



00346  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA**  
**DE MEXICO**

7  
Zej

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**"ESTUDIO IN VIVO SOBRE LA VALIDEZ DEL MODELO  
REPLICATIVO DE PRODUCCION DE INTERCAMBIOS  
EN LAS CROMATIDAS HERMANAS"**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE**

**MAESTRIA EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA CELULAR)**

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

**BIOL. VIRGINIA LETICIA CRUZ VALLEJO**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. PEDRO R. MORALES RAMIREZ**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Mi sincero agradecimiento al Dr. Pedro Morales, por apoyarme en mi desarrollo profesional y tenerme mucha paciencia.**

**Con mucho cariño a Teresita Vallarino, Regina Rodríguez y Mary Tere Mendiola, por su amistad y comprensión en los momentos difíciles.**

**Con aprecio a mis compañeros de laboratorio: Francisco González, Angel Reyes, Perfecto Aguilar, Felipe Beltrán y a Miguel Angel por su ayuda incondicional y en especial al Ing. Jorge Mercader.**

**A los integrantes del jurado les expreso mi gratitud por sus comentarios y sugerencias para el enriquecimiento de este trabajo.**

**Dr. Pedro Morales Ramírez.**

**Dr. Miguel Betancourt Rule.**

**Dr. Mario Altamirano Lozano.**

**Dr. Emilio Rojas del Castillo.**

**Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo.**

**Dra. Patricia Ostrosky Shejet.**

**M en C. María Teresa Mendiola Cruz.**

**Dedico esta tesis con mucho amor a mis padres Don Antonio Cruz González y a Doña Albina Vallejo de la Cruz (quién siempre estará en mi recuerdo), porque me amaron aún antes de conocerme y guiaron mis pasos enseñándome que todo objetivo puede ser alcanzado.**

**A mi compañero, amigo y esposo F. Eduardo, a mis hijos Fermín Antonio y Katherine Lizzeth, porque gracias a ellos he comprendido lo maravilloso que es disfrutar la vida.**

**A mis hermanos Esther, Jorge y Guillermo.**

**Y a SPCH quién siempre quiso adelantarse en todo.**

**Agradezco a las autoridades del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares y al personal del departamento de biología de esta institución, las facilidades otorgadas tanto para los estudios de posgrado como para la realización de esta tesis.**

## INDICE

	PAG.
<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCION</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Definición</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Antecedentes</b>	<b>3</b>
<b>2.2.1 Establecimiento de las técnicas para la tinción de las cromátidas hermanas</b>	<b>4</b>
<b>2.2.2 Sistemas para el análisis de ICH</b>	<b>6</b>
<b>2.3 ICH como indicador de daño</b>	<b>10</b>
<b>2.3.1 Lesiones en el ADN inductores de ICH</b>	<b>14</b>
<b>2.4 Agentes inductores de ICH</b>	<b>16</b>
<b>2.4.1 Inducción de ICH por radiación ionizante</b>	<b>17</b>
<b>2.4.2 Inducción de ICH por Mitomicina C</b>	<b>18</b>
<b>2.5 Modelos de formación de ICH</b>	<b>23</b>
<b>2.5.1 Modelo de Kato (1977)</b>	<b>23</b>
<b>2.5.2 Modelo de Shafer (1977)</b>	<b>24</b>
<b>2.5.3 Modelo de Ishii y Bender (1980)</b>	<b>29</b>
<b>2.5.4 Modelo de Morales y Col. (1990)</b>	<b>33</b>
<b>2.5.5 Modelo de Cleaver (1981)</b>	<b>35</b>
<b>2.5.6 Modelo de DuFrain (1981)</b>	<b>37</b>
<b>2.5.7 Modelo de Painter (1980)</b>	<b>37</b>

<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Objetivo general</b>	<b>41</b>
<b>3.2 Objetivos particulares</b>	<b>41</b>
<b>4. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Protocolos</b>	<b>43</b>
<b>4.1.1 Protocolo de la primera etapa</b>	<b>44</b>
<b>4.1.2 Protocolo de la segunda etapa</b>	<b>44</b>
<b>4.1.3 Protocolo de la tercera etapa</b>	<b>46</b>
<b>4.2 Animales</b>	<b>49</b>
<b>4.3 Tratamientos</b>	<b>49</b>
<b>4.3.1 Irradiación</b>	<b>49</b>
<b>4.3.2 Mitomicina C (MMC)</b>	<b>50</b>
<b>4.3.3 Bromodesoxiuridina (BrdU)</b>	<b>50</b>
<b>4.3.4 Colchicina</b>	<b>50</b>
<b>4.4 Cosecha de células</b>	<b>50</b>
<b>4.5 Preparación de laminillas</b>	<b>51</b>
<b>4.6 Tinción diferencial de las cromátidas</b>	
<b>hermanas</b>	<b>51</b>
<b>4.7 Análisis al microscopio</b>	<b>51</b>
<b>4.8 Estadística</b>	<b>52</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>56</b>
<b>5.1 Variabilidad de la frecuencia basal de ICH,</b>	
<b>TGP e IM en las células de la médula ósea</b>	

<b>femoral entre las extremidades izquierda y derecha de ratones <u>in vivo</u>.</b>	<b>56</b>
<b>5.2 Comparación del efecto de la exposición a radiación gamma sobre los valores de ICH, TGP e IM, entre las células de la médula ósea femoral de ambas extremidades de cada ratón.</b>	<b>59</b>
<b>5.3 Comparación del efecto del tratamiento con MMC sobre los valores de ICH, TGP e IM, entre las células de la médula ósea femoral de ambas extremidades de cada ratón.</b>	<b>63</b>
<b>5.4 Efecto del pretratamiento con radiación gamma sobre los valores de ICH, TGP e IM causados por MMC, en las células de la médula ósea femoral.</b>	<b>67</b>
<b>6. DISCUSION</b>	<b>76</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>85</b>
<b>8. REFERENCIAS</b>	<b>86</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	<b>Acido desoxirribonucleico</b>
<b>AFC</b>	<b>Afidicolina</b>
<b>ara C</b>	<b>1-β-D-arabino furanosilcitosina</b>
<b>ARN</b>	<b>Acido ribonucleico</b>
<b>BrdU</b>	<b>Bromodesoxiuridina</b>
<b>CldU</b>	<b>Clorodesoxiuridina</b>
<b>CHO</b>	<b>Células de ovario de criceto chino</b>
<b>CHX</b>	<b>Cicloheximida</b>
<b>CP</b>	<b>Ciclofosfamida</b>
<b>DCMMC</b>	<b>Decarbamoil mitomicina C</b>
<b>ddTTP</b>	<b>2',3'-dideoxitimidina-trifosfato</b>
<b>DE</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>DMS</b>	<b>Dimetil metano sulfonato</b>
<b>EMS</b>	<b>Etil metano sulfonato</b>
<b>Gy</b>	<b>Gray (unidad de absorción equivalente a 100 rads)</b>
<b>HU</b>	<b>Hidroxiurea</b>
<b>ICH</b>	<b>Intercambio en las cromátidas hermanas</b>
<b>IdrU</b>	<b>Iododesoxiuridina</b>
<b>IM</b>	<b>Indice mitótico</b>
<b>KCL</b>	<b>Cloruro de potasio</b>
<b>LF</b>	<b>Luz fluorescente</b>
<b>MMC</b>	<b>Mitomicina C</b>
<b>MMS</b>	<b>Metil metano sulfonato</b>
<b>MNNG</b>	<b>N-metil-N-nitro-N-nitroso guanidina</b>
<b>MNU</b>	<b>N-metil-N-nitrosourea</b>
<b>NB</b>	<b>Novoblocina</b>
<b>NCS</b>	<b>Neocarcinostantina</b>
<b>4-NQO</b>	<b>4-nitroquinoleína-1-óxido</b>
<b>PBS</b>	<b>Buffer salino de fosfatos</b>
<b>PGE1</b>	<b>Prostaglandina E1</b>
<b>POR</b>	<b>Porfiromicina</b>
<b>TGP</b>	<b>Tiempo de generación promedio</b>

<b>TPA</b>	<b>12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato</b>
<b>TT</b>	<b>Thiotepa</b>
<b>UV</b>	<b>Ultravioleta</b>

## 1. RESUMEN

Los intercambios en las cromátidas hermanas (ICH) han sido usados ampliamente como un indicador de daño al material genético, sin embargo su significado biológico aún se desconoce. Se han propuesto modelos para explicar el mecanismo de su formación, que pueden ser agrupados en dos categorías: a) Los que consideran que los ICH son producidos mediante lesiones discretas al ADN y que ocurren en el lugar de la lesión. b) Los que proponen que los ICH son causados por un conjunto de lesiones y que por lo tanto el sitio en el que ocurren puede no estar asociado con una lesión en particular. Dentro de este último grupo se encuentra el modelo de Painter (1980). En él se sugiere que la región del ADN en donde se unen los agrupamientos de replicones es el único sitio en el cual puede ocurrir el intercambio de doble cadena durante la síntesis del ADN y hace la predicción de que dado que los rayos x retrasan el inicio de la duplicación, el pretratamiento con radiación ionizante debería disminuir la frecuencia de ICH inducidos por agentes capaces de bloquear el alargamiento de la cadena de ADN, que son los más eficientes inductores de ICH.

El objetivo del presente trabajo fue establecer la validez de este modelo replicativo para la formación de ICH, con base en su predicción.

Para lo cual, se determinó el efecto de la pre-exposición unilateral de ratones a radiación gamma, sobre la inducción de ICH por Mitomicina C (MMC), en células de la médula ósea femoral in vivo. Esta estrategia permite determinar el efecto del pretratamiento en el mismo organismo minimizando la variabilidad de la respuesta entre individuos.

En los resultados obtenidos no se encontró variabilidad significativa entre las frecuencias de ICH, basales e inducidas por radiación gamma o MMC en el mismo individuo. Los organismos que recibieron el pre-tratamiento con radiación gamma, mostraron una reducción de aproximadamente el 30 % en

la frecuencia de ICH, suponiéndose un efecto aditivo de la radiación y la MMC, estos resultados coinciden con la predicción de Painter relacionada con el Modelo Replicativo de formación de ICH sin embargo, no se consideró condición suficiente para su validación. Se discuten estos resultados en relación con otras posibles explicaciones para el efecto inhibitorio antes mencionado.

También se determinaron las consecuencias del pretratamiento con radiación gamma sobre el efecto de la MMC en indicadores de daño citotóxico. El índice mitótico, no mostró efecto y el tiempo de generación promedio, tuvo un efecto aditivo.

## **2. INTRODUCCION**

### **2.1 Definición**

Los intercambios en las cromátidas hermanas (ICH), son transposiciones simétricas en el mismo locus entre las cromátidas de un mismo cromosoma que no producen alteraciones estructurales. La frecuencia de ICH es utilizada como indicador de daño producido al material genético.

### **2.2 Antecedentes**

La existencia de este evento fue inferida por McClintock desde 1938, en un estudio en cromosomas de células de maíz, en el que describió la formación de anillos dicéntricos del doble del tamaño original, distintos a los producidos durante la separación normal en la división celular. Este hecho sólo podía explicarse si había ocurrido división errónea del centrómero ó bien la formación de ICH.

Posteriormente Taylor en 1958, al demostrar que el proceso de duplicación del ADN sucedía de manera semiconservadora, también proporcionó la primera evidencia directa de la ocurrencia de los ICH. En cromosomas en metafase de células de Bellevaria romana, tratadas con timidina tritlada en el primero de dos ciclos de división, observó mediante autoradlografía la presencia de una cromátida marcada y otra sin marcar, así como intercambios recíprocos a lo largo de las cromátidas hermanas.

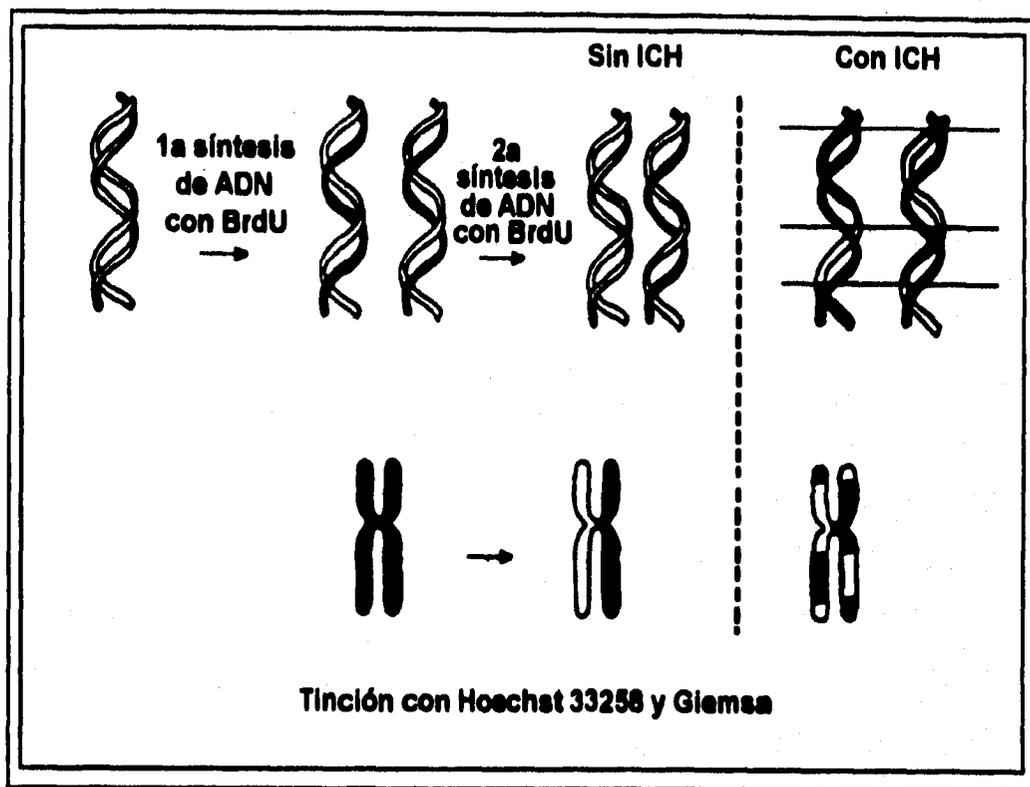
### **2.2.1 Establecimiento de las técnicas para la tinción diferencial de las cromátidas hermanas**

El método autoradiográfico en un tiempo fue la única alternativa para la determinación y el análisis de los ICH, aunque tiene la desventaja de que su resolución es limitada y la timidina tritiada produce ICH per se.

La observación más definida de los ICHs, se logró mediante la incorporación de un análogo de base en el material genético durante dos divisiones celulares sucesivas que es la 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), en substitución de la timidina radioactiva y la tinción del ADN con bibenzimida que fluoresce menos cuando hay BrdU incorporada.

Latt en 1973, describió la técnica, en la que utilizó el colorante bibenzimida 33258 de Hoechst en cromosomas humanos, este colorante normalmente tiene fluorescencia intensa cuando se encuentra unido a poli(dA-dT), pero esta propiedad es disminuída si esta asociado a poli(dA-BrdU) (Latt, 1975). Otros colorantes fluorescentes que también pueden ser utilizados son el naranja de acridina, la proflavina y la quinacrina (Kato, 1974; Benyush y Zelein, 1983). Para lograr la tinción diferencial de las cromátidas hermanas, las células deben atravesar dos ciclos de replicación en presencia de BrdU, este compuesto es integrado dentro del material genético como bromodesoxiuridina monofosfato durante la etapa de síntesis (Zakharov y Egolina 1972; Friedberg, 1985).

La metodología denominada fluorescencia más Giemsa es la más utilizada para obtener la tinción diferencial de las cromátidas hermanas, la cual requiere de la incorporación de BrdU al ADN, así como de la tinción con Giemsa, que es precedida por tinción con Hoechst y exposición a luz natural, ultravioleta (UV) (Wolff y Perry, 1974), o de mercurio (Goto y col. 1975), e incubadas en amortiguador de citrato de sodio. Esta técnica permite obtener preparaciones permanentes que no requieren del microscopio de fluorescencia para su análisis (Figura 1).



**Figura 1**  
**Detección de intercambios en las cromátidas hermanas**  
**por el método de tinción diferencial (Vogel, 1991).**

Con esta metodología es posible que los intercambios ocurridos en la primera división celular queden enmascarados si sucede nuevamente un ICH en el mismo locus durante el segundo ciclo. Para el análisis de la persistencia de las lesiones inductoras de ICH es utilizada la técnica denominada tinción diferencial en tres tonos, la que permite detectar la frecuencia de ICH originados en cada uno de tres ciclos consecutivos de división celular (Schvartzman y Goyanes, 1980; Morales y col., 1987).

### **2.2.2 Sistemas para el análisis de ICH**

El auge en la investigación concerniente a los ICH, partió del establecimiento de las técnicas necesarias para su detección (Korenberg y Freedlender, 1974; Scheres y col., 1977; Takayama y Sakanishi, 1977; Schvartzman y Goyanes, 1980; Becher y Sandberg, 1982), de ellas derivó el análisis en diversos tipos celulares; bajo condiciones tanto in vitro como in-vivo.

En células de mamífero in vitro los ICH han sido observados en linfocitos humanos (Gómez-Arroyo y col., 1981; Honeycombe, 1981; Elizondo y col., 1994), células de rata canguro (Gibson y Prescott, 1972), células fetales de ratón (Raffetto y col., 1979), fibroblastos de pulmón V 79 (Bradley y col., 1979; Kim, y col., 1985), células de pulmón (DON) y de ovario de criceto chino (CHO) (Abe y Sasaki, 1977; Loveday y Latt, 1978; Majone y Levis, 1979; Baker y col., 1983). Estos estudios son simples y relativamente rápidos, sin embargo presentan serios problemas como: la influencia de los componentes del medio, la fotoactivación por luz y la capacidad limitada para la activación metabólica de algunos agentes químicos entre otros.

Se pueden realizar protocolos combinados, en los que la exposición al agente bajo análisis es realizada in vivo y la incorporación de BrdU en las células es in vitro, como es el caso de los trabajos en linfocitos de

conejo y humanos (Huff y col., 1982; Gundy y col., 1984), en médula ósea y bazo de ratón y de criceto chino (Krishna y col., 1987).

El principio de los trabajos in vivo fue marcado por Bloom y Hsu en 1975, quienes determinaron la posibilidad de utilizar este indicador de daño en cromosomas obtenidos de embriones de pollo. También pueden ser analizados en tejidos de pez adulto (Klingerman y Bloom, 1976). A pesar de que la mayoría de los estudios en mamífero in vivo han sido hechos en células de la médula ósea, es posible estudiarlos en células de hígado (Schreck y col., 1979), de bazo (Palitti y col., 1982), de intestino (Blakey, 1985), de glándula salival (Morales, 1980; Morales y col., 1995a), fetales (Kram y col., 1980) y en espermatogonias de rata y ratón (Manyak y Schleiermacher, 1973; Kanda y Kato, 1979; Abraham y Fränz, 1983).

Como se mencionó previamente, para la visualización de los ICH en cromosomas en metafase, es fundamental la incorporación de un nucleótido halogenado en el ADN (Perry y Wolff, 1974; Conner y col., 1978; DuFrain y Garrand, 1981), durante al menos el primero de dos ciclos sucesivos de división celular. Una limitante en los sistemas in vivo la constituyó la rápida metabolización de la BrdU dentro del organismo, por lo que fueron diseñados diversos métodos para asegurar su disponibilidad durante un periodo largo, como: inyecciones intraperitoneales múltiples, infusiones intravenosas o subcutáneas permanentes o la implantación subcutánea de una tableta de BrdU, con lo cual fue posible obtener la tinción diferencial de cromosomas en metafase de espermatogonias, células de la médula ósea, epitelio intestinal, e hígado, (Allen y Latt, 1976; Schneider y col., 1976; Pera y Mattías, 1976; Allen y col., 1977; 1978; King, y col., 1982).

No obstante, estos métodos de administración del análogo de base son complicados, una forma de simplificarlo fue mediante una sola inyección intraperitoneal de BrdU previamente adsorbida a carbón activado, con la que se asegura su liberación continua durante dos periodos de replicación, para el estudio en espermatogonias (Kanda y

Kato, 1979) y en células de la médula ósea y de la glándula salival de ratón (Morales, 1980). Este método tiene características similares a los demás, aunque resulta substancialmente más fácil (Madrigal-Bujaidar y Sánchez-Sánchez, 1991).

Las frecuencias de ICH basales establecidas en cada sistema celular estudiado (Morales y col., 1984b) son dependientes de la incorporación de un análogo halogenado de la timidina al ADN, que pueden ser BrdU, CldU ó IdU (DuFrain y Garrand; 1981) y se define como la cantidad de ICH que se mantiene constante en un rango determinado de concentración de BrdU sin exponerse a otro agente citotóxico, al menos en forma intencional. Se ha observado que esta frecuencia aumenta conforme se incrementa la concentración de BrdU por arriba de cierto límite (Kato, 1974; Tice y col., 1976).

Las condiciones de cultivo y el método de tinción diferencial son dos factores que influyen en la determinación de la frecuencia basal (Davison y col., 1980; Morgan y Crossen, 1981), así como las variaciones genéticas entre diversas cepas de ratones (Nishi y col., 1993). En los sistemas in vitro, las frecuencias de ICH son más altas que en aquellas in vivo (Kram y col., 1979; Gundy y col., 1984).

La frecuencia espontánea fue deducida desde el trabajo de McClintock en 1938, siendo considerada como la cantidad de ICH por célula, que ocurre de manera natural en ausencia de algún agente externo, principalmente BrdU que es inductor de ICH per se.

Por extrapolación en células de meristemos de cebolla, fueron estimados en 0.06 ICH espontáneos por picogramo de ADN por ciclo celular (Gutiérrez y col., 1983). Morales y col. en 1987, evaluaron mediante tinción diferencial en tres tonos en células de médula ósea de ratón in vivo, que la frecuencia espontánea es de 0.15 ICH/cél/ciclo celular. Por lo que infirieron que si no todos, la mayoría de los ICH basales son producidos por la BrdU incorporada.

Se han hecho diversos estudios para establecer la influencia que puede tener la BrdU incorporada al ADN, sobre la inducción de ICH por diversos agentes. En células de médula ósea de ratón *in vivo*, tratadas con radiación ionizante, se observó que la incorporación de BrdU sensibiliza a las células respecto a la inducción de ICH (Morales y col., 1983; 1984a). La posible interacción entre la BrdU con la MMC, que es un agente capaz de producir una alta incidencia de ICH, fue estudiada en linfocitos humanos, células CHO, fibroblastos y médula ósea de ratón encontrándose un efecto aditivo (Ishii y Bender, 1978; Kram y col., 1979; Natarajan y col., 1983; Morgan y Wolff, 1984). Los resultados de los tratamientos con N-Metil-N'-Nitro N-Nitrosoguanidina (MNNG), en células de criceto chino V79 (Popescu y col., 1980) y con Metil Metano-Sulfonato (MMS) en células CHO (Ockey, 1981), mostraron que la incorporación de BrdU disminuye la inducción de ICH debida a estos agentes.

Stetka y Spahn en 1984, obtuvieron evidencia indicativa en células de criceto chino *in vitro*, de que la frecuencia de ICH era determinada por la replicación de las cadenas de ADN ya substituídas con BrdU y no durante la fase de incorporación del análogo de base.

En 1993 Tohda y col., investigaron el papel que desempeña la BrdU en la incidencia de ICH inducida por ácido okadaico, que es un potente promotor de tumores e inhibidor de las proteínas fosfatasa 1 y 2A. Observaron en células CHO-K1 y en células humanas NL3, que los tratamientos prolongados con este agente antes de la incorporación de BrdU no producían ICH, sin embargo si el ácido okadaico era administrado después de la BrdU, la frecuencia resultaba ser dosis dependiente de la concentración del análogo de base, lo que indicó que la presencia de BrdU era esencial para la ocurrencia de estos intercambios. Consideraron como un mecanismo general de acción de la BrdU, que este compuesto dentro de la célula es fosforilado generando BrdUTP, el cual posteriormente se integra al ADN, en donde la cadena que lo contiene puede tener rompimientos de cadena sencilla y presentar sitios lábiles al alcali que

pueden servir como sustratos para la producción de ICH.

### **2.3 ICH como indicador de daño**

La actividad citotóxica de algunos agentes, ha sido detectada utilizando el análisis de ICH bajo condiciones *in vivo*, e *in vitro* (Kato y Shimada, 1975; Latt, 1975; Solomon y Bobrow, 1975; Abe y Sasaki, 1977; Carrano y col., 1978; Raposa, 1978; Bradley y col., 1979; Nakanishi y Schneider, 1979), porque constituye un ensayo rápido, sensible y cuantitativo para detectar agentes que producen daño genético. Además, el conteo de los ICH es simple y reproducible.

En el primer reporte del programa GENE-TOX sobre ICH, se estableció el protocolo que aún es válido para determinarlos en células de mamífero *in vivo* (Latt, y col., 1981). Se deben utilizar ratones de 3 a 6 meses de edad, se han hecho estudios que revelan que la frecuencia de ICH inducida permanece constante durante la edad adulta, sin embargo es reducida de manera significativa en las células de animales viejos, siendo sugerida una alteración gradual de la respuesta celular al daño en el ADN, o la existencia de alteraciones en la estructura de la cromatina asociadas con la edad (Kram y col., 1978; Nakanishi y col., 1979; Das y Sharma, 1983).

El número mínimo de animales por dosis es de tres y el análisis es de aproximadamente 25 células por cada organismo.

Existen ventajas en relación a la utilidad de este indicador de daño:

Es excelente para detectar sustancias que producen aductos en el ADN (Heflich, y col., 1986; Daza y col., 1992), compuestos tanto de acción directa como indirecta que requieren de activación metabólica (Stetka y Wolff, 1976a, b; Ikeuchi y Sasaki, 1981; Abe y Sasaki, 1982) así como, metabolitos mutagénicos en la orina humana (Guerrero y col., 1979). Los ICH pueden ser inducidos por dosis subtóxicas de agentes que dañan al

material genético y no producen cambio morfológico al cromosoma a diferencia de las aberraciones cromosómicas (Latt, 1974; Wolff y col., 1977; Nakanishi y Schneider, 1979).

Es un sistema de prueba que puede ser usado en plantas (Gómez-Arroyo col., 1988a, b), animales e inclusive en poblaciones humanas para monitoreo ambiental de agentes genotóxicos (Pant y col., 1976; Gómez-Arroyo y Souza, 1985; Ostrosky y col., 1991; Gómez-Arroyo y col., 1992; Consebatt y col., 1995), y permite el análisis de células somáticas y germinales (Tsuchimoto y col., 1979; Yokota y col., 1989; Russo y col., 1993; Morales y col., 1994a; Obe y col., 1994).

El resultado positivo para la inducción de ICH, generalmente indica que el compuesto probado es mutágeno y/o carcinógeno y este ensayo da pocos falsos positivos.

No obstante, el análisis de ICH también presenta desventajas: como lo son el efecto aditivo o sinérgico que puede tener la BrdU con el agente y sobre todo, el desconocimiento de su mecanismo de formación y de su significado biológico.

Como los ICH resultaron ser un buen indicador de daño al ADN, también fueron asociados con algunas enfermedades para establecer la sensibilidad que presentan estas células ó bien su capacidad de reparación.

Se ha observado que las frecuencias de ICH, en células de pacientes con la enfermedad de Huntington (Delhanty y col., 1981), o poliomielititis (Bhatnagar y col., 1984) no mostraron diferencias con los valores basales de células normales. En las células de personas con el síndrome de xeroderma pigmentosum y anemia megaloblástica la frecuencia de ICH resultó ser equivalente a las células normales (Kato y Stich, 1976); no obstante, que son muy sensibles a la luz ultravioleta (Bartram y col., 1976; Dee Weerd-Kastelein y col., 1977), así como a algunos agentes químicos (Wolff y col., 1977; Knuutila y col., 1978), presentando frecuencias inducidas muy altas. Se tiene conocimiento de que estas células son

deficientes en procesos de reparación (Wolff y col., 1975). Otro síndrome en el cual se ha relacionado incremento en la sensibilidad y muerte celular por luz ultravioleta es el de Cockayne (Marshall y col., 1980).

Las células provenientes de personas con anemia de Fanconi, progeria, síndrome de Werner, diskeratosis congénita y ataxia telanglectasia muestran respuesta similar a la obtenida en células normales, cuando fueron expuestas a agentes alquilantes (Chaganti y col., 1974; Latt y col., 1975; Hayashi y Schmid, 1975; Galloway, 1977; Novotná y col., 1979; Darlington y col., 1981; Kano y Fujiwara, 1982). En cultivos celulares de carcinoma embrionario, la frecuencia de ICH inducida por MMC fue baja (Fabricant y Hofnung 1979). Sin embargo, el incremento inducido por este mismo agente fue considerable en células de pacientes con anemia megaloblástica (Knuutila y col., 1978) y en líneas celulares caracterizadas por monosomías X ó anomalías estructurales del cromosoma X (Iqbal y col., 1984), así como en células de fibroblastos de pacientes inmunodeficientes (46 BR) (Henderson y col., 1985).

En las células de enfermos con anemia linfocítica, no se encontró relación alguna entre la formación de ICH y la reparación por excisión (Shiraishi y Sandberg, 1979).

En el síndrome de Bloom, que es un padecimiento autosómico recesivo de origen molecular desconocido, la frecuencia basal de ICH que se presenta en sus células, es de aproximadamente de 89 ICH/cél. Esta es más de doce veces la basal promedio en células normales (Chaganti y col., 1974; Bartram y col., 1976; Shiraishi y Sandberg, 1978). No obstante, la frecuencia basal puede ser disminuida si se hibridan con fibroblastos normales, con células CHO-YH21, o con fibroblastos del síndrome de Lesch-Nyhan (Tlce y col., 1978; Bryant y col., 1979; Alhadeff y col., 1980; Rüdiger y col., 1980; Schonberg y German, 1980). El efecto que produce la MMC sobre estas células ha conllevado a la idea de que los ICH involucran preferencialmente regiones homólogas de cromosomas homólogos (Comings, 1975), los hallazgos citológicos son compatibles con deficiencia

en la reparación del ADN, así como algún defecto en la duplicación debido a que es lenta en las células con este padecimiento.

Se tiene conocimiento de que la formación de ICH, ocurre durante o inmediatamente después de la replicación del ADN y se ha sugerido que la horquilla sería el sitio donde se produce este evento genético (Kato, 1977, 1980).

En células de criceto chino, se demostró que la luz UV puede inducir lesiones persistentes en el ADN que darán origen a ICH, únicamente cuando estas células atraviesan por la etapa de síntesis (S). Si estas lesiones son producidas en la fase  $G_1$  y persisten durante S, ocasionan rompimientos cuyos extremos pueden interactuar para formar ICH (Wolff y col., en 1974). En células de meristemas de Allium cepa con su ADN unifilarmente substituidos con BrdU irradiadas con luz visible al comienzo de la fase de síntesis, se observó un incremento considerable en la frecuencia de ICH, que fue disminuyendo conforme avanzaba esta etapa. Se sugirió que los ICH se producen durante la replicación debido a la presencia de lesiones no reparadas (Schvartzman y Gutiérrez, 1980). La disminución en la cantidad de ICH ocasionadas por MNNG, ocasionada al pasar de las fases  $G_1$  a  $G_2$ , confirma que los ICH ocurren durante la síntesis (Renault y col., 1982).

Con el tratamiento combinado en células CHO con 8-metoxipsoralen y luz UV cercano y variando los tiempos de administración durante la síntesis de ADN, se encontró que la inducción del intercambio estaba restringido en regiones que fueron replicadas durante o después del daño al ADN (Latt y Loveday, 1978).

Sono y Sakaguchi en 1988, propusieron la existencia de proteínas en la horquilla de replicación implicadas en la formación de ICH, que aumentan la frecuencia de recombinación entre cromátidas hermanas.

### **2.3.1 Lesiones en el ADN inductoras de ICH**

De todas las lesiones que pueden ocurrir en el ADN, no todas son capaces de desencadenar el proceso de formación de ICH (Reynolds y col., 1979; Sahar y col., 1981).

En células CHO fue probada la capacidad de la MMC, Porfiromicina (POR) y Decarbamoil mitomicina C (DCMMC) para inducir ICH. Los dos primeros agentes son productores de enlaces cruzados intercadena de ADN, cuya única diferencia es el grupo reactivo y el tercero es monofuncional. Los resultados sugirieron que los enlaces cruzados en el ADN contribuyen ampliamente en el origen de este evento, sin embargo no parecen ser los únicos responsables de la formación de los ICH (Latt y col., 1975; Carrano y col., 1979; Novotná y col., 1979; Kano y Fujiwara, 1981). Ishii en 1981 propone a los enlaces cruzados ADN-proteína.

Los monoadductos son otra lesión implicada en este proceso y de ellos se obtuvo evidencia de que su influencia es parcial (Kano y Fujiwara, 1981; Sahar y col., 1981; Linnaimaa y Wolff, 1982).

La alquilación del O<sup>6</sup> de la guanina es considerada una de las lesiones más importantes en la inducción de ICH causados por la MNNG y la N-metil-N-nitrosourea (MNU), siendo al parecer dependiente de las cantidades absolutas presentes en el ADN al momento de la replicación, (Bignami y col., 1987; Kaina y col., 1993).

La probabilidad de que las lesiones ocasionadas por el etil metanosulfonato (EMS) produzcan ICH se incrementa con el postratamiento con afidicolina (AFC), que es inhibidora de la síntesis de ADN y previene la división celular (Nishi y col., 1982)

En células CHO, se ha observado que las endonucleasas de restricción AluI, EcoRI, MspI, PvuII y SmaI, provocan frecuencias altas de ICH, lo que indica que las rupturas de doble cadena causadas por estas enzimas están involucradas en la formación de este evento (Balajee y

Natarajan 1993).

Además de la diversidad de lesiones involucradas en el origen de los ICHs, algunas pueden ser reparadas más rápidamente que otras o ser incluso persistentes y trascender la división celular.

A pesar de ser diferente el tipo de daño causado por 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO), cloruro de vinil, ciclofosfamida (CP), EMS y MMS, las lesiones mostraron ser perdurables por al menos tres ciclos de división celular subsecuentes, en cultivos de linfocitos humanos, en células CHO, así como en células de la médula ósea de ratón *in vivo* (Ishii y Bender, 1978; Linnaimaa y Wolff, 1982; Natarajan y col., 1983; Morales-Ramírez y col., 1988, 1990, 1992, 1995b; Daza y col., 1992; Escalza y col. 1992; Fució y col., 1992).

Se había determinado en linfocitos humanos y en células CHO expuestas a MMC o a radiación ionizante, que la expresión de lesiones inducidas por estos agentes manifestadas como ICH, únicamente ocurrían durante el primer periodo de síntesis (Littlefield y col., 1979;1983; Natarajan y col., 1983). Sin embargo, mediante la técnica de tinción diferencial en tres tonos para el análisis de ICH, fue posible determinar que estos agentes son capaces de producir lesiones persistentes (Morales-Ramírez y col., 1990; Daza y col., 1992). Escalza y col. en 1992, observaron reparación parcial de estas lesiones en células CHO.

La presencia de lesiones persistentes manifiesta que no son reparadas o bien, que su reparación es lenta (Latt y Loveday, 1978; Nagasawa y col, 1982). Una forma de determinar la reparación puede ser a través de la comparación de las frecuencias de ICH inducidas durante la fase G<sub>1</sub> temprana con las inducidas en G<sub>1</sub> tardía, considerando que las primeras tienen más tiempo para remover el daño que produce la formación de ICH, antes de que la célula atraviese por la etapa de síntesis. De esta manera se observó en cultivos de fibroblastos y linfocitos humanos, que las lesiones producidas por mostaza nitrogenada, acetaldehído y acetato de vinilo son reparadas al menos parcialmente, en

tanto que las producidas por adriamicina y MMS no (Lambert y col., 1983; Lambert y col., 1984; He y Lambert 1985).

En células de la glándula salival de ratón *in vivo*, se encontró con este protocolo una disminución de aproximadamente el 35 % en la frecuencia de ICH producidos por MMC, únicamente cuando la exposición al mutágeno ocurrió antes de la incorporación de BrdU en la fase G<sub>1</sub>, así como reparación parcial de las lesiones inducidas por radiación en el ADN substituido con BrdU (Morales-Ramírez y col, 1995a).

## **2.4 Agentes inductores de ICH**

Al parecer existen dos mecanismos de producción de ICH, uno es mediante lesiones que van a causar el ICH en el sitio de replicación y otro es mediante el efecto de algún agente sobre la síntesis de ADN.

Son diversos los agentes químicos y físicos capaces de conducir a la formación de ICH, entre ellos que se encuentran: el suero fetal de bovino (Kato y Sandberg, 1977); drogas químicas, aditivos alimenticios, colorantes, ingredientes de cosméticos (Abe y Sasaki 1977); compuestos carcinógenos (Raffeto y col., 1979); drogas quimioterapéuticas (Abraham y Fränz, 1983; Takeshita y Conner, 1985) y anticarcinógenas (Honeycombe, 1981; Singh y Gupta, 1983); inhibidores específicos de la síntesis de ADN (Ishii y Bender, 1980; Reinaldi y Mariani, 1982); el promotor de tumores 12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (Kinsella y Radman, 1978; Schwartz y col., 1982); el inhibidor de la polimerasa poli(adenosina difosfato ribosa) (Oikawa y col., 1980; Morgan y Cleaver, 1982) y algunas endonucleasas de restricción (Balajee y Natarajan, 1993). Por otra parte, también la combinación de 8-metoxipsoralen y rayos laser ó ultravioleta cercano (Latt y Loveday, 1978; Sahar y col., 1981), el ultrasonido (Liebeskind y col., 1979); la radiación ionizante (Abramovsky y col., 1978; Morales y col., 1984), la temperatura (Kato, 1980) y un antígeno viral para

polioma (Brown y Basilico, 1982), entre otros.

#### **2.4.1 Inducción de ICH por radiación ionizante.**

La mayoría de los experimentos con sistemas biológicos son realizados con radiación ionizante que puede ser x o gamma. La característica más importante de las radiaciones es la liberación localizada de una gran cantidad de energía que puede interactuar con los sistemas biológicos por daño directo o indirecto (Casarett, 1968; Hall, 1994).

Al incidir este tipo de radiación sobre el ADN, existe la posibilidad de que se produzcan diversos tipos de daño como la ruptura de los puentes de hidrógeno, rompimientos de doble cadena, formación de enlaces cruzados y la alteración de las bases nitrogenadas (Casarett, 1968).

El conocimiento de la respuesta celular a los efectos de la radiación, es requerido para comprender las bases genéticas del daño radio inducido. Larner y col. en 1994, con el uso de técnicas moleculares obtuvieron evidencia de que la radiación interactúa sobre la síntesis de ADN mediante inhibición en el origen de replicación.

La radiación ionizante no se había considerado como buen agente inductor de ICH debido a la aparente contradicción en los experimentos reportados, por lo que su eficiencia para producir lesiones persistentes y su expresión subsecuente como ICH fue cuestionada.

Se puede inferir que la eficacia como inductor de ICH esta relacionada con la etapa del ciclo celular en la que ocurre la exposición. Existen reportes en células de criceto chino, de tumor de cerebro de rata (9L) y en linfocitos humanos, en los que observaron baja cantidad de ICH cuando fueron expuestos en las etapas  $G_0$  o  $G_2$ , sucediendo lo contrario si la exposición fue realizada en las etapas  $G_1$  o S (Perry y Evans, 1975; Solomon y Bobrow, 1975; Abramovsky y col., 1978; Littlefield y col., 1979;

Morgan y Crossen, 1980; Renault y col., 1982; Tofilón y Deen, 1984).

Se tiene conocimiento de que los niveles bajos de radiación ionizante son capaces de producir frecuencias altas de ICH. En personas expuestas ocupacionalmente a pequeñas dosis se ha detectado incremento en la cantidad de ICH (Gundy y col., 1984). Dosis tan bajas como 0.36 Gy, inducen un aumento substancial en la frecuencia de ICH en células de la médula ósea de ratón in vivo que habían incorporado previamente BrdU a su ADN. Se ha obtenido evidencia de la persistencia de estas lesiones y la ocurrencia de ICH inducidas por radiación en el mismo locus por dos ciclos sucesivos de división celular (Morales y col., 1983, 1984a, 1988).

El incremento en la frecuencia de ICH ocasionado por la radiación ha sido atribuido a la sensibilización que el análogo de base BrdU provoca sobre la molécula de ADN (Littlefield y col, 1979; Painter y Morgan, 1983; Morales y col., 1984b; Luchnick y col., 1987). Sin embargo es posible aumentar significativamente la frecuencia de ICH aún antes de la incorporación de BrdU (Chao y Rosenstein, 1984; Morales y col., 1984a). Los mecanismos de formación de ICH por radiación son diferentes de los que originan las aberraciones cromosómicas, no siendo posible equiparar los tipos de daño involucrados (Perry y Evans, 1975; Renault y col, 1982; Takahashi y col., 1985).

#### **2.4.2 Inducción de ICH por Mitomicina C**

La MMC es un antibiótico altamente tóxico obtenido de Streptomyces caespitosus, que ha demostrado ser activo en un amplio rango de tumores en animales de experimentación así como en algunas enfermedades en humanos. Antes del aislamiento de la MMC, se habían obtenido otras dos fracciones la Mitomicina A y la Mitomicina B, ambas presentaron actividad antineoplásica y antibacterial, sin embargo la MMC

es la más efectiva (Crooke y Bradner, 1976).

La MMC es un agente alquilante bioreductor bifuncional o trifuncional, inactivo en su forma original y presenta tres grupos potencialmente activos, una quinona, un uretano y un grupo aziridina. Este agente es activado directamente mediante la reducción de la quinona y pérdida subsecuente de grupos metoxi. Un segundo grupo alquilante se manifiesta probablemente en el C-10 y posiblemente un tercero en el C-7 de la molécula de MMC (Figura 2). El ADN puede estar presente durante la reducción y ser alquilado, la activación propuesta es rápida y el intermediario activo es inestable (Crooke y Bradner, 1976; Lett, 1984).

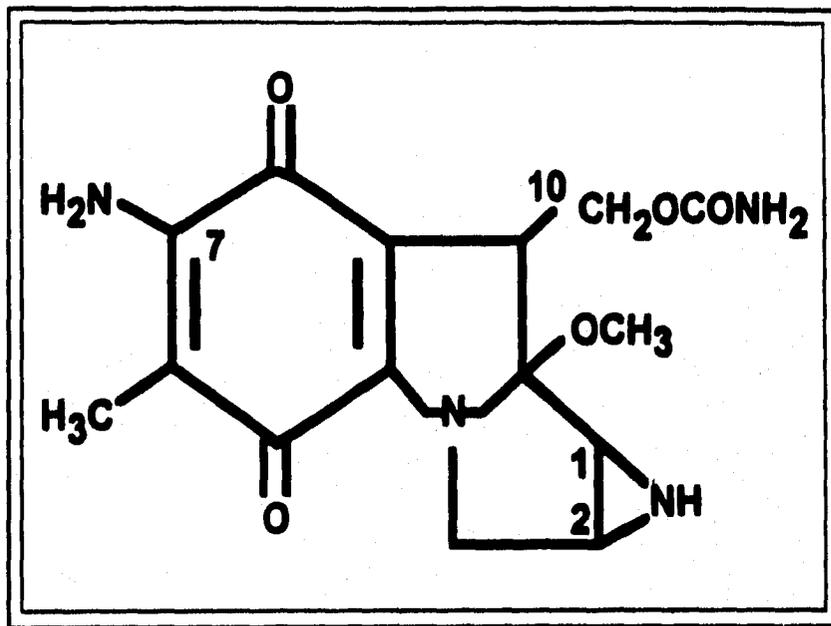
La activación de la MMC in vivo es dependiente del NADPH, pero puede ocurrir in vitro usando ADN aislado e hidrosulfito de sodio. Esta molécula no tiene acción específica sobre alguna etapa del ciclo celular.

La alquilación ocasionada por la MMC, al parecer tiene mayor afinidad por en el residuo del O<sup>6</sup> de la guanina formando aductos estables, en tanto los aductos formados en el N<sup>7</sup> son poco estables.

Además de la alquilación, la inducción de rompimientos de cadena sencilla y la producción de enlaces cruzados intercadena en el ADN, la MMC inhibe la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Lett, 1984; Kornberg y Baker, 1992).

El efecto de esta droga sobre la expresión de varios genes en embriones de pollo se relaciona de manera temporal con la formación de aductos [<sup>3</sup>H]-Porfiromicina-ADN, lo que proporcionó evidencia sugestiva de que los agentes químicos genotóxicos como la MMC tienen un blanco específico y que su efecto es sobre genes inducibles in vivo. Concluyendo que la alteración en la expresión en un gene inducible puede ser usado como marcador de daño al ADN de un gene en particular (Caron y Hamilton, 1995).

Los ICH se han usado como indicadores de daño genético y la MMC es uno de los agentes inductores más ampliamente investigado, se han hecho estudios in vitro en células de criceto chino D-6, CHO, fibroblastos



**Figura 2**  
**Estructura de la Mitomicina C (Crooke y Bradner, 1976).**

de ratón, linfocitos humanos, en células de personas con desórdenes genéticos como Anemia de Fanconi y Diskeratosi congénita, (Kato y Shimada, 1975; Latt y col., 1975; Ishii y Bender, 1978; Kram y col., 1979; Novotná y col., 1979; Kano y Fujiwara, 1981, 1982; Linnainmaa y Wolff, 1982), e *in vivo* en células fetales y maternas (Henderson y col., 1985), en espermatogonias, en células de la médula ósea y de la glándula salival de ratón y en criceto chino en células de la médula ósea y bazo (Allen y Latt, 1976; Morales y col., 1984b, 1995a). Aparentemente las células de ratón tienen más sensibilidad a los efectos de la MMC que las de criceto chino (Krisna y col., 1987).

Se conoce que este agente químico es productor de enlaces cruzados, lo que presumiblemente indicaría que fueran los responsables de la formación de los ICH, sin embargo, los estudios en células que presentan deficiencia en la reparación de este tipo de lesión, como las procedentes de pacientes con Anemia de Fanconi y Xeroderma pigmentosum, mostraron una respuesta normal de inducción de ICH por MMC y por lo tanto, fue sugerido que los enlaces cruzados no eran los únicos responsables de este suceso (Latt y col., 1975; Carrano y col., 1979; Novotná y col., 1979), otro daño también implicado al menos parcialmente son los monoadductos (Kano y Fujiwara, 1981; Linnainmaa y Wolff 1982).

Se ha especulado que la alquilación del O<sup>6</sup> de la guanina podría ser una de las lesiones por las cuales la MMC causa ICH (Kaina y col., 1993). Ishii en 1981 propuso como hipótesis alternativa, al enlace cruzado ADN-proteína y argumentó la importancia de las proteínas como sitio reactivo para la MMC.

La MMC administrada en linfocitos humanos y en células CHO en etapa G<sub>0</sub>, indujo lesiones no perdurables expresadas solamente en el primer ciclo de división celular (Littlefield y col., 1983; Natarajan y col., 1983) considerándose la existencia de reparación eficiente (Linnainmaa y Wolff, 1982). No obstante, se obtuvo evidencia de la persistencia de las

lesiones inductoras de ICH producidas por MMC, durante generaciones subsecuentes en cultivos de linfocitos humanos y en células CHO (Ishii y Bender, 1978; Schwartzman y col., 1985; Daza y col., 1992; Escalza y col., 1992), así como en linfocitos de conejo y en células de la médula ósea de ratón *in vivo* (Stetka y col., 1978; Russo y col., 1993). Mediante la técnica de tinción diferencial de las cromátidas hermanas en tres tonos, se observó que el daño inducido por MMC es persistente con propensión a ser parcialmente reparado (Morales y col., 1990).

Comings en 1975, consideró que los ICH podían estar involucrados con la reparación post-replicativa sin embargo, si los ICH estuvieran implicados al administrar en pre-tratamiento o post-tratamiento cafeína, que es un inhibidor de este tipo de reparación, se esperaría disminución en la frecuencia de ICH ocasionada por mutágenos como el EMS, MMS, dimetilsulfato (DMS); 4NQO, tiotepa (TT) y MMC, lo cual no sucedió, por lo que se descartó esta hipótesis (Palitti y Becchetti 1977; Shiraishi y Sanberg 1980).

En linfocitos de pacientes con cáncer cérvico uterino, las frecuencias de ICH basales e inducidas con MMC mostraron aumento en relación con el estado de severidad del cáncer. No obstante, no se ha encontrado alguna relación entre los ICH y la predisposición al cáncer, por lo que el uso de este indicador de daño genético no parece ser recomendable como marcador preclínico (Yokota y col., 1989).

Se observó que el post-tratamiento con carbolinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  o  $\gamma$  administradas en dosis no clastogénicas durante la fase S, causan una disminución estadísticamente significativa en la frecuencia de ICH ocasionada por MMC. Se sugirió que el efecto supresor radica en la estructura de estos compuestos y puede ser debido a la inhibición de la replicación del ADN (Sasaki y Shirasu, 1993).

Los ICH inducidos por MMC en linfocitos humanos, fueron reducidos por la prostaglandina E1 (PGE1) en dosis de  $10^{-6}$  y  $10^{-9}$  M, este resultado puede indicar que la PGE1 modifica el efecto del daño al ADN y tal vez

previene el inicio del proceso carcinógeno (Ekmekci y col., 1995).

## **2.5 Modelos de formación de ICH**

A pesar de que los ICH son un buen indicador de daño citogenético, aún no han sido establecidos sus mecanismos de formación y su posible significado biológico, por lo que se han propuesto diferentes modelos para explicarlos.

Estos modelos se pueden dividir en dos grandes grupos dependiendo de la asociación del ICH con el lugar en donde son producidas las lesiones.

Unos proponen que los ICH son causados por lesiones discretas que se producen en el sitio de la lesión o en un lugar próximo a ella (Kato, 1977; Shafer, 1977; Ishii y Bender, 1980; Morales-Ramírez y col., 1990) y otros manifiestan que son lesiones múltiples las que desencadenan el proceso y por lo tanto, el sitio en que ocurren los ICH posiblemente no está asociado con una lesión en particular (Painter, 1980; Cleaver, 1981; DuFrain, 1981).

### **2.5.1 Modelo de Kato (1977)**

Este autor realizó un estudio en células de criceto chino D-6 en las que indujo ICH con luz fluorescente (LF), previa incorporación de BrdU al ADN. Estableció la existencia de dos mecanismos mediante los cuales podían formarse el ICH.

En el primero de ellos se necesita un rompimiento de cadena sencilla, inducido por LF en la región pre-replicativa cercana al punto de replicación ó directamente en la horquilla, considera la posibilidad de que el extremo libre de alguna forma lleve a cabo el intercambio con la cadena de replicación discontinua con ayuda de la maquinaria de replicación y la

separación temporal de las histonas del punto de replicación para facilitar esta interacción. Siendo estrictamente indispensable para la formación de ICH la ocurrencia de dos rompimientos, uno debido a la LF y el otro de manera espontánea en la cadena de crecimiento discontinuo, ambos en cadenas paralelas.

La segunda alternativa puede suceder si de alguna manera es interrumpida la reparación normal del daño ocasionado al ADN por LF, ocurriendo exclusivamente en regiones post-replicativas. La formación de ICH precisa de dos rompimientos escalonados o bien de la yuxtaposición de las dos cromátidas hermanas y el transitorio desplazamiento del extremo libre de la cadena sencilla en el sitio de ruptura facilitando la interacción de dos moléculas de ADN.

El evento siguiente a los pasos iniciales en los dos mecanismos es la generación de un heteroduplex, propuesto para recombinación bacteriana, que debe transformarse en un intercambio de doble banda (ICH).

El modelo no explica el mecanismo a nivel molecular y solamente considera rompimientos de cadena sencilla como principal lesión para inducir ICH. Tampoco ha sido establecida cual de las dos opciones sucede, siendo altamente especulativos los procesos involucrados en este evento.

### **2.5.2 Modelo de Shafer (1977)**

Este modelo está sustentado en el conocimiento de que el ICH es un intercambio de doble banda que se realiza durante la síntesis, que ocurre con frecuencia entre los segmentos replicativos y que las dosis bajas de agentes productores de enlaces cruzados producen alta incidencia de ICH.

El autor explica que los ICH son un mecanismo de evasión de enlaces cruzados presentes en el ADN, que permite continuar el proceso de replicación del material genético.

En la replicación bidireccional, cuando las cadenas nacientes

avanzan a lo largo de las cadenas parentales opuestas hacia un enlace cruzado, puede crearse una tensión distorsionante y haber un desplazamiento de las cadenas complementarias o de lo contrario terminaría la duplicación de manera prematura, siendo opcional una incisión enzimática y habiendo reunión de los extremos libres de las cadenas desplazadas (Figura 3).

En este proceso (Figura 4) se produce una pequeña región heteroduplex en donde las cadenas progenitoras se traslapan, ocurriendo con más frecuencia en zonas repetidas de ADN. Este modelo no representa un mecanismo de reparación de enlaces cruzados, porque la lesión continúa en la cromátida y podría reiniciar el mecanismo de inducción de ICH por desvío de la duplicación en la célula hija, a menos que este enlace sea removido por un proceso independiente de reparación post-replicativa.

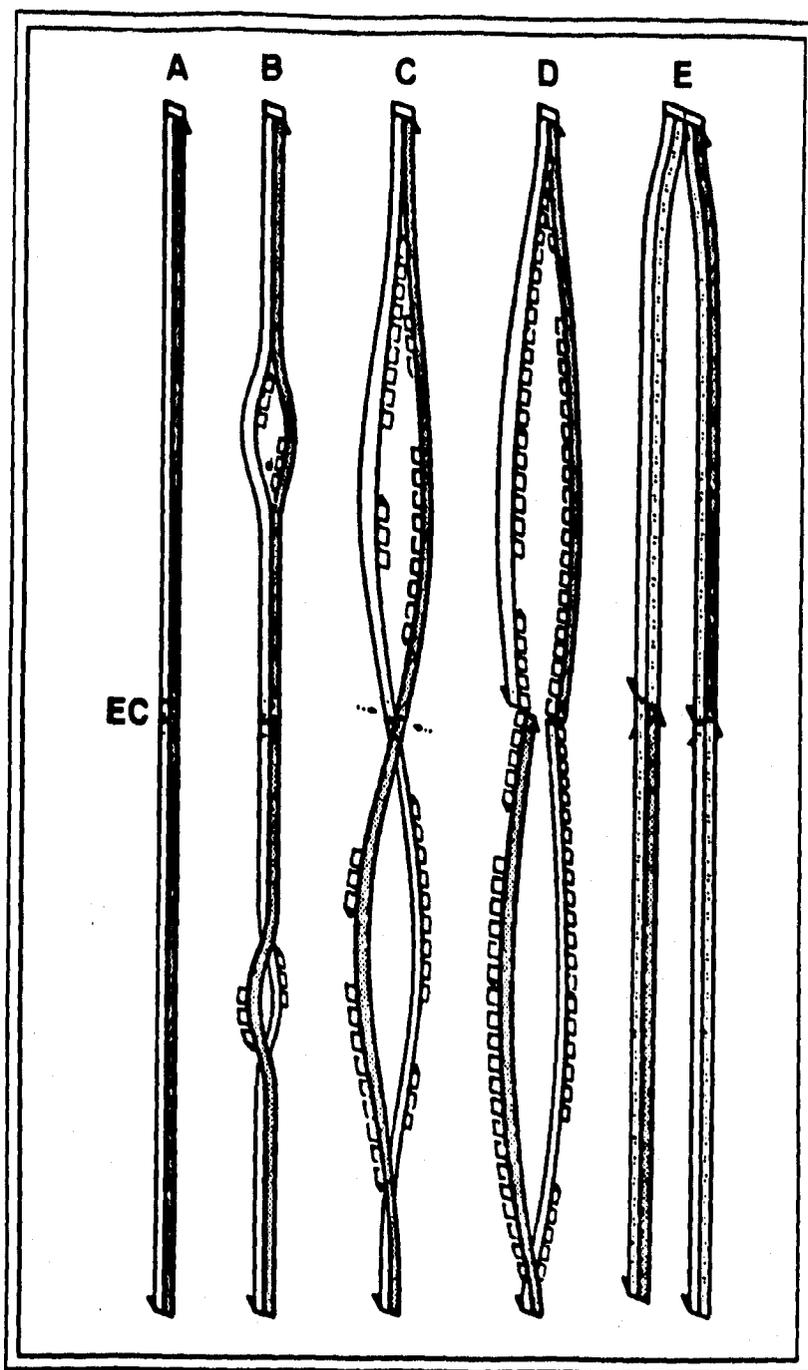


Figura 3

Modelo de Shafer (1977)

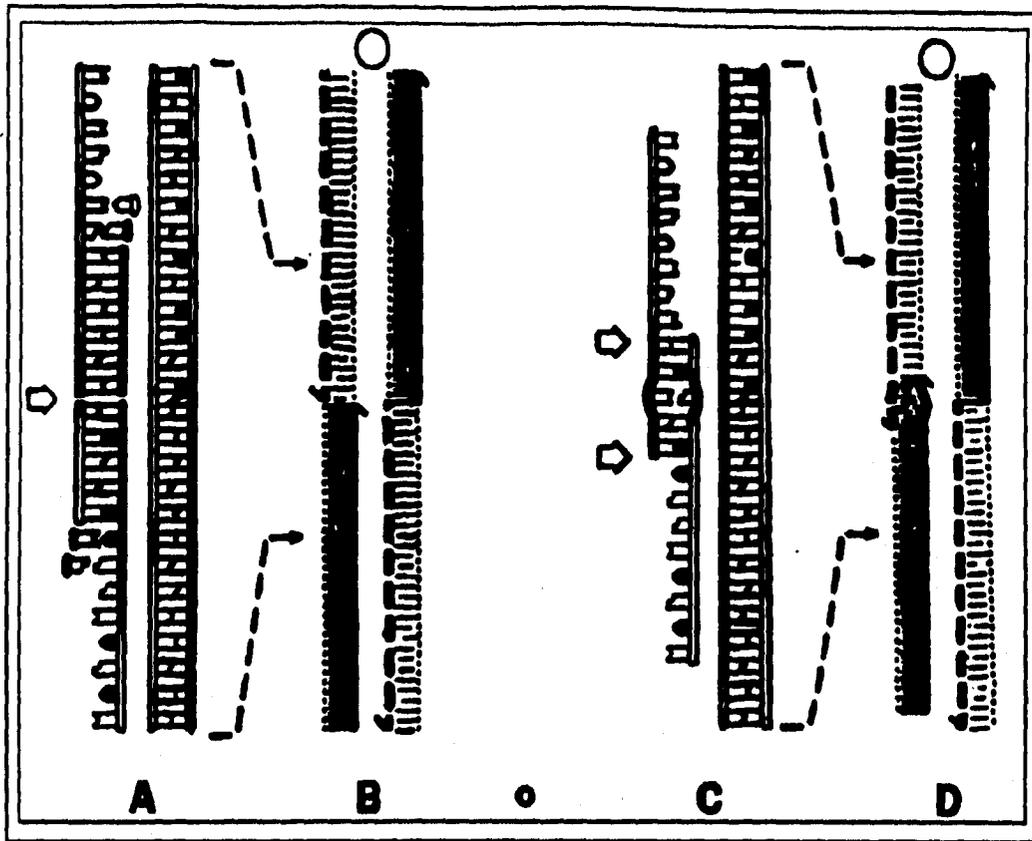
**A:** Duplicación bidireccional, la cadena sombreada b' está marcada con timidina y la cadena a' se encuentra marcada con BrdU. EC representa un enlace cruzado, o o' indican los orígenes de dos replicones.

**B:** Inicia la replicación bidireccional y las cadenas nacientes d y c' se sintetizan hacia el EC sobre las cadenas progenitoras b y a'.

**C:** Al mismo tiempo que las cadenas d y c' avanzan a lo largo de la horquilla, las regiones opuestas son sintetizadas con los fragmentos de Okasaki representados con las cadenas c y d'. Al aproximarse las cadenas c y d' al enlace cruzado se da una competencia paralela con las progenitoras a y b' en el punto de tensión (flechas). En este momento la replicación normal se detendría por la presencia del EC. El mecanismo que propone Shafer puede ocurrir para continuar la síntesis mediante dos eventos: desplazamiento y reunión. Las flechas marcan el lugar en donde ocurre el desplazamiento cuando las cadenas d y c' alcanzan el EC.

**D:** Se completa el mecanismo cuando d y c' terminan su replicación en el sitio del EC y los nuevos fragmentos c y d' se inician desde el punto de ruptura de esta forma las cadenas quedan en correcta polaridad para unirse de manera similar al proceso de ligamiento en los fragmentos de Okasaki.

**E:** Después de la replicación quedan dos cromátidas en las cuales la mitad de cada una de ellas está substituida con BrdU unifilarmente y la otra bifilarmente.



**Figura 4**

**Proceso alternativo de reunión en el mecanismo de replicación desviada**

**A:** Representa en detalle la estructura de la etapa D perteneciente a la figura 4. En este proceso las cadenas progenitoras opuestas se reúnen por el ligamiento terminal (en donde indica la flecha) mediante la formación de fragmentos de Okasaki nacientes.

**B** Las bases sombreadas representan la incorporación de timidina, estas permiten la tinción oscura en metafase.

**C:** Muestra la reunión por complementación aberrante (entre los sitios marcados por las flechas). El traslapamiento de las cadenas progenitoras puede darse en regiones de secuencias similares o repetidas que producen segmentos heteroduplex.

**D:** Cuando esto ocurre la estructura resultante en metafase puede producir pérdida de bases o errores mutacionales en las cópias hijas.

### **2.5.3 Modelo de Ishii y Bender (1980)**

Para proponer este modelo los autores realizaron un experimento en células de criceto chino de la línea V79 B-1, en el cual observaron el efecto de inhibidores de la síntesis de ADN como la hidroxilurea (HU); la 1-b-D-arabinofuranosilcitosina (ara-C); AFC; 2',3'-didesoxitimidina-trifosfato (ddTTP), neocarcinostantina (NCS), novobiocina (NB) y cicloheximida (CHX), en la frecuencia de ICH, así como el efecto de estos compuestos en los ICH inducidos con luz ultravioleta (UV).

Las frecuencias de ICH ocasionadas por el tratamiento combinado de HU, ara-C ó APC con luz UV, mostraron en las gráficas de dosis versus el número de ICH por célula un comportamiento sinérgico y equivalente a la frecuencia de ICH presentada por el tratamiento con los inhibidores únicamente, lo que dejó vislumbrar la posibilidad de que estos ICH tuvieran como origen un mecanismo similar. Siendo posible que la elongación de la cadena sea el paso sensible que tienen en común ambas frecuencias de ICH.

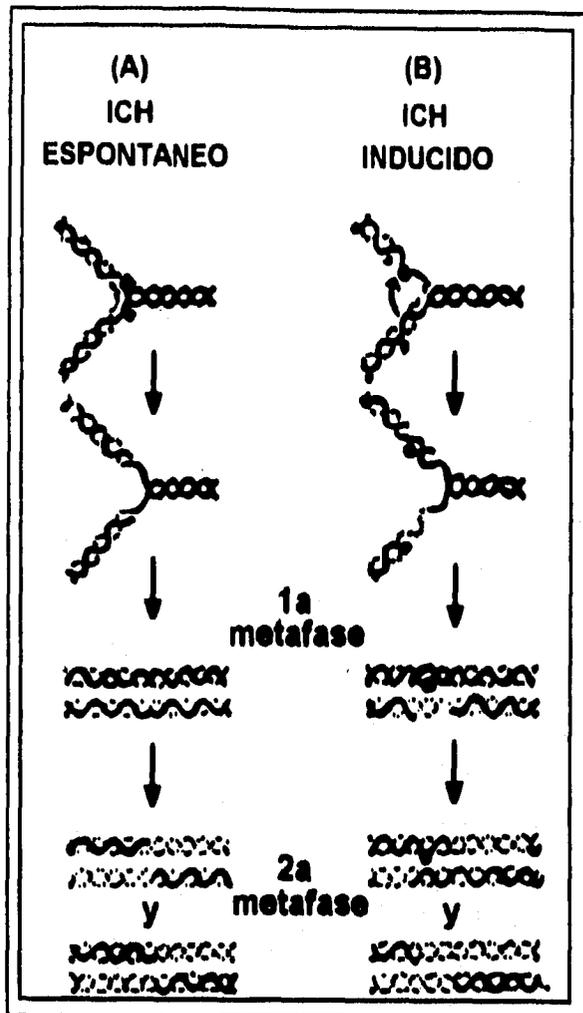
La DdTTP, NCS y NB no mostraron aumento sobre la frecuencia de ICH. La CHX produjo disminución en la frecuencia de ICH y más drásticamente en la frecuencia inducida con luz UV. Existe evidencia de que el tratamiento con cicloheximida en células eucariontes detiene la síntesis de proteínas, lo que causa una inhibición de la duplicación del ADN, así como en la síntesis de histonas asociadas con la cadena de elongación.

Al modelo de formación de ICH producido por el inhibidor le denominaron ICH espontáneo (Figura 5 A). Postularon que la cadena progenitora se puede romper ocasionalmente en la horquilla de replicación y que algunas veces los extremos resultantes se reúnen con las cadenas hijas recién sintetizadas que tienen la misma polaridad. En células con síndrome de Bloom estos eventos pueden ocurrir con más

frecuencia.

El mecanismo del modelo para ICH inducido llamado así al ICH ocasionado por el tratamiento combinado (Figura 5 B), es similar al de ICH espontáneo. Cuando una cadena de ADN porta un dímero producido por luz UV, se forma un hueco en la cadena hija opuesta al daño, éste es reparado usualmente por la síntesis de novo post-replicativa, que no daría origen a un ICH. Sin embargo de manera eventual podría suceder que la cadena progenitora portadora del daño cercano a la horquilla de replicación se rompiera cerca del extremo libre de la cadena hija recién sintetizada de la misma polaridad y se complementara con ella (Figura 6).

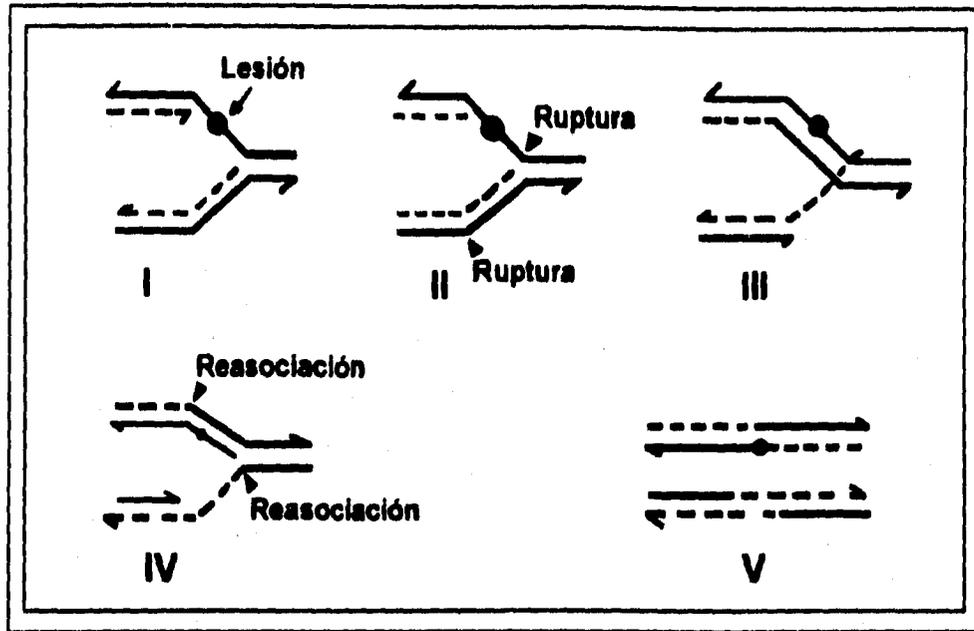
Como se había mencionado, la CHX altera la síntesis de proteínas e inhibe la actividad de la maquinaria de replicación incluyendo la función de la ADN-girasa. Los autores consideraron relevante a esta enzima implicada posiblemente en la disminución de ICH. Estimaron que el desenrollamiento de la doble hélice de ADN a través de la progresión de la horquilla de replicación produce una torsión positiva superhelicoidal en las regiones pre-replicativas del ADN y que la actividad de la ADN girasa podría eliminar esta torsión. Sería posible explicar el por que los ICH ocurren con más frecuencia en las uniones entre heterocromatina y eucromatina, en términos de que el ADN en la heterocromatina es de replicación tardía y existe la posibilidad de acumulación de más torsión en estas regiones, dando oportunidad de participación a la ADN-girasa, debido a que tiene la capacidad de romper y reunir las moléculas de ADN de doble cadena.



**Figura 5**

**Modelos de formación de ICH espontáneo (A), e inducido (B)**

Las líneas punteadas representan las cadenas substituidas con BrdU y las líneas continuas las no substituidas. Los símbolos  $\odot$  y  $\Delta$  indican el daño (dímero) y la ruptura respectivamente (Ishii y Bender, 1980).



**Figura 6**

**Modelo de Ishii y Bender (1980)**

**I: Bifurcación del ADN durante la síntesis; hueco (gap) en la cadena hija a nivel de la porción dañada.**

**II: Ruptura de las bandas progenitoras dañada y no dañada.**

**III: Reasociación de la banda progenitora dañada con la cadena hija recién sintetizada de la misma polaridad.**

**IV: Reasociación de la cadena progenitora no dañada con la cadena hija de la misma polaridad.**

**V: Intercambio de doble banda (ICH).**

#### **2.5.4 Modelo de Morales y col., (1990)**

El modelo se basa en la información obtenida, mediante un protocolo que permite la evaluación de la persistencia de las lesiones que darán origen a ICH y de la frecuencia con que ocurren en un mismo locus en divisiones sucesivas. Emplearon el método de tinción diferencial en tres tonos, en células de la médula ósea de ratón in vivo, para determinar el destino de las lesiones involucradas en la formación de ICH, después del tratamiento con MMC ó con CP. La inducción de ICH por ambos agentes fue cercana a la frecuencia esperada en dos divisiones celulares subsecuentes, suponiendo una probabilidad de expresión del 50 %. Esta sería la probabilidad con que el intermediario de Holliday daría lugar al ICH, partiendo de la base de que este intermediario tiene dos opciones de solución y sólo una da lugar al intercambio de doble banda. La frecuencia de ICH que ocurrió en el mismo locus fue más baja que la esperada, sugiriendo que hubo reparación. Los resultados fueron comparados con datos obtenidos previamente, mediante la exposición a rayos gamma, observaron que la persistencia y tenacidad de las lesiones inducidas con este agente físico es del 100 %.

Ellos proponen que los ICH están relacionados con un proceso que permite a la célula sintetizar ADN en presencia del daño y que la formación de ICH ocurre cerca o en el sitio de la lesión. Las observaciones anteriores permitieron la proposición de un modelo para el ICH, mismo que está basado en el de recombinación de Holliday y el de reparación post-replicativa (Figura 7).

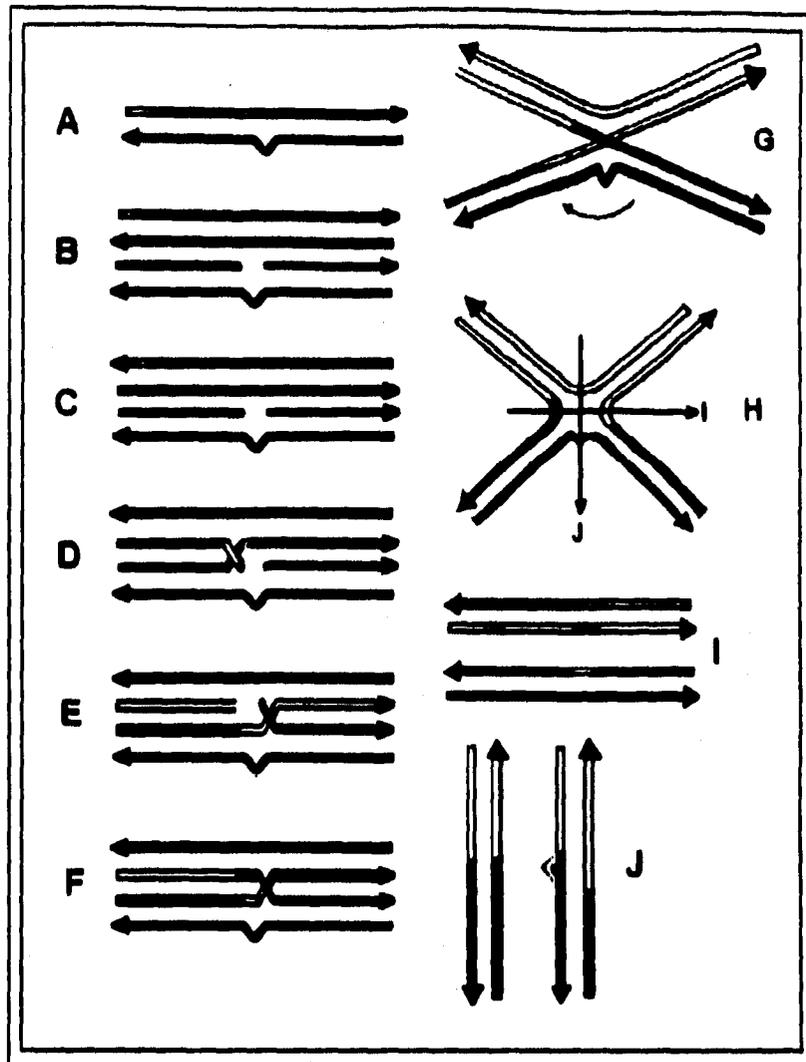


Figura 7

Modelo de Morales y col. (1990)

El proceso se inicia por la presencia de lesiones que impiden la duplicación en la zona dañada (B), lo que favorecería la recombinación de cadenas sencillas de igual polaridad (C y D). El intercambio de banda sencilla se desplazaría al otro extremo de la zona dañada (E), abriéndose desde ese momento la posibilidad de que la zona no duplicada, debido a la presencia de la lesión pueda duplicarse a partir de la banda complementaria recién sintetizada (F). Después este complejo se resolvería de acuerdo con Holliday. Finalmente, dependiendo del sentido en que se rompiera el complejo Chi, se podría dar lugar a la recombinación de un segmento pequeño de cadena sencilla (I), o al intercambio de doble banda (J).

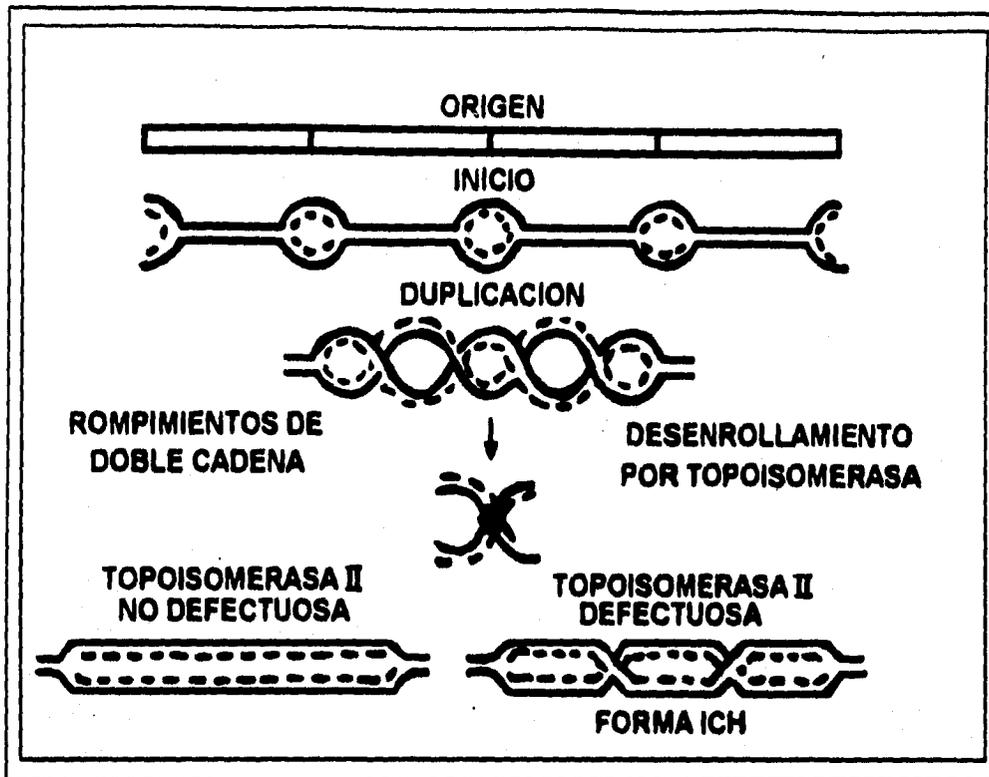
### **2.5.5 Modelo de Cleaver (1981)**

En el modelo de Cleaver el tamaño de los replicones esta relacionado en la formación de ICH. Estudió la relación entre el tamaño de los replicones y la frecuencia de estos intercambios en diferentes líneas celulares. Utilizó células transformadas con el virus SV 40 para aumentar el tamaño de los replicones y una metodología que le permitió medir la distancia promedio entre los orígenes de replicación.

Los datos observados mostraron una relación proporcional entre el tamaño del replicón y la frecuencia de ICH, es decir que las células que tenían sus replicones más grandes presentaron una frecuencia basal mayor de ICH. El autor aseveró que en tanto sea mayor la unidad replicativa, más grande será la tendencia de incrementar el nivel basal de ICH. Por lo que los ICH son debidos a errores en el desenrollamiento de la doble hélice, producidos por las topoisomerasas I y II que originan rupturas y reasociaciones de doble cadena. Estos errores causan intercambios detrás de la horquilla de replicación y no en ella.

Consideró que las células cuyos orígenes de replicación están más cercanos entre sí y las células con pequeños replicones necesitarían menos topoisomerasas para desenrollar el ADN, lo que daría menor oportunidad para que estas enzimas tuvieran errores en las reasociaciones para producir ICH espontáneo, en comparación con las células con replicones de mayor tamaño.

Propuso que la presencia de un daño no reparado en la doble cadena al momento de la replicación podría interferir en el reconocimiento y función normal de las topoisomerasas de tal manera que las cromátidas hermanas son reunidas en forma errónea originando el ICH (Figura 8).



**Figura 8**

**Modelo de Cleaver (1981)**

**Posible mecanismo de producción de ICH. Se postula que la cadena de ADN se desenrolla por la acción de una topoisomerasa que rompe y reúne al ADN de doble cadena. Algunos daños al ADN podrían alterar la función de esta enzima y causar errores en la reunión de las cadenas, lo que puede tener como consecuencia la formación de ICH. La enzima defectuosa produciría ICH y la normal no.**

### **2.5.6 Modelo de DuFrain (1981)**

Más que un modelo formal es una "hipótesis conformacional" sobre el mecanismo de producción de ICH e hizo referencia a la carencia de un modelo adecuado para explicar su formación.

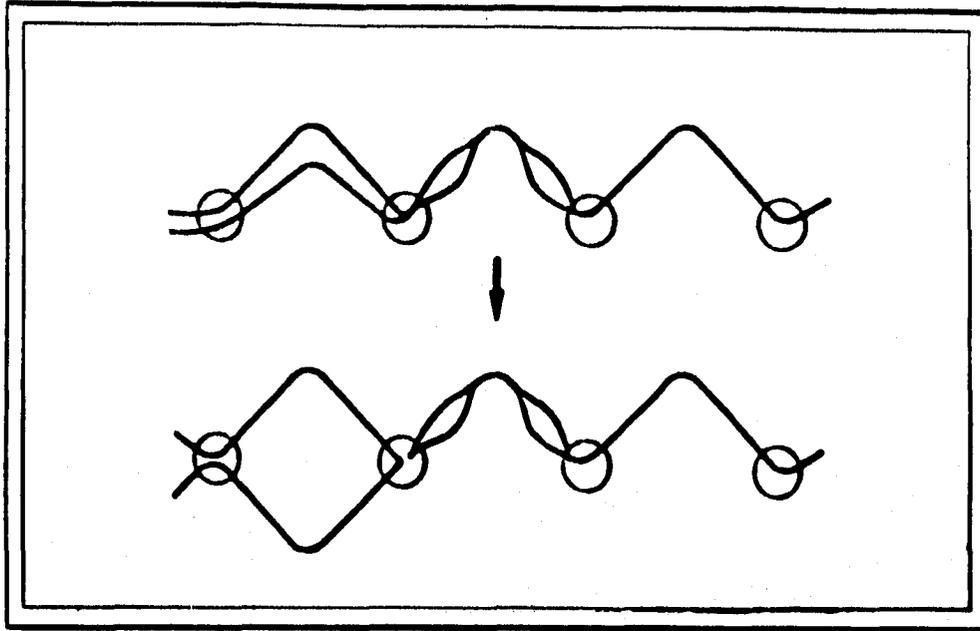
En esta hipótesis el autor considera que al momento de la duplicación las alteraciones presentes en la conformación molecular en el ADN, causadas por las lesiones produciría tensión durante la síntesis, misma que podría aliviarse con el intercambio de doble banda, dando lugar al ICH. Esto podría suceder en la horquilla de replicación o en la unión de replicones. Los ICH resultantes no son causados por lesiones individuales específicas, pero son manifestaciones de la suma total de cambios ocurridos en la configuración del ADN. Lo que significa la existencia de múltiples vías moleculares posibles, que permiten la formación de ICH durante la replicación. Y por lo tanto, la frecuencia de ICH observados en los cromosomas en metafase son producto de la adición de diversas alteraciones que generan cambios de disposición en las moléculas de ADN.

### **2.5.7 Modelo de Painter (1980)**

Este autor propone que los ICH no se presentan en el sitio en donde se encuentran las lesiones e hizo patente que los ICH están situados entre las uniones de las subunidades estructurales. Había observado que solamente una pequeña fracción del daño ocasionado por luz UV era capaz de producir ICH, con una relación de 1 ICH en 20,000 lesiones. Asumió que la cantidad de lesiones causadas al ADN es mayor en relación con los ICH inducidos, por lo que si el número de ICH fuera cercano al total de sitios dañados, la presencia de este evento no sería observable al microscopio de tal manera que en lugar de visualizar regiones claras y oscuras, el cromosoma se vería todo gris.

La subunidad central en este modelo es el replicón, que es la región que contiene cada inicio de replicación del ADN. Painter sugirió que los ICH ocurren en la región del cromosoma en donde estas subunidades se unen. Se encuentra sustentado en la idea de que un conjunto de lesiones pueden bloquear y retardar la progresión de la síntesis en los puntos de crecimiento y alterar el tiempo de replicación de los agrupamientos contiguos de replicones. El ADN en estas uniones no es replicado durante algún tiempo, lo que incrementa la probabilidad de que suceda un rompimiento de doble banda en el sitio de unión después de que el conjunto de orígenes de replicación ha terminado este proceso (Figura 9). Si esto sucede, existe la posibilidad de que las cadenas hijas replicadas se unan aleatoriamente con las cadenas progenitoras de la misma polaridad de los replicones con duplicación tardía. Cuando la replicación de este último conjunto finalice, el proceso de ligamiento entre las cadenas restantes en el sitio de unión completaría el intercambio de doble banda de manera azarosa (Figura 10).

Consideró, que los agentes como la MMC o la luz UV, que bloquean y retardan parcialmente el alargamiento de la cadena de ADN durante la replicación, producen más ICH, en comparación con los agentes que inhiben el inicio de la duplicación como los rayos x ó gamma en dosis relativamente bajas (100-500 rads) e hizo la predicción de que el pretratamiento con radiación ionizante debería disminuir la frecuencia de ICH inducidos por un agente capaz de bloquear la progresión de la síntesis.

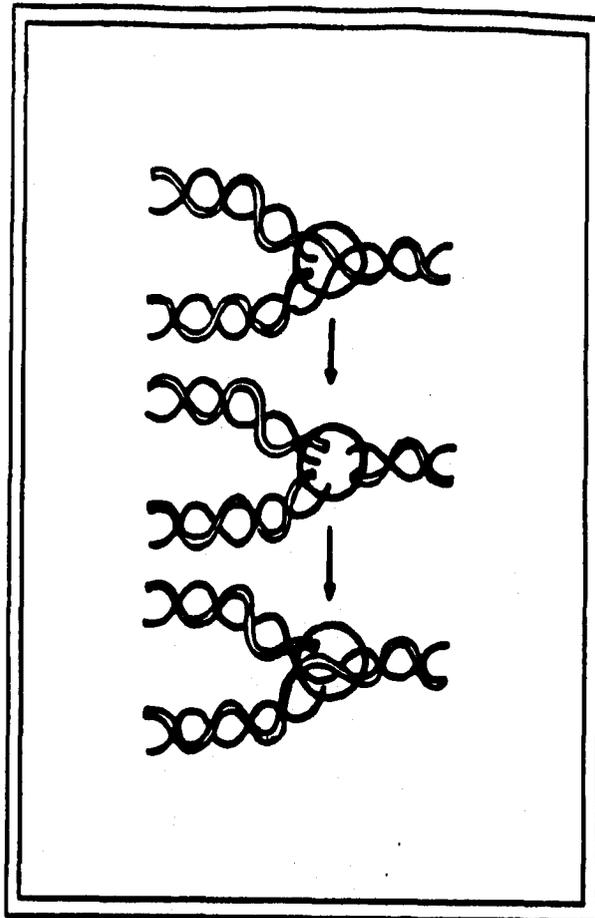


**Figura 9**

**Modelo de Painter (1980)**

**I: Progresión de la replicación del ADN entre los agrupamientos de replicones.**

**II: Retardo en la replicación debido al daño e incremento de la posibilidad de intercambio de doble banda en el sitio de unión entre el grupo total y el parcialmente replicado.**



**Figura 10**

**Intercambio de doble banda en la unión entre los agrupamientos de replicones**

**El intercambio observado al final del diagrama se da entre las cadenas hijas recién sintetizadas de los orígenes replicados y las cadenas progenitoras del agrupamiento no replicado. El sistema responsable de la unión del ADN en este sitio completará el ICH (Painter, 1980).**

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

El objetivo de este trabajo es establecer la validez del modelo replicativo para la formación de intercambios en las cromátidas hermanas propuesto por Painter (1980), determinando el efecto de la radiación gamma sobre la inducción de ICH producida por Mitomicina C, en células de la médula ósea de ratón in vivo.

#### **3.2 Objetivos particulares**

Para cumplir lo anterior, fue necesario comparar la frecuencia de ICH ocasionada por MMC, en las células de la médula ósea femoral de la extremidad irradiada con la extremidad no irradiada en cada ratón, por lo que se tuvo que determinar:

- a) La variabilidad en la frecuencia basal de ICH en las células de la médula ósea femoral entre las extremidades de cada animal.
- b) La variabilidad de la frecuencia de ICH inducidos por radiación gamma o por MMC, en las células de la médula ósea femoral de cada una de las extremidades en cada animal.
- c) El efecto del pretratamiento con radiación gamma sobre la inducción de ICH causada por MMC en las células de la médula ósea de cada animal.

**d) El efecto del pretratamiento con radiación gamma sobre el tiempo de generación promedio (TGP) y el índice mitótico (IM) causado por MMC.**

## **4. MATERIALES Y METODOS**

### **4.1 Protocolos**

La estrategia del estudio se basa en la determinación del efecto del pretratamiento con radiación gamma sobre las frecuencias de ICH, producidas por MMC, en células de la médula ósea femoral en el mismo animal. Para lo cual a un grupo de ratones se les administró MMC, después de haber irradiado la extremidad posterior izquierda, de tal forma que el fémur derecho representa el tratamiento solamente con MMC y el fémur izquierdo el tratamiento combinado, reduciendo con esto la variabilidad de la respuesta entre individuos.

El experimento se dividió en tres etapas, en las que se determinó:

4.1.1) La variabilidad en la frecuencia basal de ICH entre las extremidades de cada organismo.

4.1.2) La variabilidad de la frecuencia de ICH inducidos por radiación gamma o por MMC entre las extremidades de cada organismo.

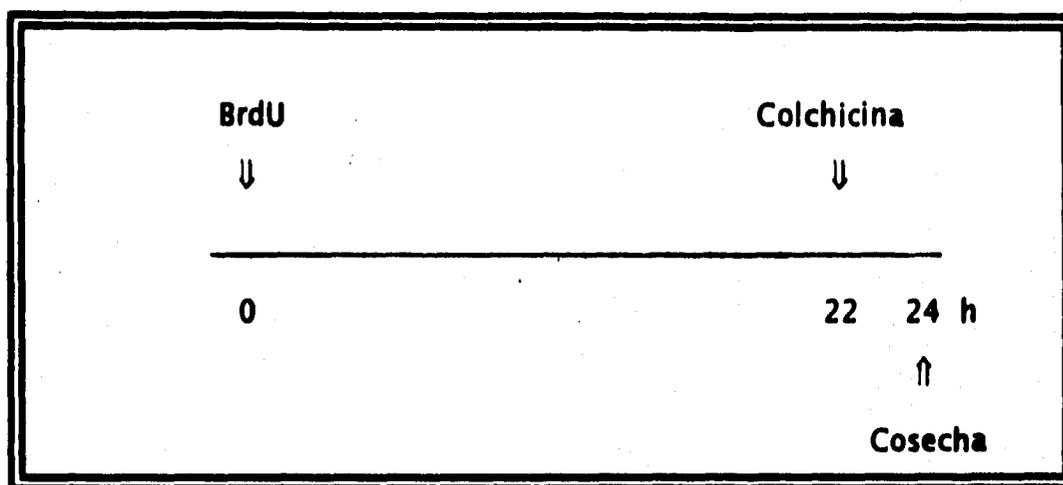
4.1.3) El efecto del tratamiento combinado de radiación gamma y MMC.

Además se determinaron los valores basales y el efecto citotóxico debido a los diferentes tratamientos, en términos del IM y el TGP.

#### 4.1.1 Protocolo de la primera etapa

A los animales se les administró BrdU al inicio del experimento, colchicina 22 horas después y dos horas más tarde fueron sacrificados. La cosecha de las células de la médula ósea de cada fémur se realizó por separado.

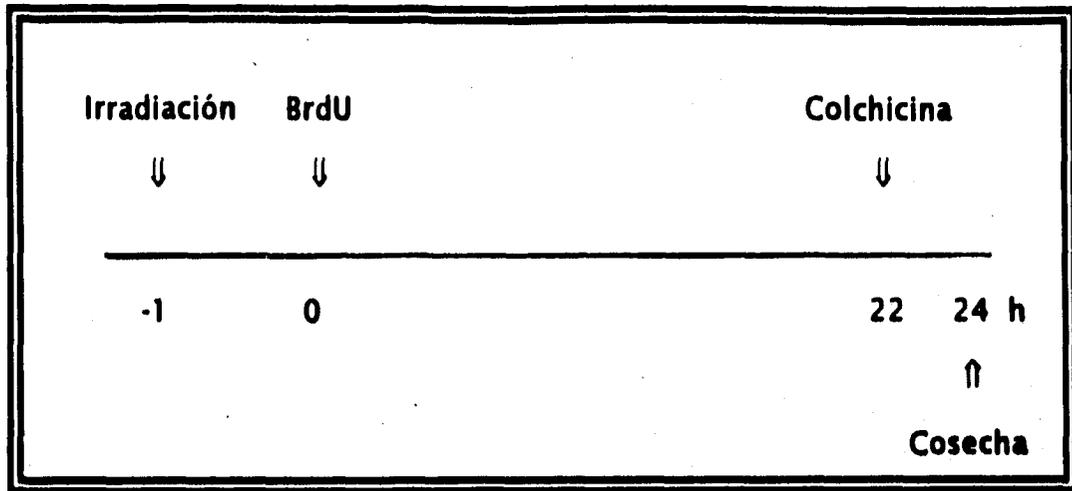
##### Primera etapa:



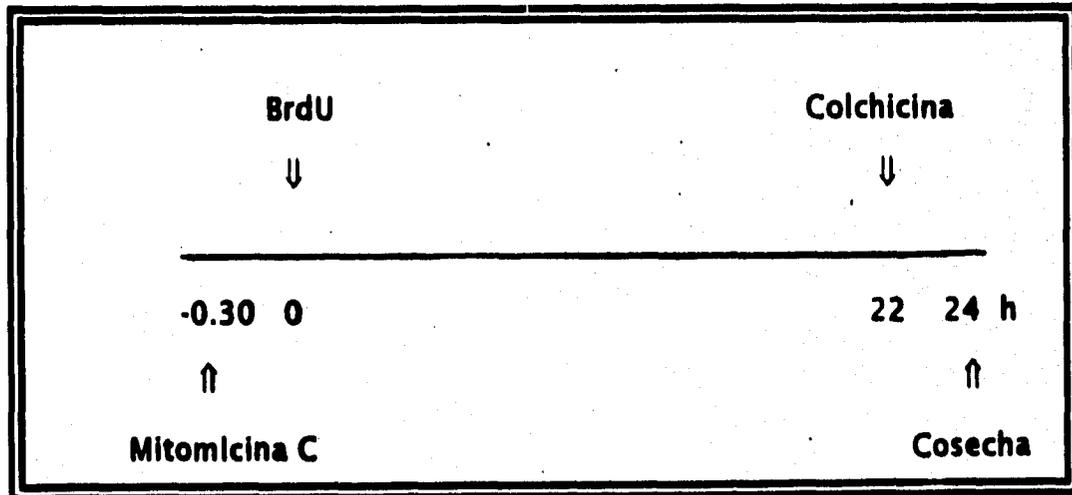
#### 4.1.2 Protocolo de la segunda etapa

Previo a la administración de BrdU, los grupos de ratones fueron tratados 1 h antes con radiación gamma, (A), o 30 min antes con MMC. (B); 22 h después del suministro de BrdU se les inyectó colchicina y fueron sacrificados 2 h más tarde. Las células de la médula ósea de cada fémur se cosecharon de manera independiente.

**Protocolo A de la segunda etapa:**



**Protocolo B de la segunda etapa:**



### **4.1.3 Protocolo de la tercera etapa**

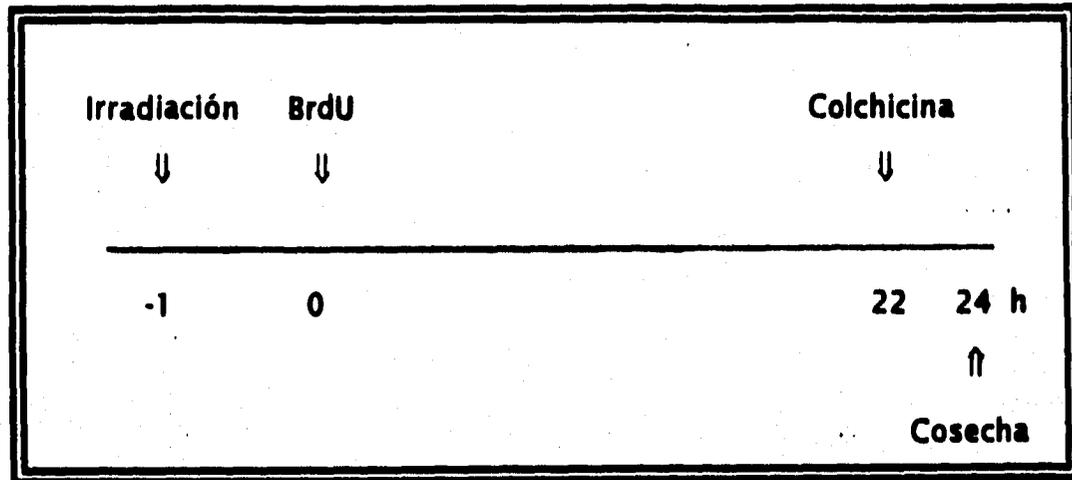
En este protocolo, se formaron dos grupos, en cada uno de ellos las células de la médula ósea de cada fémur de ratón fueron procesadas por separado.

Al primer un grupo de ratones se les irradió la extremidad posterior izquierda 1 h antes de la administración de BrdU, 22 h después se les administró colchicina y finalmente se sacrificaron dos horas más tarde. La frecuencia de ICH/cél del fémur derecho no irradiado representa la frecuencia basal y la del fémur izquierdo irradiado corresponde a la inducción de ICH causada por radiación.

Al segundo grupo de ratones se les irradió solamente el fémur izquierdo al inicio del experimento, 30 min después se les trató con MMC y transcurridos 30 min se les administró BrdU, 22 h más tarde se les inyectó colchicina y finalmente 2 h después fueron sacrificados. Las frecuencias de ICH/cél en las células del fémur derecho no irradiado representan la inducción de ICH causada solamente por MMC y la obtenida en el fémur izquierdo expuesto a la radiación representa el efecto del pretratamiento de radiación gamma sobre la inducción de ICH por MMC.

**Primer grupo de la tercera etapa:**

La extremidad posterior derecha representa al grupo testigo y la extremidad posterior izquierda al grupo irradiado.



**Segundo grupo de la tercera etapa:**

La extremidad posterior derecha representa al grupo que recibió tratamiento solamente con MMC y la extremidad posterior izquierda al grupo pre-irradiado y tratado con MMC.

<b>Irradiación</b>	<b>BrdU</b>		<b>Colchicina</b>
↓	↓		↓
<hr/>			
-1	-0.30	0	22 24 h
	↑		↑
<b>Mitomicina C</b>			<b>Cosecha</b>

## **4.2 Animales**

En este estudio se emplearon ratones machos de la cepa BALB/c de aproximadamente 30 g de peso y de 2 a 3 meses de edad. Estos animales son mantenidos y reproducidos en jaulas de plástico, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y períodos de luz-obscuridad. Son alimentados con comprimidos de Purina para roedores pequeños y agua ad libitum.

## **4.3 Tratamientos**

Los diferentes tratamientos se realizaron en grupos de cinco ratones a los tiempos señalados en los protocolos.

### **4.3.1 Irradiación**

Los animales fueron irradiados en una fuente de Cobalto ( $^{60}\text{Co}$ ) Teratrón con una dosis de 1.0 Gy, administrado en 10 min. La exposición se hizo simultáneamente en grupos de cinco ratones, colocados en un dispositivo diseñado especialmente para irradiar solamente la extremidad posterior izquierda y se protegió el resto del cuerpo del animal mediante blindaje de plomo. Se corroboró la dosis de exposición colocando en ambas extremidades dosímetros termoluminiscentes (TLD-200), (Figura 11).

### **4.3.2 Mitomicina C (MMC)**

La MMC (Sigma Chem.) se suministró mediante una inyección intraperitoneal, a una dosis de 2 mg/Kg de peso corporal en una solución acuosa.

### **4.3.3 Bromodesoxiuridina (BrdU)**

La BrdU (Sigma Chem.) previamente adsorbida a carbón activado (Morales-Ramírez, 1980), se administró mediante una inyección intraperitoneal de una suspensión acuosa a una dosis de 1.5 mg de BrdU/g de peso corporal.

### **4.3.4 Colchicina**

La colchicina a dosis de 3.7 mg/Kg, en solución acuosa se les administró mediante una inyección subcutánea.

## **4.4 Cosecha de células**

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical 2 h después de haber sido tratados con colchicina. Cada fémur fue procesado por separado, se cortaron ambos extremos y se obtuvieron las células por arrastre con una inyección de una solución salina balanceada (PBS). La suspensión se centrifugó a 1200 r.p.m. durante 5 min, el botón celular se resuspendió en solución hipotónica de cloruro de potasio (KCl 0.075 M) y

se incubó a 37°C durante 15 min. Posteriormente las células fueron fijadas con metanol-ácido acético 3:1 por tres períodos de 10 min, cada uno seguido por centrifugación (Figura 12).

#### **4.5 Preparación de laminillas**

Las laminillas se prepararon mediante el goteo de la suspensión celular sobre portaobjetos limpios y fríos, las cuales fueron flameadas rápidamente.

#### **4.6 Tinción diferencial de las cromátidas hermanas**

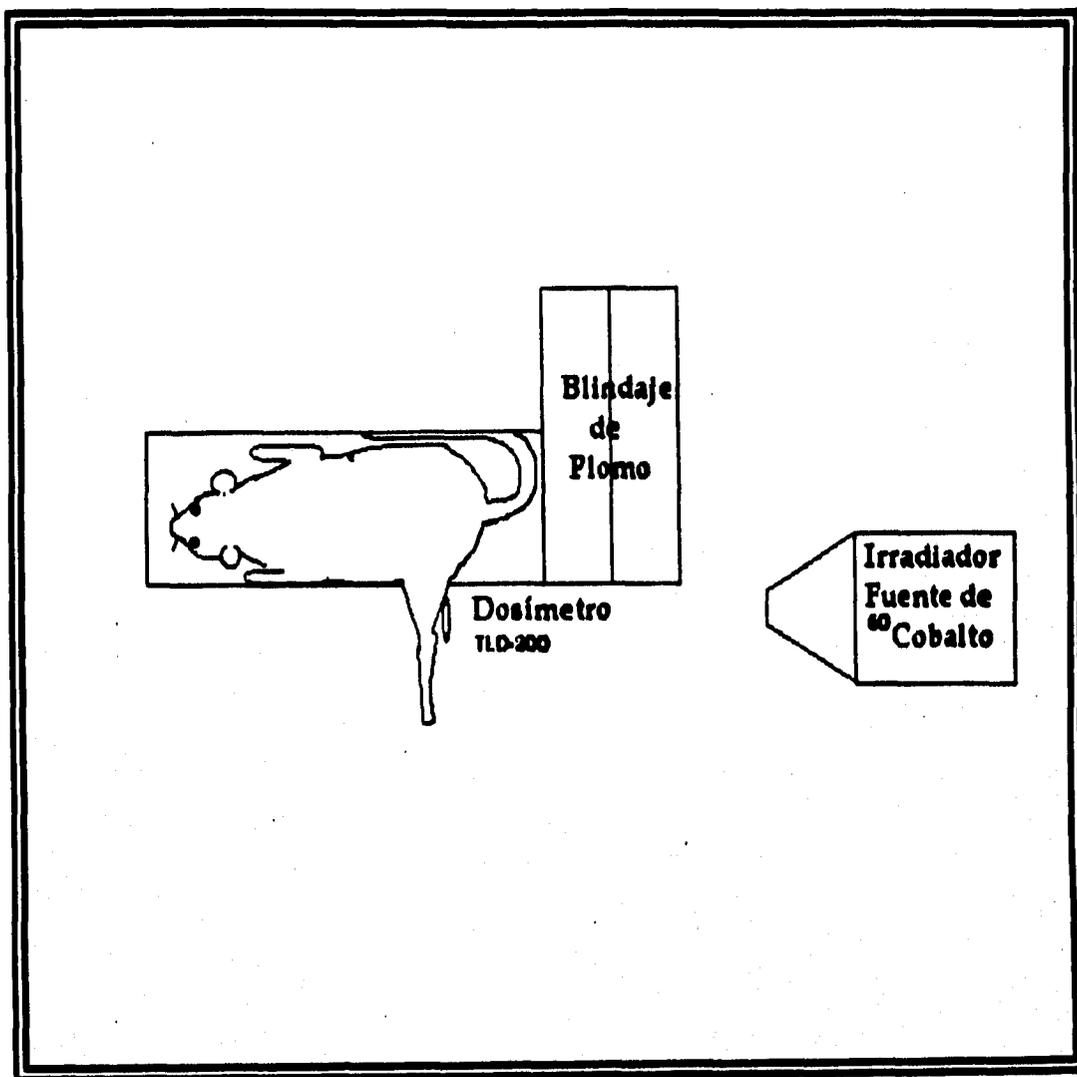
La tinción diferencial de las cromátidas hermanas se realizó por el método de fluorescencia más Giemsa (Perry y Wolff, 1974) ligeramente modificado (Goto et al., 1975) (Figura 13).

#### **4.7 Análisis al microscopio**

Los ICH se analizaron en 30 metafases con sus cromátidas bien diferenciadas. El índice mitótico (IM) se determinó por el número de metafases en 3000 células por animal. El tiempo de generación promedio (TGP) se estableció por el conteo de la cantidad de células en 1a, 2a y 3a división de un total de 300, siguiendo el método de Ivett y Tice (1982).

## **4.8 Estadística**

La significatividad estadística de las diferencias entre los valores se estableció con la prueba de t para muestras pareadas y/o la t de "student", utilizando un programa para computadora personal (Camps et al., 1993), considerándose significativo desde  $p < 0.05$ .



**Figura 11**  
**Irradiación**

## COSECHA DE CELULAS

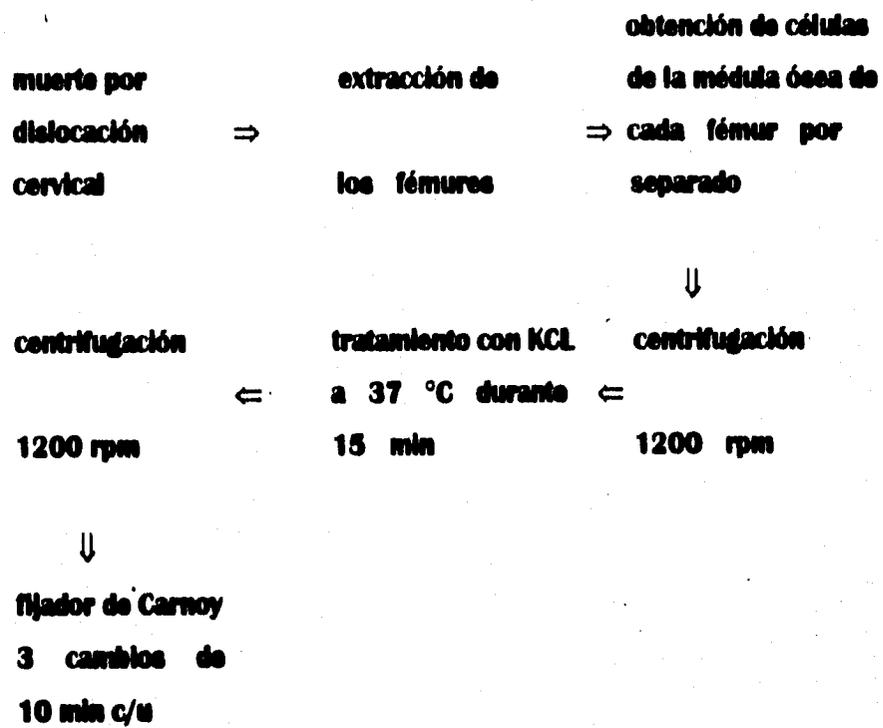
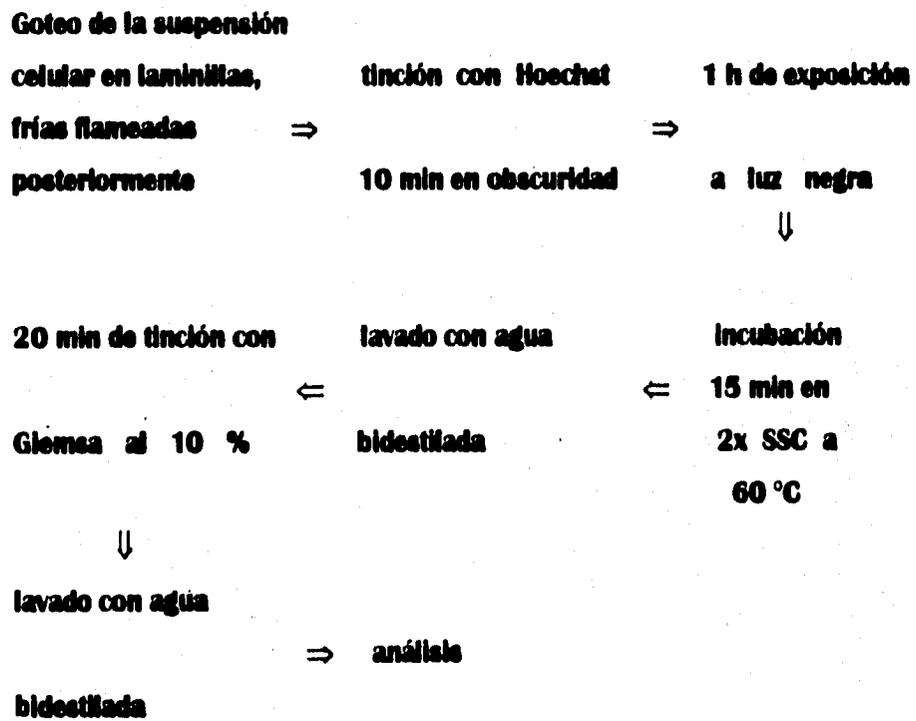


Figura 12

**PREPARACION DE LAMINILLAS Y TINCION DIFERENCIAL  
DE LAS CROMATIDAS HERMANAS**



**Figura 13**

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Variabilidad de la frecuencia basal de ICH, TGP e IM, en las células de la médula ósea femoral, entre las extremidades izquierda y derecha de ratones in vivo

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos con el protocolo de la primera etapa, para equiparar los valores basales de ICH, TGP e IM de las células de la médula ósea del fémur derecho con las del izquierdo. El promedio presentado en los fémures derechos fue de 2.8 ICH/cél, el TGP de 12.4 h y el IM de 55.2 mitosis/3000 células, en tanto que los valores correspondientes a los fémures izquierdos fueron de 3.0 ICH/cél, un TGP de 12.6 h, y un IM de 57.5 mitosis/3000 células. Con la prueba estadística de t para muestras pareadas, no se observaron diferencias significativas en los distintos índices analizados entre las extremidades de cada ratón.

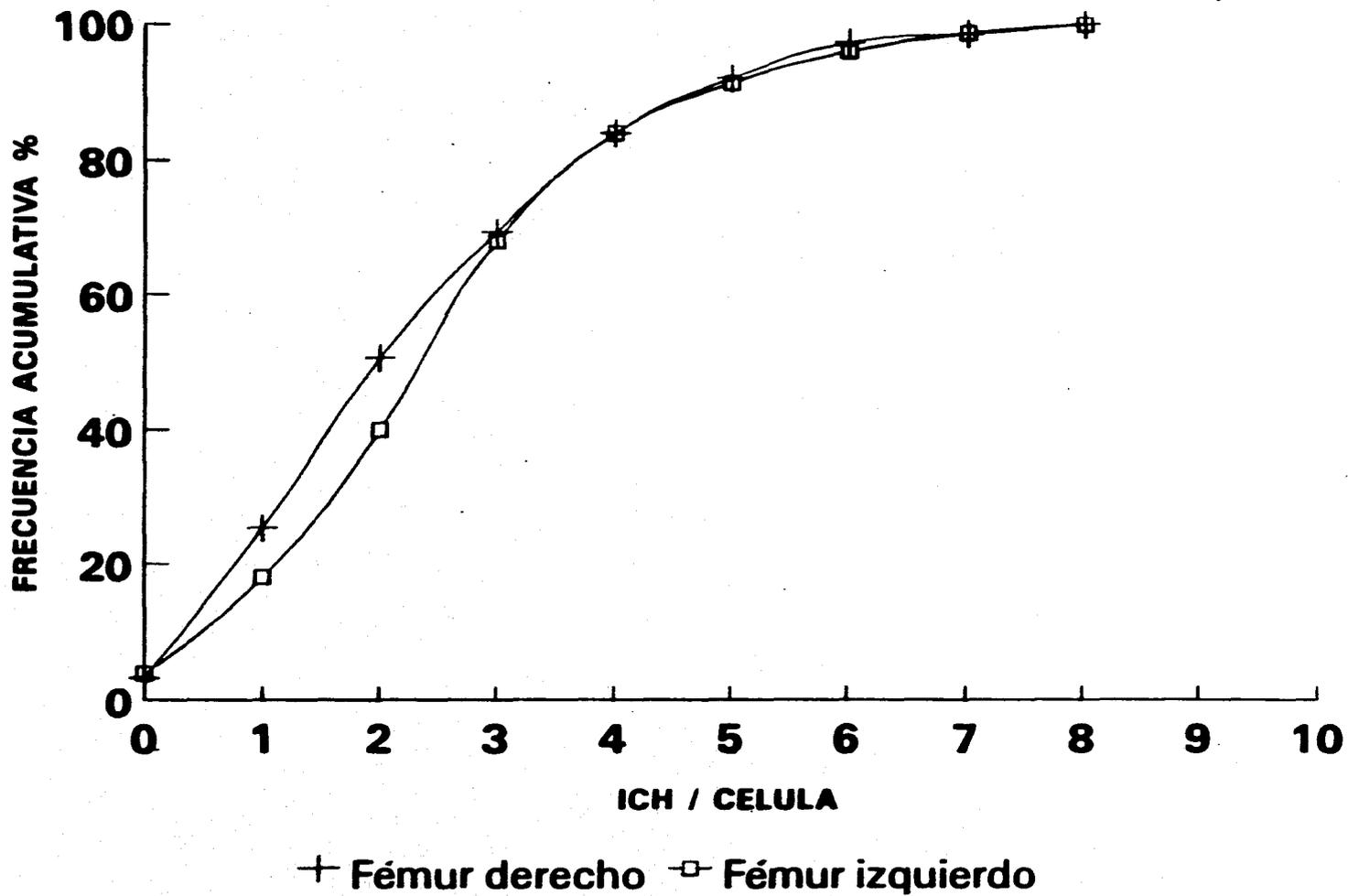
En la Figura 14 se aprecia la gráfica de frecuencias acumulativas en porcentaje de células versus el número de ICH/célula obtenida de los fémures derecho e izquierdo de los organismos, en donde el 50 % en las dos poblaciones presentaron 2 o más intercambios y las curvas analizadas casi se sobreponen, no se observó diferencia entre ellas. Siendo evidente un comportamiento similar entre las dos poblaciones celulares analizadas.

**TABLA 1. COMPARACION DE LAS FRECUENCIAS BASALES DE ICH, TGP • IM ENTRE LAS CELULAS DE LA MEDULA OSEA FEMORAL DE CADA RATON**

RATON	ICH/CELULA		TGP (n)		# MITOSIS/3000 CEL. <sup>IM</sup>	
	DER.	IZQ.	DER.	IZQ.	DER.	IZQ.
<b>FEMURES</b>						
1	2.6	3.4	11.7	11.6	53.0	53.3
2	2.5	2.8	12.2	12.5	45.7	60.7
3	3.1	3.1	12.6	13.1	61.7	57.7
4	3.4	2.8	13.0	13.0	66.7	66.3
5	2.4	3.0	12.7	12.6	49.7	49.3
$\bar{x} \pm D.E$	2.8 $\pm$ 0.4 ▲	3.0 $\pm$ 0.2 ▲	12.4 $\pm$ 0.5 ▲	12.6 $\pm$ 0.6 ▲	55.2 $\pm$ 8.3 ▲	57.5 $\pm$ 6.6 ▲

Comparación entre fémures, prueba t para muestras pareadas: ▲ Diferencia no significativa

**FIGURA 14. FRECUENCIA ACUMULATIVA DE CELULAS (%),  
CON RESPECTO AL No. DE ICH/CEL EN LOS FEMURES  
DERECHO E IZQUIERDO**



## **5.2 Comparación del efecto de la exposición a radiación gamma sobre los valores de ICH, TGP e IM, entre las células de la médula ósea femoral de ambas extremidades de cada ratón.**

Con el protocolo A de la segunda etapa, se obtuvieron los resultados presentados en la Tabla 2 en la cual se analizó la variabilidad entre la respuesta a rayos gamma de las extremidades izquierda y derecha de los grupos testigo e irradiado.

En el grupo testigo los valores promedio de ICH, TGP e IM mostraron similitud en ambos fémures. Las células del fémur derecho tuvieron valores de 3.0 ICH/cél, un TGP de 12.4 y un IM de 63.1 mitosis/3000 células y en los fémures izquierdos se observaron 3.0 ICH/cél, un TGP de 12.9 h y un IM de 64.9 mitosis/3000 células.

Las células irradiadas presentaron semejanza en los datos de ICH, TGP e IM en las dos extremidades. Los valores promedio de los fémures derecho e izquierdo fueron respectivamente de 4.2 y de 4.0 ICH/cél, el TGP de 13.2 h en las dos extremidades y el IM de 68.5 y 72.1 mitosis/3000 células.

No hubo diferencia significativa en los distintos índices analizados, entre los valores de los fémures derecho e izquierdo de un mismo grupo ya sea testigo o irradiado con la prueba de t para muestras pareadas. Con esto se confirma que los promedios de las frecuencias basales e inducidas por radiación gamma son reproducibles en ambos fémures.

La comparación de los grupos testigo e irradiado se realizó obteniendo los promedios de los valores de ICH, TGP e IM de las dos extremidades de cada ratón. Estos fueron de 3.0 ICH/cél en el primero y de 4.1 ICH/cél en el segundo, observándose diferencia significativa con la prueba t de "student" con un valor de  $p < 0.001$ . El TGP y el IM en las

células testigo e irradiadas respectivamente fueron de 12.6h y de 13.2 h y de 64.0 y 71.4 mitosis/300 células, en ellos no se presentó diferencia significativa.

Las gráficas de frecuencias acumulativas en porcentaje de células versus el número de ICH/célula de la Figura 15, incluyen las frecuencias de los fémures derecho e izquierdo del grupo testigo y las del grupo irradiado e indican un comportamiento similar en las poblaciones celulares de las dos extremidades dentro de un mismo grupo. En las poblaciones del grupo testigo, el 50 % de las células en las dos extremidades tuvieron más de 2 ICH/cél y en las poblaciones del grupo irradiado el 50 % de células de la médula ósea femoral presentaron más de 3 ICH/cél.

**TABLA 2. FRECUENCIAS DE ICH, TGP • IM INDUCIDAS CON 1.0 Gy DE RADIACION GAMMA EN LAS CELULAS DE LA MEDULA OSEA FEMORAL DE CADA ORGANISMO,**

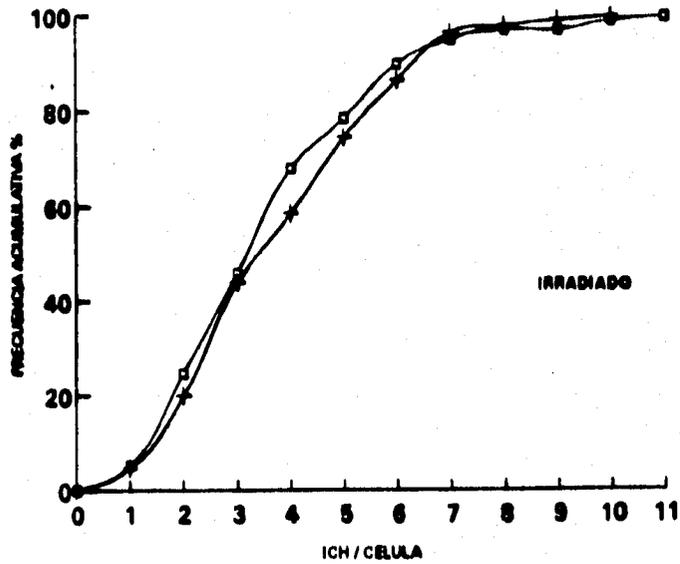
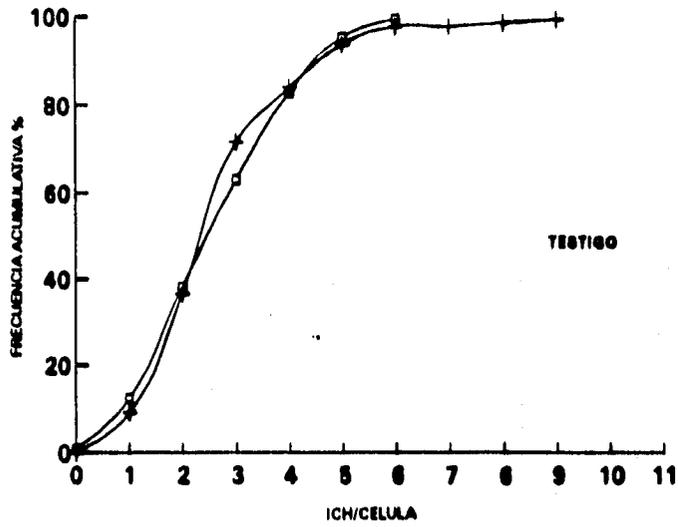
	ICH/CELULA		TGP (h)		IM # MITOSIS/3000 CEL	
<b>FEMURES</b>						
GRUPO	DER	IZQ	DER	IZQ	DER	IZQ
TESTIGOS	2.8	3.2	13.0	13.9	62.7	65.7
	2.9	2.5	12.2	12.4	64.0	67.3
	3.4	3.5	12.4	12.5	59.3	58.0
	3.2	3.0	12.0	12.7	66.3	68.7
$\bar{x} \pm D.E$	$3.0 \pm 0.3$ <sup>▲</sup>	$3.0 \pm 0.4$ <sup>▲</sup>	$12.4 \pm 0.4$ <sup>▲</sup>	$12.9 \pm 0.7$ <sup>▲</sup>	$63.1 \pm 2.9$ <sup>▲</sup>	$64.9 \pm 4.8$ <sup>▲</sup>
$\bar{x} \pm D.E$	$3.0 \pm 0.3$ •		$12.6 \pm 0.54$ ▼		$64.0 \pm 3.81$ ▼	
TRATADOS	4.4	4.0	12.8	13.2	88.3	81.7
	4.2	4.2	13.7	13.5	63.0	68.7
	4.2	4.0	13.5	13.2	62.0	68.3
	4.0	3.6	13.1	13.0	66.0	73.3
$\bar{x} \pm D.E$	$4.2 \pm 0.1$ <sup>▲</sup>	$4.0 \pm 0.2$ <sup>▲</sup>	$13.2 \pm 0.4$ <sup>▲</sup>	$13.2 \pm 0.2$ <sup>▲</sup>	$68.5 \pm 11.2$ <sup>▲</sup>	$72.1 \pm 5.7$ <sup>▲</sup>
$\bar{x} \pm D.E$	$4.1 \pm 0.1$ •		$13.2 \pm 0.2$ ▼		$71.4 \pm 9.2$ ▼	

Comparación entre extremidades, prueba t para muestras pareadas: ▲ Diferencia no significativa

Comparación de los promedios entre grupos testigo e irradiado, prueba t de "student":

▼ Diferencia no significativa; • p < 0.001

**FIG. 15. FREC. AC. DE CEL (%), RESPECTO AL No. DE ICH/CEL EN FEMURES DER. E IZQ. EN RATONES TESTIGO E IRRADIADOS**



+ Fémur derecho ◊ Fémur izquierdo

### **5.3 Comparación del efecto del tratamiento con MMC sobre los valores de ICH, TGP e IM, entre las células de la médula ósea femoral de ambas extremidades de cada ratón**

Los datos de la Tabla 3 pertenecen al protocolo B de la segunda etapa, e indican que la inducción de ICH, TGP, e IM con MMC en las extremidades de cada ratón es muy reproducible.

En el grupo testigo, los valores promedio presentadas en las células de la médula ósea de los fémures derecho e izquierdo fueron parecidas, con 4.1 y 3.9 ICH/cél, un TGP de 12.6 y 12.5 h y un IM de 75.0 y 75.3 mitosis/3000 células respectivamente. En las células tratadas con 2 mg/Kg de MMC también se observó similitud en los valores promedio de ICH, TGP e IM en las extremidades derecha e izquierda, siendo de 16.3 y 16.5 ICH/cél, un TGP de 14.2 y 14.0 h y un IM de 71.8 y 69.2 mitosis/3000 células.

No hubo diferencia estadísticamente significativa con la prueba t de muestras pareadas, entre los valores para cada índice en los fémures de cada ratón.

Obteniendo las frecuencias promedio de las dos extremidades de cada organismo por grupo, con la prueba estadística t de "student" se evidencian diferencias significativas en los valores de ICH y TGP de las poblaciones celulares testigo y tratadas con MMC. En el primer grupo la frecuencia fue de 4.0 ICH/cél y en el segundo de 16.4 ICH/cél, con una  $p < 0.0001$ . El TGP fue de 12.5 h y de 14.1 h respectivamente con una valor de  $p < 0.001$ . En el IM no se aprecia diferencia significativa, siendo de 75.2 mitosis/300 células en el grupo testigo, observándose una ligera disminución con respecto al tratado con 70.5 mitosis/300 células.

En la figura 16 se muestran las gráficas de las frecuencias

acumulativas en porcentaje de células versus la cantidad de ICH/célula en las dos poblaciones celulares del grupo testigo y las poblaciones del grupo tratado con MMC. No se aprecia diferencia entre las curvas obtenidas en las células de la médula ósea de los fémures derecho e izquierdo dentro de un mismo grupo.

En las células de médula ósea que recibieron tratamiento con MMC, el 50 % de las poblaciones presentaron 15 o más ICH/célula y en las poblaciones correspondientes al grupo testigo el 50 % de ellas tuvieron más de 3 ICH/cél.

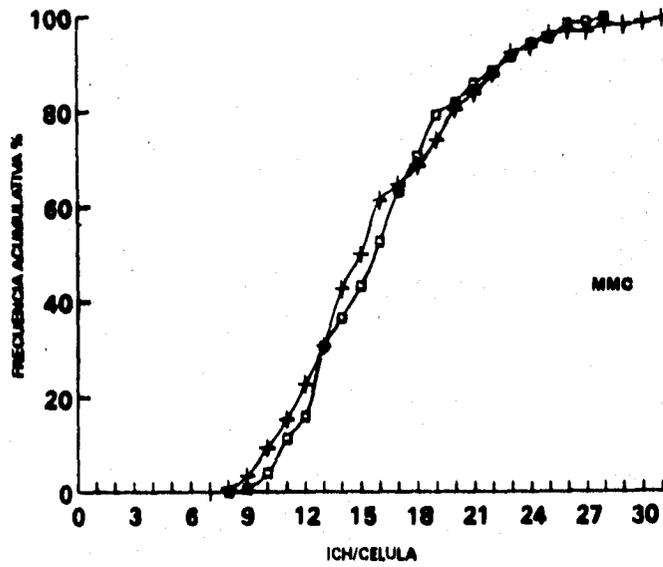
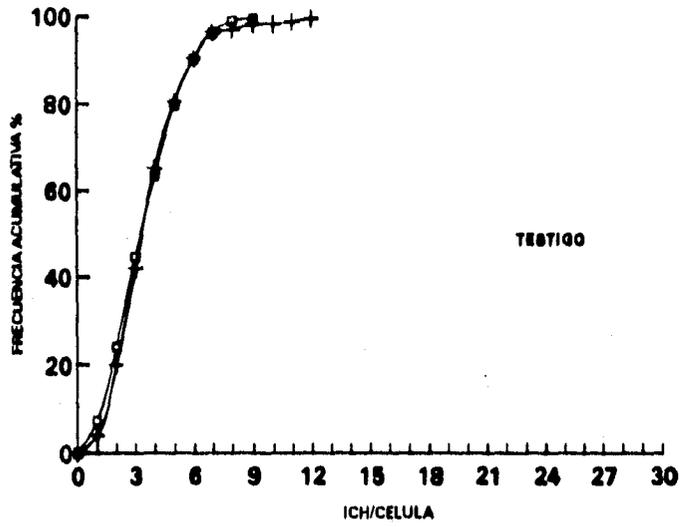
**TABLA 3. FRECUENCIAS DE ICH, TGP • IM, INDUCIDAS CON 2 mg/Kg DE MITOMICINA C EN LAS CELULAS DE LA MEDULA OSEA FEMORAL DE CADA ORGANISMO**

	ICH/CELULA		TGP (h)		IM # MITOSIS/3000 CEL	
<b>FEMURES</b>						
GRUPO	DER	IZQ	DER	IZQ	DER	IZQ
TESTIGOS	4.4	3.5	13.0	13.3	64.7	63.3
	4.7	4.3	12.6	12.6	75.7	72.3
	4.2	3.4	12.4	11.9	71.7	72.0
	3.5	4.4	12.4	12.8	78.3	84.7
	3.5	4.1	12.4	12.1	85.0	84.0
$\bar{x} \pm D.E$	$\triangle 4.1 \pm 0.5$	$\triangle 3.9 \pm 0.5$	$\triangle 12.6 \pm 0.3$	$\triangle 12.5 \pm 0.5$	$\triangle 75.0 \pm 7.5$	$\triangle 75.3 \pm 9.0$
$\bar{x} \pm D.E$	$4.0 \pm 0.3^{**}$		$12.5 \pm 0.4^{\circ}$		$75.2 \pm 8.1^{\nabla}$	
TRATADOS	15.8	17.6	14.3	13.7	70.7	69.0
	15.8	14.7	14.2	13.9	71.0	65.3
	18.1	17.8	13.6	13.6	67.0	63.3
	15.8	15.1	13.9	13.7	70.3	62.3
	16.0	17.5	14.9	15.2	80.0	86.0
$\bar{x} \pm D.E$	$\triangle 16.3 \pm 1.0$	$\triangle 16.5 \pm 1.5$	$\triangle 14.2 \pm 0.5$	$\triangle 14.0 \pm 0.7$	$\triangle 71.8 \pm 4.8$	$\triangle 69.2 \pm 9.7$
$\bar{x} \pm D.E$	$16.4 \pm 1.1^{**}$		$14.1 \pm 0.6^{\circ}$		$70.5 \pm 7.2^{\nabla}$	

Comparación entre extremidades, prueba t para muestras pareadas:  $\triangle$  Diferencia no significativa

Comparación de los promedios entre grupos testigo y tratado, prueba t de "student":  $\nabla$  Diferencia no significativa;  $^{\circ}$   $p < 0.001$ ;  $^{**}$   $p < 0.0001$

**FIG. 16. FREC. AC. DE CEL (%), RESPECTO AL No. DE ICH/CEL EN FEMURES DER. E IZQ. EN RATONES TESTIGO Y TRATADOS CON MMC**



+ Fémur derecho o Fémur izquierdo

#### **5.4 Efecto del pretratamiento con radiación gamma sobre los valores de ICH, TGP e IM causados por MMC, en las células de la médula ósea femoral**

La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos en el primer grupo de la tercera etapa experimental y corresponden al efecto que puede tener 1.0 Gy de radiación gamma sobre la frecuencia de los indicadores de daño considerados, al irradiar solamente el fémur izquierdo protegiendo el otro con blindaje de plomo para utilizarlo como grupo testigo.

En los fémures derechos, no irradiados se obtuvo una frecuencia basal de 2.7 ICH/cél, un TGP de 13.0 h y un IM de 68.1 metafases/3000 células. En las células de los fémures izquierdos irradiados, los valores fueron de 3.8 ICH/cél, un TGP de 12.7 h y un IM de 73.4 metafases/3000 células. De la comparación entre extremidades, con la prueba t para muestras pareadas se observó diferencia estadísticamente significativa únicamente entre los valores de ICH inducidos por radiación gamma con respecto al grupo testigo, con  $p < 0.001$ . El TGP y el IM no mostraron diferencia significativa.

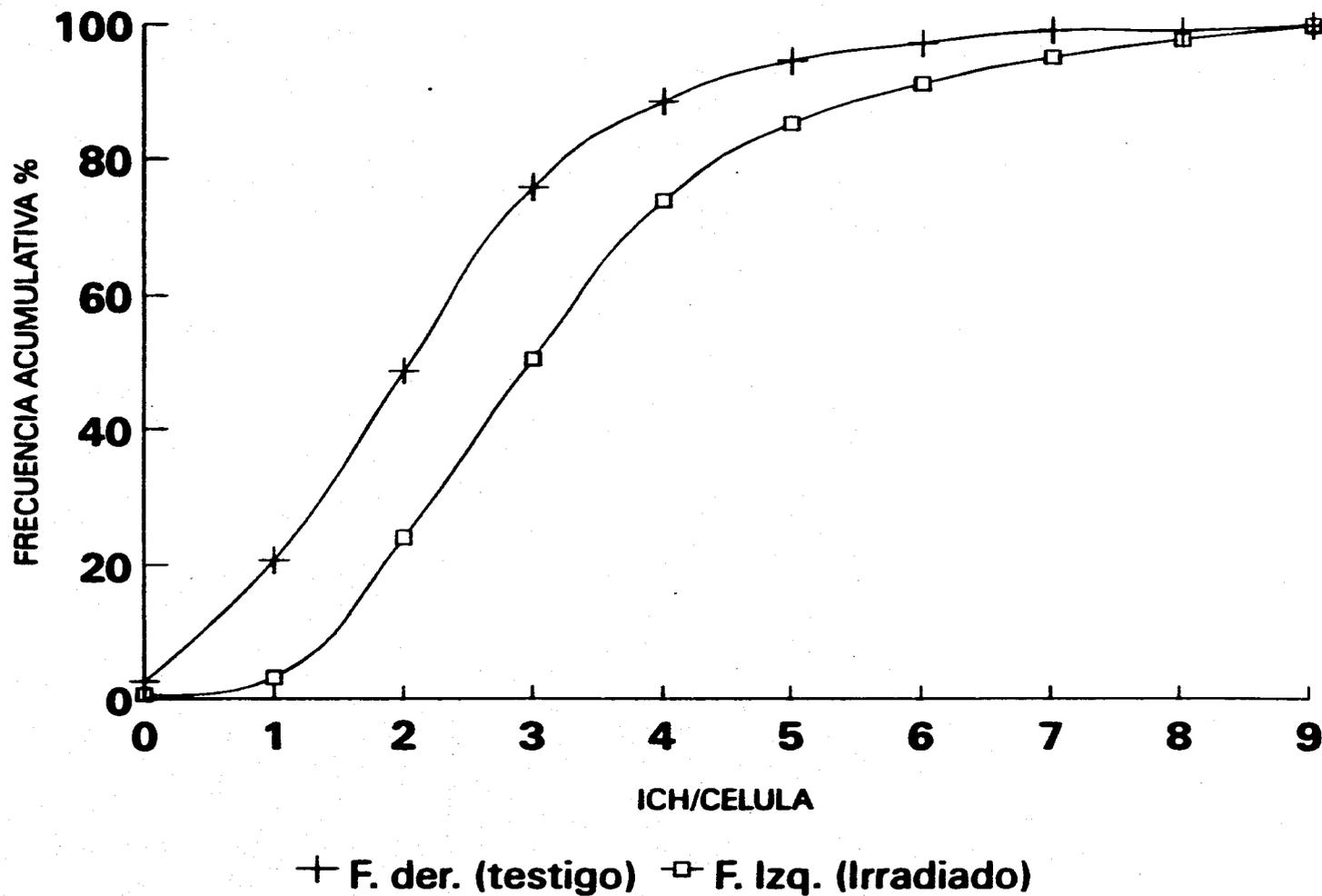
La Figura 17 representa la gráfica de frecuencias acumulativas en porcentaje de células versus el número de ICH/célula del grupo testigo (fémur derecho) y del grupo irradiado (fémur izquierdo). Se puede apreciar que el 50 % de la población del primer grupo tuvo 2 ICH/cél, en tanto que en el grupo irradiado se evidenció un desplazamiento hacia un mayor número de ICH mostrando 3 o más ICH/cél. Estos resultados son similares a los observados en la Figura 16, en donde el 50 % de las poblaciones del grupo testigo tuvieron más de 2 ICH/cél y en los fémures irradiados el 50 % de las poblaciones presentaron de 3 ICH/cél o más.

**TABLA 4. COMPARACION DE LAS FRECUENCIAS DE ICH, TGP • IM ENTRE LOS GRUPOS TESTIGO Y TRATADOS CON 1.0 Gy DE RADIACION GAMMA**

GRUPO	ICH/CELULA	TGP (h)	IM #mitosis/3000 CEL
TESTIGO ( FEMURES DERECHOS)	2.7	13.0	64.3
	2.6	14.1	66.3
	2.7	12.5	65.7
	2.8	12.5	69.7
	2.8	12.6	74.3
$\bar{x} \pm D.E$	2.7±0.1 ***	13.0±0.7 ▲	68.1±4.0 ▲
TRATADO ( FEMURES IZQUIERDOS)	3.6	12.6	67.0
	3.4	12.4	66.3
	4.2	12.4	70.3
	3.8	12.8	74.7
	3.8	13.2	88.7
$\bar{x} \pm D.E$	3.8±0.3 ***	12.7±0.3 ▲	73.4±9.2 ▲

Comparación entre extremidades, prueba t para muestras pareadas: ▲ Diferencia no significativa; \*\*\*  $p < 0.001$

**FIG. 17. FREC. AC. DE CEL (%), RESPECTO AL  
No. DE ICH/CEL EN LOS FEMURES DERECHO  
(TESTIGO) E IZQUIERDO (IRRADIADO)**



En las Tablas 5, 6 y 7, que corresponden al segundo grupo de la tercera etapa, se presentan los resultados por duplicado, en donde se determinó el efecto del pretratamiento con radiación gamma sobre la inducción de ICH, TGP e IM por MMC. Los incrementos mencionados son considerados con respecto al grupo testigo y la prueba estadística realizada fue la de t para muestras pareadas.

En la Tabla 5 se muestran las frecuencias de ICH/cél, en donde se aprecia que el grupo testigo (fémur derecho) presentó 3.6 ICH/cél y el grupo irradiado (fémur izquierdo) 5.1 ICH/cél, observándose un incremento de 1.5. Entre estos grupos se encontró diferencia estadísticamente significativa con un valor de  $p < 0.001$ .

El grupo tratado solamente con MMC (fémur derecho), mostró una frecuencia de 13.1 ICH/cél, con un incremento de 9.5 respecto al testigo no irradiado. Por otra parte, el grupo al que también se le administró MMC y que recibió el pretratamiento con radiación gamma, tuvo 11.4 ICH/cél con un aumento de 7.8. Con la prueba estadística realizada se estableció diferencia significativa con una  $p < 0.05$ .

Si se considerara un efecto aditivo de los aumentos en la frecuencias de ICH ocasionadas por la MMC de 9.5 y el de la radiación de 1.5, el incremento esperado debería de ser de 11 sin embargo, el obtenido experimentalmente fue de 7.8, lo que indica una reducción del 30% en la frecuencia de ICH causada por la interacción de ambos agentes.

La Figura 18 muestra la gráfica de frecuencias acumulativas en porcentaje de células versus el número de ICH/célula, obtenida de las células de la médula ósea de los fémures testigo, tratados con radiación, MMC, o ambos. Se puede apreciar que el 50 % de la población del grupo testigo presenta 3 ICH/cél, en las células irradiadas se observó un desplazamiento de la curva hacia valores más altos de ICH en donde el 50 % de la población presentó frecuencias de 4 ICH/cél o mayores. En la

población celular tratada con MMC se hace evidente un desplazamiento más notorio hacia una cantidad mayor de ICH, de tal manera que el 50 % de la población exhibe más de 11 ICH/cél. En lo que respecta a las tratadas con ambos agentes los valores fueron ligeramente menores a las tratadas únicamente con MMC, en donde el 50 % de la población tienen 10 ICH/cél. Lo anterior indica que la inducción de ICH por MMC es reducida por el pretratamiento con rayos gamma.

En la Tabla 6 se muestran los datos del efecto de la radiación gamma sobre el TGP producido por MMC. En el grupo testigo fue de 12.8 h y en el irradiado de 13.2 h con un incremento de 0.4. En estos grupos, no hubo diferencia estadísticamente significativa. En los fémures tratados con MMC, el TGP fue de 13.2 h, habiendo un aumento de 0.4 con respecto al testigo y en el grupo expuesto a MMC que recibió el pretratamiento con radiación gamma fue de 14.0 h, con un incremento de 1.2. Se puede inferir un efecto aditivo en el TGP, porque la radiación gamma y la MMC producen un aumento de manera independiente y la combinación es casi equivalente a la suma de ellos. Se encontró diferencia significativa con la prueba estadística aplicada a estos dos grupos con un valor de  $p < 0.01$ .

Las frecuencias observadas en relación al IM para los grupos fueron las siguientes, el testigo de 64.8, el irradiado de 59.8, el tratado con MMC de 60.0 y con el tratamiento combinado de 62.6 mitosis/3000 células. No se observó diferencia significativa con la prueba estadística de t para muestras pareadas.

**TABLA 5. INTERACCION DE LA RADIACION GAMMA  
SOBRE LA INDUCCION DE ICH POR MITOMICINA C**

FEMUR	DERECHO	IZQUIERDO
TRATAMIENTO	TESTIGO	IRRADIADO
EXPERIMENTO 1	3.6	4.8
	3.8	4.9
	3.9	4.5
EXPERIMENTO 2	3.6	5.6
	3.4	4.5
	3.6	5.7
	3.3	5.9
	3.5	5.2
$\bar{x} \pm D.E$	3.6 $\pm$ 0.2 ***	5.1 $\pm$ 0.5 ***
(incremento)		1.5
TRATAMIENTO	MMC	RAD + MMC
EXPERIMENTO 1	13.2	13.5
	12.8	10.6
	11.3	11.4
	13.4	10.4
EXPERIMENTO 2	14.3	11.3
	11.1	9.3
	15.4	13.3
$\bar{x} \pm D.E$	13.1 $\pm$ 1.5 **	11.4 $\pm$ 1.5 **
(incremento)	9.5	7.8

Comparación entre extremidades, prueba t para muestras pareadas: \*\* p < 0.05; \*\*\* p < 0.001

**TABLA 6. INTERACCION DE LA RADIACION GAMMA SOBRE EL TIEMPO DE GENERACION PROMEDIO INDUCIDO POR MITOMICINA C**

FEMUR	DERECHO	IZQUIERDO
TRATAMIENTO	TESTIGO	IRRADIADO
EXPERIMENTO 1	12.0	12.2
	13.9	13.4
	14.5	14.2
EXPERIMENTO 2	13.2	13.5
	12.1	13.0
	12.5	13.8
	12.1	13.0
	12.3	12.5
$\bar{x} \pm D.E$	12.8±0.9 $\blacktriangle$	13.2±0.7 $\blacktriangle$
(incremento)		0.4
TRATAMIENTO	MMC	RAD + MMC
EXPERIMENTO 1	12.0	12.2
	12.6	13.2
	13.5	13.6
	13.6	14.7
EXPERIMENTO 2	13.5	15.0
	13.0	14.0
	14.6	15.1
$\bar{x} \pm D.E$	13.2±0.8 * $\dagger$	14.0±1.0 *
(incremento)	0.4	1.2

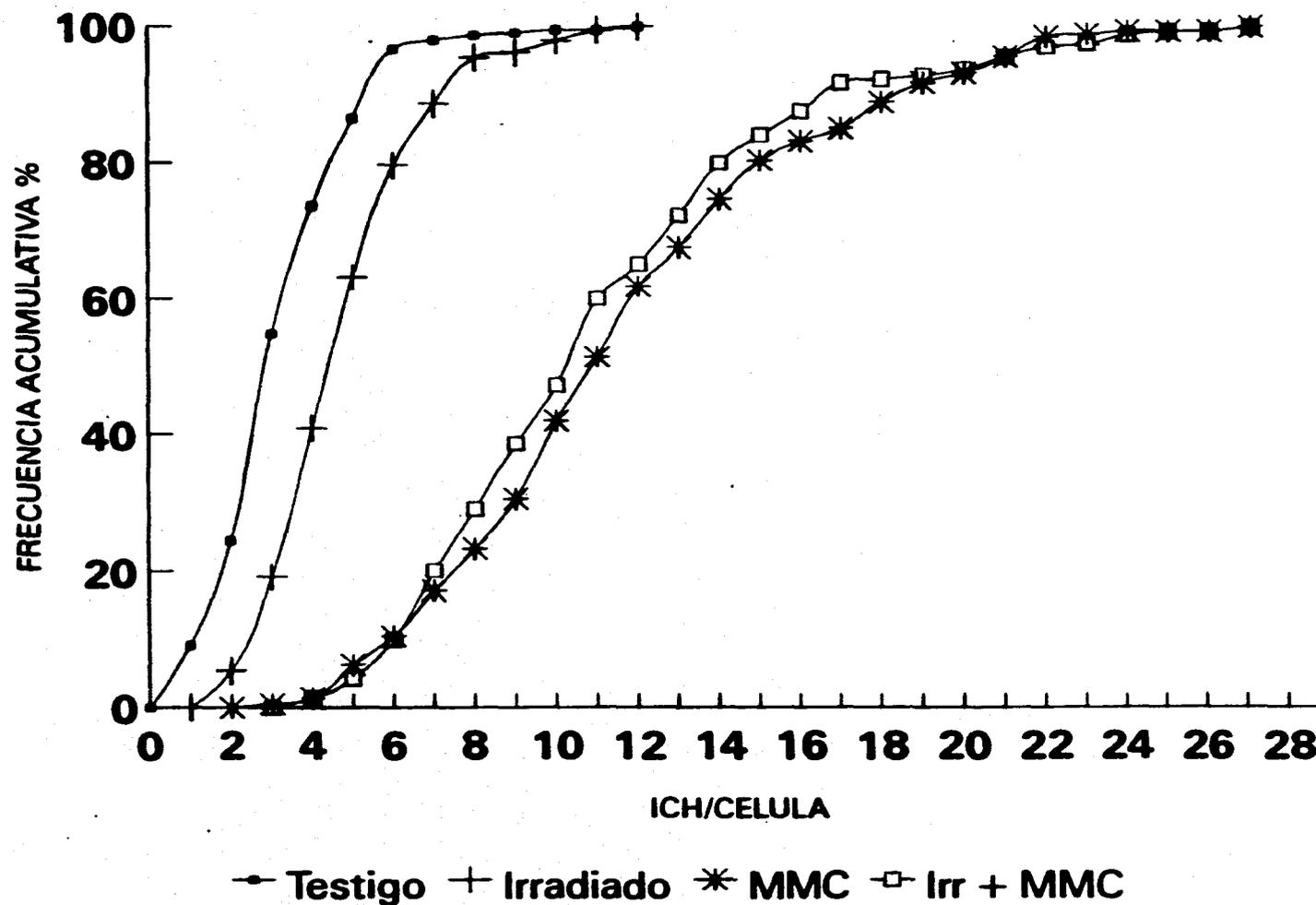
Comparación entre extremidades, prueba t para muestras pareadas:  $\blacktriangle$  Diferencia no significativa; \*  $p < 0.01$

**TABLA 7. INTERACCION DE LA RADIACION GAMMA SOBRE EL INDICE MITOTICO INDUCIDO POR MITOMICINA C**

FEMUR	DERECHO	IZQUIERDO
TRATAMIENTO	TESTIGO	IRRADIADO
EXPERIMENTO 1	47.3	58.6
	61.7	50.3
	45.3	34.0
EXPERIMENTO 2	68.0	68.3
	84.0	71.0
	74.3	73.0
	60.7	57.0
	77.3	66.0
$\bar{x} \pm D.E$	64.8±13.8 ▲	59.8±12.9 ▲
TRATAMIENTO	MMC	RAD + MMC
EXPERIMENTO 1	65.0	79.0
	56.3	54.3
	58.0	57.7
	56.7	60.3
EXPERIMENTO 2	50.7	59.7
	67.0	68.3
	66.7	59.3
$\bar{x} \pm D.E$	60.0±6.2 ▲	62.6±8.3 ▲

Comparación entre extremidades, prueba t para muestras pareadas: ▲ Diferencia no significativa

**FIG. 18. FREC. AC. DE CEL (%), RESPECTO AL No. DE ICH/CEL EN RATONES TESTIGO Y TRATADOS CON RADIACION, MMC O AMBOS.**



## 6. DISCUSION

Existe evidencia de que los intercambios en las cromátidas hermanas se llevan a cabo durante la síntesis del ADN, en la horquilla de replicación o en un lugar próximo a ella (Wolff y col., 1974; Latt y Loveday, 1978; Ishii y Bender, 1980; Kato, 1980), sin embargo el mecanismo exacto de formación y su significado biológico se están tratando de elucidar. De tal forma que se han propuesto varios modelos que intentan explicar como son producidos.

De manera general estos modelos pueden ser clasificados en dos grupos, los que proponen que la producción de ICH es el resultado de lesiones discretas y que éstos ocurren en el mismo lugar de la lesión o bien en un lugar cercano a ella y otros sugieren que son causados por lesiones múltiples, no habiendo por lo tanto una relación topográfica entre el sitio en donde ocurre el ICH y alguna lesión en particular.

Los modelos incluidos en la primera alternativa son: i) El de Kato (1977), en el que quedó de manifiesto que para la ocurrencia de ICH es indispensable la presencia de dos rompimientos en la cadena de ADN ya sea en la región cercana al punto de duplicación, directamente en la horquilla o bien en las regiones postreplicativas, considero a los rompimientos de cadena sencilla como la lesión principal para inducir ICH. ii) El de Shafer (1977), en el que se propuso que los enlaces cruzados podían ser desviados durante la duplicación mediante la formación de ICH, requiriéndose de la incisión en cada una de las cadenas de ADN que sirvieron como molde, así como de la unión de ellas con las cadenas hijas. iii) El de Ishii y Bender (1980), propone que el proceso de ICH puede suceder cuando la replicación de ADN se detiene en la cadena que presenta una lesión y continua en la otra,

ocurriendo posteriormente una ruptura en cada una en las cadenas progenitoras de ADN, habiendo desplazamiento y reunión con las cadenas hijas. iv) El modelo de Morales-Ramírez y col. (1990), postula que los ICH están relacionados con un proceso que permite a la célula sintetizar ADN en presencia de daño. Las lesiones en una de las bandas parentales que impiden la duplicación de esta zona, desencadenan la recombinación de cadenas sencillas de igual polaridad, abriendo la posibilidad de que la región no replicada pueda hacerlo debido a la banda complementaria recién sintetizada. La lesión que aún permanece favorece la formación del intermediario de Holliday, el cual puede dar lugar al intercambio de un pequeño segmento de banda sencilla o al intercambio de doble banda que se va a expresar a nivel cromosómico como ICH con una probabilidad del 50 %. Apoyan con datos obtenidos con radiación gamma, MMC y CP que las lesiones o sitios cercanos a ellas son el lugar en donde ocurren los ICH.

En los modelos que pertenecen a la segunda alternativa se encuentran: i) El de Cleaver, quien en 1981 intentó explicar la producción de ICH en base al tamaño de los replicones, además de errores en el desenrollamiento de la doble hélice ocasionado por una topoisomerasa no específica. ii) El de Du Frain (1981), involucra alteraciones en la conformación molecular del ADN, que al momento de la duplicación producen tensión, misma que se libera mediante la formación de ICH. iii) En el modelo de Painter (1980), se propuso que la ubicación del intercambio es en la unión de replicones debido al retardo en la progresión de la síntesis producida por un conjunto de lesiones, siendo independiente el sitio en donde se provocaron. Hace la predicción de que dado que los rayos x inhiben en inicio de la duplicación del agrupamiento de replicones, el pretratamiento con este agente debería disminuir la frecuencia de ICH inducidos por un agente que retarda el alargamiento de la cadena de ADN.

Como ya se mencionó el objetivo perseguido de esta tesis es la comprobación in vivo de la predicción del modelo de Painter relativo a la formación de ICH. Se propone que el pretratamiento con radiación gamma debe ser capaz de reducir la frecuencia de ICH inducidos por MMC. La estrategia se basó en la determinación del efecto del tratamiento combinado de estos agentes en el mismo animal para eliminar así la variabilidad de la respuesta existente entre individuos.

Los resultados presentados en este trabajo indican que la interacción de la radiación gamma y la MMC, tiene como consecuencia una reducción pequeña pero consistente del 30 % en la frecuencia de ICH inducida por MMC en células de la médula ósea femoral de ratón in vivo, (Morales-Ramírez y Cruz-Vallejo, 1996). Esto se concluye de la comparación directa de la frecuencia de ICH observada en las extremidades de los mismos ratones irradiados o no, tratados con MMC, pero sobre todo de la frecuencia esperada suponiendo un efecto aditivo de los dos agentes. Se puede afirmar que el diseño aquí empleado, permite hacer la comparación en el mismo animal y descartar la variabilidad entre los individuos lo cual dificultaría la detección de diferencias pequeñas.

En un estudio previo en células de la médula ósea de ratón, se encontró una disminución del 28% en la frecuencia esperada de ICH para el tratamiento combinado de rayos gamma con MMC; sin embargo debido a la variabilidad entre los organismos los resultados no se consideraron concluyentes (Morales-Ramírez y col., 1994b). En el presente trabajo al administrar MMC a los organismos, proteger el fémur derecho y exponer en resto del organismo a la radiación proporcionó la posibilidad de descartar la variabilidad entre individuos. La reproducibilidad de las frecuencias de ICH, TGP e IM basales e inducidas con radiación gamma o con MMC entre las extremidades de un mismo individuo fue comprobada previamente.

La predicción del modelo de Painter había sido estudiada por Painter y Mathur en 1984 en células CHO, en las que observaron que el efecto del pretratamiento con rayos x reducía la frecuencia de ICH inducida con luz UV, sin embargo sus resultados no fueron muy convincentes porque el efecto inhibitorio sobre la producción de ICH fue limitado. Otro estudio para comprobar esta predicción fue realizado por Chao y Rosenstein en 1984 en células de rana ICR 2A, en las que observaron una inhibición de aproximadamente el 50 % en el número de ICH inducido por luz UV mediante el pre-tratamiento con rayos gamma. Resultados similares fueron descritos por Chao y col. en 1985 en el mismo tipo celular, encontraron que el bloqueo en el inicio de la síntesis de los replicones producida por la exposición a luz UV de 313 nm, es la que induce la reducción en la frecuencia de ICH ocasionada por la luz UV de 265 nm, coincidiendo estos resultados con el pronóstico de Painter. Se consideró que la luz UV de 313 nm indujo un nivel alto de daño no dimérico cuyo efecto principal de estas lesiones es una inhibición en el inicio del replicón. Por otra parte la luz UV de 265 nm, produce dímeros de pirimidina y la acción de este tipo de daño es el bloqueo temporal de la elongación de la cadena,

La reducción en la frecuencia de ICH equivalente al 30 % obtenida en este trabajo fue mayor que la observada en células CHO (Painter y Mathur, 1984), pero menor que la encontrada en células de rana (Chao y Rosenstein, 1984), existiendo la posibilidad de que en las células CHO, algunos replicones no sean inhibidos por la radiación x o que las lesiones producidas por este agente sean reparadas de manera eficiente, por lo cual la respuesta fue limitada, entonces si la predicción de Painter fuera cierta, lo sería para células deficientes en reparación o con replicones inhibidos por radiación. La diferencia en la reducción de la frecuencia de ICH en células de rana ICR 2A con respecto al presente trabajo, podría atribuirse a que los tipos celulares tienen características

propias y que los experimentos en unos casos se realizaron in vitro y en el presente fueron in vivo además de que la energía utilizada en los cultivos fue radiación x y en esta tesis se utilizaron rayos gamma.

Aunque los resultados experimentales de este trabajo concuerdan con la predicción de Painter (1980) no es posible hacer la validación del modelo, ya que es necesario tomar en consideración que la naturaleza precisa de las lesiones en el ADN involucradas en la inducción de ICH aún es desconocida (Carrano y col., 1979; Kano y Fujiwara, 1982) y que los ICH son producidos aparentemente por diferentes tipos de lesiones (Sahar y col., 1981). Dado que la MMC y en especial la radiación causan diversas clases de daño, dan lugar a distintas consecuencias (Crooke y Bradner, 1976; Kano y Fujiwara, 1982, Linnainmaa y Wolff, 1982; Lett, 1984) y se pueden producir mediante diferentes mecanismos como pueden ser lesiones discretas en el ADN o a través del efecto sobre la síntesis del mismo (Ishii y Bender, 1980; Schwartzman y Gutlérrez, 1980; Nagasawa y col., 1982; Nishii y col., 1982; Takahashi y col., 1985). Sin embargo aparentemente es posible distinguir entre los mecanismos de inducción comparando el promedio y la varianza de la distribución de frecuencias de células respecto al número de ICH. Cuando la inducción de intercambios es a través de lesiones discretas en el material genético, se presenta una distribución de tipo Poisson, en cambio si ocurre mediante inhibición de la síntesis de ADN, causa irregularidad en esta distribución por lo que se observa la presencia de subpoblaciones celulares con frecuencias de ICH basales así como subpoblaciones con valores altos de ICH y el patrón de distribución de tipo Poisson no se conserva (Rainaldi y Mariani, 1982).

Los resultados aquí reportados indican que las curvas de distribución de la frecuencia celular con respecto al número de ICH por célula, después del tratamiento con rayos gamma o expuestos a MMC concuerdan con la distribución esperada para agentes inductores de

lesiones en el ADN y no como inhibidores de la síntesis como causa principal en la producción de ICH (Rainaldi y Mariani, 1982). Como ya se mencionó no es posible confirmar este modelo, porque existe evidencia de que el mecanismo principal de acción para la formación de ICH tanto por la radiación ionizante como por la MMC no es mediante inhibición de la síntesis. En el caso de la radiación gamma se ha observado la persistencia de las lesiones inducidas en el mismo locus en células de la médula ósea de ratón in vivo (Morales y col., 1988), lo que apoya que la ocurrencia de ICH es en el sitio de la lesión y contradice a los modelos que proponen que el lugar del ICH no es el mismo en donde se produjo el daño (Cleaver, 1981; Du Frain, 1981; Painter, 1980).

Los dos agentes utilizados en esta tesis son inductores de ICH y es probable que ocurra una reducción recíproca en la frecuencia de este evento por competencia. No obstante si se considera la reducción real de la frecuencia de ICH en la extremidad irradiada y tratada con MMC con respecto a la tratada solamente con el agente químico, los datos sugieren que la radiación es la que está causando la reducción de los ICH inducidos por MMC. La interacción de la radiación y la MMC con la célula, respecto a la inducción de ICH puede ser durante la síntesis a través de lesiones en el ADN o mediante algún factor condicionante de la expresión del daño capaz de eliminarlo, como lo es la respuesta adaptativa, también llamada hormesis.

La respuesta adaptativa es la resistencia conferida a las células a subsecuentes dosis altas de algún agente citotóxico, debida a la pre-exposición a dosis bajas no letales del mismo o de diferentes agentes, no siendo comprendidos aún los mecanismos moleculares involucrados (Samson y Schwartz, 1980).

Considerando lo anterior, es factible interpretar los resultados obtenidos en el presente experimento a través de la inducción de la respuesta adaptativa, dada la disminución observada en la frecuencia

de ICH de aproximadamente el 30 %, cuando interaccionaron ambos agentes. Se tiene conocimiento que las dosis agudas o crónicas de radiación ionizante son capaces de producir este tipo de respuesta a la inducción de ICH. En linfocitos de ratón *in vivo* pre-tratados con radiación ionizante se observó reducción significativa de ICH inducidos por MMC, los autores de este trabajo asumieron que la irradiación crónica causó un incremento en la capacidad de las células para reparar el daño al ADN (Wojcik y Tuschl, 1990). En cultivos de linfocitos humanos expuestos a rayos x como agente adaptativo durante la fase G<sub>1</sub> se produjo una disminución en la inducción de ICH por MMC de aproximadamente el 10 % (Moquet y col., 1989); cuando la irradiación se llevó a cabo en etapa G<sub>0</sub> este comportamiento no fue observado (Moquet y col., 1987).

Las aberraciones cromosómicas son otro parámetro de daño citogenético utilizado para determinar la respuesta adaptativa. De esta forma se ha observado que las dosis bajas de radiación inducen la hormesis en linfocitos de conejo *in vitro*, en células germinales y de la médula ósea *in vivo* en las fases G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub> (Cai y Liu 1990; Liu y col., 1992; Cai y col., 1993). Existe desacuerdo en cuanto a la presencia de respuesta adaptativa en linfocitos humanos, ya que solo en algunos casos las células muestran adaptación debida a pre-exposiciones a bajos niveles de radiación y son menos sensibles a los efectos de dosis de reto (Wolff y col., 1988; Shadley y Wiencke, 1989; Cai y Liu, 1990; Shadley y Dai, 1993), en otros se presenta una respuesta acumulativa de las dosis de adaptación y reto (Bai y Chen, 1993) o no se observa efecto (Schmid y col., 1989; Iijima y Morimoto, 1991). Esto puede ser debido a la variabilidad entre muestras de sangre de diferentes donadores (Sankaranarayanan y col., 1989), además de que la población humana presenta heterogeneidad en la respuesta adaptativa a radiaciones ionizantes (Bosi y Olivieri, 1989).

La respuesta adaptativa además de haber sido estudiada mediante parámetros citogenéticos como micronúcleos, aberraciones cromosómicas e ICH, también se ha evaluado determinando supervivencia celular y síntesis de ADN (Ibuki y Goto 1994).

Los agentes que dañan al ADN y que son eficientes inductores de ICH producen distintos tipos de lesiones en el material genético, lo que sugiere que el proceso de reparación inducible por radiación puede ser diferente de la respuesta adaptativa ocurrida con la exposición a dosis bajas de agentes alquilantes (Wolff y col., 1988). Aunque aún no es claro el mecanismo citogenético en la hormesis, le han conferido importancia a la poli(ADP-ribosa)polimerasa que es una enzima reparadora (Shadley y Wiencke, 1989). En el caso de los agentes alquilantes, es atribuida a la inducción de proteínas como la O<sup>6</sup> alquil guanina-ADN transferasa para remover la O<sup>6</sup> metil guanina (Ikushima, 1989). Sin embargo, algunos autores han propuesto que la resistencia cruzada observada entre la radiación y la MMC indica la presencia de un mecanismo común de reparación entre los agentes productores de enlaces cruzados y la radiación (Wolff y col., 1988; Cai y Meng, 1994). El análisis de este evento en células de criceto chino V79 pre-irradiadas con dosis bajas de rayos beta o gamma tratadas con dosis de reto de rayos gamma, MMC o UV cercano, sugiere que la respuesta radio-adaptativa está unida a la red de reparación, que se enfrenta con las lesiones en la cromatina inducidas por MMC y UV. Ha sido considerado que la exposición a niveles bajos de radiaciones ionizantes pueden disparar o inducir una sobre-reparación de lesiones cromosómicas inducidas por radiación (Ikushima, 1989; Osmak y Horvat, 1992).

Si bien los resultados obtenidos en la presente tesis son acordes al comportamiento observado en la respuesta adaptativa, es necesario considerar que los reportes relativos a la hormesis en general son muy variables no sólo en cuanto a la magnitud de la respuesta observada,

sino también respecto a las dosis y los tiempos que se emplean para adaptar y retar a las células.

Una explicación alternativa para la reducción neta de ICH pudiera ser la selección de células más sensibles por el pretratamiento con radiación, ya sea vía muerte o bloqueo de la división celular.

Evidentemente el efecto sobre el TGP es el más notorio y sugiere que se está bloqueando y retardando la división celular. Ya que tanto la radiación gamma como la MMC lo aumentan significativamente se puede asumir que el efecto sobre este índice es aparentemente aditivo.

Finalmente, el estudio de la interacción entre agentes mutágenos de diferente modo de acción tiene la importancia de que permite hacer predicciones con respecto a las consecuencias de la exposición combinada de agentes, que es la forma como la población humana esta siendo expuesta. Además, el empleo combinado de la radio y la quimioterapia contra el cáncer, le confiere importancia adicional a los estudios en este campo. Aunque Majumdar y col. en 1991, analizaron la viabilidad de células provenientes de tumores cancerosos y observaron que era disminuida al administrar MMC y radiación, esto debido a que había efecto supra-aditivo produciendo mayor muerte celular. En tumores mamarios de ratón, el régimen combinado de MMC y radiación demostró ser efectivo para inducir la muerte de células tumorales (Rockwell, 1993).

## **7. CONCLUSIONES**

De los resultados antes analizados en células de la médula ósea femoral de ratón in vivo, para determinar el efecto de la radiación gamma sobre la inducción de intercambios en las cromátidas hermanas producida por Mitomicina C se puede concluir que:

1. La pre-exposición a 1.0 Gy de radiación gamma puede reducir en casi 30 % la inducción de ICH por 2 mg/Kg de MMC.
2. Los resultados obtenidos se ajustan con la predicción de Painter (1980), sin embargo no es condición suficiente para su validación.
3. El tratamiento combinado de radiación y mitomicina C no tiene efecto sobre el índice mitótico.
4. Se puede inferir un efecto aditivo de la radiación gamma y la mitomicina C en términos del aumento del tiempo de generación promedio.
5. No hay variabilidad significativa en la inducción de ICH, TGP e IM por radiación gamma o mitomicina C en las células de la médula ósea del mismo individuo.

## 8 REFERENCIAS

**Abe S. y Sasaki M. (1977):** Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals. *J. Natl. Cancer Inst.* 58: 1635-1641.

**Abe S. y Sasaki M. (1982):** Induction of sister-chromatid exchanges by indirect mutagens/carcinogens in cultured rat hepatoma and esophageal tumor cells and in Chinese hamster DON cells co-cultivated with rat cells. *Mutat. Res.* 93: 409-418.

**Abraham S. K. y Fränz J. (1983):** Induction of sister chromatid exchanges by chemotherapeutic drugs in spermatogonia of mice: effects of procarbazine, adriamycin, cyclophosphamide and mitomycin C. *Mutat. Res.* 108: 373-381.

**Abramovsky I., Vorsanger G. y Hirshcorn K. (1978):** Sister chromatid exchange induced by X-ray of human lymphocytes and the effect of L-cysteine. *Mutat. Res.* 50: 93-100.

**Alhadef B., Velivasakis M., Pagan-Cherry I., Wriqth W. C. y Siniscalco M. (1980):** High rate of sister chromatid exchanges of Bloom's syndrome chromosomes is correct in rodent human somatic cell hybrids. *Cytogenet. Cell Genet.* 27: 8-23.

**Allen J. W. y Latt S. A. (1976):** Analysis of sister chromatid exchange formation *in vivo* in mouse spermatogonia as a new test system for environmental mutagens. *Nature* 260: 449-451.

**Allen J. W., Shuler C. F., Mendes R. W. y Latt S. A. (1977):** A simplified technique for *in vivo* analysis of sister-chromatid exchanges using 5-bromodeoxyuridine tablets. *Cytogenet. Cell Genet.* 18: 231-237.

**Allen J. W., Shuler Ch. F. y Latt S. A. (1978):** Bromodeoxyuridine tablet methodology for *in vivo* studies. *Somat. Cell*

Genet. 4: 393-405.

**Bai Y. y Chen D. (1993):** Accumulative effect of two low doses of irradiation in inducing an adaptative response in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 302: 191:196.

**Baker R. S. U., Mitchell G. A., Meher-Homji K. M. y Podobna E. (1983):** Sensitivity of two Chinese hamster cell lines to SCE induction by a variety of chemical mutagens. *Mutat. Res.* 118: 103-116.

**Balajee A. S. y Natarajan A. T. (1993):** Restriction endonucleases do induce sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 302: 25-31.

**Bartram C. R., Koske-Westphal T. y Pasarge E. (1976):** Chromatid exchanges in ataxia telangiectasia, Bloom syndrome, Werner syndrome, and xeroderma pigmentosum. *Ann. Hum. Genet.* 40: 79-85.

**Becher R. y Sandberg A. (1982):** Rapid method for Giemsa staining of sister chromatids. *Cancer Genet. Cytogenet.* 7: 223-225.

**Benyush V. A. y Zelein M.G. (1983):** A sensitive method of detecting 5-bromodeoxyuridine incorporated differentially into mammalian chromosomes. *Byulluten' Eksperimental' noi Biologii i Meditsiny* 95 (4): 122-123.

**Bhatnagar A., Rani R. y Ghosh P. K. (1984):** Chromosome aberrations and sister-chromatid exchanges (SCE) in peripheral blood lymphocytes of patients suffering from poliomyelitis. *Mutat. Res.* 141: 55-58.

**Bignami M., Terlizzese A., Zijno A., Calcagnile A., Frosina G., Abbondandolo A. y Dogliotti E. (1987):** Cytotoxicity, mutations and SCEs induced by methylating agents are reduced in CHO cell expressing an active mammalian O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Carcinogenesis* 8: 1417-1421.

**Blakey D. H. (1985):** Sister chromatid exchange analysis in the colonic and small intestinal epithelium of the mouse. *Cancer Lett.* 28: 299-

305.

**Bloom S. E. y Hsu T. C. (1975):** Differential Fluorescence of sister chromatids in chicken embryos exposed to 5 bromodeoxyuridine. *Chromosoma* 51: 261-267.

**Bosi A. y Olivieri G. (1989):** Variability of the adaptative response to ionizing radiations in humans. *Mutat. Res.* 211: 13-17.

**Bradley M. O., Hsu I. Ch. y Harris C. C. (1979):** Relationships between sister chromatid exchange and mutagenicity, toxicity and DNA damage. *Nature* 282: 318-320.

**Brown E. H. y Basilicio C. (1982):** Induction of sister chromatid exchange by polyoma large viral tumor antigen in transformed rat fibroblast. *Cancer Res.* 42: 1909-1912.

**Bryant E. M., Hoehn H. y Martin G. M. (1979):** Normalization of sister chromatid exchange frequencies in Bloom's syndrome by euploid cell hybridization. *Nature* 279: 795-796.

**Cai L. y Liu S. Z. (1990):** Induction of cytogenetic adaptative response of somatic and germ cell *in vivo* and *in vitro* by low-dose X-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 58 (1): 187-194.

**Cai L., Jiang J., Wang B., Yao H. y Wang X. (1993):** Induction of an adaptative response to dominant lethality and to chromosome damage of mouse germ cells by low dose radiation. *Mutat. Res.* 303: 157-161.

**Cai L. y Meng Q-Y. (1994):** Studies on the induction of cross-resistance by low dose radiation or by low concentrations of chemicals. *Blom. Environ. Sci.* 7: 241-247.

**Camps E., Anguiano G. y Ondarza R. (1993):** Sistema básico de estadística (SBE). Reporte Técnico Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. México IB-93-11. 19 pp.

**Caron R. M. y Hamilton J. A. (1995):** Preferential effects of the

chemotherapeutic DNA crosslinking agent mitomycin C on inducible gene expression *in vivo*. Environ. Mol. Mutagen. 25: 4-11.

**Carrano A. V., Thompson L. H., Lindl P. A. y Minkler J. L. (1978):** Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. Nature 271: 551-553.

**Carrano A. V., Thompson L. H., Stetka D. G., Minkler J. L., Mazrimas J. A. y Fong S. (1979):** DNA crosslinking, sister-chromatid exchange and specific-locus mutations. Mutat. Res. 63: 175-188.

**Cassarett A. P. (1968):** Radiation Biology. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs. New Jersey. 368 pp.

**Chaganti R. S. K., Schonberg S. y German J. (1974):** Manyfold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes. Proc. Natl Acad. Sci. 71: 4508-4512.

**Chao C. C.-K. y Rosenstein B. S. (1984):** Inhibition of the UV induction of sister-chromatid exchanges in ICR-2A frog cells by pretreatment with gamma-rays. Mutat. Res. 139: 27-30.

**Chao C. C.-K., Rosenstein R. B. y Rosenstein B. S. (1985):** Induction of sister-chromatid exchanges in CR 2A frog cells exposed to 265-313 nm monochromatic ultraviolet wavelengths and photoreactivating light. Mutat. Res. 149: 443-450.

**Cleaver J. E. (1981):** Correlation between sister chromatid exchange frequencies and replicon size. Expl. Cell Res. 136: 27-30.

**Comings D. E. (1975):** Implications of somatic recombination and sister chromatid exchange in Bloom's syndrome and cells treated with Mitomycin C. Humangenetik 28: 191-196.

**Conner M. K., Boggs S. S. y Turner J. H. (1978):** Comparisons of *in vivo* BrdU labeling methods and spontaneous sister chromatid exchange frequencies in regenerating murine liver and bone marrow cells. Chromosoma 68: 303-311.

**Crooke S. T. y Bradner W. T. (1976):** Mitomycin C: a review. *Cancer Treat. Rev.* 3: 121-139.

**Darlington G. J., Dutrowski R. y Brown T. W. (1981):** Sister chromatid exchange frequencies in progeria and Werner syndrome patients. *Ann. J. Hum. Genet.* 33: 762-766.

**Das B. C. y Sharma T. (1983):** Influence of age on the frequency of sister-chromatid exchanges and X-ray-induced chromosome aberrations in muntjac. *Mutat. Res.* 109: 53-63.

**Davidson R. L., Kaufman E. R., Dougherty G. P., Ovellette A. M., Difolca C. M. y Latt S. (1980):** Induction of sister chromatid exchanges by is BrdU largely independent of the BrdU content of DNA. *Nature* 284: 74-76.

**Daza P., Escalza P., Mateos S. y Cortés F. (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. *Mutat. Res.* 270: 177-183.

**Dee Weerd-Kastelein E. A., Keijzer W., Reinaldi G. y Bootsma D. (1977):** Induction of sister chromatid exchanges in Xeroderma pigmentosum cells after exposure ultraviolet light. *Mutat. Res.* 45: 253-261.

**Delhanty J. D. A., Parrington J. M., Casey G., Attwood J., West L., Kirk D. y Corney G. (1981):** Growth DNA repair, sister chromatid exchange and chromosome studies in fibroblast from Huntington's disease patients. *Ann Hum. Genet.* 45: 181-198.

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

**DuFrain R. J. y Garrand T. J. (1981):** The influence of incorporated halogenated analogues of thymidine on the sister-chromatid

exchange frequency in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 91: 233-238.

**Ekmekci A., Sayli A., Dönmez H. y Bal F. (1995):** *In vitro* effects of prostaglandin E1 and indomethacin on mitomycin C-induced sister-chromatid exchanges in mitogen-stimulated human lymphocytes. *Mutat. Res.* 328: 49-53.

**Elizondo G., Montero R., Herrera J. E., Hong E. y Ostrosky-Wegman P. (1994):** Lymphocyte proliferation kinetics and sister-chromatid exchanges in individuals treated with metronidazole. *Mutat. Res.* 305: 133-137.

**Escalza P., Daza P., Piñero J. y Cortés F. (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. *Mutagen.* 7 (2): 137-140.

**Fabricant J. D. y Hofnung M. J. (1979):** Sister chromatid exchange induction by mitomycin C is deficient in embryonal carcinoma cells. *Mutat. Res.* 63: 215-219.

**Friedberg E. C. (1985):** DNA Repair. Ed. W. H. Freeman & Company. 1a. ed. San Francisco, Cal. (U.S.A) 614 pp.

**Fucić A., Garaj-Vrhovac V., Dimitrovic' B. y Skara M. (1992):** The persistence of sister-chromatid exchange frequencies in men occupational exposed to vinyl chloride monomer. *Mutat. Res.* 281: 129-132.

**Galloway S. M. (1977):** Ataxia telangiectasia. The effects of chemical mutagens and x-rays on sister chromatid exchanges in blood lymphocytes. *Mutat. Res.* 45: 343-349.

**Gibson D. A. y Prescott D. M. (1972):** Induction of sister chromatid exchanges in chromosomes of rat Kangaroo cells by tritium incorporated into DNA. *Exp. Cell Res.* 74: 397-402.

**Gómez-Arroyo S., Altamirano M. y Villalobos-Pietrini R.**

**(1981):** Sister-chromatid exchanges induced by some chromium compounds in human lymphocytes *in vitro*. *Mutat. Res.* 90: 425-431.

**Gómez-Arroyo S. y Souza V. S. (1985):** *In vitro* and occupational induction of sister-chromatid exchanges in human lymphocytes with furfuryl alcohol and furfural. *Mutat. Res.* 156: 233-238.

**Gómez-Arroyo S., Castillo-Ruiz R., Cortés-Eslava J. y Villalobos-Pietrini R. (1988a):** *Vicia Faba* Sister chromatid exchanges of the organophosphorus insecticides methyl parathion, dimethoate, Oxydemeton methyl and phoxim. *Cytologia* 53: 627-634.

**Gómez-Arroyo S., Henández-García A. y Villalobos-Pietrini R. (1988b):** Induction of sister-chromatid exchanges in *Vicia faba* by arsenic-contaminated drinking water. *Mutat. Res.* 208: 219-224.

**Gómez-Arroyo S., Noriega-Aldana N., Osorio A., Galicia F., Ling S. y Villalobos-Pietrini R. (1992):** Sister-chromatid exchange analysis in a rural population of México exposed to pesticides. *Mutat. Res.* 281: 173-179.

**Gonsebatt M. E., Salazar A., Montero R., Díaz B.F., Yañez L., Gómez H. y Ostrosky-Wegman P. (1995):** Genotoxic monitoring of workers at a hazardous waste disposal site in Mexico. *Environ. Health Perspect.* 1: 111-113.

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

**Guerrero R. R., Rounds D. E. y Hall T. C. (1979):** Bioassay procedure for the detection of mutagenic metabolites in human urine with the use of sister chromatid exchange analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* 62: 805-809.

**Gundy S., Varga L. y Bender M. A. (1984):** Sister chromatid

exchange frequency in human lymphocytes exposed to ionizing radiation in vivo and in vitro. Radiat. Res., 100: 47-54.

**Gutiérrez C., González-Gil G y Hernández P. (1983):** Analysis of baseline and BrdU-dependent SCEs at different BrdU concentrations. Exp. Cell Res. 149: 461-469.

**Hall E. J. (1994):** Radiobiology for the radiologist. J. P. Lippincot Company 4a. ed. Philadelphia. 478 pp.

**Hayashi K. y Schmid W. (1975):** The rate of sister chromatid exchanges parallel to spontaneous chromosome breakage in Fanconi's Anemia and to Treminon-induced aberrations in human lymphocytes and fibroblasts. Humangenetik 29: 201-206.

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

**Heflich R. H., Fullerton N. F. y Beland F. A. (1986):** An examination of the weak mutagenic response of 1-nitropyrene in Chinese hamster ovary cells. Mutat. Res. 161: 99-108.

**Henderson L. M. Arlett C. F., Harcourt S. A., Lehmann A. R. y Broughton B. C. (1985):** Cells from an immunodeficient patient (46 BR) with a defect in DNA ligation are hypomutable but hypersensitive to the induction of sister chromatid exchanges. Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 2044-2048.

**Honeycombe J. R. (1981):** Spontaneous and busulphan-induced sister-chromatid exchange (SCE) frequencies in hematological normal human bone marrow and lymphocytes. Mutat. Res. 84: 399-407.

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

**Ibuki Y. y Goto R. (1994):** Adaptative response to low doses of gamma ray in Chinese hamster cells: Determined by cell survival and DNA

synthesis. *Biol. Pharm. Bull.* 17 (8): 1111-1113.

**Iijima K. y Morimoto K. (1991):** Quantitative analysis of the induction of chromosome aberrations and sister-chromatid exchanges in human lymphocytes exposed to gamma-rays and mitomycin-C in combination. *Mutat. Res.* 263: 263-268.

**Ikeuchi T. y Sasaki M. (1981):** Differential inducibility of chromosome aberrations and sister-chromatid exchanges by indirect mutagens in various mammalian cell lines. *Mutat. Res.* 90: 149-161.

**Ikushima T. (1989):** Radio-adaptative response: characterization of a cytogenetic repair induced by low-level ionizing radiation in cultured Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 227: 241-246.

**Iqbal M. A., Martin A. O. y Simpson J. L. (1984):** Increased sister chromatid exchanges in human cell lines characterized by monosomy X or structural abnormalities of the X chromosome. *Human Genet.* 68: 205-208.

**Ishii Y. y Bender M. A. (1978):** Factors influencing the frequency of mitomycin C-induced sister-chromatid exchanges in 5-bromodeoxyuridine substituted human lymphocytes in culture. *Mutat. Res.* 51: 411-418.

**Ishii Y. y Bender M. A. (1980):** Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light induced sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 79: 19-32.

**Ishii Y. (1981):** Nature of the mitomycin-C induced lesion causing sister chromatid exchange. *Mutat. Res.* 91: 51-55.

**Ivett J. L. y Tice R. R. (1982):** Average generation time: A new method of analysis and quantitation of cellular proliferation kinetics. *Environ. Mutagen.* 4: 358.

**Kaina B., Fritz G y Coquerelle T. (1993):** Contribution of O<sup>6</sup>-alkylguanine and N-alkylpurines to the formation of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations and mutation gene. *Environ. Mol. Mutagen.* 22: 283-292.

**Kanda N. y Kato H. (1979):** A simple technique for in vivo observation of SCE in mouse ascites tumor and spermatogonial cells. Exp. Cell Res. 118: 431-434.

**Kano Y. y Fujiwara Y. (1981):** Roles of DNA interstrand cross-linking and its repair in the induction of sister-chromatid exchange and a high induction in Fanconi's anemia cells. Mutat. Res. 81: 365-375.

**Kano Y. y Fujiwara Y. (1982):** Dyskeratosis congenita: Survival, sister-chromatid exchange and repair following treatment with crosslinking agents. Mutat. Res. 103: 327-332.

**Kato H. (1974):** Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BrdU-labeling method. Nature 251: 70-72.

**Kato H. y Shimada H. (1975):** Sister chromatid exchanges induced by mitomycin C: a new method of detecting DNA damage at chromosomal level. Mutat. Res. 28: 459-464.

**Kato H. y Stich H. F. (1976):** Sister chromatid exchange in aging and repair deficient human fibroblast. Nature 260: 447-448.

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

**Kato H. (1977):** Mechanism for sister chromatid exchanges and their relation to the production of chromosomal aberrations. Chromosoma 59: 179-191.

**Kato H. (1980):** Evidence that the replication point is the site of sister chromatid exchange. Cancer Genet. Cytogenet. 2: 69-77.

**Kim P. J., D'Arpa P., Jacobson-Kram D. y Williams J. R. (1985):** Ultraviolet-light exposure induces a heritable sensitivity to the induction of SCE by mitomycin-C. Mutat. Res. 149: 437-442.

**King M. T., Wild D., Gocke E. y Eckardt K. (1982):** 5-Bromodeoxyuridine tablets with improved depot effect for analysis in vivo of sister-chromatid exchanges in bone-marrow and spermatogonial cells. Mutat.

Res. 97: 117-129.

**Kinsella A. R. y Radman M. (1978):** Tumor promoter induces sister chromatid exchanges: Relevance to mechanism of carcinogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 6149-6153.

**Klingerman A. D. y Bloom S. E. (1976):** Sister chromatid differentiation and exchanges in adult mudminnows (*Umbra-limi*) after in vivo exposure to 5-bromodeoxyuridine. Chromosoma 56: 101-109.

**Knuutila S., Helminen E., Vuopio P. y De la Chapelle A. (1978):** Increased sister chromatid exchange in megaloblastic anemia studies on bone marrow cells and lymphocytes. Hereditas 89: 175-181.

**Korenberg J. R. y Freedlender E. F. (1974):** Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. Chromosoma 48: 355-360.

**Kornberg A. y Baker T. A. (1992):** DNA Replication. W. H. Freeman. New York. (USA) 931 pp.

**Kram D., Schneider E. L., Tice R. R. y Gianas P. (1978):** Aging and sister chromatid exchange. I. The effect of aging on mitomycin-C induced sister chromatid exchange frequencies in mouse and rat bone marrow cells in vivo. Exp. Cell Res. 114: 471-475.

**Kram A., Schneider E., Senula G. C. y Nakanishi Y. (1979):** Spontaneous and Mitomycin-C induced sister-chromatid exchanges. Comparison of in vivo and in vitro systems. Mutat. Res. 60: 339-347.

**Kram D., Bynum G. D., Senula G. C., Bickings C. K. y Schneider E. L. (1980):** In uterus analysis of sister chromatid exchange: Alterations in susceptibility to mutagenic damage as a function of fetal cell type and gestational age. Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 4784-4787.

**Krishna G., Nath J. y Ong T. (1987):** Mitomycin C, induced sister chromatid exchanges in vivo and in vivo/in vitro in mice and Chinese hamster. Environ. Mol. Mutagen. 10: 157-167.

**Lambert B., Sten M., Soderhall S., Ringborg U. y**

**Lewesohn R. (1983):** DNA repair replication, DNA breaks and sister-chromatid exchange in human cells treated with adriamycin *in vitro*. *Mutat. Res.* 111: 171-184.

**Lambert B., Sten M., Hellgren D. y Domenico F. (1984):** Different SCE-inducing effects of HN2 and MMS in early and late G<sub>1</sub> in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 139: 71-77.

**Larner J. M., Lee H. y Hamlin J. L. (1994):** Radiation effects on DNA synthesis in a defined chromosomal replicon. *Mol. Cell. Biol.* 14 (3): 1901-1908.

**Latt S. A. (1973):** Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70: 3395-3399.

**Latt S. A. (1974):** Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: Detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71: 3162-3166.

**Latt S. A., Stetten G., Juergens L. A., Buchanan G. R. y Gerald, P. S. (1975):** Induction by alkylating agents of sister chromatid exchanges and chromatid breaks in Fanconi's Anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 72: 4066-4070.

**Latt S. A. y Loveday K. S. (1978):** Characterization of sister chromatid exchange induction by 8-methoxypsoralen plus near U. V. light. *Cytogenet. Cell Genet.* 21: 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. (1981):** Sister-chromatid exchanges: A report of the gene-tox program. *Mutat. Res.* 87: 17-62.

**Lett J. T. (1984):** *Advances in Radiation Biology.* Academic Press. Inc. Orlando Florida. 440 pp.

**Liebeskind D., Bases R., Mendes F., Elequin F. y**

**Koenigsberg M. (1979):** Sister chromatid exchanges in human lymphocytes after exposure to diagnostic ultrasound. *Science* 205: 1273-1275.

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

**Littlefield G. L., Colyer S. P., Joiner E. E. y DuFrain R. J. (1979):** Sister chromatid exchanges in human lymphocytes exposed to ionizing radiation during G<sub>0</sub>. *Radiat. Res.* 78: 514-521.

**Littlefield G. L., Colyer S. P. y DuFrain R. J. (1983):** SCE evaluations in human lymphocytes after G<sub>0</sub> exposure to mitomycin C. *Mutat. Res.* 107: 119-130.

**Liu S. Z., Cai L. y Sun S. Q. (1992):** Induction of a cytogenetic adaptative response by exposure of rabbits to very low dose-rate gamma radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 62 (2): 187-190.

**Loveday K. S. y Latt S. A. (1978):** Search for DNA interchange corresponding to sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Nucleic Acids Res.* 5: 4087-4109.

**Luchnik N. V. Porjadkova N. A., Kondrashova T. V. y Seilanov A. S. (1987):** Production of sister-chromatid exchange by irradiation during the G<sub>1</sub> stage: The probable role of 5-bromodeoxyuridine. *Mutat. Res.* 190: 149-152.

**Madrigal-Bujaidar E. y Sánchez-Sánchez M. A. (1991):** Sister-chromatid exchange analysis *in vivo* using different 5-bromo-2'-deoxyuridine-labeling systems. *Mutat. Res.* 262: 15-19.

**Majone F. y Levis A. G. (1979):** Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells treated *in vitro* with hexavalent chromium compounds. *Mutat. Res.* 67: 231-238.

**Majumdar S. D., Bhattacharya S., Mitra A. y Mukherji S.**

**(1991):** Concomitant effect of mitomycin C and gamma radiation on sarcoma 180 ascites tumor bearing mice. *Ind. J. Phys.* 65B (6): 621-627.

**Manyak A. y Schleiermacher E. (1973):** Action of mitomycin C on mouse spermatogonia. *Mutat. Res.* 19: 99-108.

**Marshall R. R., Ariett C. F., Harcourt S. A. y Broughton B. A. (1980):** Increased sensitivity of cell strains from Cockanel's syndrome to sister-chromatid-exchange induction and cell killing by UV light. *Mutat. Res.* 69: 107-112.

**McClintock, B. (1938):** The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior or ring-shaped chromosomes. *Genetics* 23: 315-376.

**Moquet J. E., Lloyd D. C. Prosser J. S. y Edwards A. A. (1987):** Sister-chromatid exchanges induced by mitomycin C after exposure of human lymphocytes in G<sub>0</sub> to low dose of X-radiation. *Mutat. Res.* 176: 143-146.

**Moquet J. E., Prosser J. S., Edwards A. A. y Lloyd D. C. (1989):** Sister-chromatid exchanges induced by mitomycin C after acute or chronic exposure of human lymphocytes to low dose of X-rays. *Mutat. Res.* 227: 207-213.

**Morales R. P. (1980):** Analysis in vivo of sister chromatid exchange in mouse bone marrow and salivary gland cells. *Mutat. Res.* 74: 61-69.

**Morales-Ramírez P., Vallarino-Kelly T. y Rodríguez-Reyes R. (1983):** Effect of BrdU and low doses of gamma radiation on sister chromatid exchange, chromosome breaks, and mitotic delay in mouse bone marrow cells In Vivo. *Environ. Mutagen.* 5: 589-602.

**Morales R. P. (1984):** Efecto de los rayos gamma sobre la inducción y persistencia de intercambios entre cromátidas hermanas (ICH) y otros eventos citogenéticos en células de médula ósea de ratón In vivo. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias (UNAM) México.

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

**Morales-Ramírez P., Vallarino-Kelly T. y Rodríguez-Reyes R. (1984b):** Detection of SCE in rodent cells using the activated charcoal bromodeoxyuridine system. Basic Life Sci. 29B: 599-611.

**Morales-Ramírez P., Vallarino-Kelly T. y Rodríguez-Reyes R. (1987):** Analysis of spontaneous sister-chromatid exchanges in vivo by three way differentiation. Mutat. Res. 178: 49-56.

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

**Morales R. P., Rodríguez R. R. y Vallarino K. T. (1990):** Fate of DNA lesions that elicit sister-chromatid exchanges. Mutat. Res. 232: 77-88.

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

**Morales-Ramírez P., Mendiola-Cruz M. T., Vallarino-Kelly T. y Rodríguez-Reyes R. (1994a):** Comparison of sister chromatid exchange induction in murine germinal and somatic cells by gamma radiation exposure in vivo. Environ. Mol. Mutagen. 24: 89-95.

**Morales-Ramírez P., Vallarino-Kelly T. y Rodríguez-Reyes R. (1994b):** Efecto de la radiación gamma sobre la inducción de intercambios en las cromátidas hermanas por mutágenos químicos. Acta Univ. 4: 29-35.

**Morales-Ramírez P., Cruz-Vallejo V., Vallarino-Kelly T. y**

**Rodríguez-Reyes R. (1995a):** Persistence during G<sub>1</sub> of gamma ray or mitomycin C-induced lesions eliciting SCE in murine salivary gland cells in vivo. Somat. Cell Mol. Genet. 21 (1): 33-41.

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

**Morales-Ramírez P. y Cruz-Vallejo V. (1996):** In vivo effect of gamma ray pretreatment on sister-chromatid exchange induction by mitomycin C in murine bone marrow cells. Mutat. Res. 367: 225-232.

**Morgan W. F. y Crossen P. E. (1980):** X irradiation and sister chromatid exchange in cultures human lymphocytes. Environ. Mutagen. 2: 149-155.

**Morgan W. F. y Crossen P. E. (1981):** Factors influencing sister chromatid exchange rate in cultures human lymphocytes. Mutat. Res. 81: 395-402.

**Morgan W. F. y Cleaver J. E. (1982):** 3-amino benzamide synergistically increases sister-chromatid exchanges in cells exposed to methane sulfonate but not to ultraviolet light. Mutat. Res. 104: 361-366.

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

**Nagasawa H., Fornace A. J., Ritter M. y Little J. B. (1982):** Relationship of enhanced survival during confluent holding recovery in ultraviolet-irradiated human and mouse cells to chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, and DNA repair. Radiat. Res. 92: 483-496.

**Nakanishi Y., Kram D. y Schneider E. L. (1979):** Aging and sister chromatid exchange. IV Reduced frequencies of mutagens-induced sister chromatid exchanges in vivo in mouse bone marrow cells whit aging. Cytogenet. Cell Genet. 24: 61-67.

**Natarajan A. T., Meijers M., Neuteboom I. y Vogel N. (1983):** Induction of sister-chromatid exchanges (SCEs) and chromosomal aberrations by mitomycin C and methyl methanesulphonate in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 121: 211-223.

**Nishi Y., Hasegawa M. M., Inui N., Ikegami S. y Yamada M. (1982):** Effects of post-treatment with aphidicolin a specific inhibitor of DNA polymerase  $\alpha$  - on sister-chromatid exchanges induced by ethyl methanesulfonate. *Mutat. Res.* 103: 155-159.

**Nishi Y., Hasegawa M. M. e Inui N. (1993):** Genetic variations in baseline and ultraviolet light-induced sister chromatid exchanges in peritoneal lymphocytes among different mouse strains. *Mutat. Res.* 286: 145-154.

**Novotná B., Goetz P. y Surkova N. I. (1979):** Effects of alkylating agents on lymphocytes from controls and from patients with Fanconi's anemia. *Human. Genet.* 49: 41-50.

**Obe G., Schunck C. y Johannes C. (1994):** Induction of sister-chromatid exchanges by Alu, DNase I, benzon nuclease and bleomycin in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutat. Res.* 307: 315-321.

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

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

**Osmak M. y Horvat D. (1992):** Chromosomal analysis of Chinese hamster V79 cells exposed to multiple gamma-ray fractions: induction of adaptative response to mitomycin C. *Mutat. Res.* 282: 259-263.

**Ostrosky-Wegman P., Gonsebatt M. E., Montero R., Vega**

**L., Barba H., Espinosa J., Palao A., Cortinas C., García-Vargas G., Razo del L. M. y Cebrián M. (1991):** Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in México. *Mutat. Res.* 250 477-482.:

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

**Painter R. B. y Morgan W. F. (1983):** SCEs induced by ionizing radiation are not the result of exchanges between homologous chromosomes. *Mutat. Res.* 121: 205-210.

**Painter R. B. y Mathur V. (1984):** Effect of prior X-irradiation on ultraviolet light-induced sister chromatid exchange. *Mutat. Res.* 139: 123-126.

**Palitti F. y Becchetti A. (1977):** Effect of caffeine on sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations induced by mutagens in Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 45: 157-159.

**Palitti F., Tanzarella C., Cossi R., Ricordy R., Vitagliano E. y Fiore M. (1982):** Comparison of the frequencies of SCEs induced by chemical mutagens in bone-marrow, spleen and spermatogonial cells of mice. *Mutat. Res.* 103: 191-195.

**Pant G. S., Kamada N y Tanaka R. (1976):** Sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of atomic bomb survivors and of normal individuals exposed to radiation and chemical agents. *Hiroshima J. Med. Sci.* 25 (3): 99-105.

**Pera F. y Mattias P. (1976):** Labeling of DNA and differential sister chromatid staining after BrdU treatment *in vivo*. *Chromosoma* 57: 13-18.

**Perry P. y Wolff S. (1974):** New Giemsa method for the differential staining of sister chromatid. *Nature* 251: 156-158.

**Perry P. y Evans H. (1975):** Cytological detection of mutagen

carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 258: 121-125.

**Popescu N. C. Amsbaugh S. A. y Di Paolo J. A. (1980):** Reduced N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine sister chromatid exchange induction in Chinese hamster V79 pre-exposed to 5-Bromodeoxyuridine. *Chromosoma* 76: 329-338.

**Raffeto G., Parodi S., Faggin P. y Maconi A. (1979):** Relationship between cytotoxicity and induction of sister-chromatid exchanges in mouse foetal cells exposed to several doses of carcinogenic and non-carcinogenic chemicals. *Mutat. Res.* 63: 335-343.

**Raposa T. (1978):** Sister chromatid exchange studies for monitoring DNA damage and repair capacity after cytostatics *in vitro* and in lymphocytes of leukaemic patients under cytostatic therapy. *Mutat. Res.* 57: 241-251.

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

**Renault G., Gentil A. y Chouroulinkov I. (1982):** Kinetics of induction of sister-chromatid exchanges by X-rays through two cells cycles. *Mutat. Res.* 94: 359-368.

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

**Rockwell S. (1993):** Combination therapy with radiation, mitomycin C, and 5-fluorouracil in EMT6 tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 28: 127-133.

**Rüdiger H., Bartram C. R., Harder W. y Passarge E. (1980):** Rate of sister chromatid exchanges in Bloom syndrome fibroblast reduced by co-cultivation with normal fibroblast. *Ann. J. Hum. Genet.* 32: 150-157.

**Russo A., Dorigo E., Stocco A. y Majone F. (1993):** Persistence of chromosomal lesions induced in mouse bone marrow cells by mitomycin C, as evaluated by SCE analysis. *Mutat. Res.* 287: 275-282.

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

**Samson L. y Schwartz J. L. (1980):** Evidence for an adaptive DNA repair pathway in CHO and human skin fibroblast cell lines. *Nature* 287: 861-863.

**Sankaranarayanan K., Duyn A. V. , Loos M. J. y Natarajan A. T. (1989):** Adaptive response of human lymphocytes to low-level radiation from radioisotopes or X-rays. *Mutat. Res.* 211: 7-12.

**Sasaki Y. F. y Shirasu Y. (1993):** Suppressing effects of S phase post-treatment with carbolines on sister-chromatid exchanges induced by mitomycin C in Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 302: 164-171.

**Scheres J. M. J. C., Hustinx Th. W. J., Rutten F. J. y Merks G. (1977):** "Reverse" differential staining of sister chromatids. *Exp. Cell Res.* 109: 466-468.

**Schmid E., Bauchinger M. y Nahrstedt U. (1989):** Adaptive response after X-irradiation of human lymphocytes?. *Mutagenesis.* 4 (2): 87-89.

**Schneider E. L., Chaillet J. y Tice R. (1976):** *In vivo* BrdU labeling of mammalian chromosomes. *Exp. Cell Res.*, 100: 396-399.

**Schreck R. R. Paika I. y Latt S. A. (1979):** *In vivo* induction of sister-chromatid exchanges in liver and marrow cells by drugs requiring metabolic activation. *Mutat. Res.* 64: 315-328.

**Schonberg S. y German J. (1980):** Sister chromatid exchange in cells metabolically coupled to Bloom's syndrome cells. *Nature* 284:72-74.

**Schwartzman J. B. y Goyanes V. (1980):** A New method for

identification of SCEs per cell cycle in BrdU-substituted chromosomes. Cell. Biol. Int. Rep. 4: 415.

**Schwartzman J. B. y Gutiérrez C. (1980):** The relationship between the cell time available for repair and the effectiveness of damaging treatment in provoking the formation of sister-chromatid exchanges. Mutat. Res. 72: 483-489.

**Schwartzman J. B., Goyanes V., Campos A., Lage, A. M., Veiras C., Silva M. y Ramos S. (1985):** Persistence of DNA lesions and the cytological cancellation of sister-chromatid exchanges. Chromosoma 92: 17-10.

**Schwartz J. L., Banda M. J. y Wolff S. (1982):** 12-O-Tetra decanoylphorbol-13-acetate (TPA) induces sister-chromatid exchanges and delay in cell progression in Chinese hamster ovary and human cell lines. Mutat. Res. 92: 393-409.

**Shadley J. D. y Wiencke J. K. (1989):** Induction of the adaptative response by X-rays is dependent of radiation intensity. Int. J. Radiat. Biol. 56 (1): 107:118.

**Shadley J. D. y Dai G. (1993):** Evidence that the adaptative response of human lymphocytes to ionizing radiation acts on lethal damage in nonaberrant cells. Mutat. Res. 301: 171-176.

**Shafer D. A. (1977):** Replication bypass of sister chromatid exchanges and implications for Bloom's syndrome and Fanconi anemia. Human Genet. 39: 177-190.

**Shiraishi Y. y Sandberg A. (1978):** Effects of mitomycin C on sister chromatid exchange in normal and Bloom's syndrome cells. Mutat. Res. 49: 233-238.

**Shiraishi Y. y Sandberg A. (1979):** Effects of various chemical agents on sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and DNA repair in normal and abnormal lymphoid cell lines. J. Natl. Cancer Inst. 62: 27-

35.

**Shiraishi Y. y Sandberg A. (1980):** Effects of caffeine-induced defective DNA replication on SCE and chromosome aberrations produced by alkylating agents. *Mutat. Res.* 72: 251-256.

**Singh B. y Gupta R. S. (1983):** Mutagenic responses of thirteen anticancer drugs on mutation induction at multiple genetic loci and on sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 43: 577-584.

**Solomon E. y Bobrow W. (1975):** Sister chromatid exchanges a sensitive assay of agents damaging human chromosomes. *Mutat. Res.* 30: 273-278.

**Sono A. y Sakaguchi K. (1988):** Inhibition of protein synthesis does not antagonize induction of UV-induced sister-chromatid exchange in Xeroderma pigmentosum cells. *Cell Structure and Function* 13: 39-43.

**Stetka D. G. y Spahn M. V. (1984):** SCEs are induced by replication of BrdU-substituted DNA templates, but not by incorporation of BrdU into nascent DNA. *Mutat. Res.* 140: 33-42.

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

**Stetka D. G. y Wolff S. (1976b):** Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens. II *In vitro* test for compounds requiring metabolic activation. *Mutat. Res.* 41: 343-350.

**Stetka D. G., Minkler J. y Carrano A. V. (1978):** Induction of long-lived chromosome damage, as manifested by sister-chromatid exchange, in lymphocytes of animals exposed to mitomycin-C. *Mutat. Res.* 51: 383-396.

**Takahashi K., Kaneko I., Nishiyama Ch. y Nakano K. (1985):** Effect of novobiocin on the frequencies of chromatid-type

aberrations and sister-chromatid exchanges following gamma-irradiation. *Mutat. Res.* 144: 265-270.

**Takayama S. y Sakanishi S. (1977):** Differential Giemsa staining of sister chromatids after extraction with acids. *Chromosoma* 64: 109-115.

**Takeshita T. y Conner M. K. (1985):** Persistence of cyclophosphamide-induced damage in bone marrow as indicated by sister chromatid exchange analysis. *Carcinogenesis* 8: 1097-1102.

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

**Tice R., Chaliliet J. y Schneider E. L. (1976):** Demonstration of spontaneous sister chromatid exchanges *in vivo*. *Exp. Cell Res.* 102: 426-429.

**Tice R., Windler G. y Rary J. M. (1978):** Effect of cocultivation on sister chromatid exchange frequencies in Bloom's syndrome and normal fibroblast cells. *Nature* 273: 538-540.

**Tofilón P. J. y Deen D. F. (1984):** BCNU-induced sister chromatid exchanges are increased by x irradiation. *Radiat. Res.* 97: 171-177.

**Tohda H., Nagao M., Sugimura T. y Oikawa A. (1993):** Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, induces sister-chromatid exchanges depending on the presence of bromodeoxyuridine. *Mutat. Res.* 289: 275-280.

**Tsuchimoto T., Matter B. E. y Deysenroth, H. (1979):** Analysis of chromosome aberrations and sister-chromatid exchanges in human lymphocytes exposed *in vitro* to hydroxyurea. *Mutat. Res.* 67: 39-45.

**Vogel E. W. (1991):** Genotoxic chemicals: An introduction into basic principles of genetic toxicology. *Manual del Curso Internacional de Genética Toxicológica Molecular y Aplicada.* Facultad de Ciencias. 66 pp.

**Wojcik W. y Tuschl H. (1990):** Indication of adaptive response in C57BL mice pre-exposed *in vivo* to low doses of ionizing radiation. *Mutat.*

Res. 243: 67-73.

**Wolff S. y Perry P. (1974):** Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography. *Chromosoma* 48: 341-353.

**Wolff S., Bodycote J. y Painter R. (1974):** Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cell by UV irradiation at different stages of the cell cycle: the necessity for cell to pass through S. *Mutat. Res.* 25: 73-81.

**Wolff S., Bodycote J., Thomas G. H. y Cleaver J. E. (1975):** Sister chromatid exchange in xeroderma pigmentosum cells that are defective in DNA excision repair or post-replication repair. *Genetics* 81: 349-355.

**Wolff S., Rodin B. y Cleaver J. E. (1977):** Sister chromatid exchanges induced by mutagenic carcinogens in normal and xeroderma pigmentosum cells. *Nature* 265: 347-349.

**Wolff S., Afzal V., Wiencke J. K., Olivieri G. y Michaeli A. (1988):** Human lymphocytes exposed to low doses of ionizing radiations become refractory to high doses of radiation as well as to chemical mutagens that induce double-strand breaks in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 53 (1): 39-48.

**Yokota K., Ueda K., Ohama K. y Fujiwara A. (1989):** Increased spontaneous and mitomycin C-induced sister chromatid exchanges in patients with cancer of the cervix uteri, with special reference to stage of cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 43: 79-87.

**Zakharov, A. y Egorina, N. (1972):** Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. I BrdU-revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes. *Chromosoma* 38: 341-365.

## In vivo effect of gamma ray pretreatment on sister-chromatid exchange induction by mitomycin C in murine bone marrow cells

P. Morales-Ramírez<sup>\*</sup>, V. Cruz-Vallejo

*Departamento de Genética, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Apartado Postal No. 18-1027, CP 11801, México, D.F., Mexico*

Received 29 August 1995; revised 30 October 1995; accepted 30 October 1995

### Abstract

The effect of gamma ray pretreatment on sister-chromatid exchange induction by mitomycin C (MMC) was determined in murine bone marrow cells in vivo. A 30% reduction in the expected SCE frequency was observed assuming an additive effect. These results support the prediction of the replicative model for SCE formation with regard to the interactions between mutagens, and confirm previous results focused on the adaptive response.

*Keywords:* Sister-chromatid exchange; Gamma ray; Mitomycin C; Adaptive response

### 1. Introduction

The sister-chromatid exchange (SCE) is an amply studied phenomenon, although, its biological meaning is not well understood. Several models have been proposed for both the mechanism of its formation and for its genetic meaning (Comings, 1975; Kato, 1977; Shafer, 1977; Stetka, 1979; Ishii and Bender, 1980; Painter, 1980; Cleaver, 1981; DuFrain, 1981; Conner et al., 1984; Morales-Ramírez et al., 1990). These models can be classified in two groups: one that proposes that SCEs are induced by discrete lesions and occur in the site or near the site in which the lesions are located (Kato, 1977; Shafer, 1977; Ishii and Bender, 1980; Morales-Ramírez et al., 1990) and another that suggests that SCEs are caused by several lesions and the site of occurrence is not

related to a specific lesion (Painter, 1980; Cleaver, 1981; DuFrain, 1981).

In this latter group, one can consider the replicative model of Painter (1980), which proposes that the unique site in which a double-strand break could occur during DNA synthesis, is the replicon cluster region. Considering that SCE occurs during DNA synthesis, the model predicts that due to the fact that X-rays delay replication initiation, pretreatment with X-rays will reduce the SCE frequency induced by agents that block DNA chain elongation. This prediction has been assayed in CHO cells using X-rays and UV light (Painter and Mathur, 1984), in frog cells using gamma rays and UV light (Chao and Rosenstein, 1984). In the first study a 10% reduction of the expected SCE frequency was obtained, in the second, a time dependent reduction of approx. 75% was observed. In a previous study conducted in murine bone marrow cells in vivo pretreated with gamma

<sup>\*</sup> Corresponding author. Fax: 521-37-98.

rays and then exposed to either cyclophosphamide or MMC, a 5% and 30% reduction was observed, respectively; however, due to the variability of response between animals, the results were not considered definitive (Morales-Ramírez et al., 1994).

The aim of the present study is to test *in vivo*, the prediction of the replicative model, by comparing the SCE frequencies between the femoral marrow cells of each mouse irradiated partially with gamma rays and then treated with MMC.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Rationale

The study was based on partial exposure (one posterior extremity) of each animal with gamma radiation and the intraperitoneal administration of MMC 30 min later. The strategy permits one to compare the effect of the MMC alone with the combined treatment in the same animal, obviating the variability of response between animals.

The study was divided into three steps:

1. Comparison of the basal SCE frequency between the bone marrow cells of each femur in the mice.
2. Comparison of SCE frequency induced by gamma rays or MMC in the femurs of each animal.
3. Comparison of SCE induction caused by MMC between the irradiated and unirradiated femurs in each mouse.

### 2.2. Protocols

#### 2.2.1. Step 1

Bromodeoxyuridine (BrdU) was administered at the beginning of the experiment, colchicine at 22 h; the animals were killed 2 h later. The bone marrow cells of each femur were processed independently.

#### 2.2.2. Step 2

Groups of mice were either irradiated 1 h before BrdU administration or treated with MMC 30 min before BrdU injection. Twenty-two hours after BrdU the mice were injected with colchicine and killed 2 h later. The bone marrow cells of each femur were harvested individually.

#### 2.2.3. Step 3

A group of mice was irradiated in only one posterior extremity 1 h before BrdU administration. Twenty-two hours later a colchicine solution was administered intraperitoneally, and finally the mice were killed 2 h afterwards. The SCE in the bone marrow cells from the unirradiated femur represents the basal frequency, and the SCE frequency in the irradiated femur represents those induced by gamma rays. Another group was also partially irradiated (one posterior leg) and then injected with MMC and BrdU 30 and 60 min later respectively. Twenty-two hours later the mice were injected with a solution of colchicine and killed by cervical dislocation 2 h after that. The bone marrow cells of each femur were processed independently. The data obtained in the cells from the unirradiated leg represent the MMC effect, and that obtained from the irradiated one represent the effect of radiation on the MMC effect.

### 2.3. Animals

In this study 2 to 3-month-old BALB/c male mice weighing approx. 30 g were used. The animals were bred and maintained in plastic cages under controlled conditions of temperature, humidity, dark-light periods, and given Purine chow for small rodents and water *ad libitum*.

### 2.4. Treatments

The treatments were carried out at the time previously mentioned in protocols.

#### 2.4.1. Irradiation

The animals were partially irradiated in groups of five using a  $^{60}\text{Co}$  source (Teratron), with a 1.0 Gy dose administered in 10 min in a device designed for the partial irradiation; the rest of the body was protected with a Pb shield. The exposure was controlled by thermoluminescent dosimeters in both legs.

#### 2.4.2. Mitomycin C

Mitomycin C (MMC; Sigma Chemicals) was administered intraperitoneally in aqueous solution with a dose of 2 mg/kg of body weight.

### 2.4.3. Bromodeoxyuridine

BrdU (Sigma Chemicals) previously adsorbed to charcoal (Morales-Ramírez, 1980) was administered intraperitoneally in aqueous suspension, at a dose of 1.5 mg of BrdU/g of body weight.

### 2.4.4. Colchicine

Mice were intraperitoneally injected with 3.7 mg of colchicine aqueous solution (Sigma Chemicals) per kg of body weight.

## 2.5. Chromosome preparations

Two hours after colchicine treatment, the animals were killed by cervical dislocation, both femurs dissected and bone marrow cells flushed out by injecting a buffered saline solution at one end. The cell suspension was centrifuged at 1000 rpm for 5 min, the pellet was resuspended in 0.075 M KCl, incubated at 37°C for 15 min, and the cells were fixed in methanol/acetic acid 3:1 for three periods of 10 min each; finally the cell suspension was dropped onto chilled slides.

## 2.6. Differential staining

Sister-chromatid differential staining was obtained by the fluorescence plus Giemsa method (Perry and Wolff, 1974) slightly modified (Goto et al., 1975).

## 2.7. Analysis

SCE frequencies were analyzed in 30 well-differentially stained metaphases. The mitotic index (MI) was determined by scoring the number of metaphases in 3000 cells. The average generation time (AGT) was determined by scoring 300 cells

Table 1  
Comparison of basal frequencies of SCE, AGT and MI between femurs of each mouse

$\bar{x} \pm SD$					
SCE		AGT		MI	
Right	Left	Right	Left	Right	Left
2.8 ± 0.4	3.0 ± 0.2	12.4 ± 0.5	12.6 ± 0.6	55.2 ± 8.3	57.5 ± 6.6

No significant differences between legs paired *t*-test.

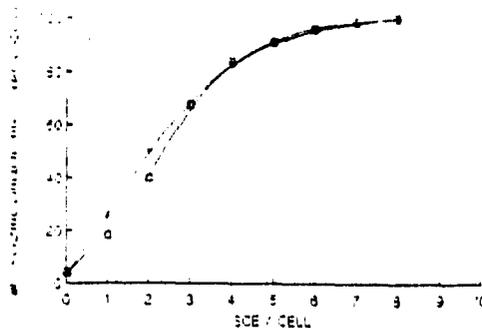


Fig. 1. Cumulative frequencies of cells (%) with respect to the SCE number in bone marrow cells from the right (+) and left (□) femurs of untreated mice.

following a previously reported method (Ivett and Tice, 1982).

## 2.8. Statistics

The statistical significance between groups was determined by the paired test *t*-using a PC program (Camps et al., 1993).

## 3. Results

### 3.1. Comparison of basal SCE frequency, AGT and MI between the bone marrow cells of the right and left femur of each mouse.

Table 1 shows the basal frequencies of SCE, AGT and MI in the bone marrow cells from the right and left posterior extremities of the mice. No statistical difference was found between extremities for any end point. Fig. 1 shows the plots of cumulative cell frequency with respect to the number of SCE (CCF vs. SCE), obtained from the cells of the right and left legs of the mice; the curves are almost identical.

### 3.2. Comparison of radiation- or MMC-induced SCE frequency, AGT, and MI between the bone marrow cells of the right and left femur of mice.

The data of SCE, AGT and MI of the bone marrow cells of the right and left femur appear in Table 2. These results indicate that there is no statis-

Table 2  
Comparison of SCE, AGT and MI values induced by 1.0 Gy of gamma-rays between femurs of each mouse

$r \pm SD$					
SCE		AGT		MI	
Right	Left	Right	Left	Right	Left
Control					
3.0 $\pm$ 0.3	3.0 $\pm$ 0.4	12.4 $\pm$ 0.4	12.9 $\pm$ 0.4	63.1 $\pm$ 2.9	64.9 $\pm$ 4.8
Radiation					
4.2 $\pm$ 0.1	4.0 $\pm$ 0.2	13.2 $\pm$ 0.4	13.2 $\pm$ 0.4	68.5 $\pm$ 11.2	72.1 $\pm$ 5.7

No significant differences between legs, paired *t*-test.

tical difference for any of the indexes determined, in the response observed in the marrow cells of both posterior extremities to radiation exposure. However, a significant difference was observed between irradiated and unirradiated controls, but only with respect

Table 3  
Comparison of SCE, AGT and MI values induced by MMC between femurs of each mouse

$r \pm SD$					
SCE		AGT		MI	
Right	Left	Right	Left	Right	Left
Control					
4.1 $\pm$ 0.5	3.9 $\pm$ 0.5	12.6 $\pm$ 0.3	12.5 $\pm$ 0.5	75.0 $\pm$ 7.5	75.3 $\pm$ 9.0
MMC					
16.3 $\pm$ 1.0	16.5 $\pm$ 1.5	14.2 $\pm$ 0.5	14.0 $\pm$ 0.7	71.8 $\pm$ 4.8	69.2 $\pm$ 9.7

No significant differences between legs, paired *t*-test.

to SCE frequency. The plots of CCF vs. SCE shown in Fig. 2 also indicate that there is no difference in SCE induction by gamma rays, in the bone marrow cells from the right and left femur.

Table 3 shows the frequencies of SCE and the

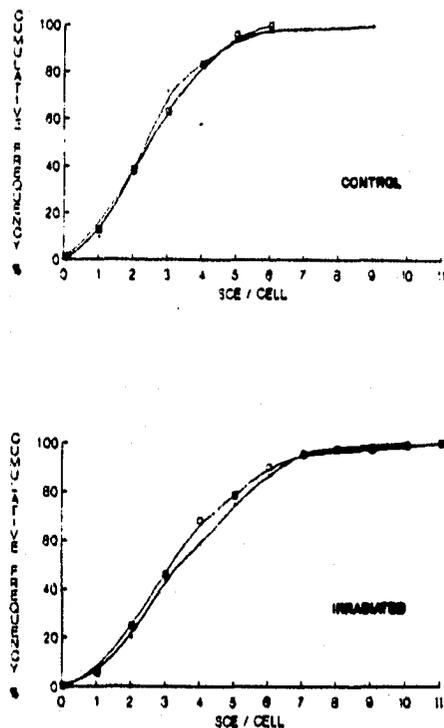


Fig. 2. Cumulative frequencies of cells (%) with respect to the SCE number in bone marrow cells from the right (small black square) and left (□) femurs of control and irradiated mice.

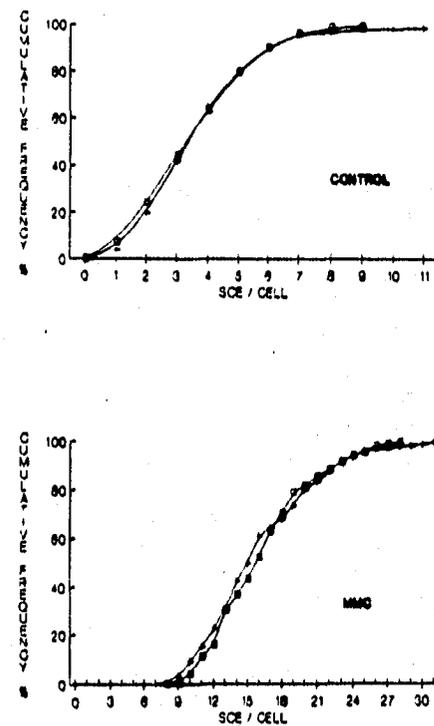


Fig. 3. Cumulative frequencies of cells (%) with respect to the SCE number in bone marrow cells from the right (+) and left (□) femurs of control and MMC-treated mice.

Table 4  
Effect of gamma-ray exposure on posterior SCE induction by MMC

SCE/Cell $\pm$ SD (increase)			
Femur:	Right	left	n
Treatment:	Control	Radiation	8
	3.6 $\pm$ 0.2 **	5.1 $\pm$ 0.5 ** (1.5)	
Treatment:	MMC	RAD + MMC	7
	13.1 $\pm$ 1.5 * (9.5)	11.4 $\pm$ 1.5 * (7.8)	

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$  paired *t*-test.

values of AGT and MI in the bone marrow cells of the right and left femurs of mice exposed to MMC; the data indicate the same effect in both femurs; however, it is statistically higher than that obtained in the untreated controls for SCE and AGT. Fig. 3 shows the curves of CCF vs. SCE from bone marrow cells of the right and left femur of mice exposed or not to MMC. Both pairs of curves were very similar, indicating there was no difference in the response of the marrow cells from the femurs of each mouse.

### 3.3. Effect of pre-exposure with gamma rays on changes in SCE induction, AGT and MI caused by MMC treatment.

The results shown in Table 4 indicate that the cells from the femur exposed to radiation and then treated with MMC have a significantly lower SCE frequency ( $p < 0.05$ ) than that observed in the unirradiated femur exposed to MMC. However, two mice did not show a difference in SCE between those pretreated and untreated with gamma rays; nevertheless, it is necessary to consider that gamma rays per se induced a significant increase of 1.5 SCE/cell with respect to the untreated control ( $p < 0.001$ ). This means that considering an additive increase, if gamma rays and MMC induced an increase of 1.5 and 9.5 SCE/cell, respectively, the expected SCE increase for cells irradiated and treated with MMC should have been 11 SCE/cell, which compared with the observed SCE increase of 7.8, indicates a 30% reduction. In Fig. 4 the curves of CCF vs. SCE of bone marrow cells from the control femur, and the femur treated with radiation, MMC or

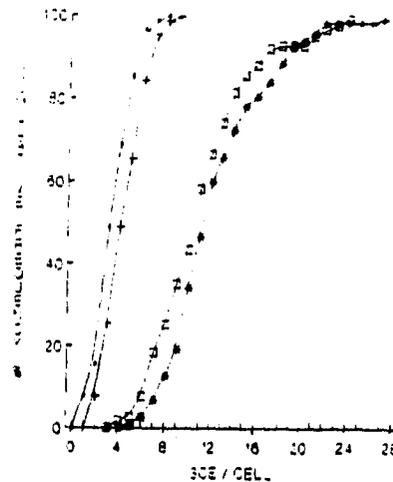


Fig. 4. Cumulative frequencies of cells (%) with respect to the SCE frequency in murine bone marrow cells from femurs: untreated (●), irradiated (+), treated with MMC (\*) or irradiated and treated with MMC (□).

with both are shown. The curves from the femurs irradiated or treated with MMC display an increase in the number of cells with higher SCE frequency with respect to that from the untreated control. In this figure, also, a slight difference is observed between the MMC-treated femurs and the ones treated with both radiation and MMC, which indicates that MMC induction of SCE frequency is reduced by the pretreatment with gamma rays.

Table 5  
Effect of pretreatment with gamma-radiation on AGT and MI induced by mitomycin C

AGT ( $\bar{x} \pm$ SD)			
Femur:	Right	Left	n
Treatment:	Control	Radiation	8
	12.8 $\pm$ 0.9	13.2 $\pm$ 0.7	
Treatment:	MMC	RAD + MMC	7
	13.2 $\pm$ 0.8 *	14.0 $\pm$ 1.0 *	
MI ( $\bar{x} \pm$ SD)			
Femur:	Right	Left	n
Treatment:	Control	Radiation	8
	64.8 $\pm$ 13.8	59.8 $\pm$ 12.9	
Treatment:	MMC	RAD + MMC	7
	60.0 $\pm$ 6.2	62.6 $\pm$ 8.3	

\*  $p < 0.01$  paired *t*-test.

The data shown in Table 5 for AGT and MI, obtained in the previous experiment, indicate an additive effect of radiation and MMC with respect to AGT, because both agents independently increase the AGT, and the combination of both agents causes an increase equivalent to the sum. With regard to the MI, it did not show any difference.

#### 4. Discussion

The results presented here indicate that pretreatment with gamma rays reduces the SCE frequency induced by MMC in murine bone marrow cells. This is concluded from the direct comparison between the SCE induction in the femoral marrow of the pre-irradiated or unirradiated legs of mice treated with MMC; however, it is clearly inferred from the expected SCE frequency assuming an additive response. This can be affirmed because the experimental design allows us to make a comparison in the same animal, eliminating the individual variability, which could make it difficult to distinguish small differences. Under this condition the reduction in SCE induction is approximately 30%. These data fit well with a previous study in the same system but analyzing the response in different groups of mice (Morales-Ramirez et al., 1994); however, they are higher than previous ones obtained in Chinese hamster cells (Painter and Mathur, 1984) and lower than others found in frog cells (Chao and Rosenstein, 1984).

Due to the fact that the study here reported considers the interaction between agents capable of inducing SCE, it is possible that each agent was capable of reducing the SCE induction caused by the other; however, the fact that the net SCE induction caused by MMC was reduced in the marrow cells treated with both radiation and MMC, suggests that radiation reduces SCE induction by MMC. Nevertheless, a reciprocal reduction, i.e., competence by sites in which SCE occurs, can not be discarded.

Actually at least two possibilities of interaction between mutagen agents on SCE induction have been proposed: one is the previously mentioned interaction of lesions caused by these agents during DNA synthesis as Painter (1980) proposed; the other is the action of mutagens with systems that eliminate

DNA damage, i.e., the adaptive response (Samson and Schwartz, 1980).

With regard to this latter possibility, evidence has been reported that gamma rays are able to induce some resistance to SCE induction by MMC in human lymphocytes (Moquet et al., 1989), Chinese hamster cells (Ikushima, 1989) and an in vivo-in vitro system in spleen cells (Wojcik and Tuschl, 1990). In these experiments the adaptive response causes from a slight decrease of up to a 20% reduction of the normal response. It is convenient to mention that the experimental conditions between these studies and with one the reported here are not completely comparable, but in all the cases the cells were irradiated prior to the MMC treatment.

Although, the results reported here fit well with the prediction derived from the replicative model of SCE induction (Painter, 1980), it is necessary to comment that the occurrence of this prediction is not a necessary and sufficient condition to validate this model. Besides, there evidence exists suggesting that there are at least two forms of SCE induction. One is by damaging DNA (MacRae et al., 1979; Schwartzman and Gutierrez, 1980; Nagasawa et al., 1982) another by inhibiting DNA synthesis (Ishii and Bender, 1980; Nishi et al., 1982). These two mechanisms can be distinguished by analyzing the curves of frequency distribution of SCE per cell. The cell frequency distribution curves from agents that induce SCE by damaging DNA lesions fit well with the Poisson distribution, and those from agents that inhibit DNA synthesis were skewed, and showed many cells with very high SCE frequencies (Rainaldi and Mariani, 1982). Both mechanisms of SCE induction are far from being well characterized.

The models of SCE induction through DNA lesions can be divided into two groups: one that proposes that SCEs are induced by a particular lesion, determining that it occurs in the site or near the site in which the lesion is located (Kato, 1977; Shafer, 1977; Ishii and Bender, 1980; Morales-Ramirez et al., 1990); and another that suggests that SCE are caused by several lesions and the site of occurrence is not related to a specific lesion (Painter, 1980; Cleaver, 1981; DuFrain, 1981). The replicative model for SCE induction is considered in this latter group (Painter, 1980); this model proposes that the unique site in which a double-strand break could

occur during DNA synthesis is the replicon cluster region, and that the SCE is produced when the double-strand breaks open the possibility of a double-strand exchange due to a delay in DNA synthesis caused by several lesions.

However, there exists evidence indicating that mutagen doses which cause substantial SCE induction do not cause a significant DNA synthesis inhibition (Kaina, 1985). This can be supported by the fact here reported, that the curves of cell frequency distribution with respect to the number of SCE per cell after gamma rays and/or MMC exposure (Figs. 2 and 3), fit well with the Poisson distribution, with only a few cells having a very high SCE frequency, in which an inhibition of the SCE-inducing mechanism could be occurring (Rainaldi and Mariani, 1982). These results confirm those previously obtained for SCE induction by gamma rays (Morales-Ramírez et al., 1984). All the previously mentioned data imply that the inhibition of DNA synthesis is not the cause of SCE induction by radiation and MMC.

Besides, there is some evidence suggesting that specific lesions are involved in SCE induction (Raith et al., 1984). In particular for SCE induction caused by radiation in mouse bone marrow cells, all lesions seem to cause SCE in the same locus in successive divisions (Morales-Ramírez et al., 1990). This does not agree with the replicative model (Painter, 1980) because according to it, the delay of DNA synthesis only opens the possibility of SCE occurrence but does not determine it.

An alternative possibility of explaining the inhibitory effect of the gamma ray pretreatment on SCE induction by MMC could be a selection of a more resistant cell population through cell death or division delay. Possibly the cell delay could be the better alternative considering that both agents affect the AGT and act in an additive way.

Finally, it is necessary to point out that the study of the interaction of mutagens with different kinds of action is important because human beings are actually exposed to several kinds of agents. In the particular case of radiation and MMC, the study results are interesting because the agents are used in cancer therapy and the subsequent use of them could determine cell resistance.

## Acknowledgements

We wish to thank Angel Reyes P., Perfecto Aguilar V. and Felipe Beltrán B. for their excellent technical assistance, the personnel from the Metrology Centre at ININ for the support in irradiation and dosimetry, and Rosa María Noriega for English editing.

## References

- Camps, E., G. Anguiano and Ondarza, R. (1993) Sistema básico de estadística (SBE). Rep. Tec. Ins. Nal. Inv. Nucleares, México, IB-93-11, pp. 19.
- Chao, C.C.-K. and B.S. Rosenstein (1984) Inhibition of the UV induction of sister-chromatid exchanges in ICR-2A frog cells by pretreatment with gamma-rays. *Mutation Res.*, 139, 35–39.
- Cleaver, J.E. (1981) Correlations between sister chromatid exchange frequencies and replicon sizes. *Exp. Cell Res.*, 136, 27–30.
- Comings, D.E. (1975) Implications of somatic recombination and sister chromatid exchange in Bloom's syndrome and cells treated with Mitomycin C. *Humangenetik*, 28, 191–196.
- Conner, M.K., M. Cheng and J.A. Biegel (1984) A path probability model for sister-chromatid exchanges induced by alkylating agents. *Mutation Res.*, 126, 35–46.
- DuFrain, R.J. (1981) A conformation based hypothesis for the mechanism of sister chromatid exchange formation. *Mammalian Chrom. Newslett.*, 22, 9.
- Goto, K., T. Akematsu, H. Shimazu, and T. Sugiyama (1975) Simple differential Giemsa staining of sister chromatids after the treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining. *Chromosoma*, 64, 223–230.
- Ikushima, T. (1989) Radio-adaptive response: characterization of a cytogenetic repair induced by low-level ionizing radiation in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Res.*, 227, 241–246.
- 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.
- Ivett, J.L. and R.R. Tice (1982) Average generation time: A new method of analysis and quantitation of cellular proliferation kinetics. *Environ. Mutagen.*, 4, 358.
- 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.
- Kato, H. (1977) Mechanism for sister chromatid exchanges and the relation to the production of chromosomal aberrations. *Chromosoma*, 59, 179–191.
- MacRae, W.D., E.A. MacKinnon and H.F. Stich (1979) The fate of UV-induced lesions affecting SCEs, chromosome aberra-

- tions and survival of CHO cells arrested by deprivation of arginine. *Chromosoma*, 72, 15-22.
- Moquet, J.E., J.S. Prosser, A.A. Edwards and D.C. Lloyd (1989) Sister-chromatid exchanges by mitomycin C after acute or chronic exposure of human lymphocytes to a low dose of X-rays. *Mutation Res.*, 227, 207-213.
- 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) In vivo persistence of sister chromatid exchanges (SCE) induced by gamma rays in mouse bone marrow cells. *Environ. Mutagen.*, 6, 529-537.
- 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.
- Morales-Ramírez, P., T. Vallarino-Kelly and R. Rodríguez-Reyes, R. (1994) Efecto de la radiación gamma sobre la inducción de intercambios en las cromátidas hermanas por mutágenos químicos. *Acta Universitaria. Universidad de Gto. México*, 4, 29-35.
- 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. *Radiation 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 alpha- 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.
- Painter, R.B. and V. Mathur (1984) Effect of prior X-irradiation on ultraviolet light-induced sister chromatid exchange. *Mutation Res.*, 139, 123-126.
- Perry, P. and S. Wolff (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251, 156-158.
- 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 SCEs. in R.R. Tice and A. Hollaender (Eds.), *Sister Chromatid exchanges*, Basic Life Sci. Vol. 29A, Plenum Press, pp. 181-198.
- Samson, L. and Schwartz, J.L. (1980) Evidence for an adaptive DNA repair pathway in CHO and Human skin fibroblast cell lines. *Nature*, 287, 861-863.
- 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.
- Shafer, D.A. (1977) Replication bypass of sister chromatid exchanges and implications for Bloom's syndrome and Fanconi anemia. *Hum. Genet.*, 39, 177-190.
- Sietka, D.G. Jr. (1979) Further analysis of the replication bypass model for sister chromatid exchange. *Hum. Genet.*, 49, 63-69.
- Wojcik, W. and H. Tuschl (1990) Indications of an adaptive response in C57BL mice pre-exposed in vivo to low doses of ionizing radiation. *Mutation Res.*, 243, 67-73.