas, y que las lesiones causadas por 4-NQO parecen ser eficientemente reparadas después del primer ciclo de duplicación (Escalza et al., 1992). Los mismos autores, empleando los mismos mutágenos, pero ahora en linfocitos humanos, determinaron que las lesiones causadas por todos ellos parecen ser capaces de persistir y dar lugar a ICH por al menos tres ciclos sucesivos de duplicación, en especial las que se produjeron por exposición a EMS, parecieron ser muy tenaces (Daza et al., 1992). En estos dos últimos trabajos no se analizó la posibilidad de la inducción de ICH en el mismo locus en generaciones celulares sucesivas y si son canceladas o no durante la formación del ICH.

Los resultados obtenidos mediante el protocolo DLI-ICH para radiación gamma y agentes químicos han permitido lograr una aproximación en el mecanismo de formación del ICH y de su significado biológico (Morales-Ramírez et al., 1990); así mismo, se ha logrado descartar el efecto sensibilizador o inhibidor de la incorporación previa de BrdU sobre la inducción de ICH por los mutágenos (Morales-Ramírez et al., 1990).

La persistencia de los ICHs causados por AA, a través de la división celular, ha sido determinada mediante diferentes protocolos. En cultivos

de linfocitos de sangre periférica de conejos se observaron incrementos significativos de ICH un día después del tratamiento con MMS y con EMS, que disminuyó a niveles basales hasta una a dos semanas después; el efecto del MMS fue más persistente (Stetka y Wolff, 1976). Si el EMS se pone en contacto con células durante una hora, se lavan dichas células y se dejan por dos ciclos celulares en presencia de BrdU, se obtiene una buena inducción de ICH (Mehnert et al., 1984). Mediante otro protocolo, en el que células no sustituidas o unifilarmente sustituidas con BrdU se expusieron a MMS se observó que las lesiones persisten después de un ciclo de división, dando lugar a ICHs en el segundo ciclo, implicando además que dichas lesiones no son letales para la proliferación celular (Natarajan et al., 1983). En linfocitos humanos, el efecto inductor de ICH por MMS permanece más tiempo que el inducido por otros AA, lo cual sugiere mayor persistencia de las lesiones inducidas por MMS (Lambert et al., 1984). Otros resultados indican que la mayor parte de las lesiones que dan lugar a los ICH por exposición a MMS son persistentes (denominadas secundarias) y trascienden la división celular (Kaina y Aurich, 1985).

9. Otras vías para la producción de ICH

Aparentemente, los ICH no son sólo la manifestación de daño al ADN, sino también pueden tener otros orígenes, por ejemplo el retraso en la progresión de la síntesis del ADN como fue demostrado por tratamiento con cafeína previo al de ciertos agentes químicos como MMC mono y bifuncional, 4NQO y EMS (Shiraishi y Sandberg, 1980), que provocó una elevación considerable en la frecuencia de ICH inducidos por dichos agentes. La frecuencia basal de ICH también se incrementó debido al

retraso en la síntesis del ADN causado por un aumento de la temperatura a partir de lo cual se sugirió una correlación entre la velocidad de síntesis y la inducción de ICH (Kato, 1980). El empleo de inhibidores de la síntesis de ADN, representa una forma más directa para correlacionar la inhibición de este proceso con la formación de los ICH, así, la hidroxiurea, 1- β -D arabinofuranosil-citocina y afidilcolín (AFC), incrementaron la frecuencia basal de ICH y tuvieron un efecto sinérgico sobre los ICH inducidos por luz UV (Ishii y Bender, 1980); el AFC también aumentó la frecuencia de ICH por EMS y dado que por si mismo, no tuvo efecto sobre los ICH, sugiere que el AFC, más que afectar directamente a la molécula eleva la probabilidad de que las lesiones causadas por EMS en el ADN den lugar a la formación de ICH (Nishi et al., 1982).

Por otro lado, la distribución de frecuencias de ICH/célula inducidas por el AFC y por la BrdU, muestra que una porción de células presenta una distribución de frecuencias tipo Poisson, lo cual denota daño al ADN, mientras que otra porción presenta valores de ICH muy altos debido probablemente a un efecto inhibitor de la síntesis del ADN; a diferencia de esto, las células expuestas a EMS sólo tuvieron una distribución de Poisson. Esta forma de análisis puede permitir distinguir dos causas para la producción de ICH (Rainaldi y Mariani, 1982).

Los agentes que bloquean la síntesis de la poly-(adenosina difosfato ribosa), tales como benzamida y sus derivados, producen un incremento en la frecuencia basal de ICH (Oikawa et al., 1980; Natarajan et al., 1981), mostrando además, una buena correlación entre ambos eventos. La 3-aminobenzamida provocó un aumento sinérgico de los ICH inducidos por MMS, pero no de los originados por luz U.V. (Morgan y Cleaver, 1982).

Aparentemente, la falta de reparación causa los ICH sobre todo después de la exposición a un agente alquilante. Por otra parte, con agentes que inhiben la síntesis de proteínas, como la cicloheximida, disminuye la frecuencia de ICH inducida por MMS y EMS, sugiriendo que se requiere de la síntesis de proteínas para la formación de ICH (Sono y Sakaguchi, 1981).

La información expuesta indica, que los ICHs son el resultado de lesiones al ADN, de alteraciones en la síntesis del ADN, o de una combinación de ambas situaciones.

OBJETIVOS.

Tomando en cuenta el potencial analítico que tiene el protocolo DLI-ICH y que hay bastante información acerca de la interacción de los agentes alquilantes con el ADN, especialmente de MMS y EMS, el presente trabajo, llevado a cabo en células de la médula ósea de ratón plantea los siguientes objetivos:

- 1.- Determinar el destino *in vivo* de las lesiones al ADN causadas por MMS, EMS y DMN involucradas en la producción de ICH.
- 2.- Correlacionar el tipo de lesiones causadas por MMS, EMS y DMN en el ADN y su destino.
- 3.- Establecer el efecto de la BrdU incorporada al ADN sobre la inducción de ICH por MMS, EMS y DMN.

MATERIALES Y METODOS

1. Animales

Para la realización de los experimentos de la presente tesis se utilizaron ratones machos de la cepa Balb/C de 45 a 70 días de edad y de 30 g de peso, los cuales fueron criados en el bioterio del laboratorio de Radiobiología Celular del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, alimentados con agua y comprimidos Purina Chow ad libitum y mantenidos en cajas de plástico bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y ciclos de luz-obscuridad.

2. Protocolo

El destino de las lesiones causadas al ADN que dan lugar a ICH (DLI-ICH) durante dos ciclos de división celular sucesivos, se determinó mediante un protocolo in vivo que emplea la tinción diferencial de las cromátidas hermanas en tres tonos (TDTT) (Schvartzman y Goyanes, 1980; Morales-Ramírez et al., 1988a). La TDTT requiere que las células pasen por tres ciclos de división celular y que la incorporación de la BrdU al ADN durante el primer ciclo sea baja y alta en el segundo y tercer ciclos (Figura 5).

Para ello, se aplicaron dos inyecciones de BrdU en la cavidad peritoneal de ratones (3 testigos y 3 tratados): la primera con una dosis baja (BrdU↓) de 0.2 mg/g de peso al inicio de los experimentos (tiempo

correspondiente a la fase de G₁ del primer ciclo de división celular) y la segunda, con una dosis de 2.0 mg/g de peso (BrdU ↑) doce horas después (tiempo correspondiente a la fase de G₁ del segundo ciclo de división). La BrdU fue previamente adsorbida a carbón activado de acuerdo con lo descrito por Morales-Ramírez (1980).

Para establecer los tiempos a los que se llevaron a cabo los diferentes tratamientos, se hizo una correlación de estos con el ciclo celular de las células de la médula ósea, tomando en cuenta lo siguiente: i) que la duración del ciclo de división celular en médula ósea es de 12 h; lo cual fue determinado en base a los datos del tiempo de generación promedio (TGP) obtenidos en células que han incorporado BrdU por 2 o 3 ciclos de división celular (Morales-Ramírez et al., 1984), expresados de acuerdo con la fórmula de Ivett y Tice (1982) y que la moda del total de células empleadas en tal determinación es de 12 h, ii). que las células seleccionadas para el análisis en el protocolo DLI-ICH presentan una tinción bien definida de las cromátidas hermanas en tres tonos que no da lugar a dudas, es garantía de que han incorporado BrdU por tres ciclos de división celular, y iii) como el experimento dura 36h, las células seleccionadas son arrestadas en mitosis; y esta etapa junto con G₂ duran 2h, síntesis 6h y G₁ 4h aproximadamente; la BrdU ↑ se suministra a las 12h y los AA 30 min, antes de esta última, es muy probable que la exposición a tales agentes ocurra en la etapa G₁ del segundo ciclo de división (Figura 6)

Para determinar los ICH que ocurrieron durante cada uno de dos ciclos sucesivos de división, así como los que se produjeron en el mismo locus en ambas divisiones, a los animales se les administró

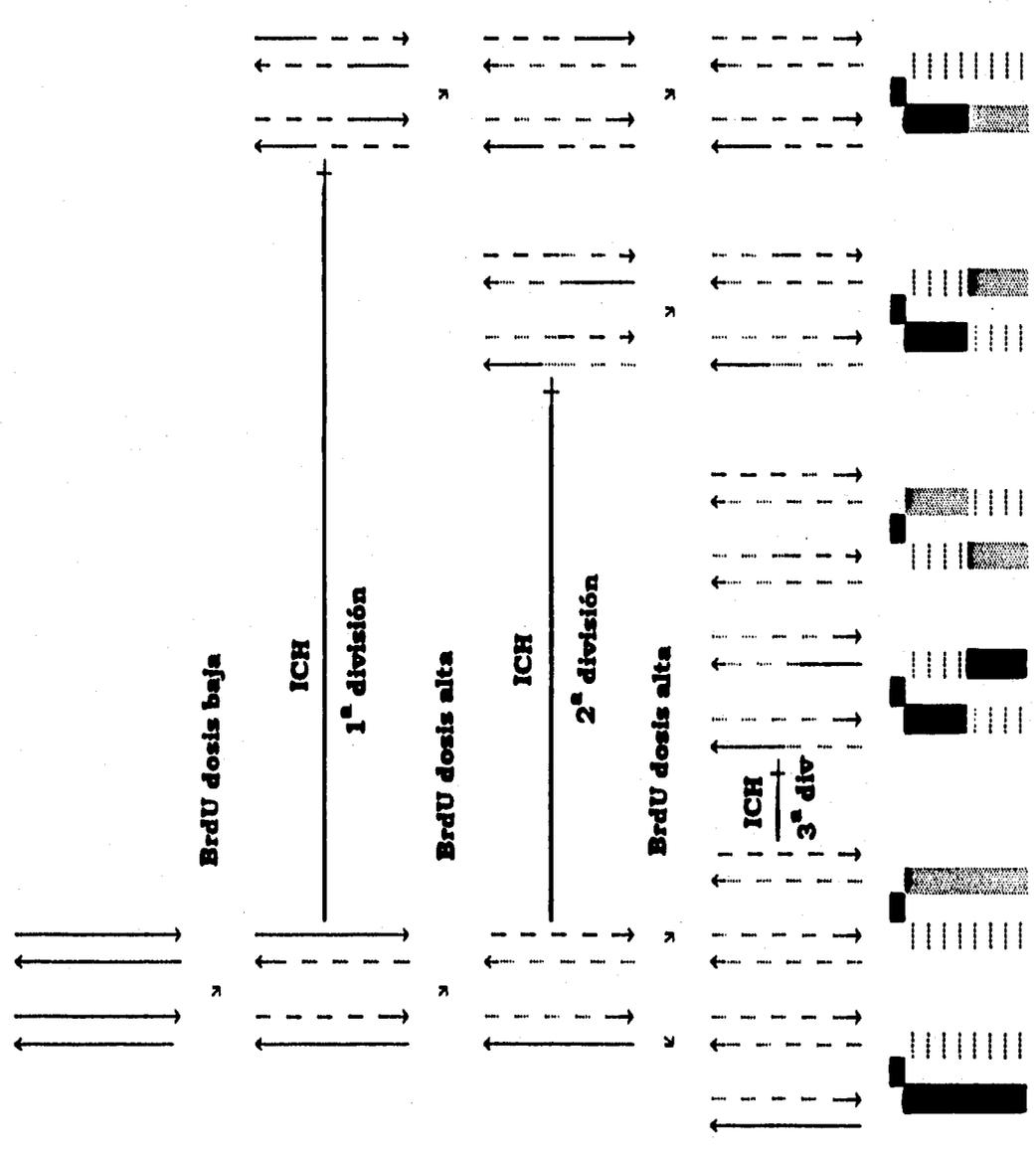
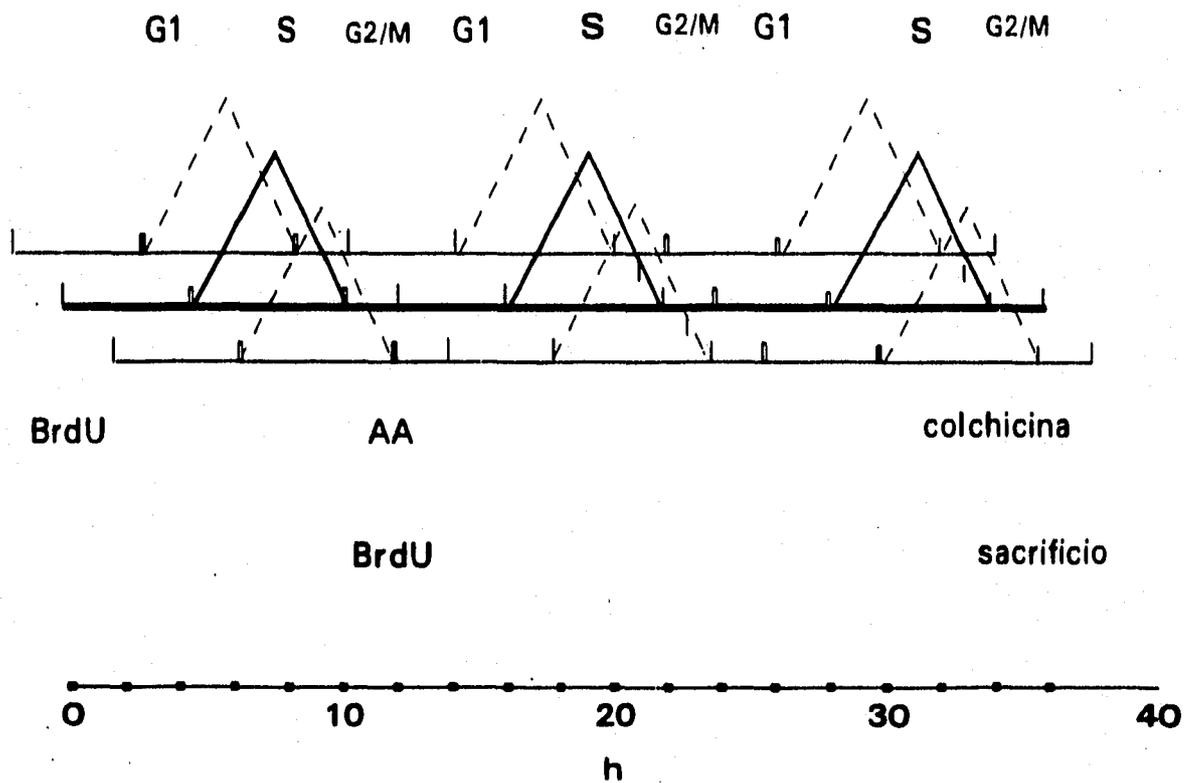


Figura 5. Protocolo para la tinción diferencial de las cromátidas hermanas en tres tonos (TDTT) propuesta por Schwartzman y Goyanes (1980). De acuerdo a la incorporación de BrdU. Las bandas de ADN se representan de la siguiente manera: alta incorporación líneas punteadas, baja incorporación líneas discontinuas y no incorporación líneas sólidas. En la parte inferior del diagrama se representa el aspecto de las cromátidas que han sido teñidas según este protocolo, así como los intercambios que ocurren.

Figura 6. Correlación teórica entre los tratamientos y la duración del ciclo celular (se seleccionaron las poblaciones con ciclo celular de aproximadamente 12h.)



intraperitonealmente MMS, EMS y DMN (Sigma) en solución acuosa, 30 minutos antes de la segunda dosis de BrdU..

Las dosis de cada mutágeno administradas a los animales se establecieron a partir de un experimento previo de dosis-respuesta, en el cual se empleó el protocolo de tinción diferencial de las cromátidas hermanas en dos tonos (TDDT). Dichas dosis fueron de 30 mg/g de peso, de 300mg/g y de 50mg/g de peso respectivamente para MMS, EMS y DMN, las cuales se seleccionaron considerando que produjeran una cantidad de ICH suficiente para medir el efecto de los mutágenos, pero no tan alta como para dificultar el análisis.

Una vez que transcurrieron dos ciclos de división después de la administración de los mutágenos, la división celular fue bloqueada en metafase, por medio de una inyección intraperitoneal de 3.75µg/g de peso de colchicina (Sigma) y dos horas después los animales fueron sacrificados.

3. Colección y procesamiento de las células de la médula ósea

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se les disectaron los fémures, los cuales se seccionaron por ambos extremos. La médula ósea se obtuvo por arrastre mediante la inyección de una solución salina amortiguada con fosfatos pH 7, por uno de los extremos empleando una aguja de calibre 26. Las células así obtenidas fueron centrifugadas a 250 X g, resuspendidas en una solución hipotónica de KCl 0.075 M., incubadas a 37 C por 15 min, y fijadas en tres cambios de metanol-ácido acético (3:1) durante 15 min cada uno. Las células fueron centrifugadas y

resuspendidas en 0.5 ml de fijador y finalmente la suspensión celular fue goteada sobre laminillas frías y h&medas como fue previamente reportado (Morales-Ramírez et al., 1988a).

4. Tinción diferencial de las cromátidas hermanas

Las laminillas con las células se dejaron secar por lo menos durante 24 h a temperatura ambiente. La tinción diferencial de las cromátidas hermanas se llevó a cabo con el método de fluorescencia más Giemsa (Perry y Wolff, 1974) modificado de la siguiente manera: las laminillas se trataron con una solución de Hoechst 33258 10 mM en amortiguador fosfato-citrato (Goto et al., 1975) y se colocaron a un centímetro de distancia de una lámpara de luz ultravioleta-cercana de 25 W durante 60 ó 90 min. Después, fueron sumergidas en una solución de citrato salino (2X SSC) a 60 C de 7 a 15 min, y una vez lavadas con agua destilada se tiñeron con Giemsa al 10% por 30 min.

En la figura 7 se mencionan los tiempos a los que se llevaron cabo los diferentes pasos antes descritos.

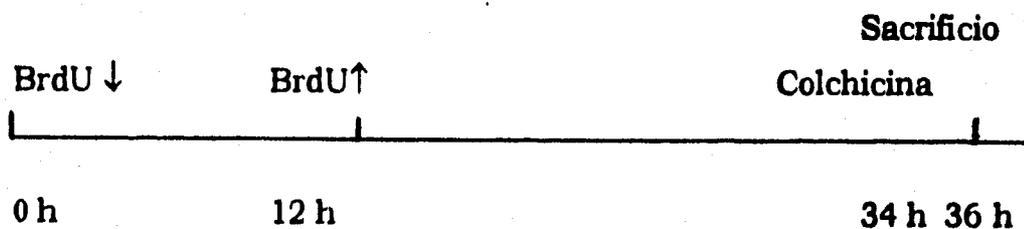
5. Análisis e interpretación de los ICH

Una vez que se tuvieron las laminillas de cromosomas metafásicos teñidas, se procedió a llevar a cabo el análisis de los ICH en un Fotomicroscopio Zeizz modelo Axiomat a 1000 aumentos. En la parte inferior de la figura 5 se reperesentan los diferentes tipos de cromosomas

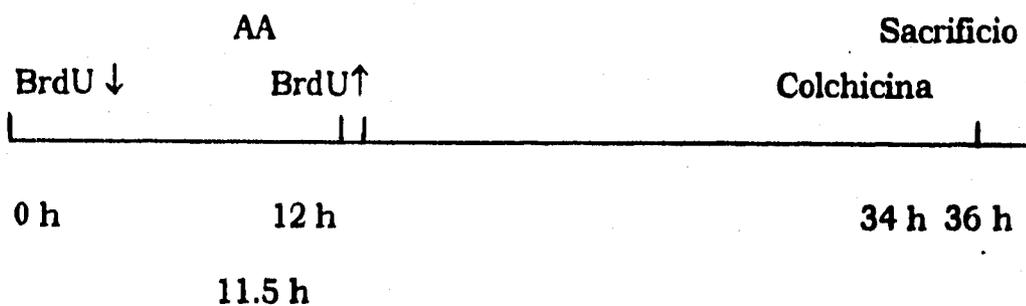
que se observan después de que incorporaron dosis baja de BrdU en el primer ciclo y alta en el segundo y tercer ciclos de

FIGURA 7. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

TESTIGOS



TRATADOS



división y que presentan la TDTT. En este esquema se parte de la base que la duplicación del ADN es semiconservativa y que los ICH son intercambios de banda doble. En la parte de la izquierda se muestran las dos posibilidades de cromosomas sin ICH y tienen una cromátida blanca y

la otra gris o negra. En la parte de la derecha, se observan cromosomas con las diferentes alternativas de ICH. Como la TDTD requiere que las células pasen por tres ciclos de división en presencia de BrdU, los ICH que se están produciendo desde el primero de ellos quedan registrados en las células de tercera división. Los cromosomas que tienen una cromátida blanca y en la otra tinción oscura junto con tinción gris, son la evidencia de ICH producidos en la 1^a división. Los que tienen tinción oscura y blanca en una cromátida contra tinción blanca y gris en la otra, representan ICH de 2^a división y finalmente, aquéllos que presentan tinción gris blanca o negra blanca en una cromátida contra blanco gris o blanco negro, en la otra, corresponden a ICH de 3^a división, con la diferencia que los gris blanco incorporaron más BrdU que los negro blanco a lo largo de los tres ciclos de división. Tanto cromosomas sin ICH como con ICH, se distinguen claramente en las fotomicrografías de la figura 8.

Para el análisis del destino de las lesiones causadas por el MMS, el EMS y la DMN, involucradas en la formación de ICH, se manejó otra nomenclatura, la cual se basa en que los mutágenos son suministrados en el segundo ciclo de división después de la BrdU ↓, mismo que es el primer ciclo de división postratamiento Morales-Ramírez et al., (1995). Por lo tanto, los ICH son denominados de la siguiente manera: ICH-1 son los que ocurren en el primer ciclo de división postratamiento (equivalen a los ICH de 2^a), ICH-2 son los que se produjeron en el segundo ciclo de división postratamiento (corresponden a los ICH de 3^a) e ICH-1,2 sucedieron en el mismo locus en ambos ciclos de división (se ven igual a



Figura 8. Fotomicrografías de metafases que presentan la tinción diferencial de sus cromátidas hermanas en tres tonos. (A) corresponde a una metafase de un ratón testigo y (B) es una metafase de un ratón tratado con agentes alquilantes; en ambas se señalan los diferentes tipos de intercambios. En A se usa la nomenclatura respecto a la incorporación de BrdU y en B respecto a la administración de los agentes alquilantes (ver texto).

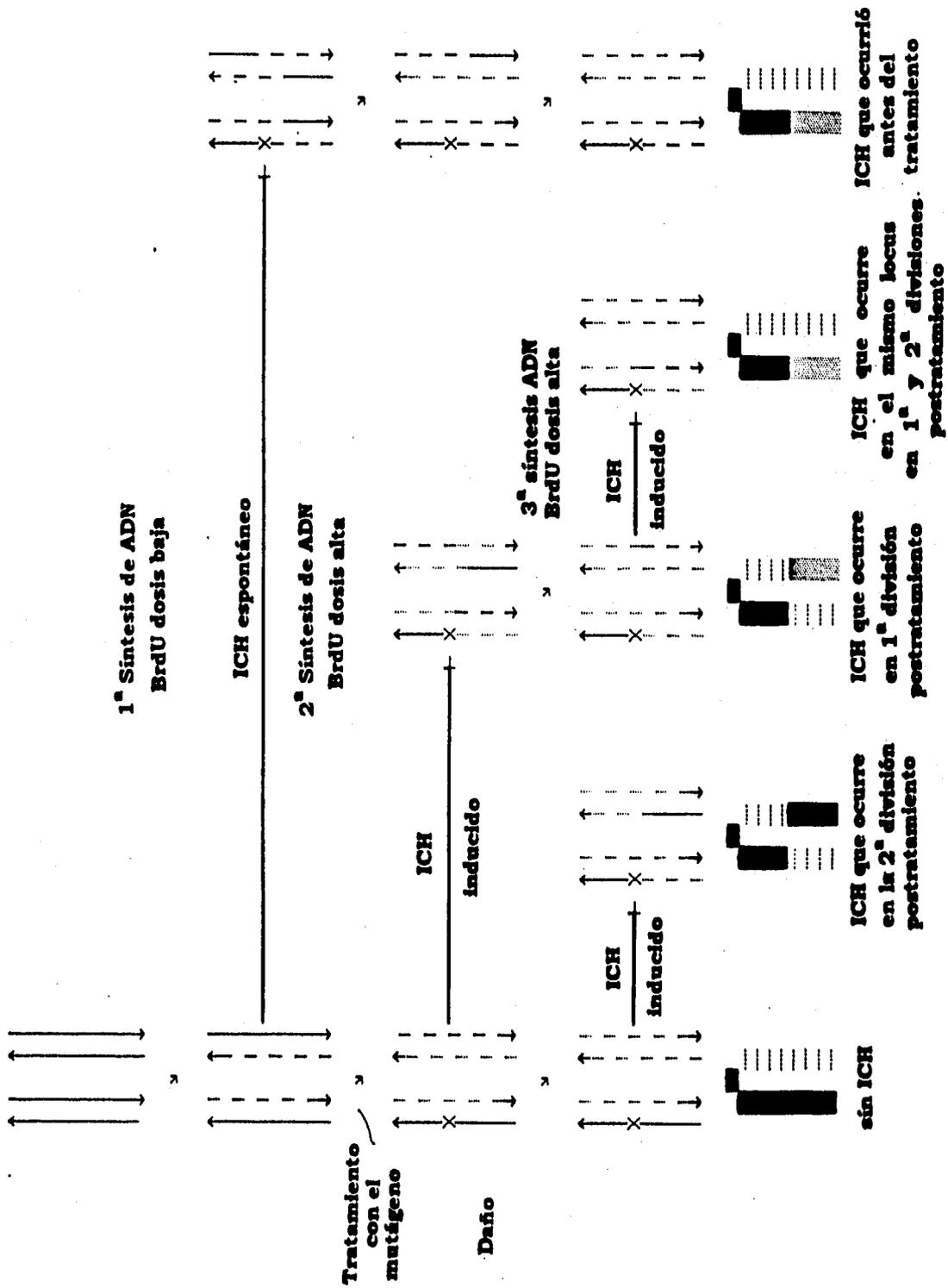


Figura 9. Protocolo *in vivo* del destino de las lesiones al ADN inductoras de ICH (DLI-ICH). En la figura se muestran los ICH ocurridos durante la primera, la segunda o en el mismo locus en ambas divisiones celulares después de la exposición a los agentes alquilantes. (tomado de Morales-Ramírez et al, 1990)

los ICH de 1^a). En la parte inferior de la figura 9 se muestran los cromosomas con los diferentes tipos de ICH inducidos por lesiones causadas en el primer ciclo denominados con la nomenclatura propuesta.

La frecuencia de los tres tipos de ICH, así como también la de los que ocurrieron en los cromosomas gris-blanco (G-B) y negro-blanco (N-B), se determinaron en 30 células en cada uno de los animales descritos en las tablas de resultados, siguiendo la clasificación publicada por Morales-Ramírez et al., (1988, 1990) (Figura 9).

Considerando que los animales fueron expuestos a los mutágenos después del primer ciclo de división en presencia de la BrdU ↓ y antes de que se les suministrara la dosis alta, el incremento en la frecuencia de ICH analizado en cada uno de los tres ciclos de división en las células de la tercera , se interpretó de acuerdo con un reporte previo (Morales-Ramírez et al., 1990), de la siguiente manera:

Un aumento en los ICH de la segunda división a partir del inicio del experimento sería la consecuencia de lesiones que sólo indujeron ICH en la primera división después del tratamiento con el mutágeno (ICH-1). Un incremento en los ICH de la tercera división, implicaría que las lesiones no produjeron ICH en la primera división posterior al tratamiento con el mutágeno sino hasta el segundo (ICH-2). Finalmente, la elevación en los ICH de la primera división, que tendrían la apariencia de haber ocurrido en la división previa al tratamiento con el mutágeno, sería debido a lesiones capaces de producir ICH en el mismo locus en las dos divisiones sucesivas al tratamiento con el mutágeno (ICH-1,2) (Figura 9).

6. Marco Teórico

A partir de los incrementos de los los distintos tipos de ICH obtenidos por el tratamiento con los tres AA, se hizo el análisis del destino de las lesiones causadas por ellos, tomando como base el esquema de probabilidades de la Figura 10 (Morales-Ramírez et al., 1990), en el cual se muestran los diferentes tipos de cromosomas metafásicos que se observan después de tres ciclos de división en el protocolo TDTT y dos ciclos después del tratamiento con los AA. La segregación se ilustra a partir de un cromosoma en el que la lesión ocurrió en la banda sustituida con BrdU y que se obtendría de manera similar cuando esta hubiera sido en la banda no sustituida. En ambos casos, los cromosomas resultantes, serían iguales y los gris-blanco con y sin intercambio en la figura mencionada, tendrían hermanos negro-blanco con y sin intercambio en la segunda posibilidad. Las probabilidades de ocurrencia de los ICH fueron estimadas asumiendo que cada lesión involucrada en este evento tiene un 50% de probabilidades de expresarse o no como tal en cada ciclo postratamiento, en ausencia de reparación, de transformación de lesiones y considerando que dichas lesiones no sean heterogéneas (Morales-Ramírez et al., 1990). De tal modo que las frecuencias relativas para los ICH que ocurrieron en la primera división postratamiento (ICH-1) equivalen a tres veces las frecuencias de los producidos en la segunda división (ICH-2) y lo mismo con respecto a la de los que fueron causados en el mismo locus en ambas divisiones (ICH-1,2) (ver Figura 10). Por lo tanto, las frecuencias relativas que se esperan para los tres tipos de ICH son respectivamente: 3:1:1. Así que los resultados obtenidos con cada agente, en caso de no ajustarse a dichas frecuencias se considerarán

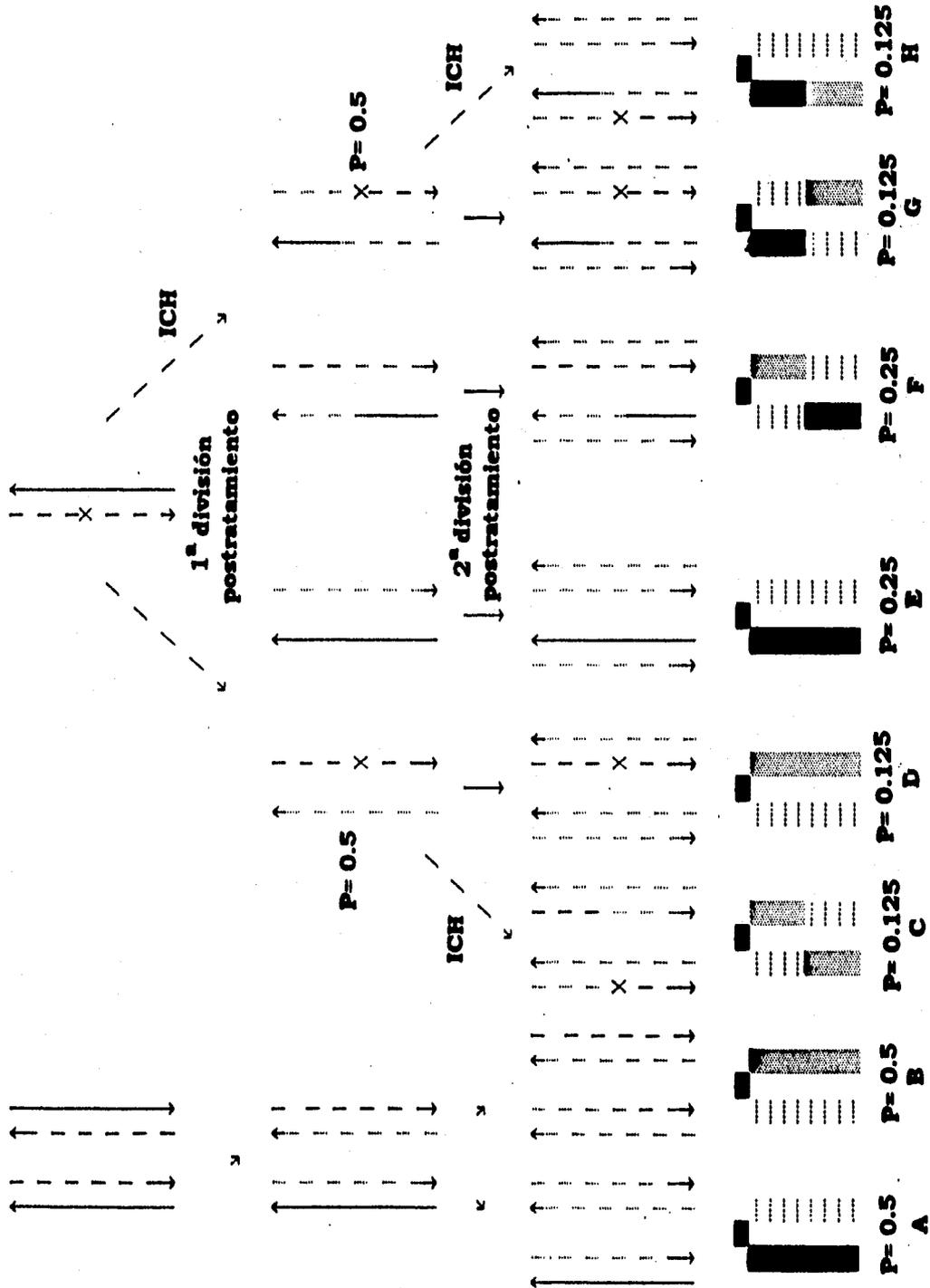


Figura 10. Probabilidades de ocurrencia de ICH en la primera división (ICH-1), en la segunda (ICH-2) o en el mismo locus en ambas divisiones (ICH-1,2) después del tratamiento con los agentes alquilantes. Se asume que cada lesión tiene un 50% de probabilidades de producir o no ICH (tomado de Morales-Ramirez et al., 1990).

como evidencia de lesiones persistentes, reparadas, transformadas o heterogéneas.

7. Métodos estadísticos.

La significatividad de las diferencias de las frecuencias de los diversos tipos de ICH observadas en los animales tratados con los mutágenos respecto a las de los testigo, se determinaron mediante la prueba "t" de student y la prueba de "t" pareada, usando para esto un programa de estadística para computadora preparado en el ININ (Camps et al., 1993). La prueba de "t" pareada se empleó para comparar la frecuencia de los ICH-2 G-B contra la de los ICH-2 N-B y cabe hacer la aclaración de que esta última comparación se lleva a cabo en las mismas células y con respecto a las frecuencias de los grupos testigo.

RESULTADOS

Se obtuvieron las curvas dosis-respuesta para ICH de cada uno de los AA empleados en el presente trabajo de tesis mediante el protocolo de tinción diferencial de las cromátidas hermanas en dos tonos (TDDT) y se seleccionó la dosis adecuada para llevar a cabo el estudio del comportamiento de las lesiones causadas por ellos, mediante el protocolo DLI-ICH, considerando que no causara decremento en el índice mitótico ni retraso en la velocidad de proliferación de las células, pero si un incremento significativo en la frecuencia de ICH, que permitiera distinguir perfectamente a los animales tratados con respecto a los testigos y además, no excediera la frecuencia de ICH analizables. En material y métodos se mencionan las dosis del MMS, del EMS y de la DMN.

El empleo del protocolo de tinción diferencial en tres tonos (TDTT) permitió obtener metafases de buena calidad (Figura 8), en las que se pudo hacer el análisis adecuado de los ICH producidos por lesiones al ADN causadas por los AA monofuncionales: MMS, EMS y DMN, a través de cada uno de dos ciclos subsecuentes de división celular posteriores al tratamiento (ICH-1, ICH-2), así como los que ocurrieron en el mismo locus durante esas divisiones.

1. Inducción de ICH por MMS, EMS y DMN

En la Tabla III se muestran las frecuencias de ICH-1, ICH-2 y de ICH-1,2 después del tratamiento con MMS, EMS y DMN, así como las de sus respectivos testigos. En dicha tabla se presentan también los

incrementos netos (elevaciones por encima de los valores basales o testigo) para los tres tipos de ICH.

TABLA III.- FRECUENCIAS DE ICH PRODUCIDAS EN LA PRIMERA, EN LA SEGUNDA Y EN EL MISMO LOCUS EN AMBAS DIVISIONES DESPUES DEL TRATAMIENTO CON AGENTES ALQUILANTES.

	ICH/ CELULA						n
	ICH-1		ICH-2		ICH-1,2		
	$\bar{x} \pm D.E$	DIF.	$\bar{x} \pm D.E$	DIF.	$\bar{x} \pm D.E.$	DIF.	
TESTIGO	2.3 ± 0.3		3.1 ± 0.5		0.49 ± 0.2		7
MMS	5.2 ± 1.1	2.9	5.5 ± 0.9	2.4	1.73 ± 0.5	1.2	7
TESTIGO	2.7 ± 0.2		3.6 ± 0.4		0.66 ± 0.2		7
EMS	9.8 ± 0.8	7.1	9.5 ± 0.7	5.9	1.90 ± 0.3	1.2	8
TESTIGO	2.2 ± 0.4		3.0 ± 0.4		0.55 ± 0.1		7
DMN	4.8 ± 1.0	2.6	9.5 ± 1.5	6.5	$0.68 \pm 0.1^*0.1$		6

*En todos los casos excepto en * hubo diferencia significativa testigo, con una $P < 0.0001$ prueba de t de Student.*

MMS

Por lo que respecta al efecto del MMS, los datos indican que los ICH aumentaron significativamente en las dos divisiones posteriores a la exposición, así como los que ocurrieron en el mismo locus ambas

divisiones. EL mayor aumento se observó en los ICH-1. En los ICH-2 y en los ICH-1,2 se detectó una disminución de aproximadamente una sexta y una tercera partes respectivamente en relación a los ICH-1.

EMS

Los resultados obtenidos después de la exposición a EMS (Tabla III), muestran que hubieron incrementos estadísticamente significativos en la frecuencia de los tres tipos de ICH. El más alto se dió en la de los ICH-1, disminuyendo ligeramente en la de los ICH-2 y el más bajo correspondió a la frecuencia de los ICH-1,2 (aproximadamente una sexta parte del incremento de ICH-1).

DMN

La DMN provocó una elevación estadísticamente significativa en las frecuencias de ICH-1 y de ICH-2, con respecto a los datos de animales testigo y que se muestra en la Tabla III. La inducción de los ICH-2 fue notablemente mayor que la de los ICH-1 que la de los ICH-1 (más del doble). En la misma tabla se observa que el incremento en la frecuencia de los ICH que ocurrieron en el mismo locus en las dos divisiones subsecuentes al tratamiento con este mutágeno (ICH-1,2) no fue estadísticamente significativo.

2. Frecuencias relativas de ICH inducidas por MMS, EMS y DMN

En la Tabla IV se observan las frecuencias relativas de ICH-1, de ICH-2 y de ICH-1,2 que se obtuvieron a partir de los incrementos

TABLA IV. FRECUENCIAS RELATIVAS DE ICH PRODUCIDOS EN DOS DIVISIONES SUBSECUENTES AL TRATAMIENTO CON AGENTES ALQUILANTES.

	ICH-1	ICH-2	ICH-1,2
ESPERADA	3	1.0	1.0
MMS	3	2.4	1.2
EMS	3	2.5	0.5
DMN	3	7.0	0.14

inducidos por cada uno de los AA (Tabla III) y de acuerdo con el esquema de probabilidades de la figura 9 de la siguiente manera: el incremento neto en los ICH-1 que causaron cada uno de los AA, se igualó al valor relativo de 3 y en base a este se calcularon los valores relativos de los incrementos de ICH-2 e ICH-1,2 mediante una sencilla ecuación matemática de proporciones. Es importante establecer que dadas las características del protocolo, a pesar de que las lesiones se diluyen por la división celular, las frecuencias de ICH no; es decir que los ICH quedan registrados en cada célula descendiente por cuando menos las tres divisiones que abarca el experimento.

MMS

La comparación de las frecuencias relativas de ICH-1 vs ICH-2, obtenidas por la exposición a MMS (3:2.4), muestra una frecuencia de ICH-2 más del doble del valor esperado, lo cual indica que el MMS

produjo lesiones que generaron una porción importante de ICH 12 h después de la administración del mutágeno. En cuanto a la relación entre las frecuencias relativas de ICH-1 vs ICH-1,2 obtenidas (3: 1.2), esta se aproximó a la esperada, indicando que las lesiones causadas por MMS productoras de ICH durante el ciclo inmediato a la exposición, tienen el 50% de probabilidades de manifestarse o no como tal, es decir, tuvieron una expresividad del 50%.

EMS

Los valores relativos de las frecuencias de ICH-1 vs ICH-2 obtenidos por el tratamiento con EMS fueron diferentes de los esperados (3:2.5 vs 3:1) e indicaron que las lesiones causadas por EMS produjeron una porción importante de ICH durante la segunda división, cuantitativamente similar a la de la primera división postratamiento. Este comportamiento fue similar al del MMS. Tampoco los valores relativos de ICH-1 vs ICH-1,2 se ajustaron a los esperados (3:0.5 vs 3:1), lo cual implica que aproximadamente la mitad de las lesiones causadas por el EMS durante la primera división posterior a la exposición fueron reparadas durante la formación de los ICHs, o como consecuencia de los mismos durante la segunda división.

DMN

Las frecuencias relativas de ICH obtenidas por el efecto de la DMN, muestran diferencias notables con respecto a las esperadas. El hecho de que la comparación de la frecuencia de ICH-1 vs ICH-2 fue de 3:7, podría sugerir que la DMN causó lesiones frescas durante la segunda división postratamiento o lesiones transformables a productoras de ICH durante el

mismo ciclo. Por otra parte, la comparación de las frecuencias relativas de ICH-1 vs ICH-1,2 (3: 0.14) sería una evidencia probable de que un porcentaje considerable de las lesiones provocadas durante la primera división fueron removidas en la segunda postratamiento.

3. Análisis de la inducción de ICH a nivel de poblaciones celulares

La inesperada inducción de ICH originada por los tres AA durante el segundo ciclo de división postratamiento (ICH-2), motivó el interés por ver esta respuesta a nivel de poblaciones celulares. Para lo cual se agruparon las células de todos los ratones sometidos a los tratamientos con cada uno de los AA, así como las de los testigos respectivos y se determinaron las frecuencias de células con diversas combinaciones de número de ICH-1 vs ICH-1,2 y de ICH-1 vs ICH-2. Las distintas posibilidades se ordenaron en cuadrículados (Figuras 11-16) con el fin de establecer su distribución, así, cada cuadro representa un cierto número de células con una combinación de ICH igual al número que está en sentido horizontal (ICH-1) y al que se encuentra en sentido vertical (ICH-1,2 o ICH-2). El hecho de que la comparación se hiciera con respecto a los ICH-1, fue porque son los que se producen en la primera división subsecuente a la exposición de los AA y se asume que es el momento de mayor concentración del mutágeno.

Testigos

En los cuadrículados de las poblaciones celulares de los animales testigo de cada uno de los tres AA para la comparación entre ICH-1 e ICH-

1,2 (Figuras 11, 13 y 15) se observa que las frecuencias mayores de células se distribuyen preferentemente en la zona de los ICH de primera división (ICH-1), lo cual era de esperarse, ya que en esta división se administra la dosis alta de BrdU. La distribución de las poblaciones testigo para ICH-1 vs ICH-2 (Figuras 12, 14 y 16), presenta frecuencias altas de células tanto en la zona de ICH-1 como en la de ICH-2 con un desplazamiento hacia la línea de los ICH-2, que bien pudiera estar relacionado con el hecho de que en este ciclo el ADN tiene la mayor incorporación de BrdU, la cual puede aumentar el ICH.

MMS

La figura 11 (MMS ICH-1 vs ICH-1,2), muestra que en la distribución de frecuencias de células con diferentes combinaciones de número de ICH-1 y de ICH-1,2 expuestas a MMS, aunque hubo un leve desplazamiento de células hacia la región de ICH-1,2, hay más células en la región de ICH-1, indicando la dependencia de los ICH-1,2 respecto de los ICH-1. Además, en dicha región se nota el efecto del MMS por la presencia de frecuencias de células con valores de ICH más altos que las poblaciones testigo. Por otro lado, en la Figura 12 de la distribución de las frecuencias de células para ICH-1 vs ICH-2, se puede observar, pasando una línea diagonal por el centro del cuadrulado y desde el origen que, a diferencia de su testigo respectivo, un porcentaje de células que pudiera ser del 50% está desplazado hacia la línea de los ICH-2, lo cual indica que existen lesiones que originan ICH hasta la segunda división.

FIGURA 14. DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE CELULAS CON DIFERENTES COMBINACIONES DE NUMERO DE ICH QUE OCURRIERON EN LA PRIMERA Y SEGUNDA DIVISIONES DE RATONES TRATADOS CON 300 µg/g DE PESO DE EMS.

ICH-2
 →
 ICH-1 ↓

TESTIGO

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	<
0	2	2	7	5	1		1														
1	2	4	8	6	9	5	3	3		1											
2	1	5	10	8	11	2	4	1	2	1											
3	5	5	10	7	9	4	4	3	1	1	1										
4	1	5	7	6	2	4	2	1	1	1											
5			1	2	2	4		1		1											
6				1	1	1	2	1													
7		1			1				1	1											
<		1			1	2		1													

EMS

0																					
1																					
2																					
3					2					1											
4							1	3		1											
5		1	1	3		2		1	3	1	1				1	2		1			
6			1	1	3	1	1	1	3	1	1		3				1				
7				1	1		1	2	1	3	3	1	2	1		1					
8					1	2	1	3	3	5	3	2	2	1		2	1				2
9				1	2	2	3	3	4	4	1	5	1	1	1		1				
10						2	1	2	3	2	4	5	1	1	1	1					
11		1	1	1	1	2	1	4	2	2	3	2	2	4	3				1		
12					1	3	1	1	3	1	2	1	1	3	1		2				
13						1	3		1	2	2	1		2	1		1			1	1
14						1		2		2				1	1	2					
15						1	1	1	2		2	1				1					
16															2						
17								1	1	1	1	2					2	1			
<						1								1		1		1			

EMS

En la distribución de las frecuencias de células expuestas a EMS con diferentes combinaciones de ICH-1 vs ICH 1,2 (Figura 13), se puede evidenciar el efecto del mutágeno por la presencia de células con valores altos de ICH-1 y de ICH-1,2 en comparación con su testigo; y además, es notorio que prácticamente toda la población se desplaza preferentemente hacia el lado izquierdo de una diagonal central (hacia el eje de los ICH-1), lo cual pudiera indicar que los ICH-1,2 dependen de los ICH-1, pero que en este caso, una gran proporción de estos se repararon durante la formación del ICH o como consecuencia del mismo durante la segunda división. Un comportamiento distinto de la población celular de los ratones expuestos a EMS respecto a la de sus testigos se observa en la distribución de las frecuencias de células con diferentes combinaciones de ICH-1 vs ICH-2, (Figura 14), ya que aproximadamente un 50% de las células localizadas en la parte derecha de una línea media se desplazan hacia valores altos de ICH-2, lo que sugiere que el EMS causa ICH un ciclo después de la exposición.

DMN

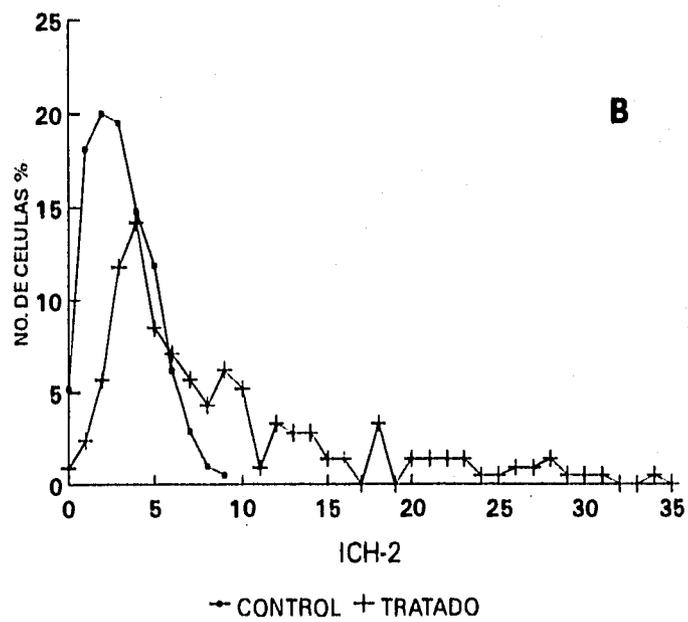
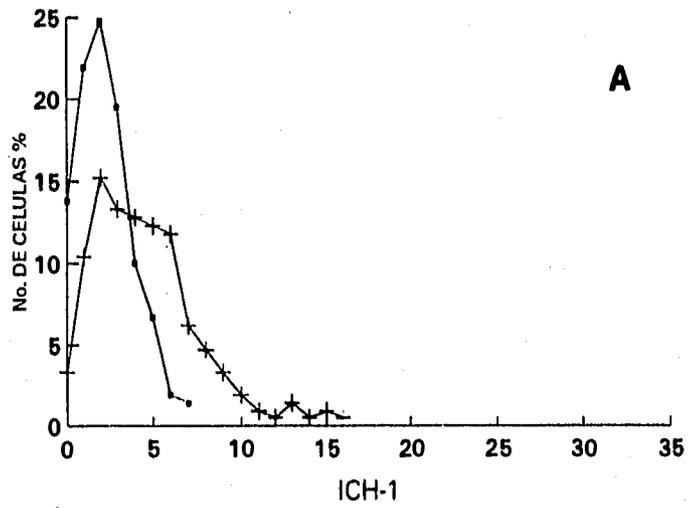
Por lo que se refiere a la respuesta de la población de células expuestas a DMN, la distribución de frecuencias respecto al número de ICH-1 vs ICH-1,2 en comparación con su testigo (Figura 15), muestra como con los dos AA anteriores, la dependencia de los ICH-1,2 respecto de los ICH-1, pero sobre todo, se puede observar al lado derecho de la línea media, que prácticamente no hay ICH en el mismo locus (ICH-1,2), lo cual indica que las lesiones que indujeron ICH en la primera división fueron reparadas en la segunda división, ya sea durante la formación de los

mismos o como consecuencia de ellos. Por otra parte, la distribución de frecuencias de células con diferentes combinaciones de número de ICH-1 vs ICH-2 (Figura 16), muestra que en la población expuesta en comparación con la testigo, el porcentaje mayor de células se distribuye con notable preferencia hacia el lado derecho de una línea media, lo cual sugiere que la DMN produjo ICH preferentemente durante la segunda división subsecuente al tratamiento.

Un hecho que llamó la atención, fue que entre las células analizadas expuestas a DMN, hubo una fracción de la población que muestra frecuencias de ICH notablemente elevadas, por lo cual se hizo el análisis de la distribución de frecuencias de células respecto al número de ICH que ocurrieron en la primera y en la segunda divisiones en la población celular total (Figura 17; A y B) y se compararon con las poblaciones testigo correspondientes.

En ambas curvas se observa que la distribución de la población testigo es bastante homogénea, con porcentajes máximos de células entre 1-2 y de 2-3 ICH para primera y segunda divisiones respectivamente. En cambio, la distribución de la población tratada, tuvo un comportamiento diferente a la de Poisson, que es la esperada; ya que mostró la existencia de dos componentes o subpoblaciones, una con picos máximos de células entre 2-3 y 3-4 ICH en primera y segunda divisiones respectivamente, que indicarían un leve efecto inductor de ICH de la DMN; y otra subpoblación, representada por células con valores de ICH muy altos y dispersos, cuyo porcentaje fue notablemente más alto durante la segunda división. El hecho de que las lesiones causadas por DMN provocaron esta respuesta peculiar de las células de la médula ósea, sobretudo durante el segundo

FIGURA 17. FRECUENCIA DE ICH EN 1ª Y 2ª DIVISIONES POSTTRATAMIENTO CON DMN EN CELULAS DE LA MEDULA OSEA.



ciclo de división postratamiento de las células, permitió determinar que la población celular respondió de manera distinta y que en realidad está formada por dos subpoblaciones y una interfase, las cuales se distinguen por la respuesta particular que cada una de ellas tuvo a la exposición de la DMN y se pueden caracterizar así: subpoblación A, formada por células con 0 a 8 ICH; interfase compuesta por células con 9 a 11 ICH y subpoblación B, integrada por células con 12 a 34 ICH. La respuesta al mutágeno fue particular en cada caso y se puede resumir de la siguiente manera: La respuesta de la subpoblación A, la cual incluyó el 60% del total, se ajustó más o menos a una población homogénea, con un pico máximo en 4 ICH. En la interfase, el grupo más pequeño (12%), se observó un pequeño pico en 9 ICH, que cae ligeramente y a partir de 11 ICH comienza la dispersión de las células. La población B, con 27 % del total se caracterizó por ser una población muy dispersa hacia valores de ICH muy altos con picos pequeños en valores de ICH bajos (12 y 18).

En estas subpoblaciones e interfase se determinaron las frecuencias de ICH-1, ICH-2 y de ICH-1,2 (Tabla V) así como las proporciones relativas de cada una (Tabla VI), con el fin de entender el destino de las lesiones causadas por DMN involucradas en la producción de ICH y el o los mecanismos de su formación.

Los datos de la Tabla V indican que las frecuencias de ICH-1 y de ICH-2 aumentaron significativamente en las dos subpoblaciones y en la interfase con respecto a las frecuencias testigo, en el siguiente orden B > interfase > A; la frecuencia de ICH-1,2 subió significativamente sólo en la subpoblación A. Se observó que la frecuencia de ICH-2 fue la más alta con respecto a las de ICH-1 y de ICH-1,2 en los tres grupos.

En cuanto a las proporciones relativas de las frecuencias de ICH (Tabla VI) llama la atención, el que la de ICH-2 en la subpoblación A fue de un valor ligeramente mayor que la de ICH-1, de casi 3 veces mayor que la de ICH-1 en la interfase y de más de tres veces en B. Todo lo cual, está indicando que las lesiones causadas por DMN al ADN producen ICH preferentemente 12 h después de su administración y el que la relación entre las proporciones de ICH-1 e ICH-1,2 haya sido de 3:0.3. en A y de 3:0 en la interfase y en B, podría significar que las lesiones inducidas por DMN tienen una expresividad muy baja en la población A y cero en la interfase y en B.

TABLA V. FRECUENCIAS DE ICH-1, ICH-2 E ICH-1,2 EN DOS SUBPOBLACIONES Y SU INTERFASE EN CELULAS DE RATONES EXPUESTAS A 50 $\mu\text{g/g}$ DE PESO DE DMN

	ICH-1		ICH-2		ICH-1,2		n
	$\bar{x} \pm S$	DIF	$\bar{x} \pm S$	DIF	$\bar{x} \pm S$	DIF	
TESTIGO	2.2 \pm 0.4		3.0 \pm 0.4		0.55 \pm 0.1		7
SUBP.-A	3.4 \pm 0.7	1.2	4.4 \pm 0.7	1.4	0.74 \pm 0.2*	0.2	7
INTERF.	4.5 \pm 1.1	2.3	9.6 \pm 3.1	6.6	0.45 \pm 0.3*	-0.1	7
SUBP. -B	6.8 \pm 1.8	4.6	18.7 \pm 2.2	15.7	0.58 \pm 0.3*	0.03	7

*En todos los casos excepto en * hubo diferencias significativas respecto al testigo con una P < de 0.01 cuando menos.*

4. Efecto de la BrdU sobre la inducción de ICH causada por MMS, EMS y DMN

El protocolo DLI-ICH, permitió la detección de la posible interacción entre la BrdU incorporada y los tres AA sobre la inducción de ICH, comparando las frecuencias de ICH que ocurrieron en la segunda división postratamiento entre los cromosomas Negro-Blanco (N-B) y los Gris-Blanco (G-B), descendientes respectivos de las bandas de ADN sustituida y no sustituida por BrdU al momento de la administración de los mutágenos.

TABLA VI.-FRECUENCIAS RELATIVAS DE ICH-1, ICH-2 Y DE ICH-1.2 EN DOS SUBPOBLACIONES Y SU INTERFASE EN CELULAS DE RATON EXPUESTAS A 50 μ g/ g DE PESO DE DMN.

	ICH-1	ICH-2	ICH-1,2
ESPERADA	3	1	1
SUBP.-A	3	3.5	0.3
INTERF :	3	8.6	0.0
SUBP.-B	3	10.2	0.02

Como se puede observar en la Tabla VII, las frecuencias de ICH en ambos tipos de cromosomas después del tratamiento con MMS mostraron

una ligera diferencia entre si, ya que hubo un mayor incremento en los cromosomas N-B, lo que indicó que la incorporación de BrdU en el ADN tuvo un efecto inhibitor sobre la inducción de ICH por MMS.

Las frecuencias de ICH en los cromosomas N-B y G-B ocasionadas por EMS no mostraron diferencias significativas mediante la prueba de t pareada lo cual fue la evidencia de que la BrdU incorporada al ADN no afectó la inducción de ICH por EMS.

TABLA VII.-FRECUENCIAS DE ICH EN CROMOSOMAS GRIS-BLANCO (G-B) Y NEGRO-BLANCO (N-B) EN LA SEGUNDA DIVISION POSTRATAMIENTO CON MMS, EMS Y DMN.

	ICH / CELULA ($\bar{x} \pm S$)				n
	G-B	DIF.	N-B	DIF.	
TESTIGO	1.3 ± 0.24		1.8 ± 0.39		7
MMS	2.1 ± 0.41	0.8	3.4 ± 0.71	1.6	7
TESTIGO	1.3 ± 0.20		2.2 ± 0.32		7
EMS	3.8 ± 0.65	2.5	5.7 ± 0.93	3.5	8
TESTIGO	1.0 ± 0.20		2.0 ± 0.22		7
DMN	3.9 ± 0.60	2.9	5.7 ± 0.88	3.7	7

Los datos de MMS y DMN mostraron diferencias significativas entre G-B y N-B con $P < 0.05$ y $P < 0.02$ respectivamente prueba de t pareada. En los datos de EMS no hubo diferencia significativa.

Por lo que respecta a los valores de ICH observados en los dos tipos de cromosomas después de la exposición a DMN (Tabla VII), estos evidenciaron diferencias significativas tanto con respecto a las frecuencias testigo como entre ellos, con un incremento mayor en los cromosomas N-B, lo cual sugirió un efecto inhibitor de la BrdU sobre la inducción de ICH por la DMN.

TABLA VIII.-FRECUENCIAS DE ICH EN CROMOSOMAS GRIS-BLANCO (G-B) Y NEGRO-BLANCO (N-B) EN LA SEGUNDA DIVISION POSTRATAMIENTO DE DOS SUBPOBLACIONES CELULARES Y SU INTERFASE DE RATONES EXPUESTOS A 50 μ g/ GRAMO DE PESO DE DMN.

	ICH / CELULA ($\bar{x} \pm S$)				
	G-B	DIF.	N-B	DIF.	n
TESTIGO	1.0 \pm 0.20		2.0 \pm 0.22		7
SUBP.-A	1.6 \pm 0.44*	0.6	2.7 \pm 0.50*	0.7	7
INTERF.	4.2 \pm 0.66*	3.2	5.0 \pm 1.00*	3.0	7
SUBP.-B	7.6 \pm 1.5**	6.6	11.0 \pm 1.30**	9.0	7

* Diferencia no significativa, ** diferencia significativa $P < 0.02$ prueba de t pareada. Se compararon los datos G-B y N-B, restándoles previamente las frecuencias del testigo.

En cuanto a la detección del efecto de la BrdU incorporada al ADN, sobre la formación de ICH en los tres grupos de células observadas

después del tratamiento con DMN, los datos de las frecuencias de ICH en cromosomas G-B y en N-B de la Tabla VIII correspondientes a la subpoblación A y a la interfase, no mostraron diferencias significativas, aunque en la subpoblación B si se encontró diferencia significativa a favor de cromosomas N-B, la cual implica que la BrdU tuvo un efecto inhibitor sobre la inducción de ICH por DMN en dicha subpoblación.

DISCUSION

1. Protocolo DLI-ICH

El Protocolo para establecer el destino de las lesiones inductoras de ICH (DLI-ICH) usando la tinción diferencial de las cromátidas hermanas en tres tonos (TDTT) representa una mayor aproximación en el estudio de la persistencia y reparabilidad de las lesiones causadas al ADN que producen ICH (Schvartzman et al., 1985; Morales-Ramírez et al., 1990) y además resuelve el problema de la cancelación, no considerado en los protocolos normales de dos tonos (Linnaima y Wolff, 1982; Ishii y Bender, 1978). La cancelación consiste en la imposibilidad de ver los ICH que ocurren en el mismo locus en dos divisiones celulares sucesivas (Stetka, 1979). La posibilidad de detectar la ocurrencia de ICH en el mismo locus mediante el protocolo de DLI-ICH, incorpora un nuevo concepto al comportamiento de las lesiones, el de la tenacidad, el cual es un índice de que tan comprometida está una lesión con la producción de ICH. El protocolo DLI-ICH permite además, analizar la persistencia y reparabilidad, en la población celular en el momento de aplicar el tratamiento con los mutágenos, así, cada célula se constituye en el registro de los eventos de ICH que ocurrieron en las divisiones celulares que comprende el experimento (Morales-Ramírez et al., 1987, 1988 a)

Por otro lado, mediante el protocolo DLI-ICH in vivo es posible determinar la inducción de ICH a partir de frecuencias basales muy bajas, sin el riesgo del efecto de las condiciones de cultivo (Kato y Sandberg, 1977). Este protocolo permite además, establecer el efecto de la BrdU

incorporada al ADN sobre la inducción de ICH por los mutágenos (Morales-Ramírez et al., 1990, 1992). Todas estas características representan situaciones ventajosas con respecto a otros protocolos empleados para el mismo fin (Stetka et al., 1978; Conner y Cheng, 1983; Conner et al., 1983).

Además, este protocolo por ser *in vivo*, tiene la importancia de que en la respuesta está implícita la participación de factores como la absorción, distribución y metabolismo y por otra parte que el fenómeno se estudia en condiciones más naturales para la célula.

Es pertinente comentar que el sistema de células de la médula ósea ha sido ampliamente usado en estudios de genotoxicidad, por presentar algunas ventajas como: a) se encuentra en proliferación continua y es posible obtener una cantidad suficiente de células en metafase para analizar diferentes eventos citogenéticos e incluso los ICH en las células con TDDT, el que requiere de una selección de células más rigurosa que para TDDT, b) que la duración de su ciclo celular es de alrededor de 12 h por lo que se obtienen resultados en un tiempo razonablemente corto, c) que el aislamiento de las células es metodológicamente sencillo, es decir, no requiere de ningún tratamiento enzimático o químico y d) que la BrdU y los mutágenos tiene un acceso fácil a este tejido.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis confirman que mediante el empleo del protocolo DLI-ICH es posible determinar el comportamiento de las lesiones causadas al ADN por MMS, EMS y DMN, generadoras de ICH, en cada uno de los dos ciclos de división posteriores a la administración e incluso la frecuencia con que las lesiones producen ICH en el mismo locus en ambos ciclos de división.

2. Marco Teórico.

El destino de las lesiones causadas por cada uno de los tres AA, se interpretó a partir de las frecuencias relativas de los ICH que ellas produjeron y comparándolas con las frecuencias esperadas que propone el marco teórico de probabilidades de ocurrencia de ICH (Morales-Ramírez et al, 1990), las cuales son de 3:1:1 para las frecuencias de ICH-1, ICH-2 e ICH-1,2 respectivamente (ver pag.1 de resultados).

La persistencia de lesiones se infirió de la comparación entre la frecuencia relativa de ICH-1 en relación a la de ICH-2 y de ICH-1,2 que se obtuvieron; por lo tanto, la persistencia será mayor en cuanto que el valor de ICH-2 o el de ICH-1,2 sean mayores que 1, es decir, que su valor se aproxime al de ICH-1, el cual siempre se considera igual a 3 y es base para el cálculo de las frecuencias relativas de ICH-2 y de ICH-1,2.

La reparabilidad de lesiones se infiere de la comparación de las frecuencias relativas de ICH-1 y de ICH-1,2; debido a que esta última frecuencia depende de la de ICH-1, por lo tanto, la reparabilidad será mayor, en tanto que el valor de ICH sea menor que 1.

Finalmente, el índice de tenacidad, se obtiene comparando los valores relativos de ICH-1 y de ICH-1,2, y a diferencia de la reparabilidad, la tenacidad será mayor cuando el valor de ICH-1,2 se aproxime al de la frecuencia de ICH-1. Este índice expresa el compromiso que tienen las lesiones para dar lugar a ICH.

2. Marco Teórico.

El destino de las lesiones causadas por cada uno de los tres AA, se interpretó a partir de las frecuencias relativas de los ICH que ellas produjeron y comparándolas con las frecuencias esperadas que propone el marco teórico de probabilidades de ocurrencia de ICH (Morales-Ramírez et al, 1990), las cuales son de 3:1:1 para las frecuencias de ICH-1, ICH-2 e ICH-1,2 respectivamente (ver pag.1 de resultados).

La persistencia de lesiones se infirió de la comparación entre la frecuencia relativa de ICH-1 en relación a la de ICH-2 y de ICH-1,2 que se obtuvieron; por lo tanto, la persistencia será mayor en cuanto que el valor de ICH-2 o el de ICH-1,2 sean mayores que 1, es decir, que su valor se aproxime al de ICH-1, el cual siempre se considera igual a 3 y es base para el cálculo de las frecuencias relativas de ICH-2 y de ICH-1,2.

La reparabilidad de lesiones se infiere de la comparación de las frecuencias relativas de ICH-1 y de ICH-1,2; debido a que esta última frecuencia depende de la de ICH-1, por lo tanto, la reparabilidad será mayor, en tanto que el valor de ICH sea menor que 1.

Finalmente, el índice de tenacidad, se obtiene comparando los valores relativos de ICH-1 y de ICH-1,2, y a diferencia de la reparabilidad, la tenacidad será mayor cuando el valor de ICH-1,2 se aproxime al de la frecuencia de ICH-1. Este índice expresa el compromiso que tienen las lesiones para dar lugar a ICH.

3. Eficiencia para la inducción de ICH por MMS, EMS y DMN.

Los tres AA empleados en esta tesis resultaron ser eficientes inductores de ICH. No obstante, se observaron diferencias entre ellos, por lo que para comparar los valores obtenidos se obtuvo un valor de eficiencia relativa, el cual se tomó a partir de los incrementos de ICH inducidos durante el primer ciclo postratamiento (ICH-1 Tabla III) por cada uno de tales agentes. Dicho valor, se consideró, como el cociente de la inducción neta de ICH entre dosis administrada. Con base a lo anterior, el MMS resultó ser el AA más eficiente de los tres; ya que indujo una frecuencia de ICH de aproximadamente cuatro y tres veces mayor, que la que indujeron el EMS y la DMN respectivamente. Por lo tanto, el orden decreciente de eficiencia fue: $MMS > DMN > EMS$.

La comparación de nuestros datos de eficiencia relativa con los de otros trabajos, es válida, no obstante que en ellos se emplee el protocolo de dos tonos de diferenciación de las cromátidas hermanas, en el que la inducción representa la suma de los ICH ocurridos durante dos ciclos de división y no se considera que los incrementos en la frecuencia de ICH en cada ciclo puede ser diferente. Además, los ICH ocurridos en el mismo locus en divisiones celulares sucesivas no son detectados debido al fenómeno de cancelación (Stetka, 1979). Así, una mayor eficiencia del MMS con respecto al EMS ya había sido demostrada en células V79 de hamster Chino (Kaina y Aurich, 1985), en células CHO (Kaina et al., 1991; 1993) y en células de la médula osea de ratón in vivo (Morales-Ramírez et al., 1984). Con respecto a la DMN, datos en células de ratones in vivo, en los cuales resultó ser muy tóxica, indicaron una eficiencia

menor para la producción de ICH que la que se detectó por exposición al MMS (Neft y Conner, 1989).

4. Destino de las lesiones causadas por MMS, EMS y DMN.

Las lesiones causadas por los tres AA empleados en esta tesis tuvieron un comportamiento similar pero con algunas particularidades, sobre todo en el caso de la DMN.

MMS

Las lesiones causadas por MMS indujeron una proporción de ICH-1,2 ligeramente mayor al valor esperado (1.2 vs 1), lo que indica que las lesiones inductoras de ICH fueron completamente persistentes, esta persistencia fue evidente también a nivel poblacional (Figura 11), ya que a pesar de que hubo un aumento importante de las células con ICH.1,2 con respecto al control, las células se distribuyeron preferentemente en la zona de frecuencias altas de ICH-1.

El hecho de que el valor relativo de los ICH-2 fue de más del doble que el esperado (2.4 vs 1) es decir, muy aproximado al valor de ICH-1, (80% de ICH-1), nos está indicando una persistencia importante de lesiones, un 50% de las cuales no indujeron ICH en el primer ciclo, sino hasta el segundo. Esta persistencia se reflejó también en la población celular, (Figura 12), en la cual se observaron células con incrementos considerables tanto de ICH-1 como de ICH-2.

EMS

Por lo que respecta al comportamiento de las lesiones que indujo el EMS, observamos que estas provocaron un fuerte incremento de ICH-1 de más del doble de la frecuencia basal, y dado que indujeron una proporción de ICH-1,2 de aproximadamente un 50% menor al esperado (0.5 vs 1), esto manifiesta que hubo una remoción de dichas lesiones de aproximadamente el 50%. En la población celular, también se observa esta tendencia, en cuanto que son escasas las células con frecuencias altas de ICH-1,2 (Figura 13).

En relación a la proporción de ICH-2 con respecto a la de ICH-1, esta fue de 3:2.5 y se alejó mucho de la esperada (3:1), de igual manera que en el caso del MMS. Esto refleja una gran persistencia alta de las lesiones capaces de inducir ICH, pero que se expresan hasta el segundo ciclo postratamiento. En la gráfica de distribución de frecuencias de células con respecto al número de ICH (Figura 14) se observa claramente esta persistencia de manera semejante a como lo fueron las lesiones inducidas por el MMS.

4.3 DMN

El que las lesiones causadas por la DMN hayan inducido un incremento tan pequeño en la frecuencia de los ICH ocurridos en el mismo locus (ICH-1,2), el cual representa cerca del 10% del esperado con respecto a la frecuencia de los ICH-1, es evidencia de que dichas lesiones

fueron reparadas casi en su totalidad antes del segundo ciclo de división celular; lo cual es muy evidente en la gráfica de distribución de frecuencias (Figura 15). Así aparentemente las lesiones inducidas por la DMN tienen una persistencia de aproximadamente un 10%. Este efecto fue muy similar al que se observó con CP, empleando el mismo protocolo (Morales-Ramírez et al, 1990).

Lo realmente sorprendente fue el gran incremento que indujo la DMN en la frecuencia de ICH-2, el cual fue de más de 7 veces la esperada y representa la mayor diferencia en la proporción esperada de ICH-2 con respecto a la de ICH-1 hasta ahora detectada en las mismas condiciones con otros mutágenos (Morales-Ramírez et al, 1988; 1990; 1992). Este hecho se muestra de manera muy clara en la Figura 16, en la que se observó que el mayor porcentaje de células se distribuye preferentemente hacia la zona de las frecuencias altas de ICH-2. Dicha observación no podría ser explicada únicamente por una persistencia muy alta de las lesiones que indujeron ICH en la primera división y se comentará más adelante (pag. 10).

A partir de la comparación de las frecuencias relativas de ICH-1 e ICH-1,2 se puede considerar que las lesiones causadas por MMS son las más persistentes, las causadas por EMS aproximadamente un 50% menos persistentes que las de MMS y que las lesiones causadas por DMN son reparadas casi en su totalidad.

No es fácil encontrar una explicación para los grandes incrementos de ICH-2 que indujeron los tres AA; una posibilidad, podría ser que en ese tiempo todavía hubiera mutágenos (MMS, EMS o DMN) metabolitos secundarios activos (DMN) capaces de producir lesiones frescas

inmediatamente después de la horquilla de duplicación, es decir que se mantuvieran hasta 4 horas después del tratamiento y en cantidad suficiente para causar incrementos de ICH similares a los que ocurrieron en el primer ciclo (MMS y EMS) o incluso, mucho más altos (DMN). Dado que nuestro modelo experimental es in vivo, esto es poco probable para el MMS y el EMS y aún para la DMN que requiere activación metabólica.

Los estudios de farmacocinética nos pueden permitir tener una idea más completa acerca de lo que ocurre dentro del organismo in vivo con los AA aquí probados e inferir como variaría su actividad genotóxica en función del tiempo.

Un trabajo bastante completo acerca de la farmacocinética de MMS y EMS se realizó en ratones machos (Cumming y Walton, 1970) que fueron inyectados con ambos mutágenos marcados con carbono 14 en el grupo alquilo (metil- ^{14}C y Etil-I- ^{14}C respectivamente) y determinando actividad en varios tejidos por periodos de tiempo desde 15 min hasta 24h así como también en productos de excreción, como orina y CO_2 . Los resultados indicaron que tanto MMS como EMS se distribuyen rápidamente dentro del organismo, el EMS de manera más homogénea que el MMS (Cumming y Walton, 1970). El MMS alquila las moléculas biológicas 4 a 6 veces más eficientemente que EMS, el cual fue más rápidamente hidrolizado.

Los productos de alquilación de MMS se eliminan más pronto que los de EMS. A las 4h de haber administrado el MMS se obtuvo el marcaje máximo y en el caso del EMS al mismo período de tiempo se ha incorporado a los tejidos del 85 al 100% del marcaje máximo, con un promedio de 96.8%. Por lo que respecta a la farmacocinética de DMN los

datos que se reportan en una revisión (Magee y Barnes, 1967) indican que este mutágeno es metabolizado rápidamente en el cuerpo de ratones, ratas y conejos, ya que a las 6h. de haber inyectado 50mg/Kg de peso de DMN, se recuperó el 30% del mutágeno, y 24h más tarde, no se detectó nada del mismo, ni en diferentes órganos ni en productos de excreción. La distribución en muchos órganos fue marcadamente similar, aunque el hígado fue el principal órgano metabolizador de DMN. Además, la demetilación de DMN in vivo en el pulmón, riñón y otros órganos vía oxidasas microsomales es rápida (Vogel, 1991; Montesano, 1979).

Lo arriba expuesto sobre la farmacocinética de estos AA, indica que en nuestros experimentos, la cantidad de alquilaciones producidas por MMS y EMS en los diferentes tejidos es muy pequeña después de iniciada la primera duplicación del ADN postratamiento; como para explicar el valor tan alto de ICH observado en la segunda división (ICH-2). Tampoco en el caso de la DMN se detectan niveles altos a esos tiempos en ratones completos (Magee, 1956), y por otra parte su metabolito principal tiene una vida media de segundos (Magee y Barnes, 1967). Por lo tanto, estas evidencias sugieren que los incrementos de ICH observados en el segundo ciclo postratamiento con MMS, EMS y DMN son inducidos por lesiones presentes desde el primer ciclo, que originalmente no son productoras de ICH y que requieren de una división celular para transformarse en productoras de ICH (lesiones secundarias).

Por otra parte datos in vitro mostraron que tanto MMS como EMS indujeron frecuencias importantes de ICH en el 2^o y 3^{er} ciclos de división después del tratamiento agudo con el mutágeno (Kaina y Aurich, 1985). Esos datos indican que se obtuvo el mayor incremento de ICH cuando la

exposición a los AA, ocurrió 2 y 3 ciclos antes de la fijación. No es fácil hacer una comparación entre sus datos y los nuestros, dado que su protocolo (dos tonos de tinción de las cromátidas hermanas) no permite distinguir los ICH que ocurrieron en cada ciclo postratamiento, ni la reparabilidad de las lesiones que los indujeron, ni tampoco los ICH que ocurrieron en el mismo locus, por lo tanto, es muy probable que las lesiones inducidas 2 y 3 ciclos antes de la fijación, hayan tenido un cierto grado de reparabilidad, que en nuestras condiciones si fue posible detectar. Una observación similar fue obtenida mediante el protocolo DLI-ICH in vitro, en el cual se demostró que un tratamiento de 1 hora con EMS induce lesiones persistentes generadoras de ICH a través de dos ciclos de división (Cortés et al, 1994).

Con respecto a la DMN, ha sido reportado que in vitro este mutágeno no fue capaz de inducir aberraciones cromosómicas (AC) en el primer ciclo después del tratamiento, sino hasta el segundo y tercer ciclos posteriores al mismo; aunque parece ser que las lesiones inductoras de ICH son diferentes que las que causan AC, estos datos indican que la DMN causa lesiones de expresión tardía (Bean y Galloway, 1993).

Lo anterior indica que el incremento de ICH detectados en el segundo ciclo posterior al tratamiento con MMS, EMS y DMN probablemente fueron inducidos por lesiones secundarias, coincidiendo con esto los resultados de la presente tesis. Por lo tanto, los incrementos de ICH-1 y de ICH-2 permiten concluir que la inducción de ICH por estos AA se debe a dos clases de lesiones: a) primarias, las cuales dan lugar a ICH en el primer ciclo después de la exposición y que presentan un cierto grado de persistencia y b) secundarias, no producen ICH en el primer

ciclo sino que para hacerlo, requieren que ocurra la duplicación del ADN metilado o etilado, es decir, estas lesiones originalmente no son inductoras de ICH y se transforman en inductoras hasta el segundo ciclo de división celular después de haber sido causadas. Por lo tanto, tales lesiones también son persistentes.

En cuanto a este último tipo de lesiones, las cuales, nuestros resultados indican que fueron generadas de manera importante por los tres AA y sobre todo por la DMN es pertinente considerar: i) que dado que la exposición a los AA se da 30 min antes de suministrar la dosis alta de BrdU cuando las células están en la etapa de G₁ del segundo ciclo de división posterior al inicio de los experimentos, misma que tiene una duración de aproximadamente 4h. ii) los tiempos en los que se dan los niveles máximos de alquilación por la exposición a los AA empleados aquí (a las 4 hs el marcaje máximo con MMS y del 96.8% con EMS) o el tiempo en que se lleva a cabo el metabolismo de la DMN (de 6-24h) y iii) que la etapa de síntesis dura de 6 a 8h; es razonable pensar que en el total los ICH producidos en la segunda división postratamiento (ICH-2), exista una cierta proporción que se deba a lesiones frescas que se produjeron en células cuyo ADN ya se hubiera duplicado antes de ser dañado por los radicales alquilo generados por cada uno de los tres AA. Es decir, estas lesiones ya no dieron lugar a ICH en el ciclo en el cual se originaron no por ser secundarias, aunque si persistentes (no fueron reparadas), sino porque materialmente ya no fue posible en ese ciclo y permanecieron hasta la siguiente etapa de síntesis (segundo ciclo postratamiento). Así, los ICH producidos de esta manera, bien podrían haber sido considerados

equivocadamente como si hubieran sido generados por lesiones que requirieron de la duplicación del ADN alquilado.

Por lo que respecta al MMS, esta posibilidad es prácticamente improbable, ya que los niveles máximos de alquilación con este agente se dan antes del tiempo esperado para la síntesis. En el caso del EMS pudiera haber una cierta proporción de ICH ocasionados por estas lesiones primarias, ya que cuando la síntesis ha comenzado, todavía se detecta un buen nivel de alquilación, aunque quizá sea pertinente considerar también el hecho de que ambos eventos, síntesis y alquilación coincidan de tal manera que los ICH debidos a lesiones primarias se estén llevando a cabo en este momento y de ser así, los ICH-2 si podrían ser tomados como evidencia de lesiones secundarias y persistentes. En relación a la DMN, la probabilidad de ocurrencia de los ICH por lesiones generadas inmediatamente después de la horquilla de duplicación pudiera ser un poco mayor, debido a que el total de su metabolismo se lleva a cabo en un lapso de tiempo más prolongado que el de la duración de G₁. No obstante, llama la atención que el mayor efecto de este agente se dé durante el segundo ciclo posterior a la exposición, cuando es muy probable que su concentración en el cuerpo de los animales sea demasiado baja después de la primera síntesis y por el contrario, tal efecto haya sido mucho menor cuando se metabolizó el 70% de la dosis administrada.

Por otro lado, de los resultados con DMN reportados en la presente tesis nos llama la atención que el incremento de ICH fuera tan dramático durante el segundo ciclo, por lo que podrían sugerir que el efecto de este mutágeno se da casi exclusivamente durante ese tiempo y sobre todo, el

hecho de que se haya observado gran dispersión en la distribución de frecuencia de células respecto al número de ICH, habiendo células con frecuencias muy altas de ICH-2 (Figura 17). Esto podría explicarse en términos de que la DMN produce una respuesta similar a la reportada para la inducción de ICH por inhibidores de la síntesis de ADN (Rainaldi y Mariani, 1982), lo que apoya la idea de que la inducción de ICH por DMN, en particular en el segundo ciclo es a través de este mecanismo. Es sorprendente este comportamiento, pues significa que se requiere que pase un ciclo de duplicación para expresarse, es decir, alrededor de doce horas después de la administración del mutágeno.

Esto indica que la inhibición de la síntesis del ADN se da de manera indirecta en algunas células durante la segunda división y que una lesión puede producir varios ICH al alterar la síntesis del ADN. Una posibilidad similar fue propuesta por Painter (1980), aunque no consideró la posibilidad de una inducción mayor en el segundo ciclo cuando las lesiones se han diluido por división. Sin embargo, ya se ha descartado la existencia de una correlación directa entre inducción de ICH e inhibición de la síntesis de ADN por agentes alquilantes (Kaina, 1985).

La ocurrencia del mecanismo de inducción de ICH vía inhibición de la síntesis de ADN, no descarta que una fracción de los ICHs inducidos por DMN sean producidos mediante lesiones en el ADN, ya sean primarias o secundarias; sin embargo, aunque es difícil hacer una distinción del origen de los ICH en cada célula, se pueden hacer algunas referencias a partir del análisis de la distribución de frecuencias de ICH/célula en la población.

5. Análisis Poblacional de la respuesta al efecto de la DMN.

El análisis poblacional mostró que la respuesta de las células al efecto de la DMN fue heterogénea, se determinó la presencia de dos subpoblaciones y una interfase cuya respuesta particular, nos permitió realizar inferencias más aproximadas del (los) mecanismo (s) probable a través del cual se producen los ICHs por la exposición a este mutágeno. En la Figura 17, la respuesta de estas subpoblaciones se podría explicar de la siguiente manera:

La inducción de ICH en la subpoblación A, se dá a través de daño directo al ADN, lo cual se puede inferir a partir del ligero desplazamiento hacia la derecha de las células tratadas con respecto a las células testigo y en la proporción relativa de ICH-1,2 respecto a la de ICH-1, la cual fue de casi la mitad de lo esperado, y que muy probablemente se deba a la remoción de lesiones (Tabla VI). Cabe recordar, que esta proporción se diluye casi totalmente cuando se considera a todas las células como una sola población (Tabla IV). En esta subpoblación, es evidente que la inducción de ICH por DMN se debe en una proporción más alta a la presencia de lesiones secundarias, ya que la frecuencia de ICH-2, mostró una relación casi directa con la frecuencia de ICH-1.

Es de esperarse que la inducción de ICH en la interfase se debiera a la combinación de un mecanismo directo y uno indirecto, ya que como se observa en la Figura 17-B las células comienzan a dispersarse hacia valores altos de ICH y en las proporciones relativas de esta población, prácticamente no existen ICH-1,2, y los ICH-2 representan casi tres veces los ICH-1, es decir, un porcentaje más alto de ICH que el de la población

A es probablemente inducido por lesiones secundarias, las cuales afectan a la síntesis del ADN.

La respuesta de la población B muestra que la inducción de ICH fue prácticamente a través del mecanismo de inhibición de la síntesis de ADN, ya que en este caso, se dió la mayor dispersión de las células hacia valores muy altos de ICH y no hubo inducción de ICH-1,2. Este mecanismo se dió con gran preferencia durante el segundo ciclo de división postratamiento, de ahí que la proporción relativa de ICH-2 fue tres veces más alta que la de ICH-1. Por lo tanto, probablemente la inhibición de la síntesis del ADN se deba a la presencia de lesiones secundarias causadas por este mutágeno.

Por otro lado resulta un tanto complicado, el poder entender porque las células de médula ósea se comportan de diferente manera a la exposición a DMN; diferentes posibilidades podrían ser mencionadas, por ejemplo: a) que haya una sensibilidad diferencial a la inhibición de la síntesis del ADN por DMN en los diversos tipos celulares de la médula ósea, b) que exista una dosis umbral de DMN para inhibir la síntesis del ADN y sólo en algunas células se rebasa ese umbral o c) que la respuesta a la DMN sea dependiente de la etapa del ciclo celular. Todo lo cual, es difícil de explicar, ya que no existen datos que apoyen o descarten definitivamente estas posibilidades, y el caso de la alternativa c, es poco probable, ya que de acuerdo a las características de nuestros experimentos, las células analizables son las que se ajustan a los tiempos de incorporación de la BrdU y de cosecha. Sin embargo en este experimento se observó que la DMN reduce a la mitad el índice mitótico y produce un retraso en el tiempo de generación promedio de una hora, lo

cual pudiera estar aumentando la variabilidad de la duración del ciclo celular y de sus etapas.

Por lo tanto, el análisis poblacional llevado a cabo con la DMN muestra que es un buen complemento para lograr una mayor aproximación a la evaluación del efecto de los mutágenos sobre el ADN.

En estudios previos usando este mismo protocolo DLI-ICH, se ha probado la respuesta con diferentes mutágenos como radiación gamma, MMC y CP. Los resultados obtenidos con radiación gamma indican que a pesar de que la inducción de ICH fue baja, esta se produjo por lesiones muy persistentes que, además mostraron mucha tenacidad para expresarse como ICH en divisiones celulares sucesivas; de hecho no hubo lesiones que sólo se expresaran en la segunda división, es decir, tuvieron 100% de tenacidad (Morales-Ramírez et al, 1988). Por su parte la MMC y la CP indujeron lesiones persistentes pero no tan tenaces en su producción de ICH como las causadas por radiación gamma, además las frecuencias de ICH-1,2 fueron menores que las esperadas para 50% de expresividad, sugiriendo que la producción de los ICH pudiera favorecer que la lesión causante fuera removida (Morales-Ramírez et al, 1990).

Un punto interesante que se deriva de los datos obtenidos previamente con radiación gamma, CP y MMC y que se confirman con los obtenidos en el presente trabajo, es el que ambos son compatibles con la alternativa de que los ICH ocurren donde se encuentran las lesiones o sitios cercanos a ellas. Esto contradice los modelos de formación de ICH, que proponen que la producción de ICH es la consecuencia de lesiones múltiples; por lo que implican que el ICH no se forma donde están las lesiones (Painter, 1980; DuFrain, 1981).

Es posible que los agentes químicos induzcan diferentes tipos de lesiones y que algunas de ellas sean más fácilmente removidas durante la producción del ICH. Esto podría explicar el orden en la eficiencia de remoción de las lesiones inductoras de ICH: CP > EMS > MMC > MMS.

Desde el punto de vista del modelo recombinacional de los ICHs previamente reportado (Morales-Ramírez et al, 1990), la diferencia en la persistencia de las lesiones inductoras de ICH puede ser explicada sobre la base de su propensión a ser removidas durante la ruptura del intermediario de Holliday o en la interfase inmediata posterior.

6. Relación entre las lesiones causadas por MMS, EMS y DMN al ADN y el destino de las lesiones inductoras de ICH

A partir de que se conocen con cierta precisión los perfiles de aductos que causan en el ADN los AA empleados en esta tesis (Beranek, 1990) y que se desconoce el tipo de lesión(es) involucrada(s) en la producción de ICH, resulta interesante analizar las posibles relaciones entre el comportamiento de las lesiones inductoras de ICH causadas por los AA aquí empleados y sus respectivos perfiles de alquilación. Son pocas las correlaciones que se pueden hacer a partir del análisis del artículo de Beranek (1990) que hace una revisión muy amplia del porcentaje de alquilaciones en los diversos sitios de la molécula de ADN. Considerando que la DMN se comportó de manera substancialmente distinta que el MMS y el EMS; se puede mencionar que la única diferencia importante del patrón de alquilación de la DMN con respecto al del MMS y el del EMS es la eficiencia para alquilar el O de la guanina por este agente, la cual es

de 20 y 4 veces más alta que la de estos últimos respectivamente. Por otro lado, los patrones de alquilación del MMS y del EMS son muy parecidos, lo cual coincide con su comportamiento similar respecto al destino de las lesiones inductoras de ICH. Pero por lo mismo no permite establecer una correlación entre los diferentes sitios de alquilación y la producción de ICH.

No es posible proponer que la alquilación en los enlaces fosfodiésteres esté relacionada con la inducción de ICH; en primer lugar, porque no se cuenta con datos de tal alquilación in vivo por los tres AA empleados en la presente tesis, y en segundo lugar, porque si el EMS alquilara in vivo de forma similar a como lo hace in vitro, la cual a su vez es parecida a la que alquilación por la DMN, no habría consistencia entre los datos de alquilación y el comportamiento similar que tuvieron el MMS y el EMS para la producción de ICH en las condiciones del presente trabajo. Sin embargo, fue reportado que in vitro hubo correlación entre ICH y la alquilación en el sitio mencionado (Heflich et al., 1982).

Sería muy conveniente que el destino de las lesiones causadas por los mutágenos, involucradas en la generación de ICH y la interacción de ellos con el ADN pudiera realizarse en las mismas células. Aunado a estas consideraciones sería necesario también tomar en cuenta lo que se refiere a todos los aspectos que tienen que ver con la interacción de los agentes y/o de sus metabolitos con el organismo completo a todos los niveles que ello implica.

7. Efecto de la BrdU sobre la inducción de ICH por MMS, EMS y DMN

El presente protocolo permitió también la evaluación del efecto que la BrdU incorporada en el ADN pudiera tener sobre la inducción de ICH por los AA aquí probados. La estrategia consistió en comparar las frecuencias de ICH que ocurrieron durante el segundo ciclo postratamiento en los cromosomas descendientes de la banda no sustituida (cromosomas negro-blanco) y de la banda sustituida con BrdU (cromosomas gris-blanco) en el momento en que se administran los mutágenos. De tal manera que cuando la frecuencia de ICH es significativamente mayor en los cromosomas negro-blanco (N-B) con respecto a la de los cromosomas gris-blanco (G-B), se interpreta como que la presencia de la BrdU incorporada en el ADN, provocó un efecto inhibitorio; o un efecto aditivo si tal frecuencia es significativamente menor. Puede ocurrir que no hubiera diferencia alguna entre ambas frecuencias, y en tal caso, se interpreta como que la BrdU no afectó la inducción de ICH por los AA.

Tal vez el inconveniente más importante de este protocolo es que la exposición al mutágeno se tenga que realizar en las células con su ADN unifilarmente substituido con BrdU y que a pesar de que la incorporación es mucho menor que con el protocolo usual, pudiera afectar los resultados como se mencionó anteriormente. Aunque, dicho efecto pudo ser evaluado para los tres AA empleados aquí.

El análisis del efecto de la BrdU incorporada al ADN, sobre la inducción de ICH causada por MMS y EMS mostró que aparentemente la inducción causada por MMS en el ADN sustituido con BrdU sufrió una

cierta reducción respecto a la producción de ICH en la banda no sustituida. la reducción en la producción de ICH fue de aproximadamente un 50%. En cambio, las lesiones causadas por EMS no mostraron efecto en la frecuencia de ICH por la presencia o ausencia de incorporación de BrdU al ADN, aunque cabe mencionar que si bien no se detectó una diferencia estadísticamente significativa en el grupo de ratones expuestos, los resultados (Tabla V) mostraron una cierta tendencia indicativa de un efecto inhibitor, y llama la atención que los promedios de ICH en los cromosomas G-B y en los N-B fueron similares a los que se obtuvieron por la exposición a DMN y que en este último caso si hubo efecto inhibitor estadísticamente significativo. Lo más probable es que esto se deba a que en el caso de EMS, hubo fluctuación entre algunas parejas de datos (G-B vs N-B) al grado que se observaron inversiones de cantidades (en algunas la frecuencia en G-B fue mayor que en N-B y en otras fue lo contrario).

Con la reserva de que el protocolo usado aquí, implica la presencia de una concentración muy baja de BrdU incorporada en el ADN en el momento de suministrar los AA, en comparación con la concentración muy alta del análogo que se tiene al emplear el de dos tonos; cabe hacer el análisis de otros trabajos, que con diferentes agentes, han contribuido al conocimiento del efecto que dicha sustancia pudiera tener sobre la inducción de ICH por dichos agentes.

Anteriormente, ya se había determinado que la BrdU tuvo un efecto sensibilizador sobre la frecuencia de ICH inducida por radiación gamma (Morales-Ramírez et al., 1983) por afidilcolín (Morgan y Wolff, 1984), y por MMC (Morgan y Wolff, 1984; Morales-Ramírez et al., 1990); aunque en el

caso de MMC asumieron que tal efecto se debió a persistencia de lesiones (Morgan y Wolff, 1984). Otros datos sugirieron un efecto inhibitor del análogo, por ejemplo, sobre la frecuencia de ICH inducida por MNNG (Popescu et al., 1980) y por MMS (Ockey, 1981). Finalmente, no se observó efecto sobre el ICH causado por otros mutágenos como bleomicina y proflavina (Morgan y Wolff, 1984), y ciclofosfamida (Morales-Ramírez et al., 1990)

La inhibición de la inducción de ICH por MMS debida a la incorporación de BrdU obtenida en el presente trabajo confirma los datos previos (Ockey, 1981), a pesar de que emplearon un protocolo muy diferente y fue *in vitro*.

La explicación de estos resultados podría ser que tal vez la BrdU incorporada al ADN reacciona más fácilmente con algunos agentes o produce una lesión más eficaz para inducir ICH como la MMC y no con otros como el MMS. Otra posibilidad es que la lesión inductora de ICH involucre la timidina, lo que a su vez determine que su sustitución por BrdU afecte la producción de ICH; aunque llama la atención el que este efecto se de aún a pesar de que la cantidad de BrdU sea mucho más pequeña en el presente protocolo, en comparación con la cantidad de BrdU que se suministra en el protocolo tradicional (Morgan y Wolff, 1984).

En el caso de la producción de lesiones inductoras de ICH por la DMN en la cadena sustituida y no sustituida con BrdU, es necesario considerar que se observa que aparentemente hay dos mecanismos de inducción de ICH, los cuales se expresan por la presencia de dos subpoblaciones. En el caso de la subpoblación en la que la inducción de ICH fue a través de lesiones en el ADN, no se observó diferencia en las

frecuencias de ICH en los cromosomas derivados de la cadena sustituida con respecto a los derivados de la no sustituida. En la subpoblación en la que la inducción fue aparentemente debida a la inhibición de la síntesis del ADN si se observó una diferencia significativamente menor en los cromosomas descendientes de la cadena sustituida. Este hecho muy probablemente está relacionado con los mecanismos moleculares de la síntesis del ADN y de la producción de ICH. Sin embargo tal vez sólo refleje la propensión a una mayor inducción de ICH entre las cadenas unifilarmente sustituida con respecto a la bifilarmente sustituida, causada por un efecto conformacional.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir lo que a continuación se presenta.

1. A partir de los incrementos de ICH producidos durante el primer ciclo de división postratamiento, se determinó que el orden decreciente de eficiencia relativa fue: $MMS > DMN > EMS$.

2. De la comparación entre las frecuencias relativas de ICH-1 e ICH-1,2 obtenidas, se puede concluir que los tres AA produjeron lesiones persistentes en el siguiente orden decreciente: $MMS > EMS > DMN$.

3. La tendencia de la tenacidad de las lesiones causadas por MMS, EMS y DMN para producir ICH, siguió el mismo orden: $MMS > EMS > DMN$.

4. El MMS y el EMS causaron lesiones secundarias en la misma magnitud, que produjeron incrementos de ICH importantes durante el segundo ciclo de división postratamiento.

5. Los resultados obtenidos con la DMN sugieren que este agente indujo ICH a través de dos mecanismos: directo e indirecto.

5.1. El mecanismo directo sucede en ambos ciclos de división postratamiento.

5.2. El indirecto posiblemente se dé vía inhibición de la síntesis del ADN y ocurre preferentemente durante el segundo ciclo de división después de la exposición.

6. Probablemente la inhibición de la síntesis del ADN se deba fundamentalmente a la presencia de lesiones secundarias causadas por la DMN..

7. Los resultados del presente trabajo no permiten establecer correlaciones formales entre las lesiones que causan los tres AA al ADN y su destino relacionado con la producción de ICH.

8. La BrdU incorporada en el ADN:

8.1. Tuvo un efecto inhibitor sobre la inducción de ICH causada por MMS.

8.2. No tuvo efecto alguno sobre la inducción por EMS.

8.3. También tuvo un efecto inhibitor sobre la inducción de ICH causada por la DMN, el cual, probablemente esté relacionado con los mecanismos moleculares de la síntesis del ADN.

En síntesis, los resultados del presente trabajo indican que las lesiones causadas por MMS, EMS y DMN son persistentes pero presentaron un comportamiento muy particular en términos de reparabilidad, expresividad y en el caso muy especial de la DMN, sugieren la posibilidad de que la producción de ICH es vía inhibición de la síntesis

del ADN. Además, no se pudieron correlacionar con la alquilación que ellos producen en el ADN

Por lo que respecta al efecto de la BrdU incorporada en el ADN sobre la producción de ICH por estos AA, nuestros datos indican que esta provocó una fuerte inhibición, como en el caso del MMS, una leve inhibición con la DMN y ningún efecto con EMS.

REFERENCIAS

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.

Barfknecht, T.R., Mecca, D.J. y Naismith, R.W.- Effect of varying the exposure and H-Thymidine labeling period upon the outcome of the primary hepatocyte DNA repair assay. *Cell Biol. Toxicol.* 4 (1988) 199-209.

Bean, C.L. y Galloway, S.M.- Evaluation of the need for late harvest time in the assay for chromosome aberrations in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Res.* 292 (1993) 3-16.

Bean, C.L., Bradt, C.I., Hill, T.E., Johnson, M.V., Stallworth, M.V. y Galloway, S.M.- Persistence of alkylation induced chromosome aberrations in Chinese hamster ovary cells, but not in normal human fibroblasts or lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 21 (1993) 5 (abstract).

Belinsky, S.A., Dolan, E.M., White, C.M., Maronpot, R.R., Pegg, A.E., y Anderson, M.W.- Cell specific differences in O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in rat pulmonary cells. *Carcinogenesis* 9 (1988) 2053-2058.

Beranek, D.T.- Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Res.* 231 (1990) 11-30.

Bignami, M., Terlizese, M., Zijno, A., Calcagnile, A., Frosina, G., Abbondandolo, A. y Dogliotti, E.- Cytotoxicity, mutations and SCEs induced by methylating agents are reduced in CHO cells expressing an active mammalian O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Carcinogenesis* 8 (1987) 1417-1421.

Brent, T.P., Dolan, M.E., Fraenkel-Conrat, H., Hall, J., Karran, P., Laval, F., Margison, G.P., Montesano, R., Pegg, A.E., Potter, P.M., Singer, B., Swenberg, J.A. y Yarosh, D.B.- Repair of O-alkylpyrimidines in mammalian cells: A present consensus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 (1988) 1759-1762.

Camps, E., Anguiano, G. y Ondarza, R.- Sistema Básico de Estadística (SBE). Reporte Técnico IB-93-11, ININ. pp 19.

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.

Conner, M.K., Luo, J.E. y Gutierrez de Gotera, O.- Induction and rapid repair of sister-chromatid exchanges in multiple murine tissues *in vivo* by diepoxybutane. *Mutation Res.* 108 (1983) 251-263.

Conner, M.K. y Cheng, M.- Persistence of ethyl carbamate-induced DNA damage *in vivo* as indicated by sister chromatid exchange analysis. *Cancer Res.* 43 (1983) 965-971.

Cortés, F., Daza, P. y Escalza, P.- Evidence that SCEs induced by mutagens do not occur at the same locus in successive cell cycles: Lack of cancellation in three-way stained CHO chromosomes. *Environ. Mol. Mutagen.* 24 (1994) 203-207.

Cumming, R.B., y Walton, M.F.- Fate and metabolism of some mutagenic alkylating agents in the mouse. I Ethyl methanesulphonate and methyl methanesulphonate at sublethal dose in hybrid males. *Mutation Res.* 10 (1970) 365-377.

D'Ambrosio, S.M., Wani, G., Samuel, M., Gibson-D'Ambrosio, R. y Wani, A.A.- Repair of O⁶-methylguanine damage in normal human tissues. En Sutherland, B.M. y Woodhead, A.D. "DNA damage and repair in Human tissues". Plenum Press New York, (1990) 397-416.

Daza, P., Escalza, P., Mateos, S. y Cortés, F.- Mitomycin C, 4-nitroquinoline-1-oxide and ethyl methanesulphonate induce long-lived lesions in DNA which result in SCEs during successive cell cycles in human lymphocytes. *Mutation Res.* 270 (1992) 177-183.

Day III, R., Babich, M.A., Yarosh, D.B. y Scudiero, D.A.- The role of O⁶ - Methylguanine in human cell killing, sister chromatid exchange and mutagenesis: A review. *J. Cell Sci. Suppl.* 6 (1987) 333-353.

Dearfield, K.L., Jacobson-Kram, D., Buenaventura, S.K. y Williams, J.R.- *In vitro* assay of *in vivo* exposure to cyclophosphamide: Induction of sister-chromatid exchanges in peripheral lymphocytes, bone-marrow cells and in cultured cells exposed to plasma. *Mutation Res.* 158 (1985) 97-104.

DuFrain, R.J.- A conformation based hypothesis for the mechanism of sister chromatid exchange formation. *Mamm. Chrom. Newslett.* 22 (1981) 9.

Dunn, W.C., Tano, K., Horesovsky, G.J., Preston, R.J. y Mitra, S.- The role of O⁶-alkylguanine in cell killing and mutagenesis in Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis* 12 (1991) 83-89.

Ehling, U.H., Cumming, R.B. y Malling, H.V.- Induction of dominant lethal mutations by alkylating agents in male mice. *Mutation Res.* 5 (1968) 417-428.

Engelse, L.D. y Philippus, E.J.- *In vivo* repair of rat liver DNA damaged by dimethylnitrosamine or diethylnitrosamine. *Chem. Biol. Interactions* 19 (1977) 111-124.

Escalza, P., Piñero, J. y Cortés, F.- Scoring of SCE frequency per cell cycle in CHO chromosomes by means of standardized 3-way-differential staining method. *Mutation Res.* 215 (1989a) 139-145.

Escalza, P., Piñero, J. y Cortés, F.- A standardized method for the three-way differential staining of plant chromosomes and the scoring of SCEs per cell cycle. *Mutation Res.* 216 (1989b) 203-209.

Escalza, P., Daza, P., Piñero, J. y Cortés, F.- Different effectiveness of 4-nitroquinoline-1-oxide, mitomycin C and ethyl methanesulphonate to induce lesions in DNA leading to sister chromatid exchange throughout successive cell cycles in Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis* 7 (1992) 137-140.

Goto, K., Akematsu, T., Shimazu, H. y Sugiyama, T.- Simple differential Giemsa staining of sister chromatids after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining. *Chromosoma* 53 (1975) 223-230.

He, S.M. y Lambert, B.- Induction and persistence of SCE-inducing damage in human lymphocytes exposed to vinyl acetate and acetaldehyde *in vitro*. *Mutation Res.* 158 (1985) 201-208.

Heddle, J.A. y Arlett, C.F.- Untransformed xeroderma pigmentosum cells are not hypersensitive to sister-chromatid exchange production by

ethyl methanesulphonate - implications for the use of transformed cell lines and for the mechanism by which SCE arise. *Mutation Res.* 72 (1980) 119-125.

Heflich, R.H., Beranek, D.T., Kodell, R.L. y Morris, S.M.- Induction of mutations and sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells by ethylating agents. Relationship to specific DNA adducts. *Mutation Res.* 106 (1982) 147-161.

Huff, V., DuFrain, R.J. y Littlefield, G.- SCE frequencies in rabbit lymphocytes as a function of time after an acute dose of cyclophosphamide. *Mutation Res.* 94 (1982) 349-357.

Ishii, Y. y Bender, M.A.- Factors influencing the frequency of mitomycin 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 mitomycin 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 quantation of cellular proliferation kinetics. *Environ. Mutagen.* 4 (1982) 358 (abstract).

Kaina, B. y Aurich, O.- Dependency of the yield of sister-chromatid exchanges induced by alkylating agents on fixation time. Possible involvement of secondary lesions in sister-chromatid exchange induction. *Mutation Res.* 149 (1985) 451-461.

Kaina, B., Fritz, G., Mitra, S. y Coquerelle T.- Transfection and expression of human O⁶methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents. *Carcinogenesis* 12 (1991) 1857-1867.

Kaina, B., Fritz, G. y Coquerelle, T.- Contribution of O⁶ -alkylguanine and N-alkylpurines to the formation of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and gene mutations: New insights gained from studies of genetically engineered mammalian cell lines. *Environ. Mol. Mutagen.* 22 (1993) 283-292.

Kano, Y. y Fujiwara, Y.- Roles of DNA interstrand crosslinking and its repair in the induction of sister-chromatid exchange and higher induction in Fanconi's anemia cells. *Mutation Res.* 81 (1981) 365-375.

Kato, H.- Temperature-dependence of sister chromatid exchange: An implication for its mechanism. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2 (1980) 61-67.

Kato, H y Sandberg, A.A.- The effect of sera on sister chromatid exchanges *in vitro*. *Exp. Cell Res.* 109 (1977) 445-448.

Kishi, K.- Effects of repair inhibition in the G₁ phase of clastogen-treated human lymphocytes on the frequencies of chromosome-type and chromatid-type aberrations and sister-chromatid exchanges. *Mutation Res.* 176 (1987) 1005-1006.

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.

Kulka, U., Paul, D. y Bauchinger, M.- Development of short-term mutagenicity test systems *in vitro* metabolic activation of indirectly acting by three immortal rat hepatocyte lines. *Mutagenesis* 8 (1993) 193-197.

Kulka, U., Doehmer, D., Glatt, H.R. y Bauchinger, M.- Cytogenetic effect of promutagens in genetically engineered V79 Chinese hamster cells expressing cytochromes P450, *Eur. J. Pharmacol.* 228 (1993) 299-304.

Lambert, B., Sten, M., Hellgren, D. y Francesconi, D.- Different SCE-inducing effects of HN2 and MMS in early and late G₁ in human lymphocytes. *Mutation Res.* 139 (1984) 71-77.

Latt, S.A. y Loveday, K.S.- Characterization of sister chromatid exchange induction by 8-methoxypsoralen plus near UV 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.

Linnainmaa, K. y Wolff, S.- Sister chromatid exchange induced by short-lived monoadducts produced by the bifunctional agents mitomycin C and 8-methoxypsoralen. *Environ. Mutagen.* 4 (1982) 239-247.

Littlefield, L.G., Colyer, S.P. y DuFrain, R.J.- Physical, chemical and biological factors affecting sister-chromatid exchange induction in human lymphocytes exposed to mitomycin C prior to culture. *Mutation Res.* 81 (1981) 377-386.

MacRae, D.W., MacKinnon, A.E. y Stich, F.H.- The fate of UV-induced lesions affecting SCEs, chromosome aberrations and survival of CHO cells arrested by deprivation of arginine. *Chromosoma* 72 (1979) 15-22.

Magee, P.N.- The metabolism of dimethylnitrosamine. *Biochem.* 64 (1956) 676-682.

Magee, P.N. y Barnes, J.M.- Carcinogenic nitroso compounds. *Adv. Cancer Res.* 10 (1967) 163-246.

Maitra, C.S. y Frei, V.J.- Organ-specific effects of DNA methylation by alkylating agents in the inbred swiss mouse. *Chem. Biol. Interactions* 10 (1975) 285-293.

Marquardt, H. y Bayer, U.- 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.

Mehnert, K., Vogel, W., Benz, R. y Speit, G.- Different effects of mutagens on sister chromatid exchange induction in three Chinese hamster cell lines. *Environ. Mutagen.* 6 (1984) 573-583.

Miller, K.- Sister-chromatid exchange in human B- and T-lymphocytes exposed to bleomycin, cyclophosphamide, and ethyl methanesulphonate. *Mutation Res.* 247 (1991) 175-182.

Mirzayans, F., Parry, J.M. y Mirzayans, R.- Application of the standard mutagenesis assay results in underestimation of ethyl

methanesulphonate-induced mutations to ouabain-resistance in Chinese hamster cells. *Mutation Res.* 282 (1992) 31-37.

Mitani, H., Ito, K., Fujino, M. y Takebe, H.- Difference in O⁶-methylguanine methyltransferase activity among transformed NIH3T3 cell clones. *Mutation Res.* 191 (1987) 201-205.

Montesano, R., Bresil, H. y Margison, G.- Increased excision of O⁶-methylguanine from rat liver DNA after chronic administration of dimethylnitrosamine. *Cancer Res.* 39 (1979) 1798-1802.

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-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T. y Rodríguez-Reyes, R.-*In vivo* persistence of sister chromatid exchanges (SCE) induced by gamma rays in mouse bone marrow cells. *Environ. Mutagen.* 6 (1984) 529-537.

Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T. y Rodríguez-Reyes, R.- Occurrence *in vivo* of sister chromatid exchanges at the same locus in successive cell divisions caused by nonrepairable lesions induced by gamma rays. *Environ. Mol. Mutagen.* 11 (1988a) 183-193.

Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T. y Rodríguez-Reyes, R. -A three way differential staining protocol for SCE analysis during three successive cell divisions in murine bone marrow cells *in vivo*. Contam. Ambient. 4 (1988b) 57-63.

Morales-Ramírez, P., Rodríguez-Reyes, R. y Vallarino-Kelly, T. Fate of DNA lesions that elicit sister-chromatid exchanges. Mutation Res. 232 (1990) 77-88.

Morales-Ramírez, P., Rodríguez-Reyes, R. y Vallarino-Kelly, T.- *In vivo* fate of MMS-induced DNA lesions that elicit SCE. Mutation Res. 272 (1992) 215-221.

Morales-Ramírez, P., Cruz-Vallejo, V.L., Vallarino-Kelly, T. y Rodríguez-Reyes, R.- Persistence during G₁ of gamma ray- or mitomycin C-induced lesions eliciting SCE in murine salivary gland cells *in vivo*. Som. Cell and Mol. Genet. 21 (1995) 33-41.

Morales-Ramírez, P., Rodríguez-Reyes, R. y Vallarino-Kelly, T.- Fate of lesions that elicit sister chromatid exchanges (FLE-SCE) produced in DNA by alkylating agents *in vivo*. Mutation Res. 344 (1995) 13-26.

Morgan, W.F. y Cleaver, J.E.- 3-Aminobenzamide synergistically increases sister-chromatid exchanges in cells exposed to methyl

methanesulphonate but not to ultraviolet light. *Mutation Res.* 104 (1982) 361-366.

Morgan, W.F. y Wolff, S.- Effect of 5-bromodeoxyuridine substitution on sister chromatid exchange induction by chemicals. *Chromosoma* 89 (1984) 285-289.

Morris, S.M., Heflich, R.H., Beranek, D.T. y Kodell, R.L.- Alkylation-induced sister-chromatid exchanges correlate with reduced cell survival, not mutations. *Mutation Res.* 105 (1982) 163-168.

Morris, S.M., Beranek, D.T. y Heflich, R.H.- The relationship between sister-chromatid exchange induction and the formation of specific methylated DNA adducts in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Res.* 121 (1983) 261-266.

Nagasawa, H. y Little, J.B.- Induction of chromosome aberrations and sister chromatid exchanges by X rays in density-inhibited cultures of mouse 10T1/2 cells. *Radiat. 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. *Radiat. Res.* 92 (1982) 483-496.

Nakanishi, Y. y Schneider, E.L.- *In vivo* sister chromatid exchange: a sensitive measure of DNA damage. Mutation Res. 60 (1979) 329-337.

Natarajan, A.T., Tates, A.D., Van Buul, P.P.W. y Vogel, N.- Cytogenetic effects of mutagens/carcinogens after activation in a microsomal system *in vitro*. I. Induction of chromosome aberrations and sister chromatid exchanges by diethylnitrosamine (DEN) and dimethylnitrosamine (DMN) in CHO cells in the presence of rat-liver microsomes. Mutation Res. 37 (1976) 83-90.

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., Tates, A.D., Meijers, M., Neuteboom, I. y Vogel, N.- Induction of sister-chromatid exchanges (SCEs) and chromosomal aberrations by mitomycin C and methyl methanesulphonate in Chinese hamster ovary cells. An evaluation of methodology for detection of SCEs and of persistent DNA lesions towards the frequencies of observed SCEs. Mutation Res. 121 (1983) 211-223.

Neft, R.E. y Conner, M.K.- Induction of sister chromatid exchange in multiple murine tissues *in vivo* by various methylating agents. Teratogen. Carcinogen. Mutagen. 9 (1989) 219-237.

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 α - on sister-chromatid exchanges induced by ethyl methanesulphonate. *Mutation Res.* 103 (1982) 155-159.

Ockey, C.H.- Methyl methane-sulphonate (MMS) induced SCEs are reduced by the BrdU used to visualise them. *Chromosoma* 84 (1981) 243-256.

Oikawa, A., Thoda, H., Kanai, M., Miwa, M. y Sugimura, T.- Inhibitors of poli, (adenosine diphosphate ribose) polymerase induce siter chromatid exchanges. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 97 (1980) 1311-1316.

Painter, R.B.- A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutation Res.* 70 (1980) 337-341.

Parida, B.B.- Induction of anaphase bridge in the rat hepatocytes as an *in vivo* short term screening test for carcinogens. *J. Zool. Soc. India* 37 (1985) 79-88.

Parida, B.B., Kato, K. y Stich, H.F.- Inhibitory effect of BHA and gallic acid on the genotoxicity induced by DMN in the rat liver. *J Zool. Soc. India* 37 (1985) 95-104.

Pegg, A.E.- Dimethylnitrosamine inhibits enzymatic removal of O⁶-methylguanine from DNA. *Nature (London)* 274 (1978) 182-184.

Perry, P. y Evans, H.J.- Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature (London)* 258 (1975) 121-125.

Perry, P. y Wolff, S.- New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature (London)* 258 (1974) 156-158.

Popescu, N.C., Tumbull, D. y DiPaolo, J.A.- Sister chromatid exchange and chromosome aberration analysis with the use of several carcinogens and noncarcinogens. *J. Natl. Cancer Inst.* 59 (1977) 289-293.

Popescu, N.C., Amsbaugh, S.C. y DiPaolo, J.A.- The relevance of caffeine post-treatment to SCE incidence induced in Chinese hamster cells. *Mutation Res.* 60 (1979) 313-320.

Popescu, N.C., Amsbaugh, S.A. y DiPaolo, J.A.- Reduced N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine sister chromatid exchange induction in Chinese hamster V79 cells pre-exposed to 5-bromodeoxyuridine. *Chromosoma* 16 (1980) 329-338.

Popescu, N.C., Amsbaugh, S.C. y DiPaolo, J.A.- Persistence of sister chromatid exchanges and *in vitro* morphological transformation of Syrian

hamster fetal cells by chemical and physical carcinogens. *Carcinogenesis* 6 (1985) 1627-1630.

Rainaldi, R. y Mariani, T.- The distribution of induced sister-chromatid exchanges: a tool of identifying agents directly interacting with DNA. *Mutation Res.* 103 (1982) 333-337.

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.

Reynolds, R.J., Natarajan, A.T. y Lohman, P.H.M.- *Micrococcus luteus* UV-endonuclease-sensitive-sites and sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Res.* 64 (1979) 353-356.

Sahar, E., Kittrel, C., Fulghum, S., Feld, M. y Latt, S.A.- Sister-chromatid exchange induction in Chinese hamster ovary cells by 8-methoxypsoralen and brief pulses of laser light. *Mutation Res.* 83 (1981) 91-105.

Sega, G.A., Owens, J.G. y Cumming, R.B.- Studies on DNA repair in early spermatid stages of male mice after *in vivo* treatment with methyl-, ethyl-, propyl-, and isopropyl methanesulfonate. *Mutation Res.* 36 (1976) 193-212.

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.

Schwartzman, J.B. y Goyanes, V.- A new method for the identification of
SCE's per cycle in BrdUrd - substituted chromosomes. *Cell Biol. Int.*
Reports. 4 (1980) 415-423.

**Schwartzman, 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
cancellation of sister-chromatid exchanges. *Chromosoma* 92 (1985) 7-10.

Schwartz, J.L., Turkula, T., Sagher, D. y Strauss, B.- The relationship
between O⁶ -alkylguanine alkyltransferase activity and sensitivity to
alkylation-induced sister chromatid exchanges in human lymphoblastoid
cell lines. *Carcinogenesis* 10 (1989) 681-685.

**Shaddock, J.G., Feuers, R.J., Chou, M.W., Pegram, R.A. y Casciano,
D.A.-** Effects of aging and caloric restriction on the genotoxicity of four
carcinogens in the *in vitro* rat hepatocyte / DNA repair assay. *Mutation*
Res. 295 (1993) 19-30.

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 alkylating agents. *Mutation Res.* 72 (1980) 251-256.

Singer, B.- N-nitroso alkylating agents: Formation and persistence of alkyl derivatives in mammalian nucleic acids as contributing factors in carcinogenesis. *JNCI.* 62 (1979) 1329-1339.

Sono, A. y Sakaguchi, K.- Inhibition of protein synthesis antagonizes induction of sister-chromatid exchanges by exogenous agents. *Mutation Res.* 80 (1981) 121-131.

Stetka, G. y Wolff, S.- Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens. I. *In vivo* test for compounds requiring metabolic activation. *Mutation Res.* 41 (1976) 333-342.

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 mitomycin-C. *Mutation Res.* 51 (1978) 383-396.

Stetka, D.G. Jr.- Further analysis of the replication bypass model for sister chromatid exchange. *Hum. Genet.* 49 (1979) 63-69.

Takayama, S. y Nakanishi, S.- Differential giemsa staining of sister chromatids after extraction with acids. *Chromosoma* 64 (1977) 109-115.

Takeshita, T. y Conner, M.K.- Persistence of cyclophosphamide-induced damage in bone marrow as indicated by sister chromatid exchange analysis. *Carcinogenesis* 6 (1985) 1097-1102.

Tano, K., Shiota, S., Collier, J., Foote, R.S. y Mitra, S.- Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O⁶ -alkylguanine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87 (1990) 686-690.

Taylor, J.H.- Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes. *Genetics* 43 (1958) 515-529.

Tice, R.R. y Schvartzman, J.B.- Sister chromatid exchange: A measure of DNA lesion persistence. En: *Sister chromatid exchange*. Alan R. Liss, Inc. New York. (1982) 33-45.

Thoda, H., Sugawara, R., Tazawa, J., Tada, M. y Oikawa, A.- Antagonizing effect of 3-aminoharman on induction of sister-chromatid exchanges by mutagens. *Mutation Res.* 129 (1984) 63-69.

Thompson, L.H., Brookman, K.W., Dillehay, L.E., Carrano, A.V., Maazrimas, J.A., Mooney, C.L. y Minkler, J.L.- A CHO-cell strain having hypersensitivity to mutagens, a defect in DNA strand-break repair, and an extraordinary baseline frequency of sister-chromatid exchange. *Mutation Res.* 95 (1982) 427-440

Todd, L.A. y Bloom, S.E.-Differential induction of sister chromatid exchanges by indirect-acting mutagen-carcinogens at early and late stages of embrionic development. *Environ. Mutagen.* 2 (1980) 435-445.

Unbenhauer, D.R. y Pegg, A.E.- Metabolism of dimethylnitrosamine and subsequent removal of O⁶ -methylguanine from DNA by isolated rat hepatocytes. *Chem. Biol. Interactions* 33 (1981) 229-238.

Vogel, E.W.- Genotoxic Chemicals: An introduction into basic principles of Genetic Toxicology. Manual del "Curso internacional de Genética Toxicológica, Molecular y Aplicada". Facultad de Ciencias UNAM (1991).

Vogel, E. y Natarajan, A.T.- The relation between reaction kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems. I. Recessive lethal mutations and translocations in *Drosophila*. *Mutation Res.* 62 (1979) 51- 100.

Wolff, S., Bodycote, J. y Painter, R.B.- Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by UV. irradiation at dfferent stages of

the cell cycle: the necessity for cells to pass through S. Mutation Res. 25 (1974) 73-81.

White, G.R.M., Ockey, C.H. Brennand, J. y Margison, G.P.- Chinese hamster cells harbouring the Escherichia coli O⁶ -alkylguanine alkyltransferase gene are less susceptible to sister chromatid exchange induction and chromosome damage by methylating agents. Carcinogenesis 7 (1986) 2077-2080

MUTENV 08849

In vivo fate of MMS-induced DNA lesions that elicit SCE

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

Departamento de Radiobiología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Mexico, D.F., Mexico

(Received 9 April 1992)

(Revision received 30 July 1992)

(Accepted 3 August 1992)

Keywords: Sister-chromatid exchange; Methyl methanesulphonate; Three-way differential staining

Summary

A previously reported *in vivo* protocol, which uses three-way differential staining (TWD) of sister chromatids, allows the screening of mutagen-induced sister-chromatid exchange (SCE) in each of the two cell divisions after mutagen treatment and also those occurring at apparently the same locus in both divisions. In the present work the effect of methyl methanesulphonate (MMS) was studied by means of this protocol. The results showed that MMS-induced DNA lesions that cause SCE are persistent. Some lesions were induced in the second division, as was inferred from the analysis of the response in single cells. The data also indicate that bromodeoxyuridine reduces DNA sensitivity to SCE induction by MMS.

The biological significance and the mechanism involved in sister-chromatid exchange (SCE) are unknown, but some lines of evidence indicate that: (a) these events occur during DNA synthesis (Wolff et al., 1974; Kato, 1980a); (b) they are produced either by DNA damage (MacRae et al., 1979; Schwartzman and Gutierrez, 1980; Nagasawa et al., 1982) or by inhibitors of DNA synthesis (Ishii and Bender, 1980; Nishi et al., 1982); (c) lesions involved in SCE induction are not known (Carrano et al., 1979; Cassel and Latt, 1980; Ishii, 1981; Kano and Fujiwara, 1982); (d) SCE-inducing lesions persist for more than one cell division (reviewed in Tice and Schwartzman, 1982) and are

capable of inducing SCE at apparently the same locus in successive cell divisions (Morales-Ramírez et al., 1988, 1990).

An *in vivo* protocol for three-way differential staining of sister chromatids allows the screening of mutagen-induced SCE in each of the two cell divisions after mutagen treatment and also those occurring at the same locus in both divisions (Morales-Ramírez et al., 1988). By using this protocol, it has been determined that: (a) γ -rays, mitomycin C (MMC) and cyclophosphamide (CP) induce persistent DNA lesions capable of causing SCE in two successive cell divisions either at the same or at different loci; (b) γ -ray-induced lesions demonstrated 100% expressivity as a SCE in the second division with respect to the first, while CP and MMC only demonstrated 50%; and (c) 5'-bromodeoxyuridine (BrdU) increases sensitivity to SCE induction by MMC but not by CP (Morales-Ramírez et al., 1988, 1990).

Correspondence: Dr. P. Morales-Ramírez, Departamento de Radiobiología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Sierra Mojada 447, Lomas Barrilaco, CP 11010, Mexico, D.F., Mexico.

The aim of this work is to determine, using the previously mentioned protocol: (a) the fate of MMS-induced DNA lesions eliciting SCE, (b) the expressivity as SCE of the MMS-induced lesion and (c) the effect of bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation on SCE induction by MMS, in murine bone marrow cells *in vivo*.

Materials and methods

Animals

Balb/C male mice 2–3 months old and weighing 30 g were used in these experiments. The animals were housed in plastic cages under controlled conditions of temperature and dark–light periods, and were fed with Purina chow and water *ad libitum*.

Protocol

The experiments were carried out according to an *in vivo* protocol to establish the fate of DNA lesions involved in SCE formation during two successive cell divisions (Morales-Ramírez et al., 1988). This protocol is based on the three-way differential staining (TWD) of sister chromatids (Schvartzman and Goyanes, 1980). In order to obtain the two levels of BrdU incorporation to DNA necessary for TWD, BrdU (Sigma) was injected intraperitoneally twice; the first dose was 0.25 mg/g b.wt. at the beginning of the experiment and the second dose, 12 h. later, was 2.0 mg/g b.wt. The BrdU was previously adsorbed to activated charcoal, according to a described method (Morales-Ramírez, 1980; Morales-Ramírez et al., 1984).

The MMS in aqueous solution was injected intraperitoneally 30 min before the second BrdU dose; the MMS (Sigma) dose was 30 μ g/g b.wt.

Bone marrow cells were arrested in metaphase by injecting intraperitoneally 7.5 μ g of colchicine per gram of body weight 34 h after the first BrdU administration; the mice were killed by cervical dislocation 2 h later.

After the animals were killed, femurs were dissected, sectioned on both ends, and the bone marrow cells were obtained by injecting a phosphate-buffered saline solution (NaCl 0.15 M, KCl 3.3 mM in buffer phosphate 0.01 M, pH 7.2) into one end with a 26-gauge needle. The cells were

centrifuged at $250 \times g$ for 5 min, resuspended in 0.075 M KCl, incubated at 37°C for 15 min, and fixed in two changes of ethanol–acetic acid (3:1) for 15 min each. The cells were then centrifuged and resuspended in 0.5 fixative. Finally the cell suspension was dropped onto clean chilled slides.

Differential staining of sister chromatids

Slides containing the metaphase figures were dried for at least 24 h before staining by a slightly modified fluorescence plus Giemsa method (Perry and Wolff, 1974). Slides were mounted in 10 μ M Hoechst 33258 in a phosphate–citrate buffer (Goto et al., 1975) and placed beneath a 25-W black light lamp for 60–90 min. The slides were then incubated in $2 \times$ SSC at 60°C for 20 min, washed with distilled water, and stained with 10% Giemsa for 5 min.

Analysis and statistical methods

SCEs occurring in the first division, second division or both cell divisions after mutagen treatment were scored in 30 cells per animal, in seven animals, following the rationale. Results were compared with a current control group of seven untreated mice. The statistical significance was determined with Student's *t*-test or paired *t*-test, using a Hewlett Packard 25 Microcomputer.

Rationale

Considering that the animals were exposed to the mutagen after the first cell division and before the second BrdU dose, the increase in SCE frequency at each of the three successive divisions analyzed in the third division cells was interpreted as follows (Fig. 1).

An increase in SCEs occurring in the second division after the beginning of the experiment is a consequence of lesions that only induce SCE during the first division after mutagen treatment (SCE 1st).

An increase in SCEs occurring in the third division after the beginning of the experiment implies that lesions did not induce SCE in the first but rather in the second division after exposure to the mutagen (SCE 2nd).

Finally, an increase in SCEs with the appearance of those occurring in the cell division previous to the mutagen treatment is the consequence

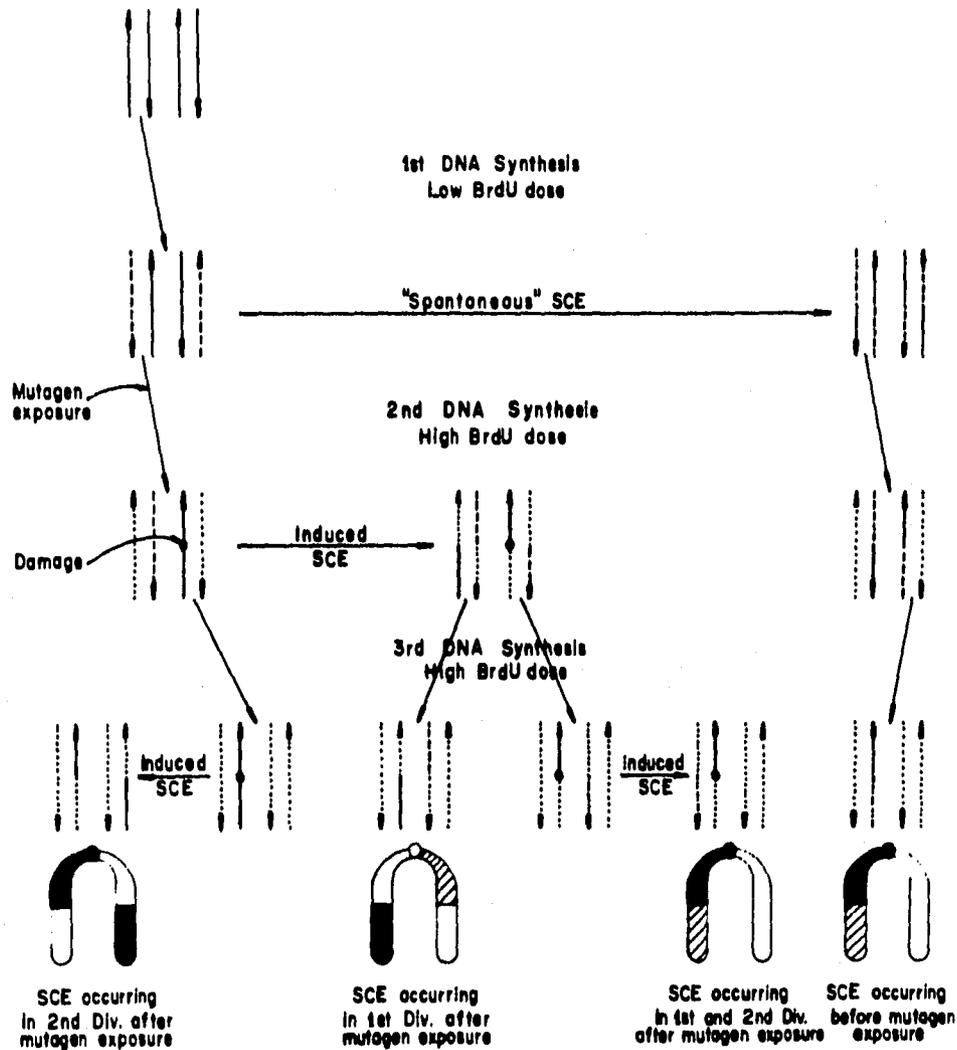


Fig. 1. Rationale for the analysis of SCE induced in the first, second or in both divisions at the same locus, after mutagen exposure; see text.

TABLE 1
SCE FREQUENCIES (SCE/cell) OCCURRING IN FIRST, SECOND, AND IN BOTH DIVISIONS AFTER TREATMENT WITH MMS

	Division post treatment					
	1st		2nd		1st-2nd	
	X ± SD	Dif.	X ± SD	Dif.	X ± SD	Dif.
Control	2.3 ± 0.33	-	3.1 ± 0.47	-	0.49 ± 0.19	-
MMS	5.2 ± 1.10 *	2.9	5.5 ± 0.90 *	2.4	1.73 ± 0.45 *	1.2

Dif. = difference with respect to the control. 30 cells were analyzed per animal, in 7 mice per group.

* $P < 0.0001$, Student's *t*-test.

of lesions that elicit SCE at the same locus in two successive cell divisions after mutagen exposure (SCE 1st-2nd).

Results

The frequencies of SCE occurring in the first (SCE 1st), second (SCE 2nd), or both divisions (SCE 1st-2nd) after treatment with MMS are shown in Table 1. These data indicate that the frequencies of all types of SCE increase significantly with respect to basal values. The largest increase was observed in SCEs occurring during the first division after treatment. Whereas the SCE frequency decreases slightly in the second division after exposure, SCE occurring at the same locus in both divisions after mutagen exposure (1st-2nd) were 3 times lower than the frequency in the first division.

As was previously proposed, the expected probabilities for SCE occurring in the first, second or both divisions after mutagen treatment would be 3:1:1, assuming that: (a) each lesion has a 50% probability of manifesting itself as an SCE, (b) there is no repair of lesions and (c) the lesions are not transformed (Morales-Ramírez et al., 1990).

The fact that the frequency of SCE occurring in both divisions at the same locus (1st-2nd) is approximately one third of that which occurs during the first division (1st) suggests that the probability of a lesion to induce a SCE is 50%. This means that the lesions have 50% expressivity (Morales-Ramírez et al., 1990).

The ratio of the frequencies of SCE occurring in the first and second divisions after treatment with MMS is very different from the expected value; there were nearly the same SCE frequencies in both divisions. These data suggest that DNA lesions eliciting SCE were probably induced during the second division.

To explore the previously mentioned possibility, the distribution of frequencies of cells with different number of SCE occurring in the first and second divisions after MMS treatment is plotted in Fig. 2B and is compared with the distribution of frequencies of untreated control cells which appears in Fig. 2A. These figures show that in the control, the higher frequency is

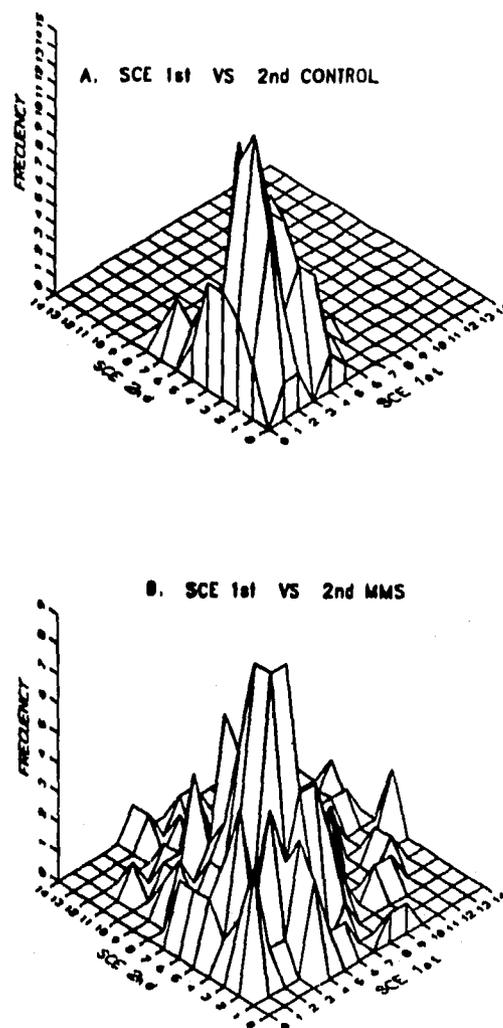


Fig. 2. Distribution of frequencies of bone marrow cells with different numbers of SCE occurring in the first and second divisions after MMS treatment (B) and the same type of graph for the equivalent divisions in the untreated control cells (A).

for cells that have one first-division SCE and two second-division SCE. In the MMS-treated cells, the peak corresponds to cells with 4:4, 5:4 and 4:5 rates of first-division with respect to second-division SCE, and the distribution of the cell frequencies is centrally located, indicating that nearly 50% of the cells have higher second-division than first-division SCE. This strongly suggests that half of the SCE-inducing lesions were

produced during the second division after MMS treatment. In contrast, a similar type of graph for MMS-induced SCE in first and first/second divisions (Fig. 3B), clearly shows that the distribution of the cell frequencies appears in the region near the first division-SCE axis, reflecting that most of the cells have higher first division-SCE frequen-

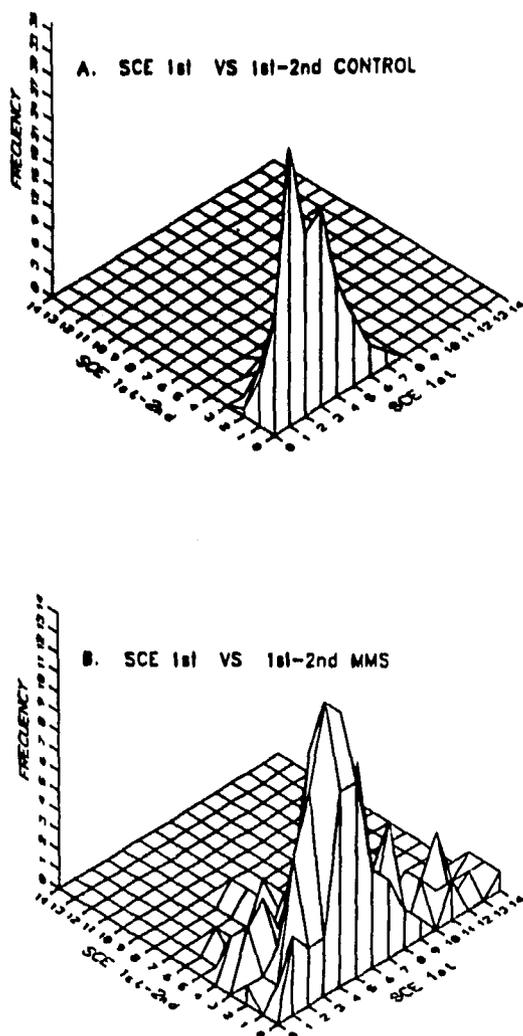


Fig. 3. Distribution of frequencies of bone marrow cells with different number of SCE occurring in first and first/second divisions, after MMS treatment (B) and the same type of graph for the equivalent divisions in the untreated control cells (A).

TABLE 2

SCE FREQUENCY IN BLACK-WHITE (BW) AND GRAY-WHITE (GW) CHROMOSOMES, IN SECOND DIVISION AFTER MMS TREATMENT

	SCE/cell ($\bar{X} \pm SD$)	
	GW	BW
Control	1.32 ± 0.24	1.81 ± 0.39
MMS	0.82 ± 0.41^a	1.61 ± 0.71^a

^a Minus basal SCE frequency, $P < 0.05$, paired Student's *t*-test.

cies than SCE 1st-2nd frequencies as was expected (Morales-Ramirez et al., 1990).

The present protocol allows the detection of the possible interaction between incorporated BrdU and mutagens on SCE induction, by comparing the frequencies of SCE which occur in the second division post treatment in the chromosomes descended from the unsubstituted strand (black-white) and from the BrdU-substituted strand (gray-white). As shown in Table 2, the SCE frequencies of these types of chromosomes differ significantly in the cells treated with MMS, indicating that BrdU incorporation in DNA inhibits SCE induction by MMS.

Discussion

Although considerable evidence has been obtained concerning the persistence of DNA lesions involved in SCE production, the fate of these lesions and the biological consequences of lesions remain largely unknown. Lesion persistence has been related to neoplastic transformation (Margison and Kleihues, 1975).

In Syrian hamster fetal cells *in vitro*, there is evidence that the increase in MMS-induced SCE persists after several divisions or is partially reduced (Popescu et al., 1985).

Using the protocols based on the analysis of SCE by means of the two-tone differential staining of the sister chromatids, an underestimation of SCE results if the SCE occur in the same locus, as has been proposed (Stetka, 1979).

The protocol used in the present study allows the determination of: (a) the persistence of lesions eliciting SCE, (b) how often the SCE occur

at the same locus, and (c) the events of SCE occurring in three cell divisions without decrease caused by cell division. Another advantage is that it permits the determination of SCE induction *in vivo* from very low basal values (Morales-Ramírez et al., 1987) without the uncertainty of the effect of culture conditions that could cause SCE induction (Kato and Sandberg, 1977; Morgan and Crossen, 1981). Perhaps the most important disadvantage of the present protocol is that mutagen must be administered after BrdU incorporation for one cell division, and although the incorporation at that moment is lower than that required in the two-tone protocol, it could affect the results, as was previously mentioned. Nevertheless, the relevance of BrdU incorporation to DNA on SCE induction by mutagens can be established from the comparison of SCE frequencies in the third-division chromosomes, descended from the BrdU-substituted (gray-white) and unsubstituted (black-white) DNA strands present at the moment of mutagen exposure (Table 2).

In our previous work using the same protocol, it was observed that SCE induction by γ -rays, although low, is provoked by a very persistent lesion which is very tenacious in inducing SCE in successive divisions (Morales-Ramírez et al., 1988).

The evidence obtained in the previously reported studies suggests that MMC- and CP-induced lesions involved in SCE have 0.5 probability of inducing SCE. The response obtained with MMS is similar, as inferred from the comparison of first division SCE and first/second division SCE. It seems that MMS was able to cause 'fresh' lesions or that the damage was transformed into SCE-inducing lesions, up to the second division.

The lesions induced by MMC and CP and involved in SCE are prone to be removed either during, or as a consequence of, SCE formation (Morales-Ramírez et al., 1990). The present data suggest that MMS-induced lesions are completely persistent but not tenacious (i.e., it is always involved in SCE induction) in inducing SCE. This behavior differs from that reported for γ -ray-induced lesions that elicit SCE, which are very tenacious (Morales-Ramírez et al., 1988).

BrdU substitution increases sensitivity to SCE induction by MMC; however, no effect was found

with CP (Morales-Ramírez et al., 1990). The data obtained with exposure to MMS indicate that BrdU inhibits the SCE induction with this agent. This could be interpreted in the sense that MMS-induced SCE are dependent on thymidine residues. It is possible that the chemical agents induce different types of lesions and some of these are more easily removed during, or as a result of, SCE formation. This could explain the higher efficiency of removing the CP-induced lesions involved in SCE production with respect to the MMC-induced lesions.

The results obtained in the present work indicate that: (a) MMS-induced lesions which cause SCE are persistent, but with a 0.5 expressivity as SCE in successive cell divisions, (b) BrdU incorporation reduces DNA sensitivity to SCE induction by MMS, and (c) MMS is capable of inducing 'fresh' lesions 12 h after its *in vivo* administration or lesions able to be transformed into SCE-inducing lesions long after exposure.

Acknowledgments

We wish to thank Jorge Mercader Martínez, Angel Reyes Pozos, Perfecto Aguilar Vargas, Felipe Beltrán Bibiana, and Enrique Fernández Villavicencio for their excellent technical assistance, and Rosa Ma. Noriega for English edition.

References

- Carrano, A.V., L.H. Thompson, D.G. Stelka, J.L. Minkler, J.A. Mazrimas and S. Fong (1979) DNA crosslinking, sister-chromatid exchange and specific-locus mutations, *Mutation Res.*, 63, 175-188.
- Cassel, D.M., and S.A. Latt (1980) Relationship between DNA adduct formation and sister chromatid exchange induction by [³H]8-methoxypsoralen in Chinese hamster ovary cells, *Exp. Cell Res.*, 128, 15-22.
- Goto, K., T. Akematsu, H. Shimazu and T. Sugiyama (1975) Simple differential Giemsa staining of sister chromatids after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining, *Chromosoma*, 53, 223-230.
- Ishii, Y. (1981) Nature of the mitomycin-C induced lesion causing sister-chromatid exchange, *Mutation Res.*, 91, 51-55.
- Ishii, Y., and M.A. Bender (1980) Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light-induced sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells, *Mutation Res.*, 79, 19-32.

- Kano, Y., and Y. Fujiwara (1982) Dyskeratosis congenita: Survival, sister-chromatid exchange and repair following treatments with crosslinking agents, *Mutation Res.*, 103, 327-332.
- Kato, H. (1980) Evidence that the replication point is the site of sister chromatid exchange, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2, 69-77.
- Kato, H. and A.A. Sandberg (1977) The effect of sera on sister chromatid exchanges in vitro, *Exp. Cell Res.*, 109, 445-448.
- MacRae, W.D., E.A. MacKinnon and H.F. Stich (1979) The fate of U.V.-induced lesions affecting SCEs, chromosome aberrations and survival of CHO cells arrested by deprivation of arginine, *Chromosoma*, 72, 15-22.
- Margison, G.P., and P. Kleihues (1975) Chemical carcinogenesis in the nervous system: Preferential accumulation of O⁶-methylguanine in rat brain deoxyribonucleic acid during repetitive administration of *N*-methyl-*N*-nitrosurea, *Biochem. J.*, 148, 521-525.
- Morales-Ramírez, P. (1980) Analysis in vivo of sister-chromatid exchange in mouse bone-marrow and salivary gland cells, *Mutation Res.*, 74, 61-69.
- Morales-Ramírez, P., T. Vallarino-Kelly and R. Rodríguez-Reyes (1984) Detection of SCE in rodent cells using the activated charcoal bromodeoxyuridine system, *Basic Life Sci.*, 29B, 599-611.
- Morales-Ramírez, P., R. Rodríguez-Reyes and T. Vallarino-Kelly (1987) Analysis of spontaneous sister-chromatid exchanges in vivo by three-way differentiation, *Mutation Res.*, 178, 49-56.
- Morales-Ramírez, P., T. Vallarino-Kelly and R. Rodríguez-Reyes (1988) Occurrence in vivo of sister chromatid exchanges at the same locus in successive cell divisions caused by nonrepairable lesions induced by gamma rays, *Environ. Mol. Mutagen.*, 11, 183-193.
- Morales-Ramírez, P., R. Rodríguez-Reyes and T. Vallarino-Kelly (1990) Fate of DNA lesions that elicit sister-chromatid exchanges, *Mutation Res.*, 232, 77-88.
- Morgan, W.F., and P.E. Crossen (1981) Factors influencing sister-chromatid exchange rate in cultured human lymphocytes, *Mutation Res.*, 81, 395-402.
- Nagasawa, H., A.J. Fornace, M.A. Ritter and J.B. Little (1982) Relationship of enhanced survival during confluent holding recovery in ultraviolet-irradiated human and mouse cells to chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, and DNA repair, *Radiat. Res.*, 92, 483-496.
- Nishi, Y., M.M. Hasegawa, N. Inui, S. Ikegami and M.-A. Yamada (1982) Effect of post-treatment with aphidicolin - a specific inhibitor of DNA polymerase α - on sister-chromatid exchanges induced by ethyl methanesulfonate, *Mutation Res.*, 103, 155-159.
- Perry, P., and S. Wolff (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature*, 251, 156-158.
- Popescu, N.C., S.C. Amsbaugh and J.A. DiPaolo (1985) Persistence of sister chromatid exchanges and in vitro morphological transformation of Syrian hamster fetal cells by chemical and physical carcinogens, *Carcinogenesis*, 6, 1627-1630.
- Schwartzman, J.B., and C. Gutierrez (1980) The relationship between the cell time available for repair and the effectiveness of a damaging treatment in provoking the formation of sister-chromatid exchanges, *Mutation Res.*, 72, 483-489.
- Stetka Jr., D.G. (1979) Further analysis of the replication bypass model for sister chromatid exchange, *Hum. Genet.*, 49, 63-69.
- Tice, R.R., and J.B. Schwartzman (1982) Sister chromatid exchange: a measure of DNA lesion persistence, in A.A. Sandberg (Ed.), *Sister Chromatid Exchange*, Liss, New York, pp. 33-45.
- Wolff, S., J. Bodycote and R.B. Painter (1974) Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by UV irradiation of different stages of cell cycle: The necessity for cells to pass through S, *Mutation Res.*, 25, 73-81.



Fate of lesions that elicit sister chromatid exchanges (FLE-SCE) produced in DNA by alkylating agents in vivo

P. Morales-Ramírez *, R. Rodríguez-Reyes, T. Vallarino-Kelly

Departamento de Radiobiología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Sierra Mojada 447, Lomas Barrilaco, CP 11010, México, D.F. Mexico

Received 11 July 1994; revised 6 February 1995; accepted 30 March 1995

Abstract

A study was made on the effect of ethyl methanesulfonate (EMS) or dimethylnitrosamine (DMN) on the frequency of SCE occurring in the first, in the second or at the same locus in both divisions. This was done with a previously reported in vivo protocol which allowed us to determine the fate of lesions that elicit SCE (FLE-SCE) in two cell divisions after mutagen treatment. The results showed that EMS-induced DNA lesions that cause SCE are persistent, and that some of them were produced in the second-division or were generated from SCE non-inducing lesions. We inferred this by the analysis of the response in cell populations. DMN seems to induce SCE mainly during the second division, but by inhibiting DNA synthesis as was interpreted from the cell frequency distribution with respect to the number of SCE in first and in second cell division.

1. Introduction

The event of sister chromatid exchange (SCE) has been amply studied; however, the biological significance and the mechanism of its formation has not been established. SCE occurs during DNA synthesis (Wolff et al., 1974) and the duplication fork seems to be the point at which this phenomenon occurs (Kato, 1980). Inhibitors of DNA synthesis are capable of inducing SCE by a process that is not well understood (Ishii and Bender, 1980; Nishi et al., 1982). This process causes a very high variability in the SCE frequency in the cells (Rainaldi and Mariani, 1982). SCE can also be induced by different kinds of mutagen, that

cause various types of DNA lesions, e.g. adducts or crosslinks (Carrano et al., 1979; Cassel and Latt, 1980; Ishii, 1981; Kano and Fujiwara, 1982); however, different lines of evidence indicate that strand breaks are not involved (MacRae et al., 1979; Shiraishi and Sandberg, 1979; Fornace Jr. et al., 1980; Morales-Ramírez et al., 1983). Evidence has been reported that SCE occurs in the site or very near the site of the lesion (Raith et al., 1984; Morales-Ramírez et al., 1990).

An in vivo protocol for determining the fate of lesions that elicit SCE (FLE-SCE) during two cell divisions has been developed (Morales-Ramírez et al., 1988). The FLE-SCE protocol is based on the three-way differential staining (TWD) of sister chromatids (Schvartzman and Goyanes, 1980), and allows one to determine if a lesion induces

* Corresponding author. Fax: (5) 521-37-98.

SCE in the first, in the second or in both cell divisions after the exposure to mutagens (Schvartzman et al., 1985). Evidence has been reported on the fate of SCE-inducing lesions caused by various mutagens using this protocol (Morales-Ramírez et al., 1988; Morales-Ramírez et al., 1990,1992). In a previous study using the FLE-SCE protocol, evidence showed that methyl methanesulfonate (MMS) is capable of inducing almost the same SCE frequency in the first and second divisions after exposure. We interpreted that MMS induces 'fresh' lesions in the second division or that original lesions, not capable of inducing SCE, were transformed in secondary SCE-inducing lesions, which in turn cause an increase of SCE during the second division (Morales-Ramírez et al., 1992). Evidences that alkylating agents produced secondary lesions has also been reported (Kaina and Aurich, 1985; Bean and Galloway, 1993; Bean et al., 1993).

The aim of the present study is to determine the behavior of the SCE-inducing lesions produced by the alkylating agents ethyl methanesulfonate (EMS) and dimethylnitrosamine (DMN).

2. Materials and methods

2.1. Animals

BALB/c male mice two to three months old and weighing approximately 30g were used in the experiments. The animals were housed in plastic cages under controlled conditions of temperature, humidity and dark light periods; they were fed with Purina Chow and water ad libitum.

2.2. Protocol

The fate of DNA lesions that elicit SCE (FLE-SCE) during two successive cell divisions was determined by a previously reported protocol (Morales-Ramírez et al., 1988), which is based on the three-way differential staining (TWD) of sister chromatids (Schvartzman and Goyanes, 1980). TWD requires a low BrdU incorporation during the first cell division and a high BrdU incorporation in the two following cell divisions. In order to

obtain the two levels of bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation, BrdU (Sigma) was injected intraperitoneally twice; the first dose was 0.25 mg/g body weight at the beginning of the experiment and the second dose, 7 h later, was 2.0 mg/g body weight. The BrdU was previously adsorbed to activated charcoal according to a described method (Morales-Ramírez, 1980; Morales-Ramírez et al., 1984).

The mutagens in aqueous solution were injected intraperitoneally 30 minutes before the second BrdU dose. The EMS (Sigma) dose was 300 µg/g body weight and that of DMN (Sigma) was 50 µg/g body weight. The appropriate dose of mutagen was established from an in vivo determination of SCE induction by different doses of mutagens in the usual protocol. The dose chosen is such that it permits enough SCE induction to measure the effect, but not so high as to make the accurate analysis difficult.

Bone marrow cells were arrested in metaphase by injecting 15 µg of colchicine per gram of body weight intraperitoneally 34 h after the beginning of the experiment. The mice were killed by cervical dislocation 2 h later.

The two femurs of each animal were dissected, sectioned on both ends, and the bone marrow cells were obtained by injecting a phosphate-buffered saline solution into one end with a 26-gauge needle. The cells were centrifuged at 250 ×g for 5 min, resuspended in 0.075 M KCl, incubated at 37 C for 15 min, and fixed in two changes of ethanol-acetic acid (3:1) for 15 min each. The cells were then centrifuged and resuspended in 0.5 fixative. Finally the cell suspension was dropped onto clean chilled slides.

2.3. Differential staining

Slides containing the metaphase figures were dried out for at least 24 h. before staining by a slightly modified (Goto et al., 1975) fluorescence plus Giemsa method (Perry and Wolff, 1974).

2.4. Analysis and statistical methods

The SCE occurring in the 1st (SCE-1), 2nd (SCE-2) or both cell divisions (SCE-1,2) after

mutagen treatment were scored in 30 cells per animal, in at least 6 animals, following a protocol previously described (Morales-Ramírez et al., 1990) (Fig. 1).

The significance between data was determined by Student's *t*-test or paired *t*-test, using a procedure developed for a personal computer.

2.5. Rationale

Because the animals were exposed to the mutagens after the first cell division and before the second BrdU dose, the increase in the frequency

of the three types of SCE, was interpreted as follows (Fig. 1):

The increase in the SCEs in the second division after the beginning of the experiment, is caused by lesions that only induce SCE during the first division after the mutagen treatment (SCE-1). The increase in the SCEs in the third division after the beginning of the experiment, is due to lesions which do not induce SCE in the first but in the second division after exposure to the mutagen (SCE-2). Finally, the increase of SCEs with the appearance of those occurring in the first division after the beginning of the experi-

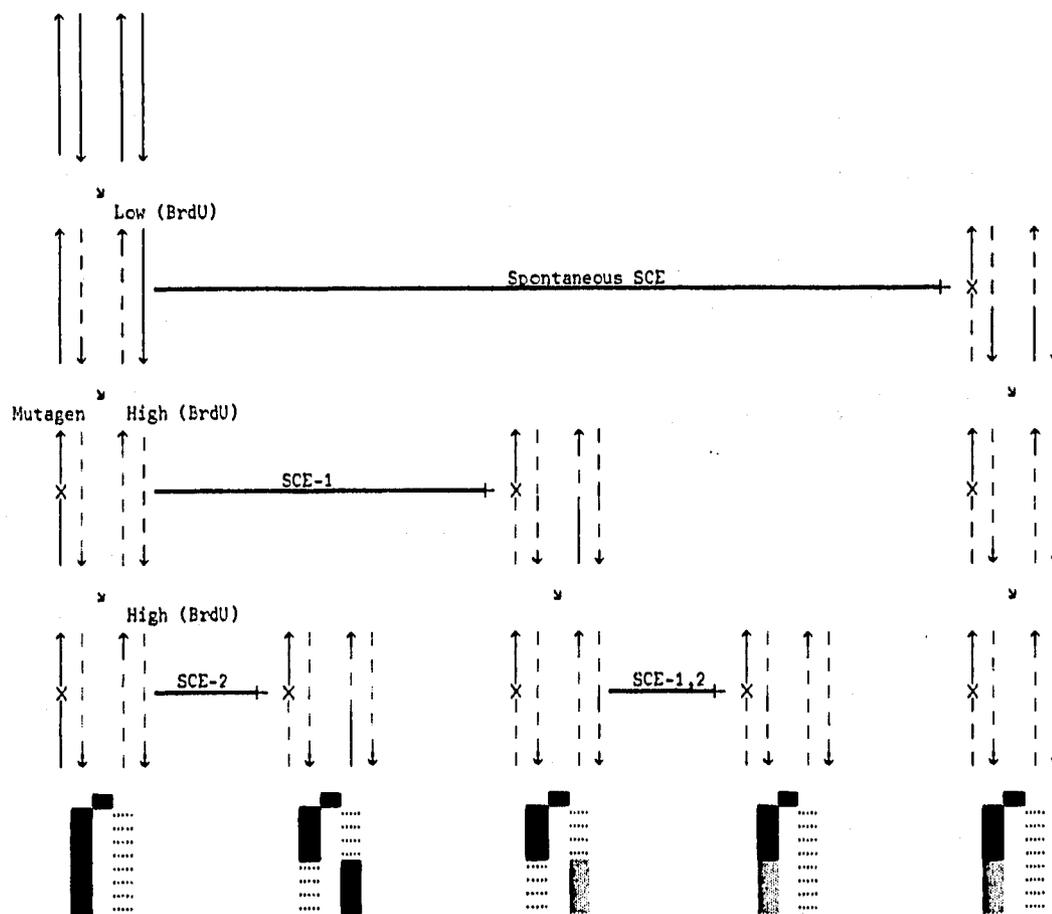


Fig. 1. Rationale for the analysis of SCE occurring in the first (SCE-1), second (SCE-2) or in both divisions at the same site (SCE-1,2) after exposure to alkylating agents (see text).

Table 1
SCE frequencies in the 1st, 2nd or 1st–2nd divisions after treatment with EMS or DMN, in bone marrow cells in vivo

Mutagen	SCE/cell post-treatment division						n
	1st		2nd		1st–2nd		
	X ± SD	dif.	X ± SD	dif.	X ± SD	dif.	
—	2.7 ± 0.2	—	3.6 ± 0.4	—	0.7 ± 0.2	—	7
EMS	9.8 ± 0.8 *	7.1	9.5 ± 0.7 *	5.9	1.9 ± 0.3 *	1.2	8
—	2.2 ± 0.4	—	3.0 ± 0.4	—	0.6 ± 0.1	—	7
DMN	4.8 ± 1.0 *	2.6	9.5 ± 1.5 *	6.5	0.7 ± 0.1 **	0.1	6

* $p < 0.0001$; ** Not significant, Student's *t*-test; dif., difference vs control; n, number of mice.

ment, is the consequence of lesions that elicit SCE at the same locus in two successive cell divisions after the mutagen exposure (SCE-1,2).

3. Results

Table 1 shows the SCE frequency induced in the first (SCE-1), the second (SCE-2) and in both divisions at the same locus (SCE-1,2) by the exposure to EMS or DMN. The EMS treatment induces a significant increase of all SCE types as compared to the control values. The net increase per cell for SCE-1, SCE-2, and SCE-1,2 was 7.1, 5.9 and 1.2 respectively. DMN increases only the frequency of SCE-1 and SCE-2; the SCE-1,2 frequency increased slightly but the difference was not statistically significant. The most interesting fact was that the SCE-2 frequency was more than twice that obtained for SCE-1.

The expected relative frequencies of SCE-1, SCE-2 and SCE-1,2 are 3:1:1 respectively; they are estimated from the lesion segregation and considering that each lesion has a probability of 0.5 to be expressed as a SCE (Morales-Ramírez et al., 1990). These relative frequencies were calculated assuming that there is neither induction of SCE-eliciting lesions during the second division, nor repair or transformation of lesions i.e. from non-SCE-inducing to SCE-inducing and vice versa. The relative SCE frequencies induced in the two successive cell divisions by the exposure

Table 2
Relative frequencies of SCE occurring in 1st, 2nd or 1st–2nd after treatment with EMS or DMN in bone marrow cells of mice in vivo

	1st	2nd	1st–2nd
Expected	3	1	1
EMS	3	2.5	0.5
DMN	3	7.0	0.14

to EMS and DMN appears in Table 2. The data indicate that SCE-inducing lesions caused by these agents did not behave as expected. EMS induces a SCE-2 increase near that of SCE-1. This suggests that an induction of 'fresh' lesions or a transformation of lesions from non-SCE-inducing to SCE-inducing ones, occurred during the second division. There were half the number of expected SCE-1,2 which can mean that some of SCE-inducing lesions were repaired before the second DNA replication or that they were transformed into non-SCE-inducing lesions.

As mentioned earlier, the response to DMN exposure was also unexpected. The frequency of SCE-2 was seven times greater than that expected. However, it seems that this cannot be attributed to an induction of fresh lesions or transformation of lesions during the second division as was previously proposed (Morales-Ramírez et al., 1992), because many cells with very high SCE frequencies were scored, suggesting that SCE induction was caused by DNA syn-

Fig. 2. Distribution of frequencies of bone marrow cells with different numbers of SCE-1 and SCE-1,2 in control and EMS-treated animals. The data were obtained from 30 cell per animal in at least 7 animals (see Table 1).

thesis inhibition (Rainaldi and Mariani, 1982). A similar response was observed for the SCE-1, indicating that the SCE induction during the first cell division was at least partially caused by the inhibition of DNA synthesis. The fact that the induction of SCE-1,2 was negligible also supports this mechanism of SCE induction by DMN, because such a mechanism could not associate one lesion to one SCE.

To discern among the different possibilities of behavior of lesions that elicit SCE, the analysis of cell frequency distribution with respect to the number of SCE-1 and SCE-2, and to the number of SCE-1 and SCE-1,2 can be useful. Fig. 2 shows the cell frequencies with respect to the number of SCE-1 and SCE-1,2 in control and EMS-treated animals. The figure indicates that EMS induces a displacement of the cell population frequencies toward higher SCE-1 frequencies with a slight increase of SCE-1,2, as was expected. The plot of cell frequency with respect to the number of SCE-1 and SCE-2 induced by EMS (Fig. 3) showed that the cell population is distributed in the center of the grid, indicating that this agent is capable of producing SCE-inducing lesions in the two cell divisions with almost the same efficiency. The latter supports the possibility that EMS causes SCE-non-inducing lesions that are susceptible to be transformed into SCE-inducing lesions, because the lesions must be diluted by cell division.

The frequency of cells with different numbers of SCE-1 and SCE-1,2 induced by DMN appears in Fig. 4. In this figure it is clear that the cell population migrates only toward higher SCE-1 frequencies and that the population is not compact, showing cells with very high SCE-1 frequencies. The plot of cell frequencies with respect to the number of SCE-1 and SCE-2 (Fig. 5) also showed the same pattern but with a cell movement toward higher SCE-2. This suggests that DMN induces SCE by inhibiting DNA synthesis.

4. Discussion

The reaction of alkylating mutagens with the nucleophilic sites in macromolecules has been studied (Murthy et al., 1984). Evidence exists that DNA alkylation in mammals is repaired by the transference of the alkyl group to an alkyltransferase, by the removal of the modified base by a glycosylase or by processes not well-characterized up to the moment (Ishida and Takahashi, 1987,1988; Schwartz et al., 1989). However, alkylating agents are both mutagenic and carcinogenic (Ishida and Takahashi, 1987; Ishida and Takahashi, 1988; Popescu et al., 1985). The monofunctional alkylating agents in general, and EMS and DMN in particular, induce adducts in different nucleophilic sites of DNA, and although the relative affinity of alkylating agents to specific sites varies in some degree, some of them are more reactive (Beranek, 1990).

There are many studies indicating that EMS is able to induce SCE (Perry and Evans, 1975; Nakanishi and Schneider, 1979), and that the lesions involved in this induction seem to be persistent and capable of inducing secondary lesions (Kaina and Aurich, 1985). In the present study the results obtained by the treatment with EMS, confirm not only the induction of persistent lesions, but also the transformation from non-SCE-inducing lesions to SCE-inducing ones. A higher SCE-2 frequency can also be explained by the less probable alternative that many fresh lesions were produced during the second division; this is so because it was demonstrated that the levels of EMS in different tissues of mice are reduced 85%, 12 hr after administration (Cumming and Walton, 1970). Recently, using the same FLE-SCE protocol but *in vitro*, evidence has been obtained that EMS induces a higher SCE in the second cell division after mutagen exposure than in the first (Cortés et al., 1994). Because EMS treatment was for one hour and then washed,

Fig. 3. Distribution of frequencies of bone marrow cells with different numbers of SCE-1 and SCE-2 in control and EMS-treated animals. The data were obtained from 30 cell per animal in at least 7 animals (see Table 1).

there is no possibility of fresh DNA lesion induction.

Evidence of a similar behavior of the lesions induced by MMS has also been reported in the same *in vivo* system used here (Morales-Ramírez et al., 1992). But, both the primary or secondary lesions that elicit SCE are persistent; this agrees with studies that measured adducts which have different levels of persistence (Beranek, 1990). However, half of the primary SCE-inducing lesions seems to be repaired during or as a consequence of SCE production, as was suggested by a lower SCE-1,2 frequency than that expected. Using the same protocol in CHO cells *in vitro*, no SCE induction of SCE-1,2 was found indicating that lesions were not able to cause SCE at the same locus in successive divisions (Cortés et al., 1994). This implies that the lesions were repaired during or as a consequence of SCE occurrence.

In previous experiments *in vitro* using the three-way differential staining of sister chromatids in human lymphocytes and CHO cells, the persistence of lesions induced by EMS was determined. Unfortunately these results cannot be compared with those reported here, because the mutagen exposure was achieved in the first instead of the second cell division, as was reported (Schvartzman et al., 1985). This makes the interpretation of results difficult, because of the possibility that each lesion could induce SCE in later cell divisions, which in turn could determine that the appearance of the SCE does not correspond with the cycle in which the SCEs occur, as shown in Fig. 6. In this figure we assume that each lesion could or could not cause a SCE and a total lesion persistence; we consider the segregation of chromatids containing a lesion. Under these circumstances, SCEs with the appearance of those occurring in the first division could be due to SCEs occurring subsequently at the same locus in the second and third divisions. SCEs with the appearance of those occurring in the second division, could be caused by SCE occurring at the

same locus in the first and third divisions; lastly SCEs with the appearance of those being produced during the 3rd division could be elicited from the subsequent SCE occurrence at the same locus during the first and second divisions. Besides, the SCE occurring at the same locus during the three divisions are not detectable. However, the results in these experiments clearly indicate that EMS causes a persistent lesion(s) capable of inducing SCE in subsequent cell divisions (Daza et al., 1992; Escalza et al., 1992).

DMN is an indirect mutagen which has proved to be capable of inducing SCE (Kulka et al., 1993a,b). The results obtained in the present study by the exposure with DMN were completely unexpected, because this agent displays a response similar to that reported for SCE induction by DNA synthesis inhibition (Rainaldi and Mariani, 1982). Since alkylating agents have shown an inhibitory effect on DNA synthesis (Kaina, 1985), the DMN effect could not be at all surprising, but considering that this effect is strongly expressed during the second division, the explanation for this behavior is not simple. Also, evidence has been obtained in CHO cells that some of the primary lesions caused by DMN on DNA are not involved in chromosome aberrations (CA) in the first division, but can induce CA during the second or third division (Bean and Galloway, 1993). In this study the presence of some cells with more than 10 CA has been observed in subsequent divisions after exposure; these cells were analogous to those with higher SCE frequencies observed in the present study after the treatment with DMN and to those observed after exposure with DNA polymerase inhibitors (Rainaldi and Mariani, 1982). Also higher increases in SCE and chromosome aberrations in some cells were caused by topoisomerase inhibitors (Cortés et al., 1993).

DMN is an indirect mutagen that is mainly metabolized in liver (Kulka et al., 1993a,b). However, it is difficult to consider that the levels of

Fig. 4. Distribution of frequencies of bone marrow cells with different numbers of SCE-1 and SCE-1,2 in control and DMN-treated animals. The data were obtained from 30 cell per animal in at least 6 animals (see Table 1).

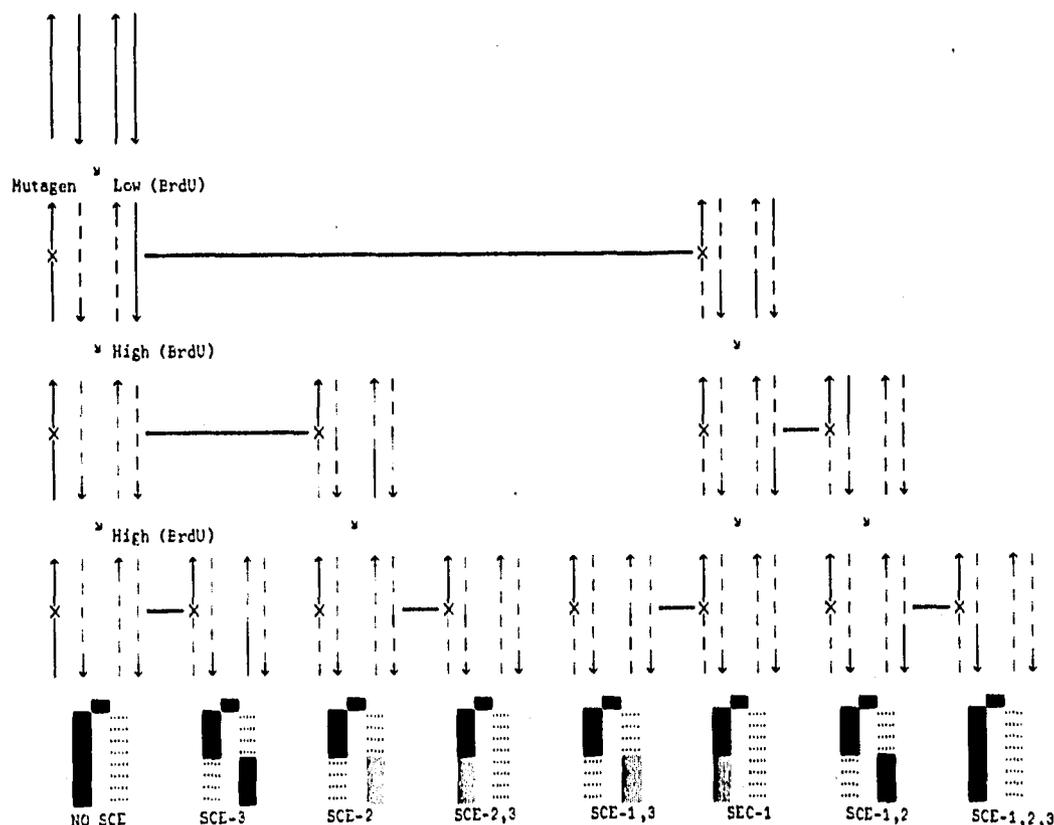


Fig. 6. Three-way differential staining appearance originated by single or several SCEs occurring at the same locus in three subsequent cell divisions after mutagen exposure; assuming complete lesion persistence and the possibility that each lesion could or could not cause a SCE (see text).

the active metabolite of DMN were higher 12 h after it was administered, because it was reported that the levels of DMN in the whole mice are not detectable 4 hr after administration (Magee, 1956) and the principal metabolite has a half-life of seconds (Magee and Barnes, 1967). This implies that there is low probability of a direct inhibition of DNA synthesis in the second division, i.e. DNA polymerase inhibition. This also implies that DNA alkylation induced by DMN alters DNA synthesis in some cells during the second cell division, and this is expressed as an increased

frequency of SCE. If so, this means that a single lesion is able to induce several SCEs by altering DNA synthesis.

The SCE induced by damage seems to occur at the site in which there is a lesion (Raith et al., 1984; Morales-Ramírez et al., 1990). However, the induction of SCE by inhibitors of DNA synthesis, particularly those inhibiting DNA polymerase (Rainaldi and Mariani, 1982) or DNA topoisomerases (Cortés et al., 1993), induces a higher and more variable frequency of SCE in some cells. This suggests that the effect of some

Fig. 5. Distribution of frequencies of bone marrow cells with different numbers of SCE-1 and SCE-2 in control and DMN-treated animals. The data were obtained from 30 cells per animal in at least 6 animals (see Table 1).

agents on the replicative machinery increases the probability that a SCE may occur.

If the presence of cells with very high SCE frequencies after treatment with DMN is caused by an effect on DNA synthesis, this implies that in addition to SCE induction by discrete lesions in DNA (Carrano et al., 1979; Cassel and Latt, 1980; Ishii, 1981; Kano and Fujiwara, 1982), by inhibiting the enzymes involved in DNA synthesis (Ishii and Bender, 1980; Nishi et al., 1982), or by the incorporation of nucleotide analogues (Morales-Ramírez et al., 1987; Kaufman, 1989), SCE induction is possible by agents that damage DNA and cause subsequent alteration in DNA synthesis, as the present study suggests.

This latter possibility was previously proposed (Painter, 1980), however, it was considered a general mechanism of SCE induction. The fault of a complete correlation between SCE induction and DNA synthesis inhibition was clearly discerned in an earlier study, in which SCE induction was demonstrated with doses of alkylating agents that do not cause any DNA synthesis inhibition (Kaina, 1985).

The results here obtained indicate that the behavior of the lesions induced by EMS and DMN are quite different. This could be explained on the basis of the differences of action between these two mutagens. Certainly the more relevant difference is represented by the sites in DNA which are preferentially alkylated by them, i.e. DMN induces more alkyl O⁶ guanine than EMS (Beranek, 1990). However, the knowledge of the consequences of alkylation at different DNA bases is far from being clearly known.

Acknowledgements

We wish to thank Jorge Mercader Martínez, Angel Reyes Pozos, Perfecto Aguilar Vargas, Felipe Beltrán Bibiana, and Enrique Fernández Villavicencio for their excellent technical assistance, and Rosa Ma. Noriega for English editing.

References

- Bean, C.L. and S.M. Galloway (1993) Evaluation of the need for late harvest time in the assay for chromosome aberrations in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Res.*, 292, 3–16.
- Bean, C.L., C.I. Bradt, R.B. Hill, T.E. Johnson, M.V. Stalworth and S.M. Galloway (1993) Persistence of alkylation-induced chromosome aberrations in Chinese hamster ovary cells, but not in normal human fibroblasts or lymphocytes, *Environ. Mol. Mutagen.*, 21, 5 (abstract).
- Beranek, D.T. (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents, *Mutation Res.*, 231, 11–30.
- Carrano, A.V., L.H. Thompson, D.G. Stetka, J.L. Minkler, J.A. Mazrimas and S. Fong (1979) DNA crosslinking, sister chromatid exchange and specific-locus mutations, *Mutation Res.*, 63, 175–188.
- Cassel, D.M. and Latt, S.A. (1980) Relationship between DNA adduct formation and sister chromatid exchange induction by [³H]-methoxy-psoralen in Chinese hamster ovary cells, *Exp. Cell Res.*, 128, 15–22.
- Cortés, F., J. Piñero and T. Ortiz (1993) Importance of replication fork progression for the induction of chromosome damage and SCE by inhibitors of DNA topoisomerases, *Mutation Res.*, 303, 71–76.
- Cortés, F., P. Daza, J. Piñero and P. Escalza (1994) Evidence that SCEs induced by mutagens do not occur at the same locus in successive cell cycles: lack of cancellation in three-way stained CHO chromosomes, *Environ. Mol. Mutagen.*, 24, 203–207.
- Cumming, R.B. and M.F. Walton (1970) Fate and metabolism of some mutagenic alkylating agents in the mouse. I ethyl methanesulfonate and methyl methanesulfonate at sublethal dose in hybrid males, *Mutation Res.*, 10, 365–377.
- Daza, P., P. Escalza, S. Mateos and F. Cortés (1992) Mitomycin C, 4-nitroquinoline-1-oxide and ethyl methanesulfonate induce long-lived lesions in DNA which result in SCEs during successive cell cycles in human lymphocytes, *Mutation Res.*, 270, 177–183.
- Escalza, P., P. Daza, J. Piñero and F. Cortés (1992) Different effectiveness of 4-nitroquinoline-1-oxide, mitomycin C and ethyl methanesulfonate to induce lesions in DNA leading to sister chromatid exchange throughout successive cell cycles in Chinese hamster ovary cells, *Mutagenesis*, 7, 137–140.
- Fornace Jr., A.J., H. Nagasawa and J.B. Little (1980) Relationship of DNA repair to chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and survival during liquid holding recovery in X-irradiated mammalian cells, *Mutation Res.*, 70, 323–336.
- Goto, K., T. Akematsu, H. Shimazu and T. Sugiyama (1975) Simple differential Giemsa staining of sister chromatids after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining, *Chromosoma*, 53, 223–230.
- Ishida, R. and T. Takahashi (1987) N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-resistant HeLa S3 cells still have little O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase activity and are hypermutable by alkylating agents, *Carcinogenesis*, 8, 1109–1113.
- Ishida, R. and T. Takahashi (1988) Increased O⁶-methyl-

- guanine-DNA methyltransferase activity and reduced mutability in 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea-resistant HeLa S3 cells, *Carcinogenesis*, 9, 1079–1083.
- Ishii, Y. (1981) Nature of the mitomycin-C induced lesion causing sister-chromatid exchange, *Mutation Res.*, 91, 51–55.
- Ishii, Y. and M.A. Bender (1980) Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light-induced sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells, *Mutation Res.*, 79, 19–32.
- Kaina, B. (1985) The interrelationship between SCE induction, cell survival, mutagenesis, aberration formation and DNA synthesis inhibition in V79 cells treated with N-methyl-N-nitrosourea or N-methyl N'-nitro-N-nitrosoguanidine, *Mutation Res.*, 142, 49–54.
- Kaina, B. and O. Aurich (1985) Dependency of the yield of sister-chromatid exchanges induced by alkylating agents on fixation time. Possible involvement of a secondary lesion in sister-chromatid exchange induction, *Mutation Res.*, 149, 451–461.
- Kano, Y. and Y. Fujiwara (1982) Dyskeratosis congenita: survival, sister-chromatid exchange and repair following treatments with crosslinking agents, *Mutation Res.*, 103, 327–332.
- Kato, H. (1980) Evidence that the replication point is the site of sister chromatid exchange, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2, 69–77.
- Kaufman, E.R. (1989) Induction of sister chromatid exchanges by the thymidine analog 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine, *Som. Cell Mol. Genet.* 15, 563–568.
- Kulka, U., D. Paul and M. Bauchinger (1993a) Development of short-term mutagenicity test systems in vitro: metabolic activation of indirectly acting mutagens by three immortal rat hepatocyte lines, *Mutagenesis*, 8, 193–197.
- Kulka, U., J. Dochmer, H.R. Giatt and M. Bauchinger (1993b) Cytogenetic effect of promutagens in genetically engineered V79 Chinese hamster cells expressing cytochromes P450, *Eur. J. Pharmacol.*, 228, 299–304.
- MacRae, W.D., E.A. Machinon and H.F. Stich (1979) The fate of U.V. induced lesions affecting SCEs, chromosome aberrations and survival of CHO cells arrested by deprivation of arginine, *Chromosome* 72, 15–22.
- Magee, P.N. (1956) The metabolism of dimethylnitrosamine, *Biochem J.*, 64, 676–682.
- Magee, P.N. and J.M. Barnes (1967) Carcinogenic nitroso compounds, *Adv. Cancer Res.* 10, 163–246.
- Morales-Ramírez, P. (1980) Analysis in vivo of sister-chromatid exchange in mouse bone marrow and salivary gland cells, *Mutation Res.*, 74, 61–69.
- Morales-Ramírez, P., T. Vallarino-Kelly, T. and R. Rodríguez-Reyes (1983) Effect of BrdUrd and low doses of gamma radiation on sister chromatid exchanges, chromosome breaks, and mitotic delay in mouse bone marrow cells in vivo, *Environ. Mutagen.*, 5, 589–602.
- Morales-Ramírez, P., T. Vallarino-Kelly and R. Rodríguez-Reyes (1984) Detection of SCE in rodent cells using the activated charcoal bromodeoxyuridine system. In Tice, R.R. and Halaender, A. (eds) *Sister Chromatid Exchanges*, Plenum Press, New York, pp 598–611.
- Morales-Ramírez, P., R. Rodríguez-Reyes and T. Vallarino-Kelly (1987) Analysis of spontaneous sister-chromatid exchanges in vivo by three-way differentiation, *Mutation Res.*, 178, 49–56.
- Morales-Ramírez, P., T. Vallarino-Kelly and R. Rodríguez-Reyes (1988) Occurrence in vivo of sister chromatid exchange at the same locus in successive cell divisions causing by non-repairable lesion induced by gamma rays, *Environ. Molec. Mutagen.*, 11, 183–193.
- Morales-Ramírez, P., R. Rodríguez-Reyes and T. Vallarino-Kelly (1990) Fate of DNA lesions that elicit sister-chromatid exchanges, *Mutation Res.*, 239, 77–88.
- Morales-Ramírez, P., R. Rodríguez-Reyes and T. Vallarino-Kelly (1992) In vivo fate of MMS-induced DNA lesions that elicit SCE, *Mutation Res.*, 272, 215–221.
- Murthy, M.S.S., C.J. Calleman, S. Osterman-Golkar, D. Segerbäck and K. Svensson (1984) Relationship between ethylation of hemoglobin, ethylation of DNA and administered amounts of ethyl methanesulfonate in the mouse, *Mutation Res.* 127, 1–8.
- Nakanishi, Y. and E.L. Schneider (1979) In vivo sister-chromatid exchange a sensitive measure of DNA damage, *Mutation Res.*, 60, 329–337.
- Nishi, Y., M.M. Hasegawa, N. Inui, S. Ikegami and M.A. Yamada (1982) Effect of post-treatment with aphidicolin –a specific inhibitor of DNA polymerase α –on sister chromatid exchanges induced by ethyl methanesulfonate, *Mutation Res.*, 103, 155–159.
- Painter, R.B. (1980) A replication model for sister-chromatid exchange, *Mutation Res.*, 70, 337–341.
- Perry, P. and S. Wolff (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature*, 251, 156–158.
- Perry, P. and H.J. Evans (1975) Cytological detection of mutagen-carcinogens exposure by sister chromatid exchange, *Nature*, 258, 121–125.
- Popescu, N.C., S.C. Amsbaugh and J.A. DiPaolo (1985) Persistence of sister chromatid exchanges and in vitro morphological transformation of Syrian hamster fetal cells by chemical and physical carcinogens, 6, 1627–1630.
- Rainaldi, R. and T. Mariani (1982) The distribution of induced sister-chromatid exchanges: a tool for identifying agents directly interacting with DNA, *Mutation Res.*, 103, 333–337.
- Raith, M., T. Cremer, C. Cremer and G. Speit (1984) Sister chromatid exchange (SCE) induced by laser-UV-microirradiation: correlation between the distribution of photolesions and the distribution of SCE, in: R.R. Tice and A. Halaender (Eds.), *Sister Chromatid Exchange*, Plenum Press, New York, pp 181–197.
- Schwartzman, J.B., V.J. Goyanes, A. Campos, A.M. Lage, C. Veiras, M.C. Silva and S. Ramos (1985) Persistence of DNA lesions and the cytological cancellation of sister-chromatid exchanges, *Chromosoma*, 92, 7–10.

- Schvartzman, J.B. and V. Goyanes (1980) A new method for identification of SCE's per cell cycle in BrdUrd substituted chromosomes, *Cell Biol. Int. Rep.*, 4, 415–423.
- Schwartz, J.L., T. Turkula, D. Sagher and B. Strauss (1989) The relationship between O⁶-alkylguanine alkyltransferase activity and sensitivity to alkylation-induced sister chromatid exchanges in human lymphoblastoid cell lines, *Carcinogenesis*, 10, 681–685.
- Shiraishi, Y. and A.A. Sandberg (1979) Effects of various chemical agents on sister chromatid exchanges, chromosome aberrations and DNA repair in normal and abnormal human lymphoid cell lines, *J. Natl. Cancer Inst.*, 62, 27–35.
- Wolff, S., J. Bodycote and R.B. Painter (1974) Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by U.V. irradiation at different stages of cell cycle: the necessity for cell to pass through S, *Mutation Res.*, 25, 73–81.