

00387
15



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLOGICAS

Facultad de Ciencias

EL SEGUIMIENTO DEL DESTINO DE LAS
LESIONES INDUCTORAS DE ICH COMO
ESTRATEGIA PARA AHONDAR EN EL
MECANISMO DE FORMACION DE ICH

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
P R E S E N T A

M. en C. Regina Guadalupe Rodríguez Reyes

DIRECTOR DE TESIS: DR. PEDRO MORALES RAMIREZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

JUNIO, 2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

OFICIO FCIE/DEP/0328/03

ASUNTO: Asignación de Jurado

**ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

At'n: BIÓL. FRANCISCO J. INCERA UGALDE

Comunico a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas ha asignado al(a) **M. EN C. REGINA GUADALUPE RODRÍGUEZ REYES**, el jurado para presentar Examen de Grado de **DOCTOR(A) EN CIENCIAS**.

PRESIDENTE	DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNÁIZ
PRIMER VOCAL	DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
SEGUNDO VOCAL	DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE
TERCER VOCAL	DRA. SARA FRIAS VÁZQUEZ
SECRETARIO	DR. PEDRO ROSENDO MORALES RAMÍREZ
SUPLENTE	DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
SUPLENTE	DRA. REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA

El título de la tesis es:

"El seguimiento del destino de las lesiones inductoras de ICH como estrategia para ahondar en el mecanismo de formación de ICH"

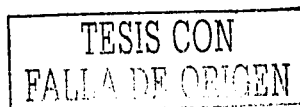
bajo la dirección del (a):

DR. PEDRO ROSENDO MORALES RAMÍREZ

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D. F., 12 de mayo del 2003
COORDINADORA DEL PROGRAMA

DRA. TILA MARÍA PÉREZ ORTIZ

TMPOIASR\grf*



B

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Pedro Morales Ramírez por la excelente dirección de este trabajo, por el entusiasmo que demostró en cada etapa del desarrollo del mismo y por la ayuda invaluable que siempre me ha brindado.

Manifiesto también mi admiración por el investigador que con gran vocación pregunta, propone y encuentra; es estimulante colaborar con él.

¡Gracias Pedro!

A los miembros del jurado, por dedicarme su tiempo y atenciones. Sus comentarios y sugerencias enriquecieron este trabajo.

Dra. Rosario Rodríguez Arnáiz
Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano
Dr. José Miguel Betancourt Rule
Dra. Sara Frías Vázquez
Dra Sandra Luz Gómez Arroyo
Dra. Regina Dorinda Montero Montoya.

A la Dra. Sandra Gómez Arroyo y al Dr. Mario Altamirano Lozano, miembros de mi Comité Tutorial les agradezco especialmente por todo lo que me dieron durante el desarrollo de esta investigación. Sus observaciones y sugerencias fueron valiosas en todo momento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A la Universidad Nacional Autónoma de México
por darme la oportunidad de realizar este doctorado,
institución de la cual me siento orgullosa.

Agradezco a las autoridades del
Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares
por las facilidades para el desarrollo
e impresión de este trabajo de tesis.

Agradezco al CONACYT por la beca que
me otorgó durante el período 2000-2003

Este trabajo de investigación
forma parte del proyecto 33167-N
financiado por el CONACYT.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A la Dra. María Teresa Mendiola por la confianza
y el apoyo que me brindó durante el
desarrollo del doctorado.

A mis compañeros del laboratorio de
Radiobiología Celular, M. en C. Virginia Cruz,
Biol. Teresita Vallarino y M. en C. Francisco
González.

El valioso apoyo técnico de mis
compañeros Angel Reyes, Perfecto Aguilar
y Felipe Beltrán.

Al M. en C. David Alcántara Díaz, por
la atención que siempre ha dado a mis
dudas e inquietudes.

A todos mis compañeros del
Departamento de Biología.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS

Por el gran significado que han tenido en mi vida dedico este trabajo a las siguientes personas:

A la memoria de mi adorada madre Sra Catalina Reyes Milán

A mi padre Sr Sóstenes Rodríguez López

A mi tía Sra .Severina Reyes Milán

A Leonardo y Horacio
mis adorados hijos

A mis queridos hermanos y sobrinos.

A mis amigas las queridas "Sapas"

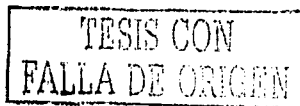
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

	PAGINAS
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCION	5
1. 1 Intercambio en las cromátidas hermanas	5
1. 2 Mecanismo de formación del ICH	6
1.2.1. Causas que generan el ICH	6
1.2.2. Relación entre la inducción ICH y la etapa de Síntesis (S).	7
1.2.3. Relación entre la producción de ICH y la horquilla de duplicación	7
1. 3 Formación de ICH	7
1.3.1 Modelos	7
1.3.2. La formación de ICH como expresión de la recombinación homóloga	12
1.3.3. Formación de ICH por cambios epigenéticos.	13
1. 4 Significado biológico del ICH.	14
1. 4. 1 Correlación del ICH con eventos celulares	15
1. 4. 2 Relación entre ICH y reparación	15
1.4.3. Persistencia de las lesiones inductoras de ICH y significado biológico del ICH.	15
1. 5. Destino de las lesiones inductoras de ICH	16
1.5.1. Protocolos para estudiar el destino de las lesiones inductoras de ICH	17
1.6. Efecto de la BrdU sobre la inducción de ICH	20
1.6.1. Efecto de la incorporación de la BrdU <i>per se</i>	20
1.6.2. Papel Modulador de la incorporación de	

BrdU sobre la inducción de ICH por mutágenos.	21
1.6.3. Modulación de la BrdU sobre el destino de las lesiones inductoras de ICH.	24
1.6.4. Mecanismo de la modulación de la BrdU sobre la inducción de ICH por los mutágenos	25
2. ANTECEDENTES	27
3. OBJETIVOS	29
3. 1 Objetivo General	29
3. 2 Objetivos Particulares:	29
4. MATERIALES Y METODOS	30
4.1. Estrategia Experimental	30
4.2. Modelo experimental	30
4.3. Animales.	30
4.4. Protocolo de tinción diferencial en tres tonos de las cromátidas hermanas	30
4.5. Protocolo experimental.	32
4.5.1. Suministro de BrdU.	32
4.5.2. Exposición a ENU.	33
4.5.3 Suministro de colchicina.	33
4.5.4. Obtención de metafases.	33
4.5.5. Tinción diferencial de las cromátidas hermanas.	34
4.6. Selección de la población celular	34
4.7. Análisis de los ICH	34
4.8. Análisis y métodos estadísticos.	35
4.9. Razonamiento para el logro de los objetivos.	35
5. RESULTADOS	37
5.1 Inducción de ICH-1, ICH-2 e ICH-3 en tres ciclos de	

F



división celular sucesivos causada por la exposición a ENU.	37
5.1.1. Frecuencias de ICH.	37
5.1.2. Progreso de la inducción de ICH-1, ICH-2 e ICH-3 en función del tiempo de exposición a ENU, en tres ciclos de división celular sucesivos	38
5.1.3. Modelo de inducción de ICH respecto a la división celular.	39
5.2. Persistencia y tenacidad de las lesiones inductoras de ICH	40
5.2.1. Inducción de ICH por lesiones de expresión inmediata	40
5.2.2. Inducción de ICH por lesiones tenaces	40
5.2.3. Inducción de ICH por lesiones de expresión tardía	41
5.2.4. Inducción de ICH por la exposición a ENU a tiempos previos	41
5.3. Efecto de la incorporación de BrdU sobre la inducción y persistencia de ICH causados por ENU.	42
5.3.1. Efecto de la incorporación progresiva de BrdU sobre la inducción de ICH por ENU en tres ciclos sucesivos.	42
5.3.2. Efecto de la incorporación de BrdU sobre la persistencia de las lesiones inductoras de ICH	43
5.3.3. Inducción de ICH en la tercera división en cromosomas 3N y en cromosomas 3G	44
6. DISCUSION	48
6.1. Relación entre la inducción de ICH y la progresión de la división celular.	48
6.2. Persistencia y tenacidad de las lesiones causadas por ENU	49
6.3. Efecto de la BrdU sobre la inducción de ICH causada por ENU	53

G

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

7. CONCLUSIONES

59

8. REFERENCIAS

61

H

ABREVIATURAS

5-azaC	5-azacitidina
3G	Cromosomas descendientes de la cadena substituida con BrdU baja en la 2ª división
3N	Cromosomas descendientes de la cadena no substituida con BrdU baja en la 2ª división
ADN	Acido desoxiribonucleico
BrdU	5-bromodesoxiuridina
CpG	Dinucleotido de citosina-guanina
DMN	Dimetilnitrosamina
dUTP	Trifosfato de desoxiuridina
EMS	Etil metanosulfonato
ENU	Etilnitrosourea
G1	Etapa previa a la síntesis de ADN
G2	Etapa previa a la mitosis
ICH	Intercambios en las cromátidas hermanas
ICH-1	ICH que ocurre en la 1ª división
ICH-2	ICH que ocurre en la 2ª división
ICH-3	ICH que ocurre en la 3ª división
ip	intraperitoneal
UV	ultravioleta
M	mitosis

MMC	Mitomicina C
MMS	Metil metanosulfonato
MNNG	N-metil-N-nitrosoguanidina
MNU	Metilnitrosourea
RH	Recombinación homóloga
S	Etapa de síntesis de ADN
SB	Síndrome de Bloom
SCE	Sister chromatid exchange
SCE-1	1st division SCE
SCE-2	2nd division SCE
SCE-3	3rd division SCE
TDTT	Tinción diferencial en tres tonos
TMP	Timidilato sintetasa
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
TWD	Three way differential staining

RESUMEN

Este trabajo se llevó a cabo con la intención de contribuir al conocimiento del mecanismo de formación del intercambio en las cromátidas hermanas (ICH), mediante el estudio *in vivo* del destino de las lesiones que lo producen. Se analizó el efecto del tiempo de exposición al mutágeno directo etilnitrosourea (ENU) sobre la inducción de ICH en cada uno de tres ciclos de división celular sucesivos, en células de la médula ósea de ratón. Se empleó el protocolo de tinción diferencial en tres tonos (TDTT) de las cromátidas hermanas, para lo cual se administró bromodesoxiuridina (BrdU) en suspensión adsorbida a carbón activado, a una dosis de 0.2 mg/g de peso y 2.0 mg/g de peso, al inicio del primero y segundo ciclos, respectivamente. De esta manera, el protocolo TDTT permite distinguir tres tipos de ICH, cada uno de los cuales corresponde a los producidos en un ciclo de división específico de los tres ciclos sucesivos (ICH-1, ICH-2 e ICH-3). Se trataron grupos independientes de tres a seis animales con 25 µg de ENU/ g de peso, a 10 tiempos diferentes durante el lapso de tres ciclos. La cinética de la inducción de cada tipo de ICH mostró picos muy agudos y regulares, que coincidieron con frecuencias mínimas de los otros dos. Esto indicó que la población celular analizada es sincrónica, con una duración del ciclo celular de aproximadamente 9 h; de la cual, la etapa de síntesis ocupa la mayor parte e implica que la producción de ICH está relacionada con el curso de la duplicación del ADN y es una evidencia directa de que los ICH se producen en la horquilla de duplicación. La inducción de ICH-2 e ICH-3 causada por la exposición en el primer ciclo, indica que la ENU causa inducción tardía de ICH, en células con su ADN no sustituido con BrdU. Para ahondar en este efecto, se determinó la inducción de ICH por la exposición en ciclos previos a los del protocolo TDTT. Se observó que el tratamiento aún 12 h antes, produce un incremento importante de los ICH-2 y aún mayor de los ICH-3, lo cual no podría ser explicado por la persistencia de las lesiones inductoras de ICH causadas por la ENU, porque tenderían a disminuir. Una alternativa es que la reparación de lesiones altera el patrón de

metilación del ADN, generando cambios epigenéticos heredables capaces de causar incrementos constantes en la frecuencia de ICH en ciclos subsecuentes, como ha sido demostrado con inhibidores de la metilación. Este aumento tal vez se produce como resultado de la perturbación en el proceso de reparación por corrección de pruebas de la ADN polimerasa, que requiere el reconocimiento de la hebra progenitora, la cual debe estar metilada. Por otra parte, la frecuencia de ICH-2 e ICH-3 fueron más altas que la de ICH-1, cuando la exposición se hizo en cada uno de los ciclos respectivos, indica que la incorporación progresiva de BrdU favorece la expresión inmediata de las lesiones como ICH. Para complementar el estudio del efecto de la BrdU sobre la inducción de ICH por ENU, se compararon los incrementos de ICH-3 en cromosomas descendientes de las cadenas de ADN que en el segundo ciclo estaban sustituidas (3G) o no (3N) con BrdU. Se observó que: a) La exposición durante el primer ciclo y en ciclos previos, causó inducción significativamente alta en cromosomas 3N y también en 3G. Para los ciclos previos esto es inesperado, dado que en esos ciclos no existen cadenas sustituidas. Se puede concluir que las lesiones en las cadenas progenitoras con timina son muy persistentes y pueden causar que durante la duplicación del ADN las cadenas recientemente sintetizadas en presencia de BrdU sean propensas a la inducción de ICH o que generen ICH en el mismo locus durante el primero y segundo ciclos ; b) las lesiones producidas por la exposición a ENU durante el segundo ciclo, indujeron frecuencias de ICH similares en cromosomas 3N como en 3G, lo cual sugiere que estas lesiones son persistentes y que la presencia de BrdU en el ADN no afecta la inducción de ICH por ENU, cuando la molécula con sustitución baja de BrdU se duplica en presencia de BrdU alta, c) la inducción de ICH en el tercer ciclo, es muy alta con respecto al testigo, tanto en cromosomas 3N como en 3G; sin embargo en los 3G fue significativamente menor que en los 3N. Esto se puede explicar por: i) las lesiones en las cadenas con timina son más propensas a la inducción de ICH cuando éstas se duplican en presencia de una concentración alta de BrdU o; ii) las lesiones en cadenas sustituidas con BrdU alta son más propensas a la inducción de ICH, cuando sus complementarias tienen timina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT

The aim of this work was to contribute to the knowledge of sister chromatid exchange (SCE) mechanism by studying the *in vivo* fate of DNA lesions involved in SCE. The time exposure effect to ethylnitrosourea (ENU), a direct mutagen, on SCE frequency in each one of three successive cell cycle in mouse bone marrow cells was analyzed. Three way differential (TWD) staining of sister chromatids protocol was employed to distinguish three types of SCE (SCE-1, SCE-2 and SCE-3) which, are produced respectively in each one of three consecutive cell cycles. Animals received two bromodeoxyuridine (BrdU) doses; a low dose, at the start of the experiments (0.2 mg/g body wt i.p.) and a high dose (2.0 mg/g body wt i.p.), 12 h later. Ten groups of mice were administered with an acute dose of ENU (25 μ g of / g body wt; s.b). Each group received the treatment at different times after the first BrdU dose. The maximum value of SCE frequency in each cell cycle was very regular in relation to the time exposure and coincided with the minimum frequency of SCEs of other cell cycles. After this maximum value, SCE frequency diminished meanwhile the SCEs of the subsequent cell cycle increased slowly. These results suggest the following: i) the cell population is synchronic and its cell cycle lasts almost 9 h ii) the S phase occupies nearly the whole cell cycle iii) the SCE induction is related to DNA replication and iv) they allow to confirm directly that the SCE formation occurs in the replication fork. The exposure to ENU during the first cell cycle caused a significant frequency of SCE-2 and SCE-3, indicating that this mutagen produces remarkably persistent lesions in non BrdU substituted DNA, capable to induce SCE in consecutive cell cycles. This fact was explored treating each of the three groups of mice with the same ENU dose at different times before the first BrdU administration. The exposure to ENU 12 hours before BrdU produced an important increase of both SCE-2 and SCE-3, specially in the last. These results are similar to those obtained by other authors after the exposure to demethylating agents and they proposed that changes in the DNA methylation pattern could cause an increase in erroneous ligation



events due to a decreased ability of the cells to discriminate between differently aged DNA strands. In the present work, it is possible that methylated cytosines were eliminated during the repair of lesions induced by ENU exposure. In other hand, the fact that the SCE-2 and SCE-3 frequencies were higher than that of SCE-1, when the exposure occurred in their respective cell cycle, indicates that the progressive BrdU DNA incorporation is responsible of the immediate expression of lesions as SCE. Moreover, the BrdU effect on the SCE induction by ENU exposure, was evaluated by comparing SCE-3 frequencies in chromosomes originated from unsubstituted (3-N) and BrdU substituted (3-G) DNA strands present in the second cell cycle. The results shown the following: a) The exposure during the first cycle and before the first BrdU dose caused a high significant induction in 3N chromosomes and also an increase in the 3-G. This observation was unexpected because there are not DNA substituted strands in those moments and let to conclude that lesions caused in DNA thymidine strands are very persistent and can generate in the recently synthesized strands, during the DNA duplication in presence of BrdU, susceptibility to induce SCE. An alternative explanation is that the lesions cause SCE at the same locus during the 1st and 2nd divisions. b) The ENU exposure in the course of second cell cycle, caused similar SCE frequencies in 3-N and in 3-G chromosomes and suggest that lesions involved are persistent and that the low BrdU substitution does not have effect when the DNA duplication occurs in presence of BrdU high c) The SCE induction in the third cell cycle was remarkably high in both types of chromosomes. However, in the 3-G was lesser than in 3-N. Two explanations are proposed i) the lesions on thymidine strands are more prone to induce SCE when these strands are duplicate in presence of high BrdU, ii) the lesions on high BrdU substitution strands are more prone to induce SCE when their complementary strands are unsubstituted.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. INTRODUCCION

1.1. Intercambio en las cromátidas hermanas.

El intercambio en las cromátidas hermanas (ICH) es un evento genético, visualizado como transposiciones simétricas y equivalentes en las cromátidas hermanas de los cromosomas en metafase. Las primeras observaciones del ICH fueron llevadas a cabo empleando métodos autorradiográficos y de marcaje previo del ADN con timidina tritiada (Taylor et al., 1957). La forma en que la timidina se incorporó al ADN indicó que la duplicación ocurrió de acuerdo al modelo semiconservador y los ICH se evidenciaron como cambios recíprocos de marca en las cromátidas hermanas de los cromosomas en metafase. Posteriormente, los ICH fueron detectados en cromosomas con tinción diferencial en sus cromátidas hermanas (Latt, 1973; Perry y Wolff, 1974; Mazrimas y Stetka, 1978), como cambios recíprocos de tinción. Esta tinción diferencial se logró gracias al desarrollo de técnicas con tinción fluorescente (Latt, 1973) y particularmente al de la técnica de fluorescencia más Giemsa (Wolff y Perry, 1975), la cual requiere que los cromosomas hayan incorporado 5-bromodesoxiuridina (BrdU) durante dos ciclos de división celular sucesivos o cuando menos en el primero de estos (Vogel y Bauknecht, 1976; Kato, 1977) y además, un tratamiento

de desnaturalización de la cadena de ADN bifilarmente sustituida (Morales-Ramírez, 1980). Estos procedimientos de tinción se han empleado en todos los trabajos recientes acerca del evento de ICH, ya que permiten obtener un mayor grado de resolución para el análisis de éste y son técnicamente más simples y rápidos que los métodos autorradiográficos.

Se ha establecido que los ICH pueden ser inducidos por la BrdU (frecuencia basal) empleada para su detección (Morris et al., 1992). Aunque existen evidencias sugestivas de la existencia de una frecuencia espontánea, como la obtenida a partir de la observación de anillos dicéntricos en heterocigotos de maíz (McClintock, 1938; Morgan et al., 1986) y la observación de anillos dicéntricos en un cromosoma humano en anillo (Brewen y Peacock, 1969), en los cuales no se usó BrdU. También se ha obtenido evidencia de una frecuencia basal de ICH mediante la detección de frecuencias constantes a rangos de concentraciones bajas de BrdU (Kato, 1974a), la determinación de ICH en cromosomas con tinción en tres tonos de sus cromátidas hermanas (Morales-Ramírez et al., 1987) o la estimación de ICH usando métodos de inmunoanálisis (Pinkel et al., 1985; Natarajan et al., 1986; Russo et al., 1994).

Por otro lado, existen evidencias de que la frecuencia de ICH se incrementa por la exposición natural o experimental a agentes ambientales; mutagénicos o carcinogénicos; como por ejemplo, los que se derivan de las actividades humanas (Yager, 1987; Gebel et al., 2001; Carere et al., 2002), o los compuestos empleados en la terapia de diferentes enfermedades (Tucker et al., 1990; Herens et al., 1995).

1.2. Mecanismo de formación del ICH

A la fecha, permanece sin resolverse la pregunta acerca del o los mecanismos involucrados en la formación del ICH. No obstante, los resultados de numerosos estudios relacionados con este evento han contribuido al logro de aproximaciones para contestar dicho cuestionamiento, como lo que a continuación se describe.

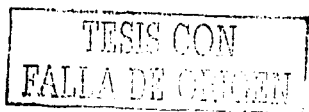
1.2.1. Causas que generan el ICH

Existen evidencias claras que demuestran que los ICH se inducen de manera directa por lesiones al ADN (Perry y Evans, 1975; Carrano et al., 1979, Cassel y Latt, 1980; Kaina et al., 1993; Engelward et al., 1998) e indirectamente, a través de inhibición o alteraciones principalmente del complejo enzimático de la duplicación del ADN (Ishii y Bender, 1980; Nishi et al., 1982; Pommier et al., 1985; Darroudi y Natarajan, 1987; Pommier et al., 1988; Dillehay et al.,

1989; Tohda et al., 1992; Mukherjee et al., 1993; Domínguez et al., 2001; Enomoto, 2001).

La naturaleza de las lesiones involucradas en la producción de ICH, no se ha dilucidado. Anteriormente, algunos resultados sugirieron como candidatos a los monoadductos (Cassel y Latt, 1980; Sahar et al., 1981), en tanto que otros, a los enlaces cruzados (Carrano et al., 1979) entre las cadenas de ADN o entre ADN y proteínas (Ishii, 1981), etc. Posteriormente, se demostró que el aducto en el oxígeno 6 de la guanina, producido por la exposición a agentes alquilantes como la N-metil-N-nitrosoguanidina (MNNG), o la metilnitrosourea (MNU), es una de las lesiones involucradas en la formación de ICH (Kaina et al, 1991; Kaina et al., 1993) y otros resultados obtenidos por la exposición a metil metanosulfonato (MMS) indicaron que también el aducto en el nitrógeno 3 de la adenina está relacionado (Engelward et al., 1996; 1998). Por lo que se ha propuesto que el ICH es inducido por varias clases de lesiones al ADN (Morales-Ramírez et al., 1992). Por otro lado, tampoco parece haber una relación directa entre el número de lesiones y de ICH; según los cálculos llevados a cabo después de la exposición a luz UV (Ishii y Bender, 1980) y a agentes alquilantes (Rasouli et al., 1994)

Por lo que respecta a la inducción de ICH a través de la inhibición del complejo



enzimático de la duplicación del ADN se ha observado que la inhibición de la ADN-polimerasa α (Ishii y Bender, 1980; Nishi et al., 1982), de las topoisomerasas I y II (Dillehay et al., 1989; Holden et al., 1989; Tohda et al., 1992; Degrassi et al., 1993; Mukherjee et al., 1993; Ribas et al., 1996; Piñero et al., 1996; Fantini et al., 1998; Domínguez et al., 2001) y la alteración estructural de una ADN helicasa debido a una mutación en el gen que la codifica (Wang et al., 2000; Yankiwski et al., 2001; Enomoto, 2001; Gaymes et al., 2002) provocan incrementos significativos en la frecuencia de ICH.

También, la inhibición de la poli(ADP-ribosa)polimerasa enzima implicada en la reparación, duplicación y recombinación del ADN, da lugar de manera indirecta a incrementos en la frecuencia de ICH (Morris y Heflich, 1984; Ikushima, 1990; Jorgensen et al., 1991; Caria et al., 1997; Domínguez et al., 2001).

1.2.2. Relación entre la Inducción de ICH y la etapa de Síntesis (S)

Se ha demostrado que el ICH ocurre durante la etapa de síntesis (S) del ciclo celular, ya que aunque el daño al ADN sea causado en cualquier etapa de éste, es necesario que las células pasen por S para que las lesiones se expresen como ICH (Wolff et al., 1974). Además, en experimentos paralelos, se determinó una coincidencia

entre el tiempo de la mayor producción de ICH por lesiones al ADN y el del pico máximo de síntesis del ADN (Kato, 1974b).

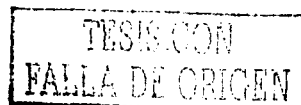
1.2.3. Relación entre la producción de ICH y la horquilla de duplicación

La correlación entre incrementos en la inducción de ICH y el número de puntos de crecimiento por bloqueo de la síntesis del ADN sugirió que la horquilla de duplicación es el sitio donde ocurre el evento de ICH (Kato, 1980). Esta sugerencia fue apoyada con la demostración en células sincronizadas de una correlación entre la inducción de ICH por lesiones al ADN con la cantidad de ADN en proceso de duplicación (Latt y Loveday, 1978) y con la observación de incrementos significativos de ICH por inhibidores de la polimerasa α que interfieren con la elongación de la cadena de ADN (Ishii y Bender, 1980). Además, otros resultados indicaron que el progreso de la horquilla de duplicación es necesario para la producción de ICH por inhibidores de las topoisomerasas (Cortés et al., 1993) lo que sugiere que la horquilla de duplicación es el sitio donde se forman los ICH.

1.3. Formación de ICH

1.3.1. Modelos

Las bases en que se sustentaron los primeros modelos para explicar el mecanismo de formación del ICH, fueron por una parte, el



conocimiento de que el evento ocurre durante la síntesis del ADN a nivel de la horquilla de duplicación debido a lesiones no reparadas o por inhibición de las enzimas involucradas en la duplicación y por otra parte, a la consideración de que el ICH es un proceso de reparación recombinacional y de reparación replicativa (Ishii y Bender, 1980). Algunos modelos se describen brevemente a continuación, tomando como referencia el nombre del autor.

Kato (1977) propuso que la formación del ICH puede ocurrir por causa de rompimientos de cadena sencilla en el ADN, a través de dos mecanismos: uno, operando en la región prereplicativa (antes de la horquilla de duplicación), el cual es más frecuente y el otro, en la región postreplicativa (después de la horquilla de duplicación), menos frecuente. El primero, ocurre mediante la participación de la maquinaria de la duplicación y el segundo, sucediendo de manera similar al entrecruzamiento meiótico.

Shafer (1977), planteó un modelo de desviación de la duplicación del ADN, en el cual propone que la formación de ICH permite la continuación de dicho proceso en presencia de enlaces cruzados entre las cadenas progenitoras. El ICH se iniciaría en el sitio en el que la duplicación bidireccional del ADN se bloquea por el enlace cruzado; al generarse rompimientos en las cadenas progenitoras opuestas a éste que permitirían el desplazamiento temporal de los extremos

libres de los segmentos producidos a cada lado 5' del enlace cruzado y con ello, se volverían a asociar con las cadenas hijas recientemente sintetizadas, por arriba y abajo del locus del enlace cruzado, produciendo un ICH.

Ishii y Bender (1980), propusieron un "Modelo de duplicación desviada", el cual se aplica tanto para ICH espontáneos como para los inducidos por luz UV; ya que inhibidores de la síntesis del ADN tuvieron el mismo efecto sobre la frecuencia de ambos. Asumen que la duplicación de una cadena progenitora que tiene una lesión (por ejemplo un dímero) se detiene, pero como la síntesis de la otra cadena continúa, la cadena recientemente sintetizada desplaza a la progenitora bloqueada uniéndose a ella detrás de una incisión producida delante de la lesión. Otra incisión, ahora en la otra cadena progenitora, en la posición opuesta al punto del bloqueo de su homóloga; permite que esta última desplace a la primera sobre un extremo de la incisión y se una al segmento desplazado en el otro extremo de la misma. Después de esto, la reorientación de la horquilla de duplicación y con ello, el reinicio de la síntesis a partir de los dos extremos libres que fueron originalmente cadenas progenitoras, facilitaría que éstas se unieran a las cadenas hijas y se completaría el ICH. Los autores consideran que este modelo plantea que el mecanismo de formación del ICH, podría ser una clase de reparación postreplicativa libre de error, es

decir, un hueco en la cadena hija opuesta a un dímero, que no es reparado por síntesis postreplicativa *de novo*, podría ser reparado por la formación del ICH.

Painter (1980), propone un modelo replicativo en el que los rompimientos e intercambios de cadena doble, que dan lugar a los ICH solo son generados en el sitio de unión entre un agrupamiento de duplicones completamente duplicado y uno parcialmente duplicado. Se basa en el hecho de que agentes como la mitomicina C (MMC) que causan una inducción alta de ICH, bloquean el progreso de la horquilla de duplicación; en tanto que agentes como la radiación-X que no inducen ICH o lo hacen a una frecuencia baja inhiben la iniciación de los agrupamientos completos. Se asume que la formación del ICH, se iniciaría con la recombinación entre las cadenas hijas de un agrupamiento duplicado y las pogenitoras del agrupamiento parcialmente duplicado y se completaría cuando la duplicación de este último hubiera concluido. El autor sugirió que este mecanismo podría requerir de la participación de una función enzimática tipo topoisomerasa.

A la fecha, ninguno de estos modelos ha resultado ser idóneo para explicar el mecanismo de formación de ICH; no obstante, en ellos se aprecia que este puede ser heterogéneo. Es evidente en los planteamientos, que las lesiones causantes del ICH son inespecíficas y que la inhibición

de la síntesis del ADN incrementa la posibilidad de que estas induzcan ICH (Ishii y Bender, 1980). En algunos modelos (Kato, 1977; Ishii y Bender, 1980), la horquilla de duplicación es el sitio donde ocurre el evento, en tanto que en otros se involucra un nivel de organización mayor del aparato de la duplicación del ADN (Shafer, 1977; Painter, 1980). Finalmente, un modelo propone que el mecanismo de formación de ICH podría ser un tipo de reparación postreplicativa libre de error (Ishii y Bender, 1980).

En un intento por corregir esta situación Dufraïn (1981) propone en su "hipótesis conformacional", que los diversos factores promotores del ICH, causan alteraciones en la conformación molecular del ADN o del complejo de la duplicación, dando lugar a estrés molecular durante la síntesis y que este estrés es aliviado por la formación de ICH en la horquilla de duplicación, en las uniones de duplicones o en las uniones de los complejos de duplicones. Los ICH no son causados por lesiones individuales, sino son el resultado de la suma total de cambios en la conformación del ADN y por lo tanto en las configuraciones de niveles de organización más altos como lo duplicones y los complejos de duplicones.

Los modelos anteriores fueron criticados por no considerar la participación enzimática en el proceso de formación de ICH (Dillehay et al., 1989) y no obstante que Painter (1980) sugirió que una enzima tipo

topoisomerasa podría intervenir en la formación de ICH en las uniones de duplicaciones, no dio ninguna descripción al respecto.

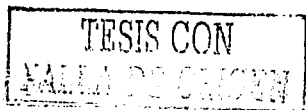
Posteriormente se han propuesto otros modelos que plantean que las topoisomerasas I y II participan activamente en el mecanismo de formación de ICH. La propuesta se basa por un lado, en el conocimiento de la función de estas proteínas durante la duplicación del ADN y por otro lado, en la capacidad de inducción de ICH por varios agentes que las inhiben (Dillehay et al., 1989). Recientemente se ha reforzado la existencia de una relación entre las topoisomerasas y el mecanismo de formación de ICH. Se determinó que el progreso de la horquilla de duplicación, es importante para la función de las topoisomerasas (Cortés et al., 1993) y se ha sugerido que estas enzimas pueden tener un papel significativo en los mecanismos de recombinación en general (Gale y Osheroff, 1992; Piñero et al., 1996; Fantini et al., 1998). Esto último es importante porque tiene relación con el hecho de que la formación de ICH está mediada por recombinación homóloga (Sonoda et al., 1999).

Las topoisomerasas son enzimas nucleares conservadas en eucariontes, que catalizan diferentes cambios topológicos en la molécula de ADN durante la duplicación, transcripción y recombinación (Dominguez et al., 2001). Estas modificaciones dependen

básicamente de la capacidad que tienen para causar rompimientos en sitios de superenrollamiento de una cadena (topoisomerasa I) o en ambas cadenas (topoisomerasa II) del ADN; formar enlaces covalentes temporales en los sitios de rompimientos (complejos escindibles ADN:topoisomerasas), remover los giros de las cadenas y restaurar los enlaces en el ADN, dejando a la molécula en su estado original (Dillehay et al., 1989; Domínguez et al., 2001). Por lo tanto, facilitan el progreso de la duplicación ya que relajan la tensión de la molécula debida al superenrollamiento de la doble hélice (Holden et al., 1989). Ejemplos de modelos que han considerado la participación de topoisomerasas en el mecanismo de formación del ICH, son los siguientes:

Cleaver (1981) en su propuesta, consideró que los ICH espontáneos se producirían entre dobles cadenas duplicadas durante la remoción de los giros de la cadena progenitora, como resultado de una alteración en la función de una topoisomerasa no específica. Las lesiones en el ADN, causadas por la exposición a mutágenos, estimularían la acción deficiente de la topoisomerasa, con lo cual se incrementaría la frecuencia de ICH.

Pommier et al. (1985) postularon un modelo de formación de ICH que involucra el intercambio de subunidades de topoisomerasa II unidas a cada una de las cadenas dobles duplicadas (complejos



escindibles) con base a que determinaron una correlación cuantitativa entre la inducción de ICH y rompimientos de cadena doble en los sitios de unión de ADN con topoisomerasa I, que fueron inducidos por agentes intercaladores. En este modelo, ambos complejos escindibles se disocian y cada monómero se reasocia con el monómero complementario de la otra doble cadena (de manera heteróloga), formando un ICH. Se asume que el incremento en la frecuencia de ICH por lesiones al ADN, podría ser debido a que un bloqueo de la horquilla de duplicación, prolongaría el período de cercanía entre los complejos ADN-topoisomerasa II para favorecer la reasociación heteróloga

Dillehay et al. (1989) en un modelo denominado como "desplazamiento homólogo", proponen que los complejos ADN-topoisomerasas I y II formados en las cadenas progenitoras dirigen los intercambios de cadenas que dan lugar al ICH cuando una cadena homóloga vecina, no involucrada en el complejo, es desplazada a través de unión complementaria desde el complejo. El ICH ocurriría durante la remoción de los giros de la hélice progenitora por la acción de topoisomerasas I y II y asumen que este mecanismo, podría operar para modelos ya propuestos (Kato, 1977; Ishii y Bender, 1980; Cleaver, 1981). Las topoisomerasas dirigirían las incisiones de las cadenas en los sitios adecuados y facilitarían la proximidad de los extremos libres de las mismas, para su unión

de tipo complementario. Además, el desplazamiento homólogo explicaría el incremento de ICH por lesiones al ADN, ya que dicho desplazamiento sucedería en un lapso mayor debido al bloqueo de la horquilla de duplicación a causa del daño. Finalmente, al completarse el ICH, se reanudaría el progreso de la horquilla de duplicación después del bloqueo.

Holden et al. 1989 proponen que el ICH espontáneo se puede producir a causa de fallas ocasionales en la reunión de las cadenas originales durante el proceso normal de duplicación. Dichas fallas pueden aumentar por perturbaciones debidas a la presencia de inhibidores de las topoisomerasas, provocando un aumento en la frecuencia de ICH. Algunas perturbaciones podrían persistir y causar incrementos de ICH en generaciones celulares sucesivas.

Posteriormente, Morales-Ramírez et al. (1990) propusieron un modelo recombinacional para la formación de ICH, la reparación o la persistencia de lesiones inductoras, el cual se basa en el modelo de recombinación bacteriana de Moore y Holliday, (1976) y en el de reparación postreplicativa en eucariontes de Lavin, (1978) y abre la posibilidad de que la duplicación del ADN puede progresar en presencia de lesiones de tal forma que durante la resolución del intermediario de Holliday puede ocurrir intercambio de doble cadena en el sitio donde está dicha lesión, es

decir, se formaría un ICH; la otra alternativa es que se genere un intercambio de cadena sencilla, el cual no daría lugar a ICH.

1.3.2. La formación de ICH como expresión de la recombinación homóloga

Como se mencionó, los modelos para explicar el mecanismo de formación de ICH, consideran que el evento es el resultado de reparación recombinacional (Ishii y Bender, 1980) y evidencias previas demostraron que la presencia de ADN híbrido está involucrada en la formación de ICH inducidos por la mitomicina C (MMC), un recombinógeno potente (Moore y Holliday, 1976). Posteriormente, se propuso que la frecuencia de ICH es una medida citogenética de eventos de recombinación (Pommier et al., 1988) y ha sido generalmente aceptado el hecho de que el ICH es el resultado de un proceso de recombinación homóloga, que sucede durante la etapa de síntesis (Morales-Ramírez et al., 1990) y comprende la producción de rompimientos en la cadena doble de las cromátidas hermanas en supuestamente, el mismo locus e intercambio y reunión de las subunidades resultantes de tales rompimientos (Wolff, 1982).

La recombinación homóloga (RH), es una de las dos vías principales de reparación de rompimientos de cadena doble de ADN (Morrison y Takeda, 2000), de enlaces cruzados intercadena y de otros tipos de daño (Godthelp et al., 2002). Es un proceso

que está íntimamente asociado a la duplicación del ADN, ya que opera cuando la horquilla de duplicación se bloquea por un rompimiento de cadena doble, que se produce a partir de una lesión de cadena sencilla que no ha sido reparada por escisión (Kuzminov, 2001; Okada et al., 2002). Se han descrito los genes involucrados en la RH, así como las proteínas codificadas por ellos y se ha observado que son altamente conservados desde bacterias hasta eucariontes (Morrison y Takeda, 2000). Numerosas evidencias han sugerido que el proceso de formación de ICH es mediado por RH en células de eucariontes (Sonoda et al., 1999; Takata et al., 2000; Lambert y Lopez, 2001) y la inducción de ICH se ha empleado frecuentemente como un indicador citológico de recombinación homóloga (Fasullo et al., 2001; French et al., 2002; Miyagawa et al., 2002; Yamashita et al., 2002). Un estudio con células de pollo deficientes en los genes RAD51 y RAD54, centrales de la vía de RH, permitió detectar una reducción significativa en la frecuencia de ICH espontáneos y la de los inducidos por MMC. La reconstitución de la vía de RH, por la expresión del transgen humano RAD51 en estas células, restauró los niveles normales de ICH (Sonoda et al., 1999). Por otro lado, los resultados de un experimento con células de *xeroderma pigmentosum* variante, mostraron una correlación entre la inducción de frecuencias altas de ICH y la formación de complejo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

hMre11, involucrado en la escisión e intercambio de la doble cadena de ADN durante el proceso de RH (Limoli et al., 2000). Aunado a esto, varios datos han mostrado que la deficiencia en otras proteínas implicadas en la vía de RH causa la reducción tanto de ICH espontáneos como la de los inducidos por mutágenos (Takata et al., 2000; Godthelp et al., 2002) y que el daño al ADN por diversos agentes como luz UV, MMS, 4-nitroquinoleína-1-óxido y rayos X estimula la producción de ICH por mecanismos de recombinación homóloga dependientes del gen RAD51. (Fasullo et al., 2001).

1.3.3. Formación de ICH por cambios epigenéticos

Entre los cambios heredables, que no alteran la secuencia de bases del ADN, el proceso de metilación de la citosina ha sido ampliamente estudiado por su participación en la estabilidad genómica y en la represión génica (Kress et al., 2001). Este es un proceso reversible y dinámico que se establece durante la gametogénesis y cambia a través del desarrollo en los mamíferos (Hsieh-C-L, 2000); los errores en dicho proceso pueden dar lugar a carcinogénesis (Wolffe et al., 1999; Paz et al., 2003). El empleo de inhibidores de la metilación, tales como la 5-azacitidina (5-azaC) han permitido estudiar las consecuencias de la desmetilación del ADN tales como la

expresión de genes silenciosos (Woodcock et al., 1983; Ianni et al., 2000) y también la capacidad de estos compuestos para inducir incrementos significativos de la frecuencia basal de ICH (Ikushima, 1984; Perticone et al., 1987, 1997; Albanesi et al., 1999). No obstante que no se conoce el mecanismo a través del cual la desmetilación del ADN da lugar a este fenómeno, se ha demostrado que esto ocurre durante la duplicación de ADN hemimetilado o desmetilado con 5-azaC (Ikushima, 1984), que esta inducción se mantiene constante por más de 10 generaciones celulares (Perticone et al., 1987) y se asocia con disminución de la metilación genómica (Perticone et al., 1990). Además, se demostró que la desmetilación sensibiliza al ADN para la inducción de ICH para la exposición a otros compuestos (Ikushima., 1984; Lavia et al., 1985; Perticone et al., 1997). Se demostró que el incremento en ICH es observado solamente si la 5-azaC es administrada dos ciclos antes del análisis (Albanesi et al., 1999) es decir, cuando el ADN hemimetilado entra en proceso de duplicación y se ha pensado que si la hemimetilación es considerada como un paso intermediario en el proceso de desmetilación, el que a su vez está relacionado con la expresión génica; entonces, la desmetilación génica podría ser una causa del incremento en el ICH (Bianchi et al., 1988). El hecho de que la eficiencia de un evento de desmetilación para la inducción de ICH, fuera

más baja en comparación con la observada por la exposición a agentes alquilantes tales como 8-metoxipsoralen, sugirió que la inducción de ICH por 5-azaC podría ser a través de un efecto indirecto a partir de cambios de amplio rango inducidos en el ADN (Shibley et al., 1985). Se ha propuesto por otra parte, que la relación entre desmetilación e ICH es a través de una perturbación de la maquinaria celular a nivel de la horquilla de duplicación, la cual produce un incremento en el apareamiento erróneo, que da lugar a eventos de recombinación. Como el nivel de metilación es mantenido (heredado), a través de varias generaciones celulares, el incremento en el ICH también es mantenido a causa de esos eventos recombinacionales (Perticone et al., 1987). Otros autores proponen que dichos incrementos son causados por acumulación de errores que no pueden ser detectados por la actividad correctora de la polimerasa, ya que esta no puede distinguir entre la cadena progenitora que debe estar metilada y la recientemente sintetizada no metilada (Albanesi et al., 1999). Además, con base en los resultados de la investigación acerca de la asociación entre cambios genéticos y epigenéticos en relación a la carcinogénesis se ha determinado que diferentes compuestos como radiación gamma, y alquilantes como la ENU, que causan diferentes tipos de daño al ADN, los cuales eventualmente puede dar lugar a mutaciones

también provocan también desmetilación en la molécula (Wachsmann, 1999) y este daño, es el mismo que está involucrado en la inducción de ICH causada por dichos compuestos.

1.4. Significado biológico del ICH

A pesar de que a la fecha no se ha podido esclarecer completamente el significado biológico del ICH, hay evidencias muy claras de que representa o es la expresión de daño al ADN, por lo cual, el análisis de la inducción de ICH ha sido empleado como un indicador de genotoxicidad. Varios resultados han permitido demostrar que agentes con actividad mutagénica y carcinogénica conocida, causan incrementos significativos en la frecuencia de ICH tanto en modelos experimentales *in vitro* (Perry y Evans, 1975) como en modelos *in vivo* (Nakanishi y Schneider, 1979; Palitti et al., 1982).

Se ha observado que el evento de ICH ocurre ampliamente en la naturaleza, ya que se ha detectado en una gran variedad de células animales y vegetales, desde eucariontes inferiores (Fasullo et al., 2001) hasta organismos altamente evolucionados como el hombre (Chao et al., 1985; Escalza et al., 1989; Wei et al., 1993; Sonoda et al., 1999; Limoli et al., 2000; Miyagawa et al., 2002), lo cual sugiere que el ICH representa o es la expresión de un proceso biológicamente

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACIÓN

relevante que ha sido preservado a través de la evolución.

1.4.1. Correlación del ICH con eventos celulares

La correlación del ICH con otros eventos ha sido debatida, aunque se ha demostrado que la frecuencia de ICH aumenta con la dosis de los mutágenos (Perry y Evans, 1975), no está bien establecida la relación entre ICH y mutación (Ishida et al., 1989; Capucci et al., 1995) y lo mismo ocurre en la correlación ICH-citotoxicidad (Pommier et al., 1988; Ishida et al., 1989; Capucci et al., 1995). Respecto a la vinculación entre ICH y aberraciones cromosómicas, algunas evidencias indican que estos eventos están involucrados con diferentes tipos de lesiones o con mecanismos de reparación distintos (Capucci et al., 1995) y otros datos muestran que una proporción de los ICH inducidos por rayos X (ICHs "falsos") están relacionados con aberraciones cromosómicas (Morales-Ramírez et al., 1983, 1984, 1988; Bruckman et al., 1999a; Sayed Aly et al. 2002).

1.4.2. Relación entre ICH y reparación

Se ha considerado que el evento de ICH podría ser la manifestación de reparación de lesiones o de desviación de la duplicación del ADN en presencia de daño a esta molécula durante la etapa de síntesis (Kishi,

1987; Stollov et al., 2002); a través de reparación post-replicativa (Afzal et al., 1995), de reparación de errores de apareamiento (Rasouli-Nia et al., 1994; Kaina et al., 1997) o de un proceso de recombinación homóloga (Sonoda et al., 1999; Limoli et al., 2000; Pichlerri et al., 2001).

La relación estrecha entre la formación de ICH y la reparación por recombinación homóloga ha permitido sugerir que este evento representa un índice de estabilidad cromosómica (Sonoda et al., 1999), ya que el daño genético que no es reparado por vías de reparación por escisión, bloquea la duplicación del ADN dando lugar a lesiones como rompimientos o huecos en las cromátidas hermanas (Okada et al., 2002). Dichas lesiones pueden ser reparadas a través de reparación por recombinación homóloga usando la cromátida hermana intacta como molde (Yamashita et al., 2002). Este proceso es más frecuente de lo que se había pensado (Johnson y Jasin, 2001) y da como resultado la restauración exacta del ADN (Hartsuiker et al., 2001).

1.4.3. Persistencia de las lesiones inductoras de ICH y significado biológico del ICH

Se ha determinado que el ICH es compatible con la supervivencia celular, ya que el tratamiento con diferentes agentes, causa inducción significativa de ICH mucho tiempo después del tratamiento; tanto en

poblaciones celulares en proliferación (Popescu et al., 1985; Morales-Ramírez et al., 1984, 1988, 1990, 1992, 1995a) como en aquéllas que no están en proliferación (He y Lambert, 1985; Conner, 1986; Tucker et al., 1986).

Esto significa que las lesiones inductoras de ICH o los cambios que generan en el ADN (Albanesi et al., 1999) permiten su duplicación en generaciones celulares sucesivas.

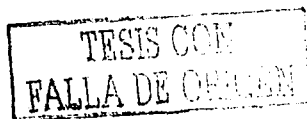
La persistencia de lesiones se ha asociado con la transformación celular (Margison y Kleihues, 1975; Popescu et al., 1985) y existen unos datos que indican que hay una relación directa entre actividad tumorigénica y persistencia de lesiones inductoras de ICH por la exposición *in vivo* a carcinógenos (Popescu et al., 1985; Conner, 1986), y de persistencia muy prolongada, de inducción de ICH por exposición *in vivo* (Tucker et al., 1990) o *in vitro* (Natarajan et al., 1983) a agentes antineoplásicos (Tucker et al., 1990; Herens et al., 1995). Por lo tanto, el estudio de la persistencia de lesiones inductoras de ICH podría contribuir al conocimiento del significado biológico de los ICH y también de su mecanismo de formación.

1.5. Destino de las lesiones inductoras de ICH

En el modelo recombinacional de Morales-Ramírez et al. (1990) para explicar la

formación de ICH, la reparación o la persistencia de lesiones inductoras, los autores plantean que la lesión puede o no ser reparada en el momento de la formación del ICH o como consecuencia del mismo. Lo cual se podría inferir de la frecuencia de ICH en ciclos de división celular sucesivos a partir del ciclo en el cual se produjeron las lesiones. El hecho de que la molécula de ADN con lesiones sea capaz de duplicarse, indica que éstas pueden ser toleradas. La tolerancia al daño por agentes alquilantes ya ha sido demostrada (Aquilina et al., 1997). Esto sería probado con la ocurrencia de ICH en ciclos subsecuentes a aquél en el ocurre la exposición a los agentes. La persistencia de lesiones también se puede establecer cuando las lesiones dan lugar a ICH en un ciclo y vuelven a causar ICH en el mismo locus del cromosoma en el ciclo subsiguiente (lesiones tenaces).

Por lo tanto, en el estudio de la persistencia de lesiones inductoras de ICH, ha sido importante el desarrollo de protocolos que permiten evaluar la persistencia o la reparación de las lesiones inductoras de ICH durante el ciclo celular (González-Beltrán y Morales-Ramírez, 1999, 2003) así como a través de ciclos de división celular subsecuentes (Schvartzman et al., 1985; Escalza et al., 1989; Morales-Ramírez et al., 1988, 1990, 1992, 1995a).



1.5.1. Protocolos para estudiar el destino de las lesiones inductoras de ICH

El empleo del protocolo tradicional para analizar el ICH, de la tinción diferencial en dos tonos de las cromátidas hermanas, permite evaluar la suma de los ICH que ocurrieron en dos ciclos sucesivos, pero no da información de la frecuencia de ICH en cada uno de ellos y por lo tanto de la reparación o persistencia de lesiones de un ciclo celular al siguiente. Además, la producción de lesiones persistentes y tenaces, las cuales dan lugar a ICH en el mismo locus en ciclos subsecuentes (Stetka, 1979; Morales-Ramírez et al., 1988; 1990; 1992; 1995a) tampoco pueden ser estimadas, ya que en este caso ocurre la cancelación de ambos ICH por la tinción

Exposición a los mutágenos en diferentes ciclos celulares

En algunos trabajos, la exposición a los mutágenos se llevó a cabo en diferentes ciclos y con base en la comparación de la inducción de ICH observada en cada caso, se infirió la inducción de ICH por ciclo (Conner et al., 1984; Kaina y Aurich, 1985). De esta manera, se concluyó que las lesiones causadas por algunos agentes son principalmente primarias, ya que produjeron ICH en el ciclo en el que ocurrió el tratamiento. Otros agentes causan además, lesiones secundarias, ya que también indujeron ICH un ciclo después de la

exposición y otros mutágenos causaron sobre todo lesiones secundarias (Kaina y Aurich, 1985). De estos resultados se concluyó que las lesiones secundarias se originan de lesiones primarias no inductoras de ICH, las cuales requieren que el ADN se duplique para transformarse en lesiones inductoras, es decir, no se reparan, sino que son toleradas (Kaina y Aurich, 1985). Sin embargo, esta estrategia no es del todo válida, ya que la inducción de ICH en el primer ciclo de división ocurre en ADN no sustituido y en el segundo ciclo, en ADN unifilarmente sustituido con BrdU y como se ha demostrado, la BrdU ejerce un efecto modulador para la inducción de ICH causada por los mutágenos (Morris et al., 1992; Morales-Ramírez et al., 1992, 1995a). Además, la exposición en el primer ciclo abre la posibilidad de cancelación de los ICH que suceden en el mismo locus en dos ciclos subsecuentes, los cuales se deben a la presencia de lesiones persistentes y tenaces (Morales-Ramírez et al., 1988, 1990, 1992, 1995a).

Análisis de ICH sencillos vs gemelos y de asimétricos vs simétricos

Otros protocolos que también emplean la tinción diferencial en dos tonos y que además permiten evaluar la inducción de ICH por ciclo son a través del análisis de ICH gemelos e ICH sencillos (Speit et al., 1985) y mediante el análisis de ICH asimétricos y simétricos (Conner et al., 1984). En el primer

caso, los ICH se observan en células endorreduplicadas que se han dividido dos veces en presencia de BrdU. Los gemelos ocurren en el primer ciclo y los sencillos en el segundo ciclo. En el segundo caso, el análisis se lleva a cabo en células que se han dividido durante tres ciclos en presencia de BrdU; los asimétricos representan la suma de los ICH que suceden en el primero y en el segundo ciclo y los simétricos son los ICH que ocurren en el tercer ciclo. Aunque ambos protocolos permiten evaluar la reparación y persistencia de lesiones inductoras de ICH, hubo contradicción en los resultados relacionados con la persistencia de lesiones causadas por MMC y metoxipsoralen más luz UVA (Ishii y Bender, 1978; Linnaima y Wolff, 1982). Además, ninguno de estos protocolos es capaz de medir la producción de ICH debida a lesiones persistentes y tenaces.

Estos hechos son los que quizá han contribuido a que ninguno de los dos protocolos haya sido empleado lo suficiente como para profundizar en la investigación sobre el esclarecimiento del mecanismo de formación y del significado biológico del ICH.

Protocolo de tinción diferencial en tres tonos de las cromátidas hermanas

Un protocolo de tinción diferencial en tres tonos de las cromátidas hermanas (TDTT) fue desarrollado primero en modelos *in vitro* (Schvartzman y Goyanes, 1980) y después en sistemas *in vivo* (Morales-

Ramírez et al., 1987). Se basa en la incorporación de BrdU al ADN durante tres ciclos de división celular sucesivos; a dosis baja en el primero y alta en el segundo y tercer ciclos. Permite distinguir los ICH que ocurren en cada uno de esos ciclos, así como los que suceden en el mismo locus en dos divisiones subsecuentes (Morales-Ramírez et al., 1988). Además, facilita la interpretación del efecto que la BrdU tiene sobre la capacidad de los mutágenos para inducir ICH (Morales-Ramírez et al., 1990, 1992, 1995a) en ciclos de división celular subsecuentes. Este protocolo se ha empleado en células vegetales (Escalza et al., 1985, 1989), células humanas (Daza et al., 1992) o células de criceto chino *in vitro* (Escalza et al., 1992) y en células de la médula ósea de ratón *in vivo* (Morales-Ramírez et al., 1988, 1990, 1992, 1995a), para estudiar el destino de las lesiones inductoras de ICH, causadas por la exposición a un sólo tiempo, a diferentes mutágenos durante el primero o el segundo ciclo. De esta manera se determinó que la radiación UV (Schvartzman et al., 1985), la radiación gamma (Morales-Ramírez et al., 1988) y diferentes mutágenos químicos como ciertos agentes alquilantes (Daza et al., 1992; Escalza et al., 1992; Morales-Ramírez et al., 1990; 1992; 1995a), producen lesiones que tienen diferentes grados de reparabilidad, persistencia y tenacidad para la producción de ICH (Morales-Ramírez et al., 1988, 1990, 1992, 1995a). Además, se ha podido

determinar el efecto de la incorporación de BrdU sobre la capacidad de esos mutágenos para inducir ICH; en términos de sensibilización o de inhibición.

El análisis de los resultados obtenidos en experimentos con estos mutágenos, en el modelo *in vivo* de células de la médula ósea de ratón, en términos de un marco teórico de probabilidades, indicó que las lesiones inductoras de ICH tienen 100% ó 50% de posibilidad de dar lugar a ICH en ciclos subsecuentes (Morales-Ramírez et al 1990, 1992, 1995a) y fue la base experimental para proponer el modelo recombinacional (Morales-Ramírez et al., 1990) que explica la formación de ICH generada por lesiones persistentes, las cuales pueden ser toleradas por la célula.

No obstante que el protocolo TDTT ha permitido un acercamiento importante en el estudio del destino de las lesiones inductoras de ICH, tiene el problema de que el empleo de un solo tiempo de exposición puede crear incertidumbre para obtener inferencias de la persistencia o reparabilidad de las lesiones a partir de las frecuencias de ICH inducidas por los mutágenos.

Debido a que los altos incrementos de ICH producidos en el siguiente ciclo al de la exposición a un sólo tiempo, a algunos agentes alquilantes, en células de médula ósea (Morales-Ramírez et al., 1992, 1995a), no se ajustaron a lo esperado de acuerdo con el marco teórico de probabilidades, no resultó

fácil inferir el destino de las lesiones involucradas, ya que dos alternativas eran probables: (i) que lesiones originales no inductoras, producidas en el ciclo de la exposición, persistieran hasta el subsiguiente, transformándose en inductoras de ICH o (ii) que esos incrementos fueran debidos a la formación de lesiones recientes en relación al ciclo postratamiento. La elección de una de estas posibilidades es posible solamente si se conoce la relación entre la inducción de ICH y el curso de la duplicación del ADN; en función del tiempo de exposición a los mutágenos, ya que la duda refleja la probabilidad de asincronía entre el tiempo de exposición a los mutágenos y el curso de la duplicación del ADN durante la división celular.

Teóricamente, la inducción de ICH debida a lesiones no persistentes ocurrirá en el ciclo de la exposición; en los subsecuentes la causada por lesiones persistentes; ambos tipos de lesiones se habrían producido delante de la horquilla de duplicación. La segunda alternativa implica que hubo un desfaseamiento entre el tiempo de exposición y el curso de la duplicación del ADN, ya que abre la posibilidad de que las lesiones hubieran ocurrido detrás de la horquilla de duplicación; en las cadenas recientemente sintetizadas con lo cual, ya no se expresaron como ICH en el ciclo de la exposición, sino en el subsiguiente; pero no son persistentes.

Para poder establecer la relación entre la inducción de ICH y el curso de la

duplicación del ADN, es adecuado el empleo de varios tiempos de exposición a los mutágenos durante los tres ciclos de división celular de protocolo TDTT, con lo cual, el empleo de éste sería más útil para estudiar el destino de las lesiones inductoras de ICH.

1.6. Efecto de la BrdU sobre la inducción de ICH

1.6.1. Efecto de la incorporación de la BrdU *per se*

Se ha establecido que la BrdU empleada para la detección de ICH por mutágenos, es capaz de inducir *per se* este evento. Algunos resultados demostraron que su incorporación durante la duplicación del ADN aumenta la posibilidad de producción de ICH (Mazrimas y Stetka, 1978), en tanto que otros datos indicaron que cuando la BrdU ya está incorporada en la cadena que actúa como molde durante la síntesis de ADN, induce ICH (O' Neill et al., 1983; Suzuki y Yosida, 1983; Stetka y Spahn, 1984; Escalza et al., 1985; Zijno et al., 1989).

Otras evidencias han permitido establecer que la frecuencia de ICH aumenta de manera proporcional con el nivel de incorporación del análogo (Schvartzman y Goyanes, 1980; Schvartzman et al., 1985; Morales-Ramírez et al., 1987; Escalza et al., 1989) y datos adicionales indican que este aumento se relaciona también con los métodos empleados para la detección del

ICH, ya que después de la incorporación *in vivo* de la misma dosis de BrdU, en dos experimentos paralelos que usaron diferentes procedimientos, la frecuencia fue más alta cuando los ICH se evidenciaron mediante la técnica de tinción diferencial de fluorescencia más Giemsa, que cuando se usó el método de detección inmunocitoquímico (Russo et al., 1994).

Se ha determinado que la alteración del equilibrio de las pozas de nucleótidos celulares también tienen importancia para la inducción de ICH. Esto ha sido demostrado mediante la utilización de líneas celulares mutantes con diferentes tasas de actividad de la enzima timidilato sintetasa (TMP) (Morris, 1991). Células de pacientes con síndrome de Bloom, con actividad TMP reducida, cultivadas en una poza baja en timidina presentan reducción notable de la frecuencia de ICH (Shiraishi et al 1989), en cambio, líneas celulares linfoblastoideas humanas con actividad TMP aumentada, muestran incremento en la frecuencia de ICH (Taguchi y Shiraishi, 1989). Además, el co-cultivo en pozas altas en timidina, de células que tienen niveles altos de TMP con células de niveles bajos reduce la inducción de ICH en estas últimas (Shiraishi y Li, 1990).

El o los mecanismos a través de los cuales la BrdU induce ICH no se han establecido. La observación de proporcionalidad entre las frecuencias basales de ICH obtenidas en el primero y

segundo ciclo, con respecto a la dosis de BrdU administrada durante tres ciclos, sugirió que la presencia de BrdU durante la síntesis del ADN induce el ICH. Sin embargo, el aumento de ICH en el tercer ciclo, no obstante el haber usado la misma dosis, apoya la idea de que la duplicación de una cadena de ADN sustituida también induce ICH (Morales-Ramírez et al., 1987).

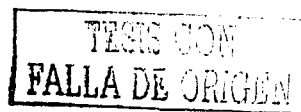
La disminución de la inducción de ICH por antipaina y dimetilsulfóxido en células SB sugirió que los radicales libres producidos por la incorporación de la BrdU en el ADN (Schwartz y Weichselbaum, 1985) están involucrados en la formación de los ICH, lo cual fue confirmado con la observación de una frecuencia baja de ICH en células de criceto chino mediante el empleo de marcaje con biotina-dUTP(biotina) en vez de BrdU, ya que la primera no causa la formación de radicales libres (Bruckmann et al., 1999b).

Por otro lado, algunos resultados indican que la sustitución de BrdU en el ADN no es la causa del incremento en la frecuencia basal de ICH en ciertos tipos celulares (Tsuji et al., 1986; Wang et al., 2000; Yankiwiski et al., 2001; Gaymes et al., 2002), sino más bien, lo es el genotipo de dichas células. En un estudio (Tsuji et al., 1986), con células mutantes que tienen una frecuencia basal de ICH más alta que la de sus progenitoras (cuatro veces), las frecuencias de ICH permanecieron constantes en un rango amplio de sustitución

de timidina por BrdU (2-90%) y los autores concluyeron que las mutaciones de estas células, son las responsables de esa inducción y no el efecto de la sustitución de BrdU en el ADN. En otra investigación, en células provenientes de pacientes con SB, (Wang et al., 2000; Yankiwiski et al., 2001; Gaymes et al., 2002), se demostró recientemente que una mutación en el gen BLM, es el origen de la alta frecuencia de ICH en éstas células, ya que esta mutación causa una alteración en la actividad de una helicasa que es esencial para el mantenimiento de la estabilidad genómica en estos individuos e implica que la presencia de BrdU en el ADN de estas células no tiene que ver con la inducción alta de ICH.

1.6.2. Papel Modulador de la incorporación de BrdU sobre la inducción de ICH por mutágenos

Numerosas evidencias indican que el papel modulador de la BrdU ocurre de forma diferente entre los mutágenos (Morris et al., 1992; Morales-Ramírez et al., 1992, 1995). Otros datos indican que dicho efecto sucede cuando se emplean concentraciones altas de los mutágenos (Natarajan et al., 1986) y que en el caso de ciertos inhibidores de la poli(ADP-ribosa)polimerasa, el nivel de sustitución de BrdU en el ADN es decisivo (Zwanenburg y Natarajan, 1984). La modulación de la BrdU puede considerarse en base a lo siguiente:



Sensibilización

Existen evidencias de que la inducción de ICH es más alta, cuando la exposición a los mutágenos ocurre después de la incorporación de BrdU; esto se interpretó en términos de que el ADN sustituido es más sensible para la inducción de ICH causada por los mutágenos, como es el caso de la exposición radlación ionizante, tanto *in vitro* (Renault et al., 1982) como *in vivo* (Morales-Ramírez et al., 1983, 1984, 1994); las metil y etil nitrosoureas (MNU, ENU) (González-Beltrán y Morales-Ramírez, 1999; Morales-Ramírez et al, 2001), en células de la glándula salival de ratón; inhibidores de la polimerasa α (Morgan y Wolff, 1984a), en células en cultivo; cisteamina y cistamina (Speit et al., 1980) en células V-79 de criceto chino, etc. Otros resultados, indicaron que los altos incrementos de ICH producidos por la camptotecina (inhibidor de la topoisomerasa I) ocurren no solamente por la BrdU incorporada en el ADN, sino también por la que está presente en el medio durante la duplicación (Zhao et al., 1992).

Inhibición

Por otro lado, se han reportado datos que indican que la exposición a ciertos mutágenos, de células cuyo ADN está sustituido con BrdU, causa una inducción menor de ICH y esto ha sido interpretado como debido a un efecto inhibitor de la BrdU

(Morales-Ramírez et al, 1992). En células V-79 de ovario de criceto chino que fueron expuestas a MNNG después de la incorporación de BrdU se observó una reducción en la frecuencia de ICH de un 70-80% en relación con la frecuencia observada cuando las células se expusieron antes del suministro de BrdU (Popescu et al., 1980). En el mismo tipo celular, la exposición a MMS después de la incorporación de BrdU indujo una frecuencia de ICH equivalente a un 50% respecto a la obtenida en células expuestas antes de la incorporación de BrdU (Ockey, 1981); lo mismo sucedió en experimentos similares en células de médula ósea de ratón, *in vivo* (Morales-Ramírez et al, 1992). Además, otros datos (Rodríguez-Reyes, 1996) indican también la existencia de un efecto inhibitor de la incorporación de BrdU para la inducción de ICH causada por dimetilnitrosamina en células de la médula ósea.

Ausencia de efecto modulador

Otros resultados, muestran que la incorporación de BrdU no tiene efecto sobre la inducción de ICH causada por ciertos mutágenos como bleomicina, proflavina y MMC (Morgan y Wolff, 1984b) y de inhibidores de la poli(ADP-ribosa)polimerasa (Morgan y Wolff, 1984c); o sobre el efecto sinérgico del postratamiento con cafeína, de células de pacientes con *xeroderma*

pigmentosum, expuestas previamente a luz UV (Tohda y Oikawa, 1988). Así mismo, se consideró el tratamiento con TPA (12-O-tetradecanollforbol-13-acetato), un promotor de tumores que provocó incrementos de ICH independientemente de la concentración de BrdU en el ADN (Popescu et al., 1982; Schwartz et al., 1982) y la inducción similar de ICH en cromosomas descendientes de cadenas no sustituidas y en descendientes de cadenas sustituidas con BrdU, causada por la exposición de células de la médula ósea a ciclofosfamida (Morales-Ramírez et al., 1990) y a etil metanosulfonato (EMS) (Rodríguez-Reyes, 1996)

Controversia del efecto modulador de la BrdU

Por otro lado, se ha observado que existe controversia en cuanto al efecto modulador de la incorporación de BrdU sobre la inducción de ICH por algunos mutágenos. En células de glándula salival de ratón *in vivo*, la exposición a MMS en ADN sustituido causó un efecto sensibilizador, ya que incrementó la frecuencia de ICH en un 100% en comparación con la detectada por la exposición en ADN nativo (González-Beltrán y Morales-Ramírez, 2003). Estos datos son totalmente diferentes de los previamente reportados para este mutágeno (Ockey, 1981; Morales-Ramírez et al., 1992). Una situación más complicada se observa con la MMC,

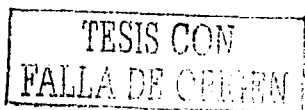
cuya capacidad inductora no se modificó por la incorporación de BrdU en células en cultivo (Morgan y Wolff, 1984c), pero sí lo fue en células de la médula ósea, en las que se detectó un efecto sensibilizador (Morales-Ramírez et al., 1990), ya que cromosomas con incorporación alta de BrdU, mostraron una frecuencia de ICH equivalente a casi tres veces más que la de cromosomas con sustitución baja. En cambio, los resultados en células de glándula salival con su ADN sustituido (Morales-Ramírez et al., 1995b) indican la existencia de un efecto inhibitor debido a que la exposición a MMC causó una reducción en la frecuencia de ICH equivalente a un 20% respecto a la que se encontró en células no sustituidas. Además, el hecho de que células CHO, expuestas a MMC; marcadas con biotina, tuvieron una frecuencia ligeramente mayor que la de células marcadas con BrdU (Stoilov et al., 2002), apoyaría la existencia de un efecto inhibitor de la BrdU, ya que se ha sugerido que la biotina no interfiere con la capacidad de los mutágenos para inducir ICH (Bruckmann et al., 1999a, b). En cuanto al EMS, se reportó ausencia de efecto modulador en células de médula ósea (Rodríguez-Reyes, 1996), pero en células de glándula salival se detectó sensibilización (González-Beltrán y Morales-Ramírez, 2003). Es posible que la explicación para estas controversias se relacione por un lado, con distintas variables como: la dosis de BrdU, el nivel de sustitución de BrdU en el

ADN, o la concentración de BrdU presente durante la duplicación del ADN con lesiones; que pueden ser específicas en diferentes trabajos y por otro lado también podría influir el hecho de que en varios experimentos se emplea el marcaje de BrdU en los dos o tres ciclos que abarca el protocolo usado (Ockey, 1981; Morgan y Wolff, 1984c; Rodríguez-Reyes, 1996), y en otros, dicho marcaje solamente sucede en el primer ciclo (Morales-Ramírez et al., 1995b; González-Beltrán y Morales-Ramírez, 1999, 2003). Adicionalmente, la absorción de la BrdU puede ocurrir de distinta manera entre los sistemas *in vivo* e *in vitro* y en células de tejidos diferentes.

1.6.3. Modulación de la BrdU sobre el destino de las lesiones inductoras de ICH

En el estudio del destino de las lesiones inductoras de ICH es ideal tener el control de las variables arriba mencionadas y poder hacer inferencias de la forma en que la BrdU afecta la capacidad de inducción de ICH por los mutágenos, la persistencia y el grado de reparación de las lesiones inductoras durante divisiones celulares sucesivas; así como la tenacidad de las lesiones para inducir ICH. Tanto persistencia como tenacidad son términos que se aplican a la producción de ICH posterior a la exposición, en relación a tiempo, divisiones celulares o en

la etapa de G1. La diferencia entre ellos es que la tenacidad se refiere a la capacidad de algunas lesiones, de poder causar ICH en el mismo locus en divisiones subsecuentes. Los protocolos que emplean la tinción diferencial en dos tonos de las cromátidas hermanas después de marcaje del ADN durante dos ciclos de división celular sucesivos no permiten distinguir el efecto modulador de la BrdU (Ockey, 1981; Kaina y Aurich, 1985), ya que si se pretende determinar la persistencia, entonces la comparación entre la inducción en el primer ciclo y la del segundo, no es del todo válida porque en un caso el ADN tiene timina y en el otro está sustituido con BrdU. Además, la producción de lesiones tenaces, que causan ICH en el mismo locus en divisiones sucesivas pasaría inadvertida porque los ICH se cancelarían por la tinción.. El protocolo de incorporación en células de glándula salival (Morales-Ramírez et al., 1995b; González-Beltrán y Morales-Ramírez, 1999, 2003), que marca al ADN durante la primera de dos divisiones sucesivas, ha hecho posible determinar que la BrdU no solamente afecta la inducción de ICH por los mutágenos, sino también el grado de reparación de las lesiones involucradas, durante la etapa de G1. Así mismo, el protocolo de la TDTT, que emplea células que incorporan tres diferentes niveles de BrdU ha permitido establecer la medida en que éstos modifican la capacidad inductora de los mutágenos y podría también ser útil



para evaluar la modulación de la persistencia de las lesiones involucradas en la formación del ICH si la exposición a los compuestos se aplica en diferentes tiempos (Morales-Ramírez et al., 1988, 1990, 1992, 1995).

Reparabilidad.

Se ha demostrado que la incorporación de BrdU en el ADN afecta el grado de reparabilidad de las lesiones que dan lugar a ICH. Esto se ha llevado a cabo en el modelo *in vivo* de células de glándula salival de ratón, las cuales son inducidas a dividirse de manera parasincrónica durante dos ciclos de división celular sucesivos después del suministro de isoproterenol (Morales-Ramírez et al., 1995b; González-Beltrán y Morales-Ramírez, 1999, 2003). La estrategia consiste en exponer a las células a los mutágenos en las etapas G1 temprana y tardía del primero y del segundo ciclos. Esto permite inferir el grado de reparación de las lesiones a partir de la diferencia entre la frecuencia de ICH por la exposición en G1 tardía menos la de G1 temprana. Como la incorporación de BrdU ocurre durante el primero de los dos ciclos, la comparación del grado de reparación entre ambos ciclos, permite establecer el efecto de la BrdU, ya que en el primero las lesiones ocurren en ADN nativo y en el segundo en ADN unifilarmente sustituido. De esta manera, se detectó que las lesiones involucradas en la formación de ICH,

causadas por MMC (Morales-Ramírez et al., 1995b), MNU (González-Beltrán y Morales-Ramírez, 1999) y EMS (González-Beltrán y Morales-Ramírez, 2003) son reparadas parcialmente si ocurren en ADN nativo; las producidas por ENU se reparan cuando suceden en ADN unifilarmente sustituido con BrdU (González-Beltrán y Morales-Ramírez, 1999) y las ocasionadas por MMS (González-Beltrán y Morales-Ramírez, 2003) se reparan de igual manera ya sea que se formen en ADN nativo o en ADN sustituido con BrdU.

1.6.4. Mecanismo de la modulación de la BrdU sobre la inducción de ICH por los mutágenos

No se ha establecido el mecanismo a través del cual la BrdU modula la inducción de ICH por los mutágenos. Es posible que la sustitución del ADN provoque modificaciones en su estructura que a su vez influyan en la capacidad de los agentes para inducir ICH (Morris, 1991) o que este efecto modulador se relacione con la interacción particular de cada uno de los mutágenos con el ADN. En el caso de la inhibición sobre la inducción de ICH por MNNG, se sugirió que la BrdU reduce los sitios en el ADN donde la MNNG reacciona (Popescu et al., 1980). Respecto al efecto sensibilizador de la incorporación de BrdU sobre la inducción de ICH por radiación gamma, algunos resultados, sugirieron que el incremento producido por la exposición de

células con su ADN sustituido, es debido a la interferencia de la BrdU libre presente en el medio de cultivo con el proceso de reparación de lesiones durante G1 (Kondrashova et al., 1990). Por otro lado, el análisis de las frecuencias de ICH y de aberraciones cromosómicas obtenidas en experimentos que usaron células marcadas con BrdU o con biotina e irradiadas en el ciclo subsecuente, permitieron concluir que una proporción de los ICH son falsos porque se derivan de aberraciones cromosómicas y que el resto son verdaderos y se producen por el daño de la radiación a sitios del ADN que tienen BrdU (Bruckmann et al., 1999b; Sayed Aly et al., 2002).

Por otro lado, se ha considerado que la inducción de ICH causada por mutágenos no es solamente modulada por BrdU. Otros

factores tales como el tiempo de administración de los mutágenos en relación al tiempo del suministro del análogo, puede modificar la respuesta en términos del grado de dispersión de las frecuencias de ICH. Esto se puede explicar no solamente con base en la condición de sustitución de BrdU en el ADN, sino también en relación a la cinética de distribución y absorción de los agentes, de sus necesidades de activación metabólica y de la magnitud de sus vidas medias (Tice et al., 1989). Aunado a esto, la inducción de ICH o incluso la diferenciación de las cromátidas hermanas podrían ser afectadas por interferencia en la tasa de absorción de la BrdU debido a retraso en el ciclo celular de las células expuestas a los mutágenos (Russo et al., 1994).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. ANTECEDENTES

El estudio del destino de las lesiones involucradas en la producción de ICH podría contribuir al conocimiento del mecanismo de formación y del significado biológico de este evento genético. Lo cual, a la fecha no se ha esclarecido del todo. Esto constituye el tema fundamental de la presente investigación

Se ha propuesto que la incorporación de BrdU empleada para la detección del ICH puede ejercer un efecto modulador sobre la capacidad de los mutágenos para inducir este evento, lo que permite suponer, que el destino de las lesiones podría ser también modificado por la BrdU. Por lo tanto, en este trabajo se consideró necesario establecer si ocurre esto.

El empleo del protocolo TDTT permite estudiar a la vez, el destino de las lesiones generadoras de ICH y el efecto de la incorporación de BrdU sobre el mismo, a través de tres ciclos de división celular sucesivos.

Debido a que en el protocolo TDTT, la relación entre el tiempo de

exposición al mutágeno y el curso de la duplicación del ADN es esencial para la interpretación del comportamiento de las lesiones, en términos de persistencia y tenacidad; es necesario establecer como transcurre el curso de la inducción de ICH en los tres ciclos celulares sucesivos en función del tiempo de exposición.

Aunado a lo anterior, es necesario tener la certeza de que el momento de exposición coincide con el momento en el que los mutágenos reaccionan con el ADN. Por lo anterior es metodológicamente más práctico emplear mutágenos de acción directa con el ADN, como es el caso de la etilnitrosourea (ENU), la cual es un agente alquilante que introduce radicales etilo en varios sitios nucleofílicos del ADN. Con esto, es posible evitar la formación de lesiones nuevas a tiempos fuera de control, causadas por el metabolismo de mutágenos de acción indirecta, lo cual crearía incertidumbre en las inferencias sobre el destino de las lesiones.

Por lo tanto, este trabajo de investigación pretende responder a tres

preguntas, a través de sus hipótesis correspondientes:

Pregunta 1.

¿Cuál es la relación entre la inducción de ICH y el curso de la duplicación del ADN en función del tiempo de exposición al mutágeno?

Hipótesis:

Nula: Que no haya tal relación.

Alternativa: Existe una relación entre la inducción de ICH y el curso de la duplicación.

Pregunta 2.

¿Es el ICH la expresión de un proceso que permite la tolerancia o reparación de lesiones en el ADN?

Hipótesis

Alternativas:

a). Los ICH representan un proceso que permite la reparación de lesiones.

b). Los ICH representan un proceso que permite la tolerancia de lesiones en el ADN.

Pregunta 3.

¿Cuál es el papel que juega la BrdU sobre la inducción y persistencia de las lesiones que inducen ICH?

Hipótesis

Nula: La BrdU no afecta la inducción de ICH ni la persistencia de las lesiones que los inducen.

Alternativas

- a) La BrdU afecta la inducción de ICH y también la persistencia de las lesiones que lo producen.
- b) La BrdU afecta la inducción de ICH pero no la persistencia de las lesiones que lo causan
- c) La BrdU no afecta la inducción de ICH pero si la persistencia de las lesiones que lo generan.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. OBJETIVOS

Con base en lo anteriormente expuesto, en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos.

3. 1 Objetivo General

Contribuir al conocimiento del mecanismo de formación de ICH mediante el seguimiento del destino de las lesiones en el ADN, que dan lugar a ICH.

3. 2 Objetivos Particulares:

3. 2. 1 Establecer el curso de la inducción de ICH en tres ciclos de división celular sucesivos por la exposición a ENU a diferentes tiempos.

3. 2. 2 Determinar la persistencia y tenacidad de las lesiones inductoras de ICH por la exposición a ENU a diferentes tiempos

3. 2. 3 Estimar el efecto de la incorporación de BrdU al ADN sobre la inducción de ICH por ENU.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Estrategia Experimental

La estrategia experimental consistió en establecer el efecto de la exposición *in vivo* a etilnitrosourea, a diferentes tiempos, sobre las frecuencias de ICH-1, ICH-2 e ICH-3 en células de la médula ósea de ratón. Dicha exposición se hizo en el lapso de los tres ciclos que comprende el protocolo TDTT usado en este estudio. A partir de dicho análisis se infirió el destino de las lesiones involucradas en la producción de ICH.

Además, el empleo del protocolo TDTT permitió determinar el efecto de la BrdU sobre la inducción de ICH y sobre el destino de las lesiones involucradas, ya que durante los tres ciclos de división, hay un aumento gradual de sustitución con BrdU en la doble cadena del ADN, así como del nivel de incorporación durante la duplicación. En el primer ciclo el ADN tiene timina y la duplicación sucede en presencia de un nivel bajo de incorporación. En el segundo, el ADN está unifilarmente sustituido y el nivel de incorporación es alto; finalmente en el tercero, está bifilarmente sustituido a niveles alto-bajo y la incorporación es alta.

4.2. Modelo experimental

Se empleó el modelo experimental de células de la médula ósea de ratón *in vivo*.

Este tejido se encuentra en proliferación continua y las células están en diferentes etapas del ciclo celular. Este modelo ha sido ampliamente usado en estudios citogenéticos (Tice e Ivett, 1985) y se determinó (Rodríguez-Reyes, 1996) con base en una fórmula propuesta por Ivett y Tice (1992) que su tiempo de generación promedio es de doce horas.

4.3. Animales.

Se usaron ratones machos BALB/c de dos a tres meses de edad y de 30 g de peso, los cuales son criados en el bioterio del ININ donde son alimentados *ad libitum* con agua y comprimidos Purina para roedores pequeños, y mantenidos en condiciones controladas de temperatura y de ciclos de luz y oscuridad.

4.4. Protocolo de tinción diferencial en tres tonos de las cromátidas hermanas

Para determinar la inducción de ICH en tres ciclos celulares consecutivos, se utilizó el método de tinción diferencial en tres tonos de las cromátidas hermanas (TDTT) (figura 1). Brevemente: el protocolo TDTT requiere que las células progresen a través de tres ciclos celulares sucesivos en presencia de BrdU; a dosis baja en el primero

y a dosis alta en el segundo y tercero. En la etapa de síntesis de esos ciclos, la BrdU se incorpora al ADN a medida que progresa la duplicación semiconservadora de éste,

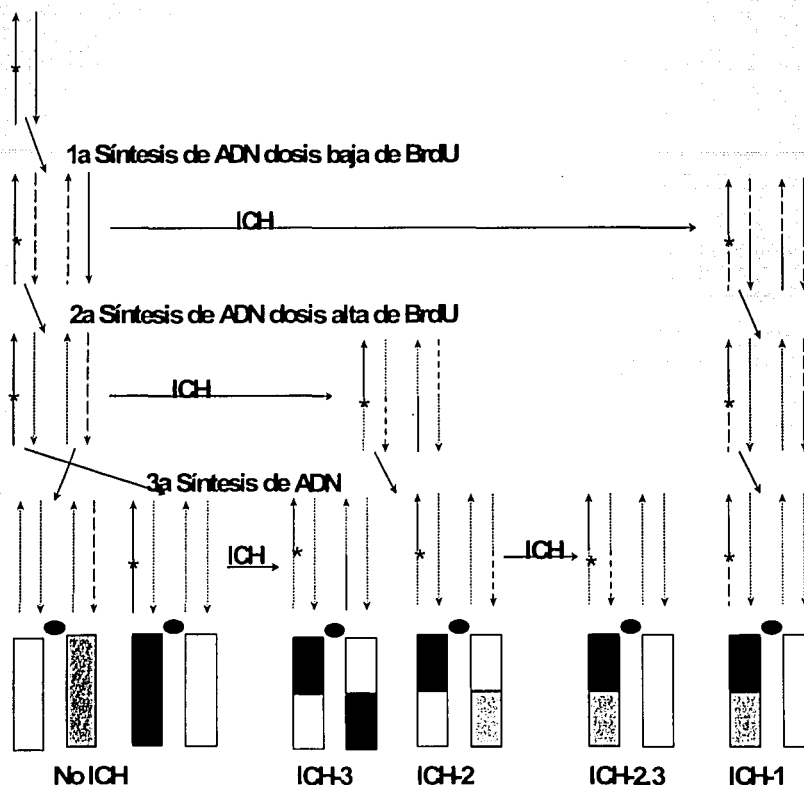


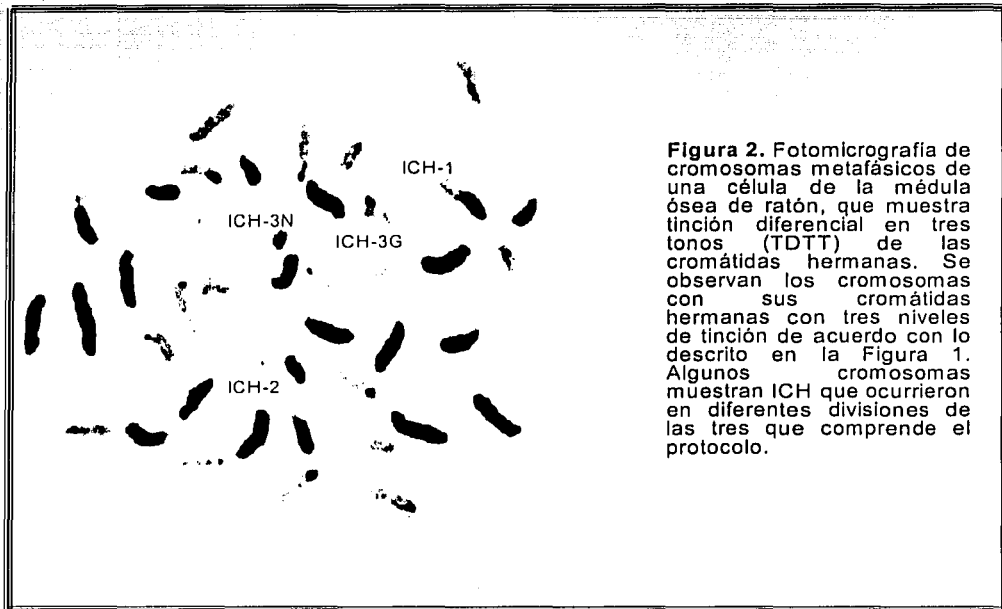
Figura 1. Esquema que muestra el protocolo de incorporación de BrdU durante la síntesis en tres ciclos de división celular sucesivos. Las líneas simbolizan las cadenas de ADN, las continuas representan las cadenas no sustituidas, las quebradas las cadenas con sustitución baja y las punteadas las cadenas con sustitución alta de BrdU. Asimismo se representan los intercambios entre las cadenas que van a dar lugar a los ICH en cada uno de los tres ciclos de división. En la parte inferior se muestra el aspecto al microscopio de los cromosomas en los que han ocurrido los ICH en las diferentes divisiones.

sustituyendo a la timina. Esto permite que en la tercera metafase, las cromátidas hermanas de los cromosomas tengan tres niveles de sustitución de BrdU, los cuales se evidencian cuando los cromosomas se someten a una

técnica de tinción diferencial (Perry y Wolff, 1974; Goto et al., 1975), con lo cual, las cromátidas presentan tres grados de tinción: intenso (cromátida negra), intermedio (cromátida gris) y pálido (cromátida blanca).

El ADN de la cromátida negra tiene una cadena no sustituida y su complementaria está sustituida con BrdU alta. En la cromátida gris el ADN tiene en una cadena sustitución baja de BrdU y alta en la otra. La cromátida blanca está bifilarmente sustituida con nivel

alto de BrdU. Esto permite distinguir en cada célula en metafase, los ICH que ocurrieron en cada uno de los tres ciclos de división, así como los que suceden en el mismo locus en el segundo y tercer ciclo, debidos a lesiones que se denominan tenaces (figuras 1 y 2).



4.5. Protocolo experimental.

Considerando que la duración del ciclo celular de la médula ósea es de 12 h (Ivett y Tice, 1982), se espera que a las 36 h éstas hayan progresado a través de tres ciclos. En este lapso, los animales recibieron los tratamientos con BrdU, colchicina y etilnitrosourea (ENU); en la figura 3 se muestran los tiempos en que ocurrieron éstos, mismos que se describen a continuación.

4.5.1. Suministro de BrdU.

La BrdU en suspensión acuosa y adsorbida previamente a carbón activado (Morales-Ramírez et al., 1980), fue administrada a los ratones mediante dos inyecciones intraperitoneales. La primera, al inicio del protocolo TDTT (tiempo cero) con dosis de 0.2 mg /g de peso (dosis baja) y la segunda con dosis de 2.0 mg/g de peso (dosis alta) 12 h después.

4.5.2. Exposición a ENU.

La exposición a ENU se hizo de manera aguda mediante una inyección subcutánea de una solución acuosa con 25 mg/Kg de peso. Diferentes grupos de ratones fueron tratados de esta forma a las 3, 6, 9, 12, 18, 24 y 30 h después de la primera

administración de BrdU y a las 3, 6 y 12 h antes de la misma. Cada grupo se integró al menos por 3 animales. Esto se llevó a cabo en varios experimentos y en cada uno de ellos se incluyó un grupo de animales testigo (testigos paralelos)

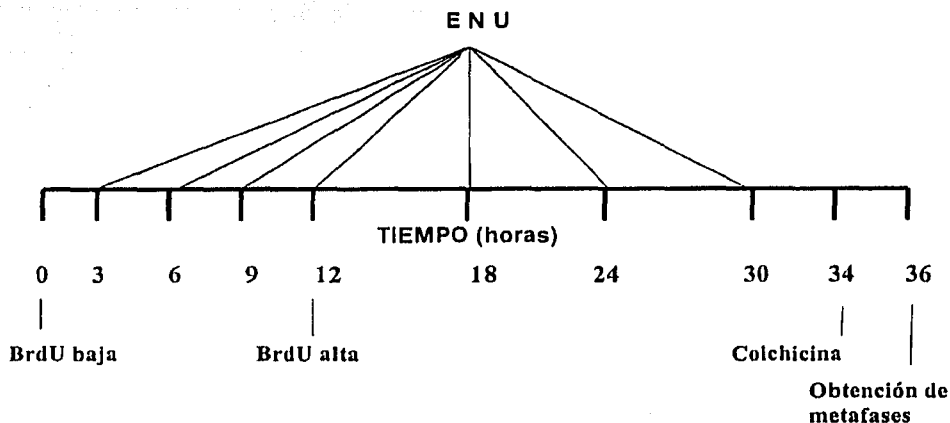


Figura 3. Protocolo experimental donde se muestran los tiempos a los que se administró la ENU en los diferentes grupos de animales; así como la BrdU y la colchicina. Asimismo, el tiempo en que los animales fueron sacrificados y se cosecharon las células para obtener las metafases.

4.5.3. Suministro de colchicina.

A las 34 h después del suministro de la dosis baja de BrdU, se les inyectó a los ratones de todos los grupos, una solución acuosa de 3.75 mg de colchicina por Kg de peso para bloquear el tercer ciclo de división celular en metafase.

4.5.4. Obtención de metafases.

Dos horas después de administrar la colchicina, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Las células fueron obtenidas de los fémures mediante arrastre por inyección de una solución salina en uno de los extremos.

Esta suspensión celular fue tratada con un método convencional para obtener metafases (Morales-Ramírez et al., 1990) y luego fue goteada sobre portaobjetos fríos y húmedos.

4.5.5. Tinción diferencial de las cromátidas hermanas.

Las preparaciones conteniendo las metafases, fueron secadas a temperatura ambiente por lo menos 24 h antes de la tinción con el método de fluorescencia más Giemsa (Wolff y Perry, 1974) modificado (Goto et al., 1975). Se les agregaron unas gotas de Hoechst 33258 10 μ M en un amortiguador de fosfato-citrato (Goto et al., 1975), se les puso un cubreobjetos y se colocaron debajo de una lámpara de luz negra de 25-W por 60 min. Se incubaron en 2 X SSC a 60^o C y después de lavarlas con agua destilada, fueron teñidas con Giemsa al 10% por 30 min.

4.6. Selección de la población celular

La población celular bajo estudio, se seleccionó en virtud de los tiempos en que se dieron los tratamientos con las dos dosis de BrdU y de colchicina, ya que las células analizables son las que muestran la tinción diferencial en tres tonos porque incorporaron la BrdU a los tiempos adecuados y estaban en metafase al momento de administrar la colchicina. El protocolo se estableció

considerando un tiempo de generación promedio de 12 h (Ivett y Tice, 1992).

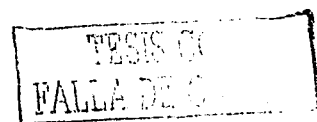
4.7. Análisis de los ICH (Figura 1; microfotografía)

El análisis de los ICH se llevó a cabo en un microscopio Zeiss modelo Axiomat a 1250 aumentos (100 X 12.5 X 1.25). Se registró el número de los ICH de cada tipo en cada una de 30 células por ratón de acuerdo con lo siguiente:

ICH-1. Se producen en el primer ciclo, se observan como segmentos adyacentes negros y grises en una cromátida; la cromátida hermana de ésta es blanca.

ICH-2. Ocurren en el segundo ciclo y se aprecian como intercambios recíprocos pero con tinción diferente; es decir, un segmento negro en una cromátida está enfrente de un segmento blanco de su cromátida hermana y subyacente al segmento negro se encuentra uno blanco, el cual a su vez está enfrente de uno gris de su cromátida hermana.

ICH-3. Son generados en el tercer ciclo y se ven como intercambios recíprocos de segmentos con igual tinción; ya sea negra o gris. En el primer caso, los ICH se denominan como **ICH-3N** y en el segundo, como **ICH-3G**. En la figura 1 solo se muestra un ICH-3N, pero se pueden apreciar los dos tipos de cromosomas 3N y 3G. Los primeros son descendientes de la cadena no sustituida



y los segundos de la sustituida con BrdU baja en el primer ciclo.

En la microfotografía de la metafase (figura 2) se observan los cuatro tipos de ICH en diferentes cromosomas.

4.8. Análisis y métodos estadísticos.

Se determinaron las frecuencias de ICH-1, ICH-2 e ICH-3 en las 30 células, así

como la frecuencia de ICH-3N e ICH-3G; tanto de los grupos expuestos a ENU como de los grupos testigo paralelos. Se aplicó la prueba estadística t de Student para evaluar las diferencias con respecto a los testigos y la de t pareada para determinar significatividad entre las frecuencias de ICH-3N y de ICH-3G, mediante el programa Excel para PC.

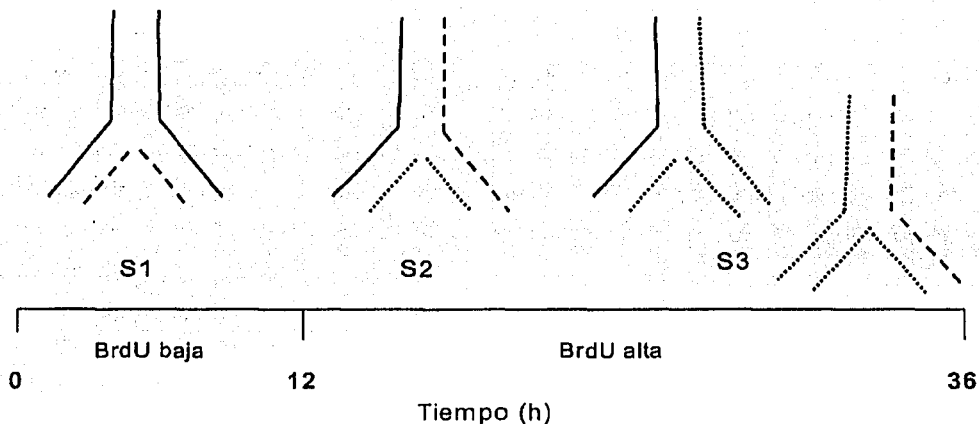


Figura 4. Incorporación de BrdU durante la síntesis de ADN (S) en tres ciclos sucesivos de división celular. El esquema representa las horquillas de replicación. Las líneas continuas representan las cadenas de ADN progenitoras sin BrdU, las líneas quebradas corresponden a las cadenas que incorporaron BrdU con una dosis baja y las punteadas las que incorporaron BrdU a una dosis alta.

4.9. Razonamiento para el logro de los objetivos.

Como cada grupo de animales fue tratado con la ENU a un diferente tiempo en el intervalo de los tres ciclos que comprende el protocolo TDTT, se pudo determinar la inducción de ICH-1, ICH-2 e ICH-3 y con esto

hacer las determinaciones necesarias para cubrir los objetivos de esta investigación:

1. El curso de la inducción de ICH en las tres divisiones celulares subsecuentes a medida que estas progresan.
2. La conducta de las lesiones involucradas en la producción de ICH, la cual puede manifestarse como: (i) inducción de

ICH en el ciclo en el cual ocurre la exposición (lesiones de expresión inmediata); o (ii) en ciclos subsecuentes (lesiones persistentes o de expresión tardía) e incluso, (iii) producción de ICH en el mismo locus en divisiones subsecuentes (lesiones tenaces). Esto último se determina cuando la exposición al mutágeno se da en la segunda división y produce lesiones tenaces que generan ICH en el mismo locus en la segunda y tercera división pero tienen la apariencia de ICH-1 (figura 1), son denominados "ICH-1".

3. Las frecuencias de ICH inducidas en diferentes condiciones de sustitución de BrdU ya que, como se mencionó, el protocolo TDTT requiere del suministro de una dosis baja de BrdU en el primer ciclo y una alta en el segundo y tercer ciclos; lo cual determina que el ADN tenga tres diferentes niveles de este análogo a lo largo de los tres ciclos. Además, considerando que la exposición al mutágeno (ENU) se da en varios tiempos antes y después de la primera administración de BrdU; se puede establecer por un lado; que la ENU va a producir lesiones en ADN con diferentes grados de sustitución y por otro lado, que este ADN con lesiones se duplicará en presencia de concentraciones diferentes de BrdU. Por lo tanto, bajo estas circunstancias se puede estudiar el efecto que la incorporación progresiva de BrdU tiene

sobre la inducción de ICH y sobre el destino de las lesiones que los producen. De acuerdo con la figura 4; en el primer ciclo las lesiones son provocadas en ADN que contiene timina (líneas continuas) y este se duplica un ciclo en presencia de dosis baja de BrdU (líneas quebradas) y luego dos subsiguientes en dosis alta de BrdU (líneas punteadas). En el segundo ciclo las lesiones pueden ocurrir en ADN no sustituido o sustituido con dosis baja de BrdU y se duplica dos ciclos subsiguientes en presencia de dosis alta de BrdU. En el tercer ciclo, las lesiones pueden ocurrir en ADN no sustituido o sustituido con dosis baja o con dosis alta de BrdU y se duplica en presencia de dosis alta de BrdU.

Otra estrategia que permite analizar el efecto de la BrdU sobre la inducción de ICH consiste en comparar las frecuencias de ICH-3 inducidas en cromosomas 3N y en 3G (figura 1). Como ya se mencionó, los cromosomas 3N son descendientes de la cadena de ADN no sustituida y los 3G de la sustituida con BrdU baja en el primer ciclo; de tal manera que se puede determinar si la BrdU tiene un efecto sensibilizador (si la frecuencia de ICH-3G es mayor que la de ICH-3N), inhibitorio (si ocurre lo contrario), o ausencia de efecto (si no hay diferencia entre ambas frecuencias).

5. RESULTADOS

5.1 Inducción de ICH-1, ICH-2 e ICH-3 en tres ciclos de división celular sucesivos causada por la exposición a ENU.

5.1.1. Frecuencias de ICH.

El cuadro 1 muestra las frecuencias de ICH inducidas en tres divisiones

subsecuentes, causadas por la exposición a ENU a diferentes tiempos con respecto a la administración de la dosis baja de BrdU (tiempo cero), así como las frecuencias de los testigos paralelos (T).

CUADRO 1. FRECUENCIA DE ICH EN TRES DIVISIONES SUBSECUENTES INDUCIDAS POR LA EXPOSICION A ENU A DIFERENTES TIEMPOS CON RESPECTO A LA PRIMERA ADMINISTRACION DE BrdU											
	3h	6h	9h	12h	18h	24h	30h	T1	T2	T3	T4
x ± DE											
ICH	x-T3	x-T2	x-T1	x-T1	x-T2	x-T3	x-T4				
1	2.9±0.2	2.8±0.7	2.7±1.3	2.5±0.6	0.86±0.4	0.88±0.1	0.69±0.2	0.43±0.1	0.75±0.1	0.89±0.2	0.53±0.1
Δ	2	2	2.3	2.1	0.11	-0.01	0.16				
2	8.3±1.0	7.1±0.9	6.0±0.7	8.7±2.5	12.9±2.3	5.2±0.6	6.7±0.7	3.8±0.3	4.2±1.1	3.6±0.7	7.3±1.6
Δ	2.7	2.9	2.2	4.9	8.7	1.6	-0.6				
3	7.4±0.6	7.3±1.0	6.3±0.8	6.5±1.3	8.3±1.1	10.3±1.4	15.0±1.2	3.8±0.5	4.4±0.7	3.8±0.6	4.4±0.8
Δ	3.6	2.9	2.5	2.7	3.9	6.5	10.6				
n	5	5	3	4	5	5	4	3	4	5	3

Todos los valores fueron significativos con respecto a sus testigos paralelos, excepto los valores en negrita. Prueba t de "Student"; p<0.05. T1 a T4 representan los diferentes grupos testigo. x-T (1-4) representa el incremento con respecto a su testigo paralelo. Δ=incremento. n=número de ratones.

En cada columna se muestran las frecuencias promedio de los tres tipos de

ICH; los que ocurren en la primera (ICH-1), en la segunda (ICH-2) o en la tercera (ICH-3)

división. En el mismo cuadro se observan la desviación estandar y el incremento neto de ICH, el cual se obtuvo restándole a la frecuencia promedio inducida (X), la frecuencia de testigos paralelos (T). Los resultados indican que la ENU induce un incremento significativo en la frecuencia de ICH-1, desde las 3 hasta las 12 h. A las 18,

24 y 30 h disminuye a valores tan bajos como los de los testigos.

Respecto a los ICH-2, su frecuencia es significativamente más alta que la de los testigos, desde las 3 h hasta las 24 h, presentando un valor máximo a las 18 h. A las 30 h, la frecuencia de ICH-2 es similar a la de los testigos.

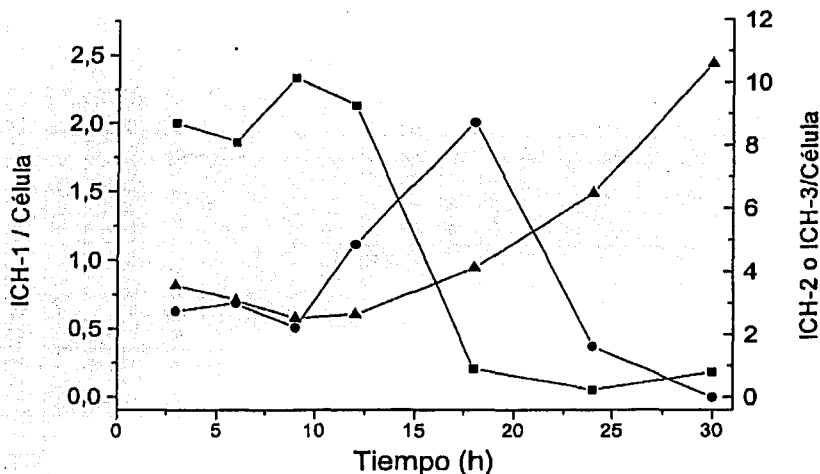


Figura 5. Incremento en dos escalas de las frecuencias de ICH-1 (), ICH-2 () e ICH-3 () por exposición a ENU a diferentes tiempos en células de la médula ósea de ratón in vivo.

La frecuencia de ICH-3 también es significativamente más alta que la de los testigos en todos los tiempos, aunque con un incremento más importante entre las 18 y las 30 h. El incremento mayor a las 30 h es superior al máximo observado para los ICH-2.

5.1.2. Progreso de la inducción de ICH-1, ICH-2 e ICH-3 en función del tiempo

de exposición a ENU, en tres ciclos de división celular sucesivos

En la figura 5 se presentan los incrementos de ICH del Cuadro 1. Se emplearon dos escalas debido a que la inducción de ICH-1 fue sustancialmente menor que la de ICH-2 e ICH-3. En el curso de la inducción de ICH a lo largo de los tres ciclos de división celular, se puede apreciar

que a las 9 h ocurre la frecuencia máxima de ICH-1, lo cual coincide con las frecuencias mínimas de ICH-2 e ICH-3. A las 18 h se observa la máxima inducción de ICH-2, y también se ve que prácticamente no hay producción de ICH-1 y la de ICH-3 es mínima. A las 30 h se presenta la frecuencia máxima de los ICH-3 y no se generan ICH-1 ni ICH-2. Esto muestra que la inducción máxima de ICH en cada ciclo de división celular puede

corresponder al momento previo a la duplicación del ADN del siguiente ciclo de división, ya que después de ese momento, el curso de la duplicación causa una reducción en la frecuencia de ICH en ese ciclo celular y un aumento progresivo en la del ciclo subsiguiente. Esto reflejaría que las lesiones son producidas, con mayor probabilidad, detrás de la horquilla de duplicación; en las cadenas de ADN recientemente sintetizadas.

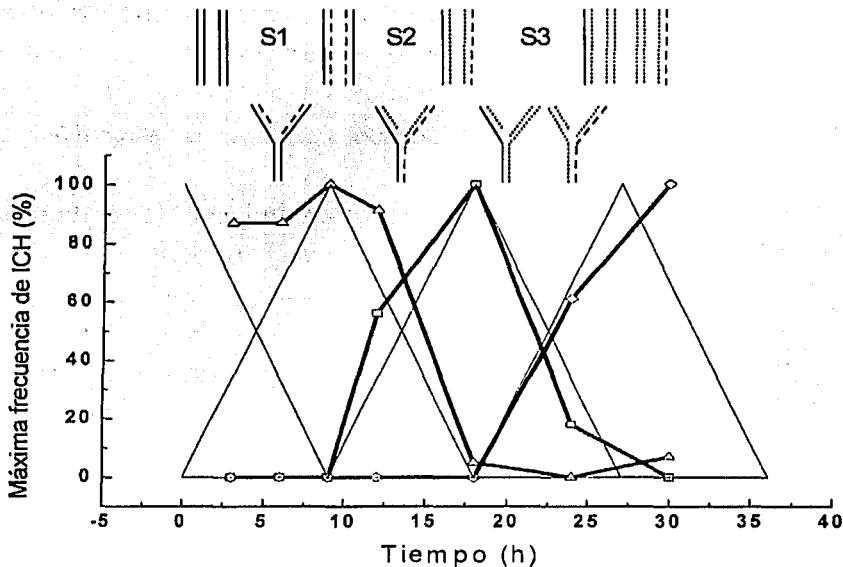


Figura 6. Modelo de inducción de ICH en divisiones celulares subsiguientes. Las líneas gruesas representan la producción real de ICH como porcentaje de la frecuencia máxima en cada división, las líneas delgadas la inducción teórica. En la parte superior se muestra la sustitución progresiva de BrdU en el ADN. Las líneas continuas representan las cadenas sin incorporación de BrdU, las quebradas con incorporación baja y las punteadas con incorporación alta.

5.1.3. Modelo de inducción de ICH respecto a la división celular.

Si los datos de las frecuencias de ICH inducidas por ENU en cada ciclo, son convertidos a porcentajes relativos al

máximo, se puede construir un modelo de inducción de ICH en divisiones subsiguientes.

En la figura 6 se muestran las curvas obtenidas de esta manera y también se muestran las esperadas, las cuales se

graficaron considerando como 100 % la inducción máxima para cada ciclo. En esta figura se aprecia mejor el progreso de la inducción de ICH en los tres ciclos de división; en especial, la correspondencia entre la frecuencia máxima en un ciclo dado y la mínima en los otros dos.

La forma de las curvas, en particular la de la segunda división, sugiere que las divisiones celulares en la médula ósea son continuas y que la duración de las etapas G₁, G₂ y M es muy breve e indica que la formación del ICH ocurre durante la fase S; específicamente en la horquilla de duplicación. A partir de este modelo se puede inferir que la duración del ciclo celular en la población estudiada es de 9 h y no de 12 h como se había determinado, usando el método de estimación de tiempo de generación promedio previamente reportado (Ivett y Tice, 1992). Esto indica que en el presente estudio la división celular está desfasada con respecto a los tiempos teóricos.

El hecho de que se pueda hacer el seguimiento de los ICH que ocurren en cada ciclo, indica que hay sincronía, la cual se debe a la selección de la población celular por la administración de BrdU y de colchicina a tiempos específicos y por la tinción diferencial en tres tonos de las cromátidas hermanas en las células analizadas. Estos resultados permitirán establecer tiempos más apropiados para los tratamientos de BrdU y

colchicina y así, obtener porcentajes más altos de células con la TDTT.

5.2. Persistencia y tenacidad de las lesiones inductoras de ICH

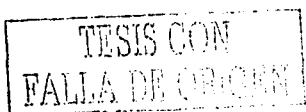
A continuación se presenta el análisis del destino de las lesiones inductoras de ICH, causadas por la exposición a ENU, a partir de las frecuencias de ICH en tres ciclos de división celular sucesivos (Cuadro 1) y de los incrementos de dichas frecuencias (figura 7). Este análisis se hizo de acuerdo con el modelo teórico de inducción de ICH en divisiones celulares sucesivas (figura 6).

5.2.1. Inducción de ICH por lesiones de expresión inmediata

Se observó que las frecuencias de ICH-1, ICH-2 e ICH-3 se incrementan preferentemente cuando la exposición a ENU ocurre durante su división celular correspondiente y es una demostración de que son producidas por lesiones de expresión inmediata, causadas al ADN recientemente y, como ya se mencionó, son el resultado del progreso de la duplicación del ADN.

5.2.2. Inducción de ICH por lesiones tenaces

El hecho de que la exposición a ENU durante la segunda división (18 h), no cause incremento en la frecuencia de ICH-1, demuestra que este mutágeno no induce "ICH-1", los cuales se producen a partir de



ICH ocasionados en el mismo locus en la segunda y tercera divisiones por lesiones tenaces al ADN (figura 1).

5.2.3. Inducción de ICH por lesiones de expresión tardía

La ENU fue capaz de inducir incrementos de ICH-2 e ICH-3 igual o más altos que los de ICH-1 por la exposición a diferentes tiempos durante la primera división

celular. Este resultado no podría ser explicado por la presencia de lesiones al ADN muy persistentes que son expresadas como ICH en divisiones celulares sucesivas, posteriores al ciclo en que ocurre la exposición al mutágeno porque la tendencia de las frecuencias de ICH sería a disminuir, ya que el número de lesiones se diluye en cada división.

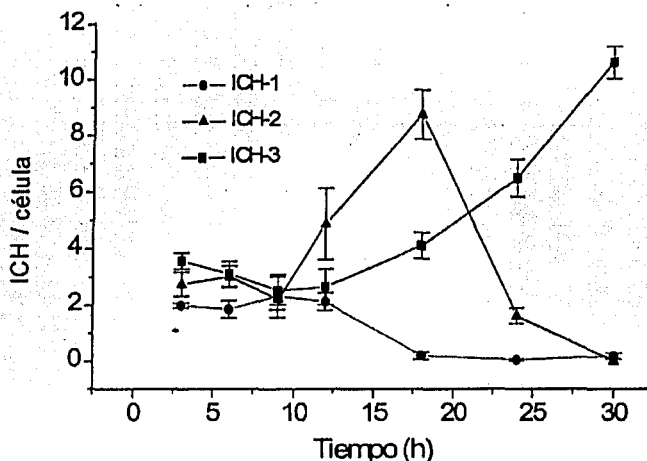


Figura 7. Incrementos en la inducción de ICH de primera (ICH-1), segunda (ICH-2) y tercera (ICH-3) división causados por la exposición con ENU a diferentes tiempos.

5.2.4. Inducción de ICH por la exposición a ENU a tiempos previos

Para explorar el hecho de que la ENU induce ICH a tiempos tardíos después de la exposición, tres grupos de animales fueron inyectados con la misma dosis de ENU usada en los experimentos anteriores a tiempos previos al de la primera administración de BrdU; 3, 6 ó 12 h antes. Cabe mencionar que en el lapso entre menos 12 h y el momento

en que se sacrifica a los ratones para analizar la inducción de ICH, las células expuestas a ENU se pueden dividir hasta cinco veces. Los resultados en el cuadro 2 muestran que las frecuencias de ICH-1, ICH-2 e ICH-3, fueron significativamente más altas que las de sus testigos paralelos y mostraron que el incremento en la frecuencia de ICH-1 fue más bajo que el de ICH-2 y que este a su vez fue menor que el de ICH-3. La exposición a ENU

3 y 6 h antes de la primera administración de BrdU, incrementó la frecuencia de ICH en las tres divisiones celulares subsecuentes en proporciones muy parecidas (1.4: 2: 3), en tanto que la exposición 12 h antes de la administración de BrdU elevó la frecuencia de ICH-1 a 1.0 y las frecuencias de ICH-2 e ICH-3 a aproximadamente 3. De hecho, el

aumento en ICH-3 es prácticamente constante en los tres tiempos de exposición.

Esto confirma que la ENU es capaz de inducir ICH varios ciclos de división después de la exposición en células con ADN no sustituido y que esta inducción se incrementa en las divisiones subsiguientes después de la exposición a ENU.

CUADRO 2. FRECUENCIA DE ICH EN TRES DIVISIONES SUCESIVAS INDUCIDA POR LA EXPOSICIÓN A ENU A DIFERENTES TIEMPOS ANTES DE LA PRIMERA ADMINISTRACION DE BrdU					
	-3h	- 6h	- 12h	T5	T6
	x ± DE				
	(x-T5)	(x-T5)	(x-T6)		
ICH-1	2.0±0.5 (1.35)	2.1±0.3 (1.45)	1.5±0.28 (0.99)	0.65±0.11	0.51±0.11
ICH-2	6.9±0.9 (1.8)	7.1±0.7 (2.0)	7.4±0.83 (3.2)	5.1±0.26	4.2±0.43
ICH-3	7.4±0.7 (3.2)	7.3±0.8 (3.1)	6.4±0.88 (2.8)	4.2±0.68	3.6±0.5
n	6	6	4	6	4

Todos los valores fueron significativos con respecto a sus testigos paralelos. Prueba t de "Student", p< 0.05. T5 y T6 representan los grupos testigo paralelos. x-T (5 ó 6) representa el incremento. n=número de animales

5.3. Efecto de la incorporación de BrdU sobre la inducción y persistencia de ICH causados por ENU.

5.3.1. Efecto de la incorporación progresiva de BrdU sobre la inducción de ICH por ENU en tres ciclos sucesivos.

En el Cuadro 1 y en la figura 7, se puede apreciar que la inducción de ICH-2 y de ICH-3 es aproximadamente cuatro y cinco veces más alta que la inducción máxima de ICH-1. Esto parece indicar que la

incorporación de BrdU tiene un papel importante en la sensibilidad de las células para la inducción de ICH por la ENU, en particular, para las lesiones de expresión inmediata. De acuerdo con el modelo teórico, en el curso de la duplicación del ADN (figura 6), a las 9 h (primera división) el ADN estaría unifilarmente sustituido con dosis baja de BrdU, después de este tiempo y hasta las 18 h (segunda división), se formarían dos clases de cadenas dobles de ADN; ambas tendrían

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

una cadena con dosis alta de BrdU; la cadena complementaria de una no estaría sustituida y la de la otra estaría sustituida con dosis baja de BrdU. A las 30 h (tercera división), se formarían tres clases de cadenas dobles; dos serían similares a las de la segunda división y la otra estaría bifilarmente sustituida con dosis alta de BrdU. Esto indica que la inducción de ICH depende de la incorporación de BrdU. Para comprender como es la relación dosis efecto, en el

Cuadro 3, se muestra la relación entre la incorporación de BrdU y la frecuencia de ICH por cromosoma durante las tres divisiones celulares. La incorporación de BrdU, en los cromosomas a los tiempos de máxima inducción, fue estimada indirectamente como el número de cadenas sustituidas a esos tiempos, multiplicado por la dosis de BrdU administrada durante la sustitución de estas cadenas.

CUADRO 3. EFECTO DE LA "INCORPORACION" DE BrdU AL ADN EN DIVISIONES SUBSECUENTES SOBRE LA INDUCCION DE ICH POR ENU		
División	"Incorporación" de BrdU	ICH / Célula (x)
1ª	0.4	2.3
2ª	4.2	8.7
3ª	6.1	10.6

La incorporación fue estimada como el producto del número de cadenas sustituidas multiplicado por la dosis administrada en la división correspondiente. Para la comparación de ICH-3 se usaron los resultados de la exposición a 30h.

Se emplearon los datos de los tiempos de inducción máxima, asumiendo que estos corresponden a los tiempos en los que se ha completado la duplicación del ADN en cada una de las tres divisiones. Los datos mostrados en dicho Cuadro indican que la inducción de ICH es proporcional a la dosis de BrdU y en la figura 8 se observa lo mismo, con $r = 0.99$. La cantidad de ICH causada por

25 mg de ENU/ Kg de peso en ausencia de BrdU, estimada por regresión lineal, fue de 1.9 ICH/ célula.

5.3.2. Efecto de la Incorporación de BrdU sobre la persistencia de las lesiones inductoras de ICH

En el Cuadro 1 y en la figura 7 se puede observar que a los tiempos de

inducción máxima, la frecuencia de los ICH causados por lesiones de expresión tardía es menor que la ocasionada por lesiones de expresión inmediata en relación al grado de incorporación de BrdU. A las 9 h (primera división), cuando de acuerdo con el modelo teórico, las cadenas dobles de ADN están unifilarmente sustituidas con dosis baja de BrdU; la proporción de ambos valores es similar (2.2 vs 2.3 ICH/ célula), pero a las 18

h (segunda división), cuando los dos tipos de doble cadena tienen un nivel mayor de sustitución; la producción de ICH por lesiones de expresión tardía es menor que la de ICH debida a lesiones de expresión inmediata (3.9 vs 8.7 ICH/ célula). Esto podría indicar que en el ADN sustituido con BrdU la ENU induce una proporción menor de lesiones tardías (persistentes) que de inmediatas.

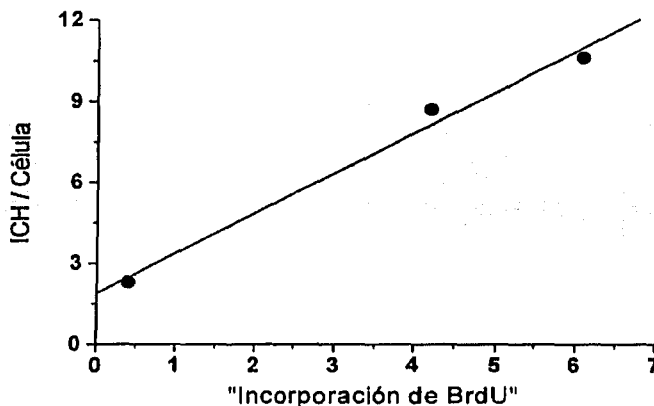


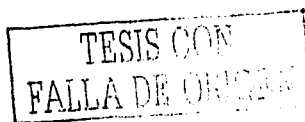
Figura 8. Curva dosis-respuesta de la Inducción de ICH en función de la Incorporación de BrdU al ADN. La Incorporación fue estimada como el producto de la multiplicación del número de cadenas sustituidas por la dosis administrada en cada división. Se usó la frecuencia máxima de ICH en cada división. La línea fue ajustada mediante mínimos cuadrados, $r=0.99$

Por otro lado, si se analizan los incrementos de ICH obtenidos por la exposición a tiempos previos a la primera administración de BrdU (Cuadro 2); se observa que hay un aumento progresivo en la frecuencia de ICH en relación con la progresión de los tres ciclos del protocolo TDTT. Por ejemplo, la exposición a -3 h, produjo incrementos de ICH / Célula de 1.35 en el primero, 1.80 en el segundo y 3.20 en el

tercer ciclos. Esto podría indicar que la BrdU que se incorpora en las cadenas recientemente sintetizadas en cada ciclo participa en la inducción tardía de ICH.

5.3.3. Inducción de ICH en la tercera división en cromosomas 3N y en cromosomas 3G

El Cuadro 4 y la figura 9, muestran respectivamente las frecuencias de ICH-3N y



de ICH-3G y los incrementos de éstas respecto a las frecuencias de testigos paralelos. Como ya se ha mencionado, los cromosomas 3N y 3G, son descendientes de cadenas no sustituidas y sustituidas con BrdU respectivamente; presentes después de la

primera división. Se consideraron los datos obtenidos por la exposición a ENU a todos los tiempos, es decir, tanto los previos como los posteriores a la primera administración de BrdU.

CUADRO 4. INCREMENTO DE LA FRECUENCIA DE ICH-3 EN CROMOSOMAS DERIVADOS DE LAS CADENAS DE ADN QUE EN LA PRIMERA DIVISION ESTABAN SUBSTITUIDAS (ICH-3G) O NO (ICH-3N) CON BrdU										
	-12h	-6h	-3h	3h	6h	9h	12h	18h	24h	30h
3N	x ± DE									
Tratados	4.0±0.8	3.7±0.6	4.2±0.4	4.9±0.6	4.6±0.6	3.8±0.8	3.6±0.7	4.3±0.5	5.6±0.9	8.5±1.7
Testigos	1.8±0.3	1.7±0.6	1.7±0.3	2.3±0.5	2.2±0.2	2.2±0.2	2.2±0.2	2.2±0.2	2.3±0.5	2.1±0.4
Tra-Test	2.2	2.0	2.5	2.6	2.4	1.6	1.4	2.1	3.3	6.4
3G										
Tratados	2.4±0.2	3.7±0.6	3.3±0.4	2.4±0.2	<u>2.6±0.7</u>	2.5±0.1	2.9±0.8	4.1±0.5	4.7±0.8	6.5±1.0
Testigos	1.9±0.3	2.5±0.6	2.5±0.6	1.5±0.2	2.1±0.4	1.7±0.2	1.7±0.2	2.3±0.4	1.5±0.2	2.3±0.5
Tra-Test	0.5	1.2	0.8	0.9	0.5	0.8	1.2	1.8	3.2	4.2
n	4	6	6	5	5	3	4	5	5	4

Todos los valores de los grupos tratados fueron significativos con respecto a sus testigos paralelos, con la excepción del valor que está subrayado (3G a 6h). Las diferencias en la frecuencia de ICH entre cromosomas 3N y 3G fueron significativas a excepción de los valores en negritas. Prueba de t pareada, (p<0.05). N de los testigos y su correspondencia se mencionan en los Cuadros 1 y 2.

La curva de ICH-3G parece mostrar una dependencia de la incorporación de BrdU. En el primer ciclo y en los tiempos previos a él, hay un pequeño pero significativo incremento de ICH con respecto al testigo, excepto para el valor obtenido por la exposición a 6 h. El hecho de que esta cadena no existe a los tiempos previos al de

la primera administración de BrdU, indica que algunas lesiones inducidas por ENU en ADN no sustituido podrían hacer a las cadenas de ADN sustituidas con dosis baja de BrdU, recientemente sintetizadas, propensas a la inducción de ICH en la tercera división. La exposición durante la segunda y tercera

divisiones incrementa continuamente la frecuencia de ICH-3G.

La inducción de ICH-3N fue significativa con respecto a los testigos en todos los tiempos del tratamiento. La respuesta para la inducción de ICH-3N fue mucho más compleja. En el ciclo celular

previo a la incorporación de BrdU hubo un incremento proporcional al tiempo. Estas lesiones persistentes provocadas durante el primero y segundo ciclo son principalmente ICH-3N; aunque esto era lo que se esperaba, el resultado confirma que la ENU puede causar lesiones persistentes en ADN nativo.

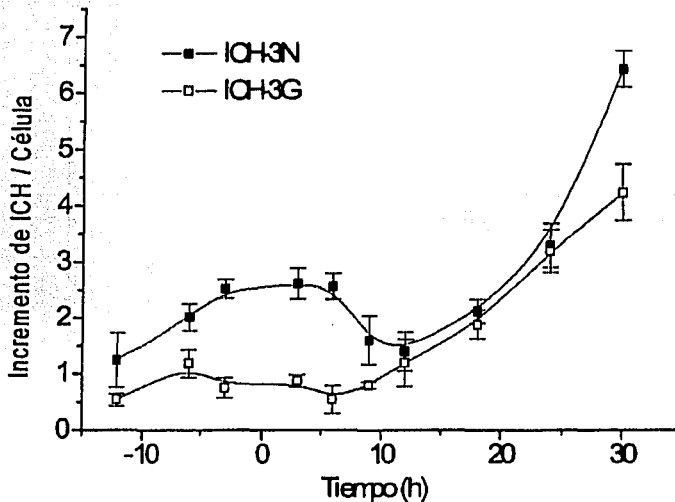


Figura 9. Incrementos en la frecuencia de ICH-3N e ICH-3G inducidos por la exposición a ENU a diferentes tiempos en células de la médula ósea de ratón *in vivo*.

Después del primer incremento, la frecuencia permanece constante y baja al tiempo en que ocurre la primera duplicación del ADN, lo cual, de acuerdo con el modelo de inducción de ICH; podría ser explicado por una menor probabilidad de producción de ICH, como resultado de la reducción a 50% en el número de cadenas no sustituidas por célula. La frecuencia de ICH-3N sube nuevamente al tiempo en que ocurre la

segunda duplicación del ADN, en presencia de dosis alta de BrdU. Después, se eleva en una proporción similar a la de los ICH-3G; esto sugiere que las lesiones de expresión medianamente tardía no son dependientes de la incorporación de BrdU, lo cual quizá se deba a que la diferencia en la sustitución entre las dos clases de cadenas es menor. Sin embargo, a las 30 h la frecuencia de ICH-3N es substancialmente más alta que la de

ICH-3G. Esta última respuesta no es fácilmente explicable; el hecho de que ambos tipos de ICH fueron registrados en las mismas células, implica que todas las condiciones experimentales fueron iguales y que la única diferencia entre los cromosomas 3N y 3G es la cadena de ADN no sustituida de los cromosomas 3N y la ligeramente sustituida de los 3G.

6. DISCUSION

6.1. Relación entre la Inducción de ICH y la progresión de la división celular

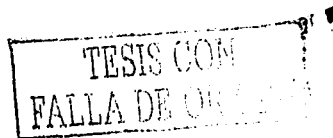
Evidencias previas demostraron que el mecanismo que da lugar a la formación de ICH está relacionado con el proceso de síntesis del ADN (Kato, 1974b; Wolff et al., 1974;) y con la inhibición de las enzimas involucradas en dicho proceso (Ishii y Bender, 1980; Nishi et al., 1982; Dillehay et al., 1989). Además, se sugirió que la horquilla de duplicación es el sitio donde se produce el ICH (Kato, 1980; Cortes et al., 1993).

Los resultados presentes indican que la población celular analizada puede considerarse sincrónica, en virtud de que la máxima inducción de ICH en cada división celular coincide con las frecuencias de ICH mínimas de las otras divisiones y de que los incrementos máximos parecen ocurrir a períodos casi regulares (~ cada 9 h). Esta sincronía se debe a que las metafases que muestran la TDTT, idóneas para ser analizadas, son aquéllas que incorporaron las dos dosis de BrdU a lo largo de las tres divisiones celulares y se encuentran en metafase al momento de la administración de colchicina. La duración estimada del ciclo celular de la médula ósea, de ~9 h está de

acuerdo con un estudio previo en rata (Schneider et al., 1977).

La observación de que la inducción de ICH por ENU disminuya en un ciclo dado y aumente concomitantemente la de la división subsiguiente, es una evidencia directa de que la horquilla de duplicación es el sitio donde ocurre el ICH. Esto implica que a medida que la producción de las lesiones inductoras se incrementa detrás de la horquilla de duplicación, la ocurrencia de ICH en la división en progreso se reduce y se incrementa la inducción en la siguiente. Este análisis permite contestar afirmativamente la primera pregunta de este proyecto de investigación. Es decir que existe una relación estrecha entre la inducción de ICH y el curso de la duplicación del ADN. Además, los resultados que sustentan esta conclusión, son una prueba directa de que la horquilla de duplicación es el sitio donde ocurre el ICH; lo cual se había propuesto anteriormente con base en evidencias indirectas (Kato, 1980).

El hecho de que los ICH se produzcan en el mismo sitio en el que ocurren las lesiones, no está de acuerdo con los modelos que consideran que el ICH es inducido por lesiones múltiples (Painter, 1980; DuFrain, 1981) y apoya a los que suponen que los ICH son el resultado de lesiones discretas (Kato,



1977; Shafer 1977; Dillehay et al., 1989; Holden et al., 1989).

6.2. Persistencia y tenacidad de las lesiones causadas por ENU

El tema de lesiones que producen ICH varias divisiones después del tratamiento con los mutágenos es importante, porque además de su asociación con cáncer (Marginson y Kleihues, 1975) tiene otras implicaciones, como la idea de que las lesiones originales deben ser compatibles con la duplicación del ADN, de tal manera que se debe producir una lesión secundaria (Kaina y Aurich, 1985). No obstante, que esta alternativa explicaría la formación de ICH en una división subsecuente a la de la exposición, no resuelve el problema de explicar la persistencia de una frecuencia constante de ICH durante varias divisiones porque las lesiones que los causan deberían ser diluidas por las divisiones sucesivas.

El empleo del protocolo TDDT permitió determinar que las lesiones causadas al ADN por ENU, indujeron ICH en la división en la que ocurrió la exposición y también en divisiones celulares sucesivas.

No obstante que el protocolo tradicional de tinción diferencial de las cromátidas hermanas en dos tonos, tiene desventajas para obtener inferencias del destino de las lesiones inductoras de ICH, existen numerosos estudios que lo han

empleado para determinar persistencia. Este protocolo requiere que las células hayan incorporado BrdU durante dos ciclos de división celular sucesivos, o cuando menos el primero de ellos, no permite detectar la ocurrencia de ICH en cada una de las dos divisiones. Además, los ICH que ocurren en el mismo locus en divisiones sucesivas pueden ser cancelados por la tinción, no son registrados en el análisis, ya que los cromosomas tienen la apariencia de no tener ICH (Stetka, 1979), por lo tanto, esto crea más incertidumbre en el estudio del destino de las lesiones inductoras de ICH.

En estudios empleando el protocolo tradicional, la interpretación de la persistencia se hizo con base en la comparación de la inducción de ICH causada por la exposición a mutágenos en la primera división, con la obtenida por la exposición en la segunda, e infiriendo a partir de la diferencia, la inducción de ICH en cada ciclo (Ockey, 1981; Conner et al., 1984; Kaina y Aurich, 1985). Sin embargo, los ICH obtenidos por exposición de ADN no sustituido en la primera división celular, representan la inducción durante dos ciclos y existe la posibilidad de cancelación. De otro modo, la exposición en la segunda división representa los ICH provocados durante una división celular pero en ADN unifilarmente sustituido con BrdU y como ya se ha señalado, esta puede afectar la inducción de ICH por los mutágenos (Morris et al., 1992; Morales-Ramírez et al., 1992, 1995). Esto da

pie a considerar la importancia de desarrollar otros protocolos que permitan distinguir la ocurrencia de ICH en divisiones celulares, tales como el método de TDTT (Schvartzman y Goyanes, 1980), el análisis de ICH simétricos *versus* asimétricos en células en tercera división (Conner et al., 1984), de ICH sencillos *versus* gemelos (Ishii y Bender; 1978; Latt y Loveday, 1978; Linnainma y Wolff, 1982) y el del análisis de ICH en tres ciclos de división celular sucesivos en células endoreduplicadas (Wolff y Afzal, 1996)

El protocolo de TDTT, no obstante que permite determinar la inducción de ICH en cada división celular, tiene la desventaja de que puede crear dudas en la interpretación del destino de las lesiones, cuando es empleado en células asincrónicas en división continua, debido a que las lesiones causadas detrás de la horquilla de duplicación darán lugar a ICH hasta la siguiente división celular. Esto es especialmente importante cuando se emplea un sólo tiempo de exposición a los mutágenos para inferir el destino de las lesiones al ADN involucradas en la inducción de ICH en divisiones celulares sucesivas (Morales-Ramírez et al., 1990, 1992, 1995a).

El presente estudio al emplearse varios tiempos de exposición durante los tres ciclos del protocolo TDTT, permitió determinar la inducción de ICH en divisiones celulares sucesivas y relacionarla con el progreso del ciclo celular, ya que una proporción muy alta de las lesiones causadas

por la ENU son de expresión inmediata y prácticamente no da lugar a lesiones persistentes y tenaces. Las lesiones tenaces, habrían producido un incremento inesperado de la frecuencia de ICH-1 por la exposición a ENU en la segunda división, debido a la inducción de ICH en la segunda y tercera divisiones en el mismo locus ("ICH-1"). Este último resultado no está de acuerdo con datos previos obtenidos por la exposición a otros agentes (Morales-Ramírez et al., 1988, 1990, 1992, 1995), los cuales causaron un ligero pero significativo incremento en "ICH-1", aunque en ese caso, también se consideró la posibilidad de que estuvieran involucradas lesiones nuevas generadas en el ciclo subsiguiente al de la exposición. Cabe mencionar que en los trabajos citados, la exposición a los mutágenos se llevó a cabo a 12 h después de la primera administración de BrdU, asumiendo que la primera división ya había terminado y que por lo tanto no es posible inducir ICH-1 verdaderos. Sin embargo, en el presente trabajo se determinó que a las 12 h aún se produce este tipo de ICH, lo cual indica que 12 h no es el tiempo adecuado para evaluar la presencia de "ICH-1", sino más bien las 18 h, ya que es el tiempo en el que se presenta la frecuencia máxima de ICH-2 y la producción de ICH-1 verdaderos ya no es factible.

El hecho de que no se produzcan "ICH-1" sugiere que las lesiones inductoras de ICH causadas por la ENU, no trascienden



la división celular e indica que son reparadas durante la formación de éste y se ha propuesto que los ICH son el reflejo de reparación postreplicativa (Ishii y Bender, 1980; Cleaver et al., 1999; Limoli et al., 2000), mediada por recombinación homóloga (Sonoda et al., 1999; Yamashita et al., 2002; Okada et al., 2002).

La falta de tenacidad también se puede deber a la reparación de las lesiones durante la interfase de la división subsiguiente. Los datos apoyan la idea de que las lesiones no son capaces de causar ICH en varias divisiones, pero contrastan con resultados previos en células de criceto chino y en células de médula ósea, en las que el nivel de ICH permanece alto a través de múltiples divisiones después de la exposición (Latt y Loveday, 1978; Morales-Ramírez et al 1984). Esto podría ser explicado con base en la existencia de subpoblaciones celulares que tienen ciclos celulares con diferente duración o, en el caso de los experimentos *in vivo*, por la emergencia de la división de células progenitoras deficientes, las cuales reemplazan a las células muertas.

Otra explicación para esto podría ser que las lesiones causadas por psoralen mas luz UV y rayos- γ , que fueron los agentes usados en los estudios mencionados, muestran una conducta diferente a la de las lesiones causadas por ENU. De hecho, un estudio en células de la médula ósea de ratón, usando ENU como mutágeno, indicó

que este agente es capaz de incrementar la frecuencia de ICH cuando el tratamiento se dio hasta cuatro divisiones celulares antes del análisis. Estos resultados son más acordes con estas observaciones de que el tratamiento con ENU, de células sin BrdU en el ADN, puede producir ICH hasta cinco divisiones celulares posteriores al ciclo en el que se aplicó dicho tratamiento. Esto implica que otros agentes además de la ENU, también pueden generar incrementos de ICH a tiempos largos, no debidos a lesiones persistentes en el ADN, sino más bien por otro mecanismo (Charles et al., 1986).

De acuerdo con esto último, los datos indican que además de producir lesiones que dan lugar a ICH de manera inmediata; en el mismo ciclo en el que sucede la exposición, la ENU es capaz de inducir una frecuencia constante de ICH-2 y de ICH-3 por la exposición en el primer ciclo e inclusive si esta ocurre dos ciclos antes del mismo. Esto podría indicar que la ENU causa lesiones inductoras de ICH que persisten hasta por cinco ciclos, en ADN no sustituido o la presencia de metabolitos de la ENU durante ese lapso. Esta ultima posibilidad podría ser descartada, ya que se ha determinado que este mutágeno no requiere activación metabólica para reaccionar con el ADN (Beranek, 1990). Además, los resultados de un estudio de farmacocinética de la ENU, permitieron concluir que la distribución, reacción y eliminación de éste mutágeno son

muy rápidos (Morales-Ramírez y Vallarino-Kelly, 1998). En dicho estudio, se observó que el período de latencia y de actividad efectiva de la ENU, inferidos, a partir de la cinética de producción de micronúcleos, fueron muy semejantes a los detectados por exposición a radiación ionizante. Existe evidencia en células de glándula salival (González-Beltrán y Morales-Ramírez, 1999), de la persistencia durante G₁ de lesiones inductoras de ICH causadas por ENU en ADN no sustituido con BrdU y por períodos largos en linfocitos de sangre periférica y de bazo de ratón (Tuker et al., 1986), así como también células de la médula ósea (Charles et al., 1986). Las evidencias previas en células de médula ósea indican que las lesiones además de ser persistentes son capaces de trascender la división celular (Charles et al., 1986). Sin embargo, los datos obtenidos en el presente estudio demuestran la inducción de una frecuencia de ICH casi constante en cada uno de tres ciclos de división sucesivos. El hecho de que el daño ocasionado en las cadenas de ADN no sustituido fue capaz de causar ICH hasta cuatro y cinco ciclos después e incluso a una frecuencia mayor es relevante para el significado biológico del fenómeno.

Se ha demostrado que ciertos agentes que inhiben la metilación del ADN causan un incremento heredable de ICH, el cual permanece constante hasta por más de diez ciclos de división (Perticone et al., 1997;

Albanesi et al., 1999). Aunque no se conoce el mecanismo por el que sucede esto, los autores proponen que los incrementos de ICH son causados por la acumulación de errores en la cadena progenitora durante ciclos sucesivos de duplicación del ADN, debido a la deficiente actividad correctora de la polimerasa porque no puede distinguir entre la cadena progenitora (que debe estar metilada) y la recientemente sintetizada. En el caso de la ENU, la persistencia constante de ICH podría ser causada por la desmetilación indirecta del ADN provocada por la remoción de citosinas metiladas durante la reparación. Si este proceso de inducción de ICH pudiera generalizarse a otros agentes alquilantes, sería relevante debido a que la metilación del ADN se ha relacionado con varios eventos biológicos, tales como la regulación de la expresión génica, la diferenciación celular, la carcinogénesis, el envejecimiento, etc. (Holliday, 1985; Jones y Vogt, 2000).

Debido a que el análisis de la inducción de ICH por agentes desmetilantes se llevó a cabo usando el protocolo de dos tonos de diferenciación de las cromátidas hermanas, sería importante determinar la inducción real de ICH durante cada ciclo y la manera en que la incorporación gradual de BrdU a través de estos, afecta esta inducción, usando el protocolo empleado en el presente trabajo.

Por otro lado, el estudio del destino de las lesiones inductoras de ICH causadas por

otros agentes alquilantes, tales como ciclofosfamida, metil y etil metanosulfonatos y dimetilnitrosamina (Morales-Ramírez et al., 1990, 1992, 1995a), mediante el empleo del protocolo TDDT, indicó que estos agentes producen una alta proporción de lesiones persistentes, ya que causaron incrementos altos de ICH en un ciclo de división posterior al ciclo en el cual se aplicó el tratamiento. Es probable que con los cambios en los tiempos de los tratamientos con los agentes, del protocolo TDTT; que se han propuesto en esta investigación, pudiera determinarse si los incrementos de ICH causados por los agentes mencionados se mantienen a través de más ciclos de división celular.

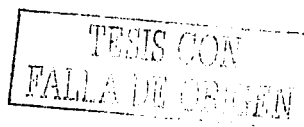
El análisis de estos resultados en términos de la relación entre inducción de ICH y reparación de lesiones o con tolerancia de las mismas y que contesta la pregunta 2 de esta investigación indica que:

Las lesiones causadas por ENU, involucradas en la inducción de ICH, se expresan principalmente en la división en la que ocurre la exposición, lo cual indica que estas se reparan antes de la siguiente división. La ENU no produce lesiones tenaces, que dan lugar a ICH en el mismo locus en divisiones celulares sucesivas, lo cual sugiere que son reparadas como consecuencia de la formación del ICH o durante la división subsiguiente. El hecho de que la ENU causara una inducción de ICH que se expresó en ciclos de división celular

sucesivos en forma de incrementos constantes, no puede ser explicado como debido a lesiones al ADN sino a través de un mecanismo indirecto tal como la desmetilación del ADN causada por la reparación de lesiones. Al respecto se ha reportado evidencia de que diversos tipos de lesiones al ADN tales como alquilación de bases, pueden causar hipometilación generalizada de residuos de citosina, en sitios CpG. En particular se ha demostrado que la exposición a etilnitrosourea causa este efecto (Wachsman, 1997).

6.3. Efecto de la BrdU sobre la inducción de ICH causada por ENU

En el presente trabajo, el empleo del protocolo de tinción diferencial de las cromátidas hermanas en tres tonos, permitió estudiar con más profundidad, el efecto *in vivo* que la BrdU tiene sobre el destino de las lesiones al ADN, causadas por ENU, e involucradas en la producción de ICH. En trabajos anteriores empleando otros mutágenos (Morales-Ramírez et al., 1990, 1992, 1995a), se determinó que la incorporación de BrdU en el ADN afecta de distinta manera la capacidad de las lesiones para producir ICH. La diferencia entre estos estudios y el presente, es que en los primeros, la exposición al mutágeno se llevó a cabo a un tiempo único (30 min. antes de la BrdU alta) y en el presente, los diez tiempos



de exposición a ENU fueron a lo largo de cinco ciclos de división y permitieron provocar lesiones en moléculas de ADN con diversos niveles de incorporación de BrdU, incluso también, en ADN sin sustitución. Además de que la duplicación de la molécula con daño, ocurrió en presencia de diferentes concentraciones del análogo.

Nuestros resultados indican, como ya se había demostrado en trabajos previos (Morales-Ramírez et al., 1987), que la incorporación de BrdU al ADN es capaz de inducir *per se* ICH (O'Neill et al., 1983; O'Neill, 1984) ya que en los grupos testigo, se observó un incremento en la frecuencia de ICH en cada ciclo, proporcional con el nivel de incorporación, lo cual está de acuerdo con los resultados de otros autores (Schvartzman y Goyanes, 1980; Schvartzman et al., 1985; Escalza et al., 1989).

Las frecuencias máximas de ICH causadas por la exposición a ENU en cada ciclo (9, 18 y 30 h), son una prueba de que la BrdU ejerce un papel importante en la inducción por lesiones de expresión inmediata. Dicho papel consiste en la sensibilización de la molécula de ADN e indica que a un mayor nivel de incorporación en el ADN corresponde un grado más elevado de sensibilización para la producción de ICH. Evidencias del papel sensibilizador de la BrdU fueron obtenidas después de la exposición a otros mutágenos como MMC (Morales-Ramírez et al., 1990), camptotecina;

inhibidor de la topoisomerasa I (Zhao et al., 1992); inhibidores de la PARP (Morgan y Wolff, 1984b), agentes alquilantes (González-Beltrán y Morales-Ramírez, 1999, 2003; Morales-Ramírez et al., 2001) y radiación ionizante (Renault et al., 1982; Bruckmann et al., 1999a) la cual por si sola induce ICH, pero la incorporación de BrdU causa un efecto sensibilizador alto (Morales-Ramírez et al., 1983, 1984, 1988, 1994, 1995b).

En contraste con lo anterior, otros resultados indican que la incorporación de BrdU ejerce un efecto inhibitor en la capacidad de las lesiones para inducir ICH; causadas por ciertos agentes como MMS (Ockey, 1981; Morales-Ramírez et al., 1992) y MNNG (Popescu et al., 1980). Otras evidencias, indican que la inducción de ICH por mutágenos no es afectada por la incorporación de BrdU (Schwartz et al., 1982; Morgan y Wolff, 1984c; Tohda y Oikawa, 1988; Morris et al., 1992)

En cuanto al efecto de la BrdU sobre las lesiones que provocan ICH causadas por ENU, en células de glándula salival de ratón, se demostró que la incorporación de BrdU en el ADN tiene un efecto sensibilizador para la inducción de ICH por dicho mutágeno; sin embargo, estas lesiones fueron más eficientemente reparadas durante G1 (González-Beltrán y Morales-Ramírez et al., 1999).

El mecanismo de sensibilización de la incorporación de BrdU no se ha establecido,



pero es probable que esté relacionado con la forma en que ocurre la interacción de los agentes con el ADN y la manera en que esta interacción pueda ser modificada por la presencia de BrdU en dicha molécula. En el caso de la ENU, puede ser porque la incorporación de BrdU genera sitios nucleofílicos adicionales representados por el átomo de bromo.

Aunque el análisis de estos resultados sugiere que hay una relación directa entre la inducción de ICH por ENU y la incorporación de BrdU (tabla 3; figura 8), fue posible inferir que la ENU es capaz de inducir ICH en las cadenas de ADN no sustituidas con BrdU. Esto contradice la idea de que la BrdU es responsable de la inducción de ICH causada por los mutágenos.

El análisis de las frecuencias de ICH en cromosomas 3N y 3G en los animales expuestos a diferentes tiempos, indica que:

i). Los incrementos inesperados inducidos en los cromosomas 3G por la exposición a ENU en el ciclo previo a la administración de BrdU, podrían ser debidos a que algunas lesiones originales producidas en las hebras con timina causen propensión en las cadenas recientemente sintetizadas en presencia de BrdU baja. Dicha propensión podría explicarse en base a alteraciones en el patrón de metilación y una concomitante acumulación de errores de apareamiento por la incapacidad de la polimerasa para

distinguir entre las hebras progenitora metilada y la hija no metilada.

ii) Los incrementos en los cromosomas 3G, por la exposición durante el primer ciclo podrían haber sido inducidos por lesiones en cadenas con sustitución de BrdU baja, porque a los tiempos correspondientes a ese ciclo, ya ocurrió el suministro de BrdU. Sin embargo, el modelo de inducción de ICH propuesto en este trabajo (Figura 6) indica que es hasta las 9 h después de este suministro cuando la síntesis del ADN alcanza su valor máximo y las cadenas hijas habrían incorporado la BrdU. A las 3 y 6 h se esperaría que esta incorporación fuera parcial y proporcional ya que la síntesis del ADN está en curso y solamente algunas regiones de la molécula estarían duplicadas y de acuerdo con datos previos (Latt y Loveday, 1978), la frecuencia de ICH sería proporcional a la cantidad de ADN sintetizado. Otra posibilidad es que estos incrementos sean debidos a la presencia de lesiones tenaces; que causen ICH en el mismo locus en la primera y en la segunda divisiones. Sin embargo, en este caso, se esperarían incrementos similares en los cromosomas 3N y además una proporcionalidad de los mismos en función del progreso de la duplicación del ADN, lo cual no ocurre. Por otro lado la propensión a la inducción de ICH en las cadenas 3G recientemente sintetizadas, podría explicarse a partir de la desmetilación causada por la ENU en las cadenas con timina, condición

que se heredaría epigenéticamente a la cadena 3G. Esto se podría sustentar en el hecho de que se ha demostrado que la ENU es capaz de inducir desmetilación (Wachsman, 1997).

iii) la observación de incrementos casi iguales en ambos tipos de cromosomas en el período entre 12 y 24 h, permitiría sugerir que la BrdU incorporada en el ADN no sensibiliza a la molécula para la inducción de ICH por ENU es decir, el nivel de sustitución ligeramente más alto de BrdU en los cromosomas 3G, con respecto al de los cromosomas 3N tiene menor importancia para tal inducción

iv). El mayor incremento de ICH-3 cuando la exposición se da a las 30 h, resulta lógico, ya que prácticamente todas las células se encuentran en la tercera división; pero lo que no es fácil de explicar es que en los cromosomas 3N se observó un incremento mayor que en los 3G porque indicaría que la presencia de un nivel mayor de BrdU en los cromosomas 3G inhibe la inducción de ICH causada por ENU; lo cual se contradice con el resultado del análisis de las frecuencias máximas de ICH en cada ciclo, que indicó la existencia de una relación directa entre el grado de incorporación de BrdU durante los tres ciclos de división y la inducción de ICH (tabla 3; figura 8).

Podría considerarse también que la susceptibilidad a la inducción de ICH no solamente tiene que ver con la condición de

sustitución de las cadenas de ADN en las que se producen las lesiones, sino también con la sustitución de las cadenas complementarias y además, con el nivel de BrdU que se incorpora en las cadenas recientemente sintetizadas. Cuando se da el tratamiento con ENU a las 30 h, ambos tipos de cromosomas tienen una cadena sustituida con BrdU alta y la complementaria en los 3N tiene timina; en tanto que en los 3G, sustitución baja de BrdU. Estos cromosomas se duplican en presencia de BrdU alta, la cual se incorpora en las cadenas hijas a medida que están se sintetizan; al mismo tiempo, que se están produciendo los ICH.

La mayor inducción en los cromosomas 3-N podría deberse a: (i) que las lesiones en la cadena con timina sean más propensas a la inducción de ICH cuando esta se duplica en presencia de BrdU alta o; (ii) que las lesiones en cadenas sustituidas con BrdU alta sean más propensas a la inducción de ICH, cuando la cadena complementaria tiene timina y la duplicación del ADN ocurre en presencia de BrdU alta.

No resulta fácil elegir una de estas alternativas. La primera puede ser posible si se toma en cuenta que las lesiones involucradas en la inducción de ICH-3N son de expresión inmediata, al igual que lo son las lesiones que causan los incrementos máximos de ICH-1 y de ICH-2 y aunque en los tres casos las lesiones suceden en una molécula de ADN que tiene al menos una

cadena con timina, el incremento tanto de ICH-3N como de ICH-2 es notablemente mayor que de ICH-1. Esto último podría explicarse con base al hecho de que los ICH-1 se producen cuando el ADN con lesiones se duplica en presencia de BrdU alta y los ICH-2 e ICH-3 en BrdU baja. Esto es sugestivo de que las cadenas de ADN con timina son más susceptibles a la inducción de ICH causada por ENU cuando la duplicación del ADN sucede en presencia de BrdU alta. No obstante que las lesiones que producen los ICH-2 pueden ocurrir también en cadenas con sustitución baja de BrdU, se puede especular que estas todavía contienen una proporción apreciable de nucleótidos con timina.

La diferencia entre las frecuencias de ICH en cromosomas 3N y 3G con respecto a los diferentes tiempos de exposición, es que las observadas por la exposición en el primero y segundo ciclo, así como las de los tiempos previos, son producto de lesiones alta o moderadamente persistentes, y las del tercer ciclo son debidas a lesiones de expresión inmediata y es probable que el comportamiento de estos dos tipos de lesiones en relación con la BrdU sea diferente. A este respecto, quizá sea útil la observación de que las lesiones de expresión inmediata que generan ICH en el segundo ciclo (18 h, figura 5), ocurren en cromosomas cuyo ADN tiene una cadena con timina y se duplican en presencia de BrdU alta, de igual

manera como sucede con las lesiones que dan lugar a la frecuencia de ICH en el tercer ciclo en los cromosomas 3N.

El incremento de ICH en los cromosomas 3G, importante aunque menor que el de 3N a las 30 h, indica que las lesiones de expresión inmediata también ocurren en ADN con sustitución alta de BrdU, pero es probable que la presencia de una cadena con timina represente una mayor susceptibilidad a la producción de ICH, o menor reparabilidad de dichas lesiones.

La evaluación del efecto de la BrdU con base en la comparación de las frecuencias de ICH-3 en cromosomas con dos diferentes grados de sustitución, constituye un sistema único en su género, ya que en la misma célula existen los dos tipos de cromosomas; con lo cual, se puede evitar que otras variables fuera de control pudieran afectar la inducción de ICH. Además, debido a que en esta investigación, la exposición al mutágeno se llevó a cabo en distintos tiempos, los cuales se pudieron relacionar con cada uno de los tres ciclos, con base al modelo de inducción de ICH propuesto fue posible inferir la condición de sustitución de BrdU en el ADN al momento de dicha exposición. Se puede comparar la respuesta de poblaciones celulares que fueron expuestas al efecto de un mutágeno en diferentes condiciones de sustitución de BrdU en su ADN.

Por lo anterior, respecto a la tercera pregunta, que se refiere al papel de la BrdU sobre la inducción de ICH producida por la exposición a ENU, estos resultados indican que la ENU provoca ICH en ADN no sustituido con BrdU y también en ADN sustituido, pero en este último caso, el análogo ejerce un papel sensibilizador. Además, la ENU produce un incremento significativo, aunque pequeño en cromosomas sustituidos cuando la exposición se realizó antes de la incorporación de BrdU.

En síntesis, los resultados de este trabajo indican que la inducción de ICH por el tratamiento con ENU ocurre a través de dos mecanismos: uno directo, mediante lesiones al ADN; las cuales son reparadas como resultado del ICH o bien, en la interfase de la siguiente división y; otro indirecto, que causa incrementos constantes de ICH en cada ciclo

y perdura varios ciclos después de la exposición, como sucede por alteraciones en el patrón de metilación del ADN. La presencia de BrdU en el ADN ejerce un papel modulador importante en ambos tipos de mecanismos. Mientras que la cantidad de ICH por lesiones aumenta en proporción directa con el nivel de incorporación de BrdU, la de ICH producidos a través del mecanismo indirecto ocurre en ADN nativo, es decir en ausencia de BrdU. Esto representa una contribución al conocimiento del mecanismo de formación del ICH y también resulta relevante en relación al significado biológico del evento de ICH. Por lo tanto, se puede afirmar que el seguimiento del destino de las lesiones inductoras de ICH fue una estrategia experimental adecuada que aportó una aproximación al conocimiento del mecanismo de formación del ICH.

7. CONCLUSIONES

El análisis de las frecuencias de ICH inducidas por la exposición a ENU en tres ciclos de división celular sucesivos permitió responder a las tres preguntas planteadas, a través de sus hipótesis correspondientes:

Pregunta 1.

¿Cuál es la relación entre la inducción de ICH y el curso de la duplicación del ADN en función del tiempo de exposición al mutágeno?

Existe una relación estrecha entre la inducción de ICH y el curso de la duplicación.

Pregunta 2.

¿Es el ICH la expresión de un proceso que permite la tolerancia o reparación de lesiones en el ADN?

Los ICH representan un proceso que permite la reparación de lesiones. Adicionalmente, se obtuvo evidencia de un proceso de inducción continua de ICH, atribuible a un cambio epigenético p. ejem. Desmetilación.

Pregunta 3.

¿Cuál es el papel que juega la BrdU sobre la inducción y persistencia de las lesiones que inducen ICH?

La BrdU si afecta la inducción de ICH y también la persistencia de las lesiones que lo producen.

Los resultados de este trabajo de investigación, permiten obtener las siguientes conclusiones:

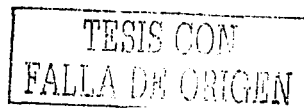
- 1) Se determinó que la población celular analizada es sincrónica.
- 2) La etapa S ocupa la mayor parte del tiempo del ciclo celular, el cual tiene una duración de 9 h aproximadamente.
- 3) La inducción de ICH es dependiente del progreso de la duplicación del ADN, lo que constituye una evidencia directa de que la horquilla de duplicación es el sitio donde se llevan a cabo los ICH.
- 4) La ENU induce ICH de manera inmediata; en el ciclo en el que se da la exposición. Esto denota que la ENU causa ICH a través de un mecanismo directo; por lesiones en el ADN.

- 5) La ENU no produce lesiones tenaces, lo cual sugiere que las lesiones inductoras de ICH se reparan durante la formación de ICH o en la interfase de la siguiente división
- 6) Este mutágeno también produce una inducción tardía y constante de ICH, que trasciende hasta cinco ciclos de división celular después de la exposición. Lo cual podría ser debido a la desmetilación de la citosina causada como resultado de la reparación de lesiones en el ADN e indica que en la formación de ICH también interviene un mecanismo indirecto.
- 7) La inducción Inmediata de ICH se incrementa de manera proporcional con el grado de incorporación de BrdU al ADN.
- 8) La inducción tardía ocurre preferentemente en ADN nativo.
- 9) Las lesiones en cadenas con timina causan propensión a la inducción de ICH en cadenas sintetizadas en ciclos de división posteriores; posiblemente a través de desmetilación del ADN.
- 10) La presencia de BrdU en el ADN no afecta la inducción de ICH por ENU, cuando la molécula con sustitución baja de BrdU se duplica en presencia de BrdU alta.
- 11) La inducción inmediata de ICH se incrementa cuando las lesiones se producen en ADN, que tiene timina en una cadena y se duplica en presencia de BrdU alta.
- 12) El nivel de sustitución de BrdU en el ADN, así como la BrdU incorporada durante la duplicación, son importantes para la expresión de las lesiones como ICH.

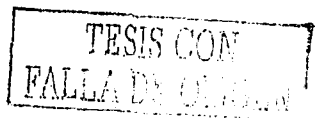
Adicionalmente: Se mejoró protocolo de TDTT para estudiar el destino de las lesiones inducidas por otros mutágenos, ya que los resultados permiten establecer tiempos más adecuados para el tratamiento con BrdU y con los mutágenos.

8. REFERENCIAS

- Afzal V, Feeney L, Thomas GH, Volpe JP, Cleaver JE.** Sister chromatid exchanges in cells defective in mismatch, postreplication and excision repair. *Mutagenesis* 1995; 10: 457-462.
- Albanesi T, Polani S, Cozzi R, Perticone P.** DNA strand methylation and sister chromatid exchanges in cells in vitro. *Mutat Res* 1999; 429: 239-248.
- Aquillina G, Flumicino S, Zijno A, Martinelli S, Ovekamp WJ, Zdzienicka MZ, Oshimura M, Wild CP, Bignami M.** Reversal of methylation tolerance by transfer of human chromosome 2. *Mutat Res* 1997; 385: 115-126.
- Beranek DT.** Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* 1990; 231: 11-30
- Bianchi NO, Larramendy M, Bianchi MS.** The asymmetric methylation of CG palindromic dinucleotides increases sister-chromatid exchanges. *Mutat Res* 1988; 197: 151-156.
- Brewen JG, Peacock WJ.** The effect of tritiated thymidine on sister-chromatid exchange in a ring chromosome. *Mutat Res* 1969; 7: 433-440.
- Bruckmann E, Wojcik A, Obe G.** X-irradiation of G1 CHO cells induces SCE which are both true and false in BrdU-substituted cells but only false in biotin-dUTP-substituted cells. *Chromosome Res* 1999a; 7: 277-288.
- Bruckmann E, Wojcik A, Obe G.** Sister chromatid differentiation with biotin-dUTP. *Chromosome Res* 1999b; 7: 185-189.
- Capucci MS, Hoffmann ME, Zdzienicka MZ, Natarajan AT.** Streptozotocin-induced chromosomal aberrations, SCEs and mutations in CHO-9 parental cells and EM-C11 mutant cell line. *Mutat Res* 1995; 326: 277-234.
- Carere A, Andreoli C, Galati R, Leopardi P, Marcon F, Rosati MV, Rossi S, Tomel F, Verdina A, Zijno A, Crebelli R.** Biomonitoring of exposure to urban air pollutants: analysis of sister chromatid exchanges and DNA lesions in peripheral lymphocytes of traffic policemen. *Mutat Res* 2002; 518: 215-224.
- Caria H, Quintas A, Chaveca T, Rueff J.** The role of poly(ADP-ribose)polymerase in the induction of sister chromatid exchanges and micronuclei by mitomycin C in Down's syndrome cells as compared to euploid cells. *Mutat Res* 1997; 377: 269-277.
- Carrano AV, Thompson LH, Stetka DG, Minkler JL, Mazrimas JA, Fong S.** DNA crosslinking, sister-chromatid exchange and specific-locus mutations. *Mutat Res* 1979; 63: 175-188.
- Cassel DM, Latt SA.** Relationship between DNA adduct formation and sister chromatid exchange induction by [³H]-methoxypsoralen in Chinese hamster ovary cells. *Exp Cell Res* 1980; 128: 15-22.
- Chao, CC, Rosenstein RB, Rosenstein BS.** Induction of sister chromatid exchanges in ICR 2A frog cells exposed to 265-313 nm monochromatic ultraviolet wavelengths and photoreactivating light. *Mutat Res* 1985; 149: 443-450.
- Charles JL, Jacobson-Kram D, Condie LW, Borzelleca JF, Carchman RA.** The kinetics of *in vivo* sister chromatid exchange induction in mouse bone marrow cells by ethylnitrosourea and methyl nitrosourea. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986; 84: 56-65
- Cleaver JE.** Correlation between sister chromatid exchange frequencies and replicon sizes. A model for the mechanism of SCE production. *Exp Cell Res* 1981; 136: 27-39.;
- Cleaver JE, Afzal V, Feeney L, McDowell M, Sadinski W, Volpe JPG, Bush DB, Coleman DM, Ziffer DW, Yu Y, Nagasawa H, Little JB.** Increased ultraviolet sensitivity and chromosomal instability related to p53



- function in the xeroderma pigmentosum variant. *Cancer Res* 1999; 59: 1102-1108.
- Conner MK, Cheng M, Biegel JA.** A path probability model for sister-chromatid exchanges induced by alkylating agents. *Mutat Res* 1984; 126: 35-46
- Conner MK.** Induction of sister chromatid exchange by ethyl carbamate and vinyl carbamate. *IARC Sci Publ* 1986; (70): 313-320
- Cortés F, Piñero, Ortiz T.** Importance of replication fork progression for the induction of chromosome damage and SCE by inhibitors of DNA topoisomerases. 1993; 303: 71-76.
- Darroudi F, Natarajan AT.** Cytological characterization of Chinese hamster ovary X-ray-sensitive mutant cells, xrs 5 and xrs 6. II. Induction of sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations by X-rays and UV-irradiation and their modulation by inhibitors of poly(ADP-ribose)synthetase and alpha-polymerase. *Mutat Res* 1987; 177: 149-160.
- Daza P, Escalza P, Mateos S, Cortés F.** Mitomycin C, 4-nitroquinoline-1-oxide and ethyl methanesulfonate induce Long-lived lesions in DNA which result in SCE during successive cell cycles in human lymphocytes. *Mutat Res* 1992; 270: 177-183.
- Degrassi F, De Salvia R, Berghella L.** The production of chromosomal alterations by beta-lapachone, an activator of topoisomerase I. *Mutat Res* 1993; 288: 263-267
- Di Ianni M, Terenzi A, Di Florio S, Venditti G, Benedetti R, Santucci A, Bartoli A, Fettucciari K, Marcono P, Rossi R, Martelli MF, Tabillo A.** In vivo demethylation of a MoMuLV retriviral vector expressing the Herpes simplex thymidine kinase suicide gene by 5' azacytidine. *Stem Cells* 2000; 18: 415-421.
- Dillehay LE, Jacobson-Kram D, Williams JR.** DNA topoisomerases and models of sister-chromatid exchange. *Mutat Res* 1989; 215: 15-23.
- Domínguez I, Pastor N, Mateos S, Cortés F.** Testing the SCE mechanism with no-poisoning topoisomerase II inhibitors. *Mutat Res* 2001; 497: 71-79.
- DuFrain RJ.** A conformation based hypothesis for the mechanism of sister chromatid exchange formation. *Mamm Chrom Newsletter* 1981; 22: 9.
- Engelward BP, Dreslin A Christensen J, Huszar D, Kurahara C, Samson L.** Repair-deficient 3-methyladenine DNA glycosylase homozygous mutant mouse cells have increased sensitivity to alkylation-induced chromosome damage and cell killing. *EMBO J* 1996; 15: 945-953.
- Engelward BP, Allan JM, Dreslin AJ, Kelly JD, Wu MM, Gold B, Samson LD.** A chemical and genetic approach together define the biological consequences of 3-methyladenine lesions in the mammalian genome. *J Biol Chem* 1998; 273: 5412-5418.
- Enomoto T.** Functions of RecQ family helicases: possible involvement of Bloom's and Werner's syndrome gene products in guarding genome integrity during DNA replication. *J Biochem (Tokyo)* 2001; 129: 501-507.
- Escalza P, Cortés F, Schwartzman JB.** Induction of sister-chromatid exchanges (SCEs) by 5-fluorodeoxyuridine. The role of 5-bromodeoxyuridine incorporated into parental DNA. *Mutat Res* 1985; 151; 77-82.
- Escalza P, Piñero J, Cortés F.** A standardized method for the three-way differential staining of plant chromosomes and the scoring of SCE per cell cycle. *Mutat Res* 1989; 216: 203-209.
- Escalza P, Daza P, Piñero J, Cortés F.** Different effectiveness of 4-nitroquinoline-1-oxide, mitomycin C and ethyl methanesulfonate to induce lesions in DNA leading to sister chromatid exchange throughout successive cell cycles in Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis* 1992; 7: 137-140.
- Fantini C, Vernole P, Tedeswchii B, Caporossi D.** Sister chromatid exchanges and DNA topoisomerase II inhibitors: effect of low concentrations of etoposide (VP-16) in ataxia telangiectasia lymphoblastoid cell lines. *Mutat Res* 1998; 412: 1-7.



Fasullo M, Giallanza P, Dong Z, Cera C, Bennett T. *Saccharomyces cerevisiae* rad51 mutants are defective in DNA damage-associated sister chromatid

exchanges but exhibit increased rates of homology-directed translocations. *Genetics* 2001; 158: 959-972.

French CA, Masson JY, Griffin CS, O'Regan P, West SC, Thacker J. Role of mammalian RAD51L2 (RAD51C) in recombination and genetic stability *J Biol Chem* 2002; 277: 19322-19330.

Gale KC, Osheroff N. Intrinsic intermolecular DNA ligation activity of eukaryotic topoisomerase II. Potential roles in recombination. *J Biol Chem* 1992; 267: 12090-12097.

Gaymes TJ, North PS, Brady N, Hickson ID, Mufti GJ, Rassool FV. Increased error-prone non homologous DNA end-joining—a proposed mechanism of chromosomal instability in Bloom's syndrome. *Oncogene* 2002; 21: 2525-2533.

Gebel TW, Muller MM, Westphal GA, Hallier E. Genotoxicity of N-nitrosodicyclohexylamine in V79 cells in the sister chromatid exchange test and the single cell gel assay. *Arch Toxicol* 2001; 75: 604-608.

Godthelp BC, Wegant WW, van Duijn-Goedhart A, Scharer OD, van Buul PP, Kanaar R, Zdzienicka MZ. Mammalian Rad51C contributes to DNA cross-link resistance, sister chromatid cohesion and genomic stability. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 2172-2182

González-Beltrán F, Morales-Ramírez P. In vivo repair during G1 of DNA lesions eliciting sister chromatid exchanges induced by methyl nitrosourea or ethyl nitrosourea in BrdU substituted or unsubstituted DNA in murine salivary gland cells. *Mutat Res* 1999; 425: 31-38

González-Beltrán F, Morales-Ramírez P. Repairability during G1 of lesions eliciting sister chromatid exchanges induced by methyl methanesulfonate or ethyl methanesulphonate in bromodeoxyuridine-substituted and unsubstituted DNA strands. *Mutagenesis* 2003; 18: 13-17.

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

Hartsuiker E, Vaessen E, Carr AM, Kohli J. Fission yeast Rad50 stimulates sister chromatid recombination and links cohesion with repair. *EMBO J* 2001; 20: 6660-6671.

He SM, Lambert B. Induction and persistence of SCE-inducing damage in human lymphocytes exposed to vinyl acetate and acetaldehyde in vitro. *Mutat Res* 1985; 158: 201-208.

Herens C, Jacquemart M, Kouloscher L, Barbason H. Nuclear lesions during hepatocarcinogenesis. I. Measuring the sister-chromatid exchanges during initiation, promotion and progression of rat hepatocarcinogenesis induced with diethylnitrosamine. *Mutat Res* 1995; 329: 153-159.

Holden HE, Barrett JF, Huntington CM, Muehlbauer PA, Wahrenburg MG. Genetic profile of a nalidixic acid analog: A model for the mechanism of sister chromatid exchange induction. *Environ Mol Mutagen* 1989; 13: 238-252.

Holliday R. The significance of DNA methylation in cellular aging. *Basic Life Sci* 1985; 13: 238-252.

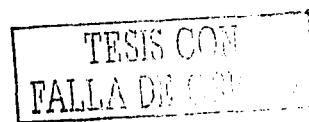
Hsieh C-L. Dynamics of DNA methylation pattern. *Curr Op Genet Dev* 2000; 10: 224-228

Ikushima T. SCE and DNA methylation. *Basic Life Sci* 1984; 29 Pt A: 161-172.

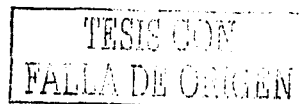
Ikushima T. Bimodal induction of sister-chromatid exchanges by luminol, an inhibitor of poly(ADP-ribose) synthetase, during the S-phase of the cell cycle. *Chromosoma* 1990; 99: 360-364.

Ishida R, Utsumi KR, Takahashi T. Sister-chromatid exchanges, cell survival and mutation in HeLa S3 cells with different sensitivity to alkylating agents; evidence that SCE induction and cell survival or mutation induction are dissociable. *Mutat Res* 1989; 215: 69-77.

- Ishii Y.** Nature of the mitomycin-C induced lesion causing sister-chromatid exchange. *Mutat Res* 1981; 91: 51-55.
- Ishii Y, Bender MA.** Factors influencing the frequency of mitomycin C-induced sister-chromatid exchanges in 5-bromodeoxyuridine substituted human lymphocytes in culture. *Mutat Res* 1978; 51: 411-418.
- Ishii Y, Bender MA.** Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light induced sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells. *Mutat Res* 1980; 79: 19-32.
- Ivett JL, Tice RR.** Average generation time: A new method for analyzing cellular proliferation kinetics based on bromodeoxyuridine-dependent chromosome differential staining patterns. *Environ Mutagen* 1982; 4: 358.
- Johnson RD, Jasin M.** Double-strand-break-induced homologous recombination mammalian cells. *Biochem Soc Trans* 2001; 29: 196-201.
- Jones PA, Vogt PK.** DNA methylation and Cancer. Springer Verlag, New York, NY, p. 170.
- Jorgensen TJ, Leonard JC, Thraves PJ, Dritschilo A.** Baseline sister chromatid exchange in human cell lines with different levels of poly(ADP-ribose) polymerase. *Radiat Res* 1991; 127: 107-110.
- Kaina B, Aurich O.** Dependency of the yield of sister-chromatid exchanges induced by alkylating agents on fixation time. possible involvement of secondary lesions in sister-chromatid exchange induction. *Mutat Res* 1985; 149: 451-461
- Kaina B, Fritz G, Mitra S, Coquerelle T.** Transfection and expression of human O6-methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents. *Carcinogenesis* 1991; 12: 1857-1867.
- Kaina B, Fritz G, Coquerelle T.** Contribution of O6-alkylguanine and N-alkylpurines to the formation of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations and gene mutations: New insights gained from studies of genetically engineered mammalian cell lines. *Environ Mol Mutagen* 1993; 22: 283-292
- Kaina B, Zlouta A, Ochs K, Coquerelle T.** Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. *Mutat Res* 1997; 381: 227-41.
- Kato H.** Spontaneous sister-chromatid exchanges detected by a revealed BudR-labeling method. *Nature (London)* 1974a; 251: 70-72
- Kato H.** Possible role of DNA synthesis in formation of sister chromatid exchanges. *Nature (London)* 1974b; 252: 739-741.
- Kato H.** Mechanisms of sister chromatid exchanges and their relation to the production of chromosomal aberrations. *Chromosoma* 1977; 59: 179-191.
- Kato H.** Evidence that the replication points is the site of sister chromatid exchange. *Cancer Genet Cytogenet* 1980; 2: 69-77.,
- Kishi K.** Effects of repair inhibition in the G1 phase of clastogen-treated human lymphocytes on the frequencies of chromosome-type and chromatid-type aberrations and sister-chromatid exchanges. *Mutat Res* 1987; 176: 105-116.
- Kress C, Thomassin H, Grange T.** Local DNA demethylation in vertebrates: how could it be performed and targeted?. *FEBS* 2001; 494: 135-140.
- Kondrashova TV, Poriadkova NA, Arefeva OV, Luchnik NV.** Effect of free 5-bromodeoxyuridine on induction of SCE in human lymphocytes gamma-irradiated at the presynthetic stage of primary and secondary mitotic cycles *Genetika* 1990; 26:1671-1674.
- Kuzminov A.** DNA replication meets genetic exchange: chromosomal damage and its repair by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 8461-8468.
- Lambert S, Lopez BS.** Role of RAD51 in sister-chromatid exchanges in mammalian cells. *Oncogene* 2001; 20: 6627-6631.



- Latt SA.** Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci* 1973; 70: 3395-3399.
- Latt SA, Loveday KS.** Characterization of sister chromatid exchange induction by 8-methoxypsoralen plus near UV light. *Cytogenetic Cell Genet* 1978; 21: 184-200.
- Lavia P, Ferraro M, Micheli A, Olivieri G.** Effect of 5-azacytidine (5-azaC) on the induction of chromatid aberrations (CA) and sister-chromatid exchanges (SCE). *Mutat Res* 1985; 149: 463-467.
- Lavin MF.** A model for postreplication repair of UV damage in mammalian cells, in: P.C. Hanawalt, E.C. Friedberg and C.F. Fox (Eds), *Repair Mechanisms*, Academic Press, New York 1978, pp. 509-512.
- Limoli CL, Giedzinski E, Morgan WF, Cleaver JE.** Inaugural article: polymerase^β deficiency in the xeroderma pigmentosum variant uncovers an overlap between the S phase checkpoint and double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7939-7946.
- Linnainmaa K, Wolff S.** Sister chromatid exchange induced by short-lived monoadducts produced by the bifunctional agents mitomycin C and 8-methoxypsoralen. *Environ Mutagen* 1982; 4: 239-247.
- Margison GP, Kleihues P.** Chemical carcinogenesis in the nervous system: preferential accumulation of O6 methylguanine in rat brain deoxyribonucleic acid during repetitive administration of N-methyl-N-nitrosourea. *Biochem J* 1975; 148: 521-525.
- Mazrimas JA, Stetka DG.** Direct evidence for the role of incorporated BUdR in the induction of sister chromatid exchanges. *Exp Cell Res* 1978; 117: 23-30.
- McClintock B.** The production of the homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes. *Genetics* 1938; 23: 315-346.
- Miyagawa K, Tsuruga T, Kinomura A, Usui K, Katsura M, Tashiro S, Mishima H, Tanaka K.** A role for RAD54B in homologous recombination in human cells. *EMBO J* 2002; 21: 175-180.
- Moore PD, Holliday R.** Evidence for the formation of hybrid DNA during mitotic recombination in Chinese hamster cells. *Cell* 1976; 8: 573-579.
- Morales-Ramírez P.** Analysis *in vivo* of sister-chromatid exchange in mouse bone marrow and salivary gland cells. *Mutat Res* 1980; 74: 61-69.
- Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Rodríguez-Reyes R.** Effect of BrdUrd and low doses of gamma radiation on sister chromatid exchanges, chromosome breaks, and mitotic delay in mouse bone marrow cells *in vivo*. *Environ Mutagen* 1983; 5: 589-602.
- Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Rodríguez-Reyes R.** *In vivo* persistence of sister chromatid exchanges (SCE) induced by gamma rays in mouse bone marrow cells. *Environ Mutagen* 1984; 6: 529-537.
- Morales-Ramírez P, Rodríguez-Reyes R, Vallarino-Kelly T.** Analysis of spontaneous sister-chromatid exchanges *in vivo* by three-way differentiation. *Mutat Res* 1987; 178: 49-56.
- Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Rodríguez-Reyes R.** Occurrence *in vivo* of sister chromatid exchanges at the same locus in successive cell divisions caused by nonrepairable lesions induced by gamma rays. *Environ Mol Mutagen* 1988; 11: 183-193.
- Morales-Ramírez P, Rodríguez-Reyes R, Vallarino-Kelly T.** Fate of DNA lesions that elicit sister-chromatid exchanges. *Mutat Res* 1990; 232: 77-88.
- Morales-Ramírez P, Rodríguez-Reyes R, Vallarino-Kelly T.** *In vivo* fate of MMS-induced DNA lesions that elicit SCE. *Mutat Res* 1992; 272: 215-221.
- Morales-Ramírez P, Mendiola-Cruz MT, Vallarino-Kelly T, Rodríguez-Reyes R.** Comparison of sister chromatid exchange induction in murine germinal and somatic cells by gamma radiation exposure *in vivo*. *Environ Mol Mutagen* 1994; 24: 89-95.



- Morales-Ramírez P, Rodríguez-Reyes R, Vallarino-Kelly T.** Fate of lesions that elicit sister chromatid exchanges (FLE-SCE) produced in DNA by alkylating agents *in vivo*. *Mutat Res* 1995a; 344: 13-26
- Morales-Ramírez P, Cruz-Vallejo VL, Vallarino-Kelly T, Rodríguez-Reyes R.** Persistence during G1 of gamma ray- or mitomycin C-Induced lesions eliciting SCE in murine salivary gland cells *in vivo*. *Somat Cell Mol Genet* 1995b; 21: 33-41.
- Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T.** Pharmacokinetic parameters determined from the clastogenic activity of ethylnitrosourea and dimethylnitrosamine in mice *in vivo*. *Mutat Res* 1998; 412: 315-322.
- Morales-Ramírez P, Cruz-Vallejo V, Rodríguez-Reyes R.** Differences in sensitivity of murine spermatogonia and somatic cells *in vivo* to sister-chromatid exchange induction by nitrosoureas. *Mutat Res* 2001; 478: 185-190.
- Morgan WF, Wolff S.** Effect of 5-bromodeoxyuridine substitution on sister chromatid exchange induction by chemicals. *Chromosoma* 1984a; 89: 285-289.
- Morgan WF, Wolff S.** Effect of bromodeoxyuridine on sister chromatid exchanges. *Basic Life Sci* 1984b; 29 Pt A: 281-292
- Morgan WF, Wolff S.** Induction of sister chromatid exchange by 3-aminobenzamide is independent of bromodeoxyuridine. *Cytogenet Cell Genet* 1984c; 38: 34-38.
- Morgan WF, Bodycote J, Doida Y, Fero ML, Hahn P, Kapp LN.** Spontaneous and 3-aminobenzamide-induced sister-chromatid exchange frequencies estimated by ring chromosome analysis. *Mutagenesis* 1986; 6: 453-459
- Morris SM, Heflich RH.** A comparison of the toxic and SCE-inducing effects of inhibitors of ADP-ribosyl transferase in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 1984; 126: 63-71.
- Morris SM, Domon OE, McGarrity LJ, Kodell RL, Casciano DA.** Effect of bromodeoxyuridine on the proliferation and growth of ethyl methanesulphonate-exposed P3 cells: relationship to the induction of sister-chromatid exchanges. *Cell Biol Toxicol* 1992; 8: 75-87.
- Morrison C, Takeda S.** Genetic analysis of homologous recombination in vertebrate somatic cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 817-831.
- Mukherjee A, Sen S, Agarwal K.** Ciprofloxacin: mammalian DNA topoisomerase type II poison *in vivo*. *Mutat Res* 1993; 301: 87-92.
- Nakanishi Y, Schneider, EL.** *In vivo* sister chromatid exchange: a sensitive measure of DNA damage. *Mutat Res* 1979; 60: 329-337.
- Natarajan AT, Tates AD, Meijers M, Neuteboom I, de Vogel N.** Induction of sister-chromatid exchanges (SCEs) and chromosomal aberrations by mirtomycin C and methyl methanesulfonate in Chinese hamster ovary cells. An evaluation of methodology for detection of SCEs and of DNA lesions towards the frequencies of observed SCEs. *Mutat Res* 1983; 121: 211-223.
- Natarajan AT, Rottevel AHM, Pleterson J van, Schliermann MG.** Influence of incorporated 5-bromodeoxyuridine on the frequencies of spontaneous and induced sister-chromatid exchanges, detected by immunological methods. *Mutat Res* 1986; 163: 51-55.
- Nishi Y, Makiko M, Hasegawa MM, Inui N, Ikegami S, Yamada M.** Effect of post-treatment with aphidicolin a specific inhibitor of DNA polymerase α - on sister-chromatid exchanges induced by ethyl methanesulfonate. *Mutat Res* 1982; 103: 155-159
- Ockey CH.** Methyl methane-sulphonate (MMS) induced SCEs are reduced by the BrdU used to visualize them. *Chromosoma* 1981; 84: 243-256.
- Okada T, Sonoda E, Yamashita YM, Koyoshi S, Tatelshi S, Yamazumi M, Takata M, Ogawa O, Takeda S.** Involvement of vertebrate polkappa in Rad18-independent postreplication repair of UV damage. *J Biol Chem* 2002; 277: 48690-48695.

- O'Neill JP, Heartlein MW, Preston RJ.** Sister-chromatid exchanges and gene mutations are induced by the replication of 5-bromo- and 5-cloro-deoxyuridine substituted DNA. *Mutat Res* 1983; 109: 259-270
- O'Neill JP.** Quantification of the induction of SCE due to the replication of unsubstituted and BrdU-substituted or CldU-substituted DNA in CHO cells. *Mutat Res* 1984; 140: 21-25.
- Painter RB.** A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutat Res* 1980; 70: 337-341.
- Palitti F, Tanzarella C, Cozzi R, Ricordy, Vitagliano E, Fiore M.** Comparison of the frequencies of SCE induced by chemical mutagens in bone-marrow, spleen and spermatogonial cells of mice. *Mutat Res* 1982; 103: 191-195.
- Paz MF, Fraga MF, Avila S, Guo M, Pollan M, Herman JG, Esteller M.** A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell. *Cancer Res* 2003; 63: 1114-1121.
- Perry P, Evans HJ.** Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature (London)* 1975; 258: 121-125
- Perry P, Wolff S.** New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature (London)* 1974; 258: 156-158.
- Perticone P, Cozzi R, Gustavino P.** Sister chromatid exchanges induced by DNA demethylating agents persist through several cell cycles in mammalian cells. *Carcinogenesis* 1987; 8: 1059-1063.
- Perticone P, Palitti F, Cozzi R, D'Erme M, Bona R.** Persistence of azacytidine-induced SCEs and genomic methylation in CHO cells *in vitro*. *Mutat Res* 1990; 245: 211-215.
- Perticone P, Gensabella G, Cozzi R.** Damage proneness induced by genomic DNA demethylation in mammalian cells cultivated *in vitro*. *Mutagenesis* 1997; 4: 259-264.
- Pichierri P, Franchitto A, Piergentili R, Colussi C, Palitti F.** Hypersensitivity to camptothecin in MSH2 deficient cells is correlated with a role for MSH2 protein in recombinational repair. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1781-1787.
- Pinkel D, Thompson LH, Gray JW, Vanderlaan M.** Measurement of sister chromatid exchanges at very low bromodeoxyuridine substitution levels using monoclonal antibody in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 1985; 45: 5795-5798.
- Piñero J, López Baena M, Ortiz T, Cortés F.** Sister chromatid exchange induced by DNA topoisomerases poisons in late replicating heterochromatin: influence of inhibition of replication and transcription. *Mutat Res* 1996; 354: 195-201
- Pommier Y, Zwelling LA, Kao-Shan CS, Whang-Peng J, Bradley MO.** Correlations between intercalator-induced DNA strand breaks and sister chromatid exchanges, mutations, and cytotoxicity in Chinese hamster cells. *Cancer* 1985; 45: 3143-3149.
- Pommier Y, Kerrigan D, Covey JM, Kao-Shan CS, Whang-Peng J.** Sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and cytotoxicity produced by antitumor topoisomerase II inhibitors in sensitive (DC3F) and resistant (DC3F/9-OHE) Chinese hamster cells. *Cancer* 1988; 48: 512-516.
- Popescu NC, Amsbaugh SA, DiPaolo JA.** Reduced N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine sister chromatid exchange induction in Chinese hamster V79 cells pre-exposed to 5-bromodeoxyuridine. *Chromosoma* 1980; 76: 329-338
- Popescu NC, Amsbaugh SC, Larramendy ML, DiPaolo JA.** 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate and its relationship to SCE induction in Syrian and Chinese hamster cells. *Environ Mutagen* 1982; 4: 73-81.
- Popescu NC, Amsbaugh SC, DiPaolo JA.** Persistence of sister chromatid exchanges and *in vitro* morphological transformation of syrian hamster fetal cells by chemical and physical carcinogens. *Carcinogenesis* 1985; 6: 1627-1630.
- Rasouli-Nia A, Sibghat-Ullah, Mirzayans R, Paterson MC, Day RS 3rd.** On the quantitative relationship between O6-methylguanine residues in genomic DNA and

production of sister-chromatid exchanges, mutations and lethal events in a Mer- human tumor cell line. *Mutat Res* 1994; 314: 99-113.

Renault G, Gentil A, Chouroulinkov I Kinetics of induction of sister-chromatid exchanges by X-rays through two cell cycle. *Mutat Res* 1982; 94: 359-368

Ribas G, Xamena N, Creus A, Marcos R Sister-chromatid exchanges (SCE) induction by inhibitors of DNA topoisomerases in cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 1996; 368: 205-211.

Rodríguez-Reyes R. Destino *in vivo* de las lesiones causadas al ADN por agentes alquilantes e involucradas en la producción de ICH. Tesis de Maestría (Biología). Universidad Nacional Autónoma de México. 1996. pp 125

Russo A, Gabbani G, Dorlgo E. Evaluation of sister-chromatid exchanges in mouse spermatogonia: a comparison between the classical fluorescence plus Giemsa staining and an immunocytochemical approach. *Mutat Res* 1994; 323: 143-149.

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

Sayed Aly M, Wojcik A, Schunck C, Obe G. Correlation of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individual CHO cells pre-labelled with BrdU and treated with Dnase I. *Int J Radiat Biol* 2002; 87: 1037-1044.

Schneider EL, Sternberg H, Tice RR. *In vivo* analysis of cellular replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 24: 2041-2044.

Schvartzman JB, Goyanes V. A new method for the identification of SCEs per cycle in BrdUrd-substituted chromosomes. *Cell Biol Int Reports* 1980; 4: 415-423

Schvartzman JB, Goyanes VJ, Campos A, Lage AM, Veiras C, Silva MC, Ramos S. Persistence of DNA lesions and the cytological cancellation of sister chromatid exchange. *Chromosoma* 1985; 92: 7-10.

Schwartz JL, Banda MJ, Wolff S. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) induces sister-chromatid exchanges and delays in cell progression in Chinese hamster ovary and human cell lines. *Mutat Res* 1982; 92: 393-409

Schwartz JL, Weichselbaum R. Antipain-mediated suppression of sister chromatid exchanges induced by an inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase. *Environ Mutagen* 1985; 7: 703-709.

Shafer DA. Replication bypass model of sister chromatid exchanges and implications for Bloom's syndrome and Fanconi's anemia. *Hum Genet* 1977; 39:177-190.

Shiple J, Sakai K, Tantravahi U, Fendrock B, Latt SA. Correspondence between effects of 5-azacytidine on SCE formation, cell cycling and DNA methylation in Chinese hamster cells. *Mutat Res* 1985; 150: 333-345.

Shiraishi Y, Taguchi T, Ozawa M, Bamezal R. Different mutations responsible for the elevated sister-chromatid exchange frequencies in Bloom syndrome and X-irradiated B-lymphoblastoid cell lines originating from acute leukemia. *Mutat Res* 1988; 211: 273-278.

Shiraishi Y, Li MJ. Bromodeoxyuridine template and thymidine pool effects on high frequencies of sister-chromatid exchange (SCE) in Bloom syndrome cells and mutant cell line (AsHa) originated from ataxia telangiectasia. *Mutat Res* 1990; 230: 177-186.

Sonoda E, Sasaki M, Morrison C, Yamaguchi Y, Takata M, Takeda S. Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 5166-5169.

Speit G, Wolf M, Vogel W. Synergistic action of cysteamine and BrdU-substituted DNA in the induction of sister chromatid exchanges. *Chromosoma* 1980; 81: 461-471.

Speit G, Vogel W, Mehnert K. Do the frequencies of sister chromatid exchanges in endoreduplicated mitoses provide a measure for lesion persistence and repair?. *Chromosoma* 1985; 91: 369-371

- Stetka DG.** Further analysis of the replication bypass model for sister chromatid exchange. *Hum Genet* 1979; 49: 63-69.
- Stetka DG Jr, Spahn MC.** SCEs are induced by replication of BrdU-substituted DNA templates, but not by incorporation of BrdU into nascent DNA. *Mutat Res* 1984; 140: 33-42.
- Stoilov L, Wojcik A, Giri AK, Obe G.** SCE formation after exposure of CHO cells prelabelled with BrdU or biotin-duTP to various DNA-damaging agents. *Mutagenesis* 2002; 17: 399-403.
- Suzuki H, Yosida TH.** Frequency of sister-chromatid exchanges depending on the amount of 5-bromodeoxyuridine incorporated into parental DNA. *Mutat Res* 1983; 111: 277-282.
- Taguchi T, Shiraishi Y.** Increased sister-chromatid exchanges (SCEs) and chromosomal fragilities by BrdU in a human mutant B-lymphoblastoid cell line. *Mutat Res* 1989; 211: 43-49.
- Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Fukushima T, Morrison C, Albala JS, Swagemakers SM, Kanaar R, Thompson LH, Takeda S.** The Rad51 paralog Rad51B promotes homologous recombinational repair. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 6476-6482.
- Taylor JH, Woods PS, Huges WL.** The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic using tritium-labelled thymidine. *Proc Natl Acad Sci (U.S.A.)* 1957; 43: 122-128.
- Tice RR, Ivett JL.** Cytogenetic analysis of bone marrow damage, en *Toxicology of the blood and bone marrow*. Richard D. Irons. Raven Press ed. New York. 1985; pp. 119-139.
- Tice RR, Ormiston BG, McFee AF.** The effect of agent dose and treatment time on the intercellular distribution of sister-chromatid exchanges induced by genotoxic agents in mouse bone marrow cells in vivo. *Mutat Res* 1989; 215: 25-37.
- Tohda H, Oikawa A.** Characterization of the enhancing effect of caffeine on sister-chromatid exchanges induced by ultraviolet radiation in excision-proficient xeroderma pigmentosum lymphoblastoid cells. *Mutat Res* 1988; 201: 1-8.
- Tohda H, Zhao JH, Oikawa A.** A possible involvement of DNA topoisomerase I in "caffeine effect" after ultraviolet irradiation. *Tohoku J Exp Med* 1992; 168: 129-132.
- Tsuji H, Shlomi T, Tsuji S, Tobarí I, Ayusawa D, Shimizu K, Seno T.** Aphidicolin-resistant mutants of mouse lymphoma L5178Y cells with a high incidence of spontaneous sister chromatid exchanges. *Genetics* 1986; 113: 433-447.
- Tucker JD, Strout CL, Christensen ML, Carrano AV.** Sister chromatid exchange induction and persistence in peripheral blood and spleen lymphocytes of mice treated with ethylnitrosourea. *Environ Mutagen* 1986; 8: 345-355.
- Tucker JD, Wyrobek AJ, Ashworth LK, Christensen ML, Burton GV, Carrano AV, Everson RB.** Induction, accumulation, and persistence of sister chromatid exchanges in women with breast cancer receiving cyclophosphamide, adriamycin and 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer Res* 1990; 50: 4951-4956.
- Vogel W, Bauknecht T.** Differential chromatid staining by in vivo treatments as a mutagenicity test system. *Nature* 1976; 260: 448-449.
- Wachsmann J.** DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: relation to carcinogenesis. *Mutat Res* 1997; 375: 1-8.
- Wang W, Seki M, Narita Y, Sonoda E, Takeda S, Yamada K, Masuko T, Katada T, Enomoto T.** Possible association of BLM in decreasing DNA double strand breaks during DNA replication. *EMBO J* 2000; 19: 3428-3435.
- Wei LY, Hou RF, Jan KY, Wang TC.** Factors affecting zero background frequency of sister-chromatid exchange in mosquito cells. *Mutagenesis* 1993; 8: 179-182.
- Wolff S.** Sister chromatid exchange, Wiley, New York, 1982.
- Wolff S, Afzal V.** Segregation of DNA polynucleotide strands into sister chromatids

and the use of endoreduplicated cells to track sister chromatid exchanges induced by crosslinks, alkylations or x-ray damage. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93: 5765-5769.

Wolff S, Bodycote J, Painter RB. Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by UV. Irradiation at different stages of the cell cycle: The necessity for cells to pass through S. Mutat Res 1974; 25: 73-81.

Wolff S, Perry P. Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography. Chromosoma 1975; 48: 341-353.

Wolffe AP, Jones PL, Wade PA. DNA demethylation. Proc Natl Acad Sci U:S:A. 1999; 96: 5894-5896.

Woodcock DM, Adams JK, Allan RG, Cooper IA. Effect of several inhibitors of enzymatic DNA methylation on the *in vivo* methylation of different classes of DNA sequences in a cultured human cell line. Nucleic Acids Res 1983; 11: 489-499.

Yager JW. Effect of concentration-time parameters on sister-chromatid exchanges induced in rabbit lymphocytes by ethylene oxide inhalation. Mutat Res 1987; 182: 343-352.

Yamashita YM, Okada T, Matsusaka T, Sonoda E, Zhao GY, Araki K, Tateshi S, Yamazumi M, Takeda S. RAD18 and RAD54 cooperatively contribute to maintenance of genomic stability in vertebrate cells. EMBO J 2002; 21: 5558-5566.

Yankiwski V, Noonan JP, Neff NF. The C-terminal domain of the Bloom syndrome DNA helicase is essential for genomic stability. BMC Cell Biol 2001; 2: 11.

Zhao JH, Tohda H, Oikawa A. Camptothecin-induced sister-chromatid exchange dependent on the presence of bromodeoxyuridine and the phase of the cell cycle. Mutat Res 1992; 282: 49-54.

Zijno A, Quaggia S, Pacchlerotti F. A cytogenetic approach to evaluate *in vivo* somatic aneuploidy. Effects of diethylstilboestrol on mouse bone marrow cells. Mutagenesis 1989; 4: 62-66.

Zwanenburg TSB, Natarajan AT. 3-Aminobenzamide-induced sister-chromatid exchanges are dependent on incorporated bromodeoxyuridine in DNA. Cytogenet Cell Genet. 1984; 38: 278-281.

Sister chromatid exchange induction and the course of DNA duplication, two mechanisms of sister chromatid exchange induction by ENU and the role of BrdU

R.Rodríguez-Reyes and P.Morales-Ramírez¹

Departamento de Genética, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Apartado Postal 18-1027, México, D.F. México

The aims of the present study were to establish the following: (i) the course of sister chromatid exchange (SCE) induction by ethylnitrosourea (ENU) in the first, second and third divisions as a function of the exposure time; (ii) the persistence of SCE-inducing lesions and the determination of whether or not they are always involved in SCE formation; (iii) the effect of bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation on the induction and persistence of SCE. Three-way differential staining of sister chromatids in murine bone marrow cells *in vivo* was used in the present study. The results indicate the following: (i) SCE induction in each cell division depends on the course of DNA duplication, suggesting that SCE occurs at the replication fork; (ii) the cell population under study could be considered synchronous and had a cell cycle duration of nearly 9 h; (iii) in the second and third cell divisions ENU preferentially induced SCE in the cycle in which the exposure occurred; (iv) lesions induced by exposure to ENU did not cause SCE at the same site in subsequent divisions; (v) ENU was also capable of producing a long-lasting induction of SCE in BrdU-unsubstituted DNA; (vi) the sensitivity to SCE induction by the mutagen increases nearly proportionally to BrdU incorporation into DNA.

Introduction

Sister chromatid exchange (SCE) is a phenomenon that occurs widely in nature (Chao *et al.*, 1985; Escalza *et al.*, 1989; Wei *et al.*, 1993); this suggests that it represents or is the expression of a biologically relevant process that has been preserved through evolution. However, its biological meaning and the mechanism of formation have not been fully elucidated. Evidence has been obtained that the occurrence of SCE requires the cell to pass through DNA synthesis (Wolff *et al.*, 1974); there are also some data suggesting that the replication fork is the site at which this event occurs (Kato, 1980; Cortés *et al.*, 1993). It has been reported that SCE could be caused by the presence of DNA lesions at the moment of replication (Kato, 1980) or by the alteration of this latter process (Ishii and Bender, 1980; Nishi *et al.*, 1982). DNA synthesis, and particularly formation of the replication fork, is the moment at which SCE most probably occurs, because this is when the homologous double strands are close together and a homologous recombinational event could take place more easily (Morales-Ramírez *et al.*, 1990). Clear evidence has recently been reported relating SCE to homologous recombination (Sonoda *et al.*, 1999).

In a model of SCE production (Morales-Ramírez *et al.*, 1990) based on the recombinational model of Holliday (Dressler and

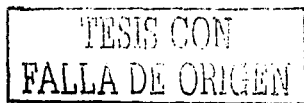
Potter, 1982) and on replicative repair in eukaryotes (Lavin, 1978), a mechanism was proposed that permits DNA duplication in the presence of lesions; these lesions could subsequently be eliminated by an associated repair process or after replication. In such a model, the Holliday intermediate could be resolved by generating a double or simple strand exchange, which determines whether a sister chromatid exchange does or does not occur. In this context, an approach to determining the biological meaning would be to establish whether SCE production is related to the elimination of DNA damage or to lesion tolerance. In order to discriminate between these two possibilities, evidence is required that may allow one to establish whether or not a lesion can cause SCE in subsequent divisions and whether it is common for SCE to occur at the same locus in subsequent cell divisions.

There is evidence that mutagen exposure can induce SCE much later in proliferative cells (Morales-Ramírez *et al.*, 1984a), indicating that not all SCE-inducing lesions are repaired during cell division. However, the evidence obtained by the usual protocol of two-tone staining of sister chromatids does not let us clearly determine the persistence or repair of SCE-inducing lesions. Given that differential staining requires two cell divisions, the SCEs analyzed could be the accumulation of SCE occurring in two cell divisions. In order to distinguish SCE induction in each cell division, the mutagen treatment was applied to different groups in each cell cycle; SCE induction in each cell division was estimated by difference (Ockey, 1981; Conner *et al.*, 1984; Kaina and Aurich, 1985). However, the cancellation effect (Stetka, 1979) in cells exposed in the first division and the bromodeoxyuridine (BrdU) substitution effect (Ockey, 1981) in those exposed in the second division make interpretation difficult.

A protocol based on the three-way differential staining (TWDS) of SCE (Schvartzman and Goyanes, 1980) allows one to determine SCE occurring in each of three successive cell generations and even the frequency at which a SCE occurs at the same locus. Using this protocol in human lymphocytes or CHO cells *in vitro* it has been reported that a single time exposure to mitomycin C, UV light, ionizing radiation or EMS was capable of inducing SCE in successive divisions, but not at the same locus (Schvartzman *et al.*, 1985; Cortés *et al.*, 1994). In murine bone marrow cells *in vivo*, also with a single exposure, it was observed that γ -rays caused 100% of lesions capable of inducing SCE at the same locus (Morales-Ramírez *et al.*, 1988); likewise, it has been noted that some chemical mutagens produced the same effect, but with 50% probability (Morales-Ramírez *et al.*, 1990) or less (Morales-Ramírez *et al.*, 1992, 1995).

In the TWDS protocol, the relationship between the time of mutagen exposure and the course of DNA duplication is essential for interpretation, because assuming that SCE occurs at the duplication fork (Kato, 1980; Cortés *et al.*, 1993), the

¹To whom correspondence should be addressed. Email: pnr@nuclear.inm.mx



DNA lesions induced behind the fork would produce SCE during subsequent cell divisions; this could be misinterpreted as a persistence of lesions.

The aims of the present study were as follows: (i) to establish the course of SCE induction in the first (SCE-1), second (SCE-2) and third (SCE-3) divisions depending on the exposure time to ethylnitrosourea (ENU); (ii) to establish if mutagen exposure causes DNA lesions eliciting SCE in successive divisions (persistent) and even at the same locus (tenacious); (iii) to determine the effect of BrdU incorporation into DNA on the induction and persistence of SCE-eliciting lesions.

Materials and methods

Animals

Two- to three-month old BALB/c male mice weighing 30 g were used in these experiments. The animals were housed in plastic cages under controlled conditions of temperature and dark-light periods and were fed with Purina chow for small rodents and water *ad libitum*.

Protocol

The protocol followed to determine SCE induction in three subsequent cell generations in murine bone marrow cells (Morales-Ramírez *et al.*, 1988, 1990, 1992, 1995) is based on three-way differential staining of sister chromatids (Schvartzman and Goyanes, 1980). The mice received a low BrdU dose (0.2 mg/kg body wt i.p.) before the first division (time 0) and a high dose (2.0 mg/kg body wt i.p.) before the second cycle of division (12 h after initiation). The BrdU had previously been adsorbed to activated charcoal (Morales-Ramírez, 1980; Morales-Ramírez *et al.*, 1984b). A dose of 25 mg/kg ENU (in water) was administered s.c. to different groups of mice 3, 6, 9, 12, 18, 24 or 30 h after the first injection of BrdU (low BrdU dose). Additional experiments were carried out with exposure 3, 6 and 12 h prior to the first BrdU dose. Colchicine (3.75 mg/kg) was administered i.p. 2 h before killing by cervical dislocation and 36 h after the first BrdU injection.

The times of treatment with the two BrdU doses and with colchicine and the differential staining in three tones permitted the selection of cell populations that divided three times between the first administration of BrdU and the end of the experiment, assuming an average generation time of 12 h (Ivett and Tice, 1992). This also allows one to predict the level of BrdU substitution in DNA strands at the moment of ENU administration (Figure 1).

The protocol permits one to score SCEs that occur in the first, second and third divisions in the cells and to infer whether or not they occur at the same site in successive divisions (Figure 1).

Chemicals

BrdU, ENU and colchicine were obtained from Sigma Chemicals.

ENU administration

The ENU dose of 25 mg/kg was established in preliminary experiments using the usual two-tone staining protocol, as the dose that causes the maximum SCE concomitant with only a moderate cytotoxic effect (data not shown). The latter was determined as the effect on the mitotic index and average generation time (Ivett and Tice, 1992).

Slide preparation

The animals were killed by cervical dislocation 2 h after administration of colchicine. Both femurs were dissected and bone marrow cells were obtained by injecting a saline solution at one end of the bone. The cells obtained were treated with a hypotonic solution, fixed as reported previously (Morales-Ramírez *et al.*, 1990) and finally dropped onto chilled slides. The slides were dried for at least 24 h before staining by the fluorescence plus Giemsa method (Perry and Wolff, 1974), as slightly modified (Goto *et al.*, 1975).

Analysis and statistical methods

The frequencies of SCE-1, SCE-2 and SCE-3 (Figure 1) were scored in 30 cells/animal. SCE-3 in chromosome descendants of the BrdU-unsubstituted DNA strand, which have a dark stained chromatid (SCE-3D), and those of the BrdU-low substituted DNA strand, which have a pale stained chromatid (SCE-3P), were analyzed in the same cells. The statistical significance among groups was determined with Student's *t*-test and the difference in SCE frequency between SCE-3D and SCE-3P was established by the paired *t*-test using the Excel program for PC.

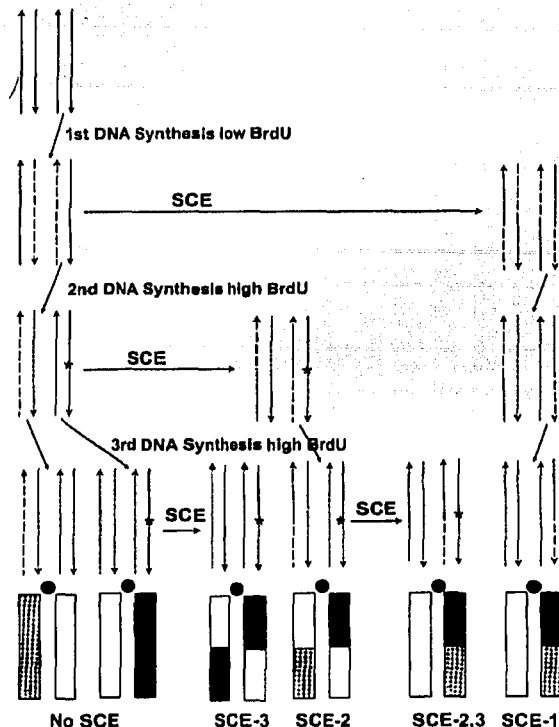


Fig. 1. The TWDS protocol for chromatids is shown. This figure describes how differential BrdU incorporation in three subsequent divisions allows one to determine the SCE in each of the three divisions, as well as to establish the probability that SCE occurs at the same locus in the second and third divisions due to tenacious lesions. As shown, when SCE occurs in these divisions at the same locus, exposure to the mutagen in the second division would paradoxically cause an increase in SCE with the appearance of those occurring in the first division. Continuous lines represent unsubstituted, dashed lines low BrdU substitution and dotted lines high BrdU substitution. The figure shows the dark and pale chromosomes derived from the unsubstituted and BrdU-substituted strands, respectively, present after the first division.

Rationale to achieve the aims

The TWDS protocol for chromatids shown in Figure 1 makes it possible to determine SCE in each of the three subsequent divisions. This allowed us to explore the following.

- i. The course of SCE induction in each of the three divisions as these three successive cell divisions progress. This was done by exposing the animals to ENU at different times.
- ii. The induction of SCE in successive divisions after exposure (persistence), as well as the probability that SCE occurs at the same locus in the second and third divisions (tenacity). The latter was determined in cells exposed to ENU during the second division (as shown in Figure 1); when SCE occurs in the second and third divisions at the same locus, the exposure in the second division would paradoxically cause an increase in SCEs with the appearance of those occurring in the first division.
- iii. The effect of BrdU on SCE induction by ENU. This was done by determining (a) the effect of cumulative incorporation of BrdU in subsequent divisions and (b) the difference in sensitivity to the induction of SCE-eliciting lesions of the BrdU-substituted and BrdU-unsubstituted DNA strands. Such a difference was established by comparing the induced frequencies of SCE-3D with those of SCE-3P.



Results

Course of SCE-1, SCE-2 and SCE-3 induction as a function of the course of successive divisions

Table I shows the SCE frequency induced in three subsequent divisions by exposure to ENU at different times with respect to administration of the first BrdU dose. The data indicate that ENU induces a significant increase in SCE-1 with respect to the matching control from 3 to 12 h. At 18, 24 and 30 h, the frequency decreases to values as low as the control values. With regard to SCE-2, the frequencies are significantly higher than the control from 3 to 24 h, with a maximum at 18 h. The SCE-2 frequency at 30 h is similar to that of the control. The SCE-3 frequencies are significantly higher at all times, even at 3 h, although there is a greater increase at 24 and 30 h.

The increments in SCE induction shown in Table I are plotted in Figure 2; two scales are used because the induction of SCE-1 is substantially lower than those of SCE-2 and SCE-3. It is important to point out the following: 9 h was the time of maximum SCE-1 frequency but had the minimum values of SCE-2 and SCE-3; 18 h was the time of maximum induction of SCE-2, but when the minimum SCE-1 and SCE-3 levels appeared; 30 h was the time of highest SCE-3 induction, but when negligible induction of SCE-1 and SCE-2 occurred. The highest SCE induction in each cell division seems to correspond to the moment prior to DNA duplication, because after this time, the course of DNA duplication reduces the SCE frequency in the current cell division. This is because there is a greater probability that lesions are produced behind the duplication fork, i.e. in the recently synthesized strands, causing a greater number of SCEs in the subsequent division. Figure 3 shows the data plotted as a percentage of the maximum induction, considering only SCE induced in the cell division of ENU exposure. A model scheme of SCE induction in subsequent divisions could be constructed from the curves. The shapes of the curves, particularly that corresponding to SCE-2, suggest that cell division in bone marrow is continuous and that the durations of the G₁, G₂ and M phases of cell division are negligible. Under these circumstances, the data indicate that SCE occurs during S phase and specifically at the replication fork. The inferences obtained from the data that support the model imply that cell division of the cells under study lasts 9 h, instead of the 12 h inferred from the average generation time (Ivett and Tice, 1992). This means the cell cycle in the present study is out of phase with respect to its theoretical course. The synchrony is due to selection of the cell subset under analysis by BrdU administration, arrest of the cells in metaphase with colchicine at specific times and the TWDS protocol for chromatids. The results will allow us to improve the TWDS protocol *in vivo*, by determining the most appropriate times for BrdU and colchicine treatments, thus obtaining a much higher percentage of cells with TWDS.

Persistent and tenacious SCE-inducing lesions

The data from Figure 2 interpreted in terms of the model of SCE induction in successive divisions indicate the following: (i) the frequencies of SCE-1, SCE-2 and SCE-3 are preferentially increased by exposure during their corresponding cell division, implying that they are caused by recently induced DNA lesions of immediate expression and, as was previously mentioned, are a result of the progress of DNA duplication; (ii) ENU did not increase the frequency of SCE-1 on exposure during the second division (18 h), indicating that this mutagen is unable to induce 'SCE-1 like' SCE arising from SCE produced at the

Table I. Frequency of SCE (mean \pm SD) in three subsequent divisions induced by exposure to ENU at different times with respect to first BrdU administration

Division	Time	Frequency of SCE (mean \pm SD) in three subsequent divisions induced by exposure to ENU at different times with respect to first BrdU administration									
		3 h (x-C3)	6 h (x-C2)	9 h (x-C1)	12 h (x-C1)	18 h (x-C2)	24 h (x-C3)	30 h (x-C4)	C1	C2	C3
First	2.9 \pm 0.2 (2)	2.8 \pm 0.7 (2)	2.7 \pm 1.3 (2.3)	2.5 \pm 0.6 (2.1)	0.86 \pm 0.4 (0.11)	0.88 \pm 0.1 (-0.01)	0.69 \pm 0.2 (0.16)	0.43 \pm 0.1	0.75 \pm 0.1	0.89 \pm 0.2	0.53 \pm 0.1
Second	6.3 \pm 1.0 (2.7)	7.1 \pm 0.9 (2.9)	6.0 \pm 0.7 (2.2)	8.7 \pm 2.5 (4.9)	12.9 \pm 2.3 (8.7)	5.2 \pm 0.6 (1.6)	6.7 \pm 0.7 (-0.6)	3.8 \pm 0.3	4.2 \pm 1.1	3.6 \pm 0.7	7.3 \pm 1.6
Third	7.4 \pm 0.6 (3.6)	7.3 \pm 1.0 (2.9)	6.3 \pm 0.8 (2.5)	6.5 \pm 1.3 (2.7)	8.3 \pm 1.1 (3.9)	10.3 \pm 1.4 (6.5)	15.0 \pm 1.2 (10.6)	3.8 \pm 0.5	4.4 \pm 0.7	3.8 \pm 0.6	4.4 \pm 0.8
n	5	5	3	4	5	5	4	3	4	5	3

All values were statistically significant with respect to their current controls by Student's *t*-test, $P < 0.05$, except for the values in bold. C1-C4 represent the different matching control groups. x-C(1-4) represent the increase with respect to its respective matching control.

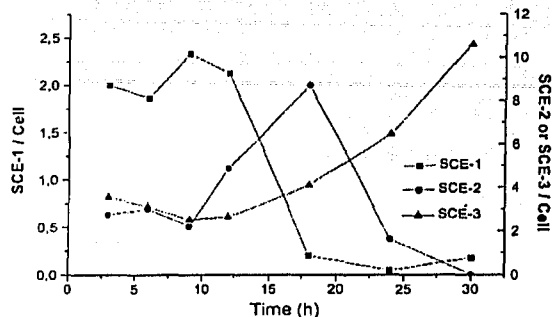


Fig. 2. Induction of SCE-1, SCE-2 and SCE-3 by exposure at different times during three cell divisions after the first BrdU administration (time 0). The data represent the increase in SCE with respect to the current control, derived from the results shown in Table I. Two scales are used because SCE-1 induction is substantially lower than SCE-2 and SCE-3.

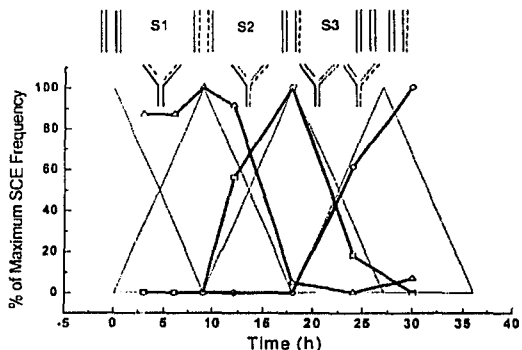


Fig. 3. Model of SCE induction in subsequent divisions. Thick lines represent the actual SCE induction in three subsequent divisions, plotted as a percentage of the maximal induction at each cell division with respect to time; the fine lines represent the theoretical progress of SCE induction in the three cell divisions. The corresponding course of subsequent DNA duplications and BrdU incorporation are shown. Continuous lines represent unsubstitution, dashed lines low BrdU substitution and dotted lines high BrdU substitution.

same locus in the second and third divisions by a tenacious DNA lesion (see Figure 1); (iii) ENU is capable of inducing a similar increase in SCE-2 and SCE-3, even higher than that of SCE-1, by exposure at different times during the first cell cycle. This result could not be explained by the presence of very persistent DNA lesions that are by chance expressed as SCE in successive cell divisions.

In order to explore the observation that ENU can produce SCE in three subsequent divisions after exposure, animals were s.c. injected with the same previously used dose of ENU, at 3, 9 or 12 h before the first BrdU administration, which means up to nearly five cell divisions prior to the analysis. The results in Table II show that for all times the frequencies of SCE-1, SCE-2 and SCE-3 were significantly different from those of their corresponding controls; they also reveal that the increase in SCE-1 frequency was lower than that for SCE-2 and that the latter was lower than the increase in SCE-3. Exposure to ENU 3 and 6 h before the first BrdU administration

increases SCE in the three subsequent cell divisions by very similar proportions (1.4:2:3), while exposure 12 h before BrdU administration increases SCE-1 frequency by 1.0 and SCE-2 and SCE-3 frequencies by ~3.0. In fact, the increase in SCE-3 is practically constant. This confirms that ENU is capable of inducing SCEs for several cell divisions after exposure in cells with unsubstituted DNA and that this induction increases in the subsequent divisions after ENU exposure.

Effect of BrdU incorporation into DNA on the induction and persistence of SCE-eliciting lesions

The maximum induction of SCE-2 and SCE-3 is nearly four and five times higher than the maximum SCE-1 induction, as shown in Table I and Figure 2. This seems to indicate that BrdU incorporation is playing an important role in the sensitivity of cells to SCE induction by ENU, particularly of immediate expression lesions. Theoretically, in the course of DNA duplication (Figure 3) at 9 h DNA would be unifilarly BrdU substituted with low BrdU. After this time and up to 18 h, two kinds of DNA double strands should be formed: both would have a single strand substituted with high BrdU, but one with a complementary unsubstituted single strand and the other with a complementary low BrdU substituted strand. At 30 h, three kinds of double strands should be formed: two similar to those of the second division, but another with a high BrdU bifilar substitution. Under such circumstances, the induction of SCE seems to depend on BrdU incorporation. In order to explain how BrdU incorporation affects SCE induction by ENU, the relationship between BrdU incorporation and SCE frequency per chromosome during the three cell divisions is shown in Table III. The incorporation of BrdU was indirectly estimated as the number of substituted strands multiplied by the BrdU dose administered during substitution of these strands. The data at the times of maximum induction were used assuming that at those times duplication for each cell division had been completed. The data indicate that SCE induction is proportional to BrdU incorporation. Figure 4 shows that the relationship is directly proportional to dose, with $r = 0.99$. The estimated SCE induction by 25 mg/kg ENU in the absence of BrdU was 1.9 SCE/cell.

Table IV and Figure 5 show the frequencies of SCE-3D and SCE-3P, i.e. of chromosomes generated from the unsubstituted and BrdU-substituted strands present after the first division, respectively. Data from exposure to ENU either before or after the first BrdU administration were considered. The curves for SCE-3P seem to show a dependence on BrdU incorporation. In the first and second divisions there is a small but significant increase in SCE with respect to the control, except for the value obtained at 6 h. The fact that this BrdU-substituted strand does not exist at these times of exposure implies that some ENU-induced lesions in the unsubstituted DNA could make the newly synthesized BrdU-substituted DNA strands prone to SCE induction in subsequent divisions. Exposure during the second and third divisions continuously increases the frequency of SCE-3P.

The induction of SCE-3D was statistically significant with respect to the controls at all times of treatment. The curve for SCE-3D induction was much more complex. In the cell cycle prior to incorporation of BrdU there was an increase proportional to time. These long-lasting lesions induced during the first and second cycles are mainly SCE-3D; although this was expected, the event confirms that ENU can in fact induce long-lasting lesions in native DNA. After the first increase,

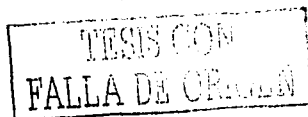


Table II. Frequency of SCE (mean \pm SD) in three subsequent divisions induced by exposure to ENU at different times prior to first BrdU administration

Division	Time			C1	C2
	-3 h (x-C1)	-6 h (x-C1)	-12 h (x-C2)		
First	2.0 \pm 0.5 (1.35)	2.1 \pm 0.3 (1.45)	1.5 \pm 0.28 (0.99)	0.65 \pm 0.11	0.51 \pm 0.11
Second	6.9 \pm 0.9 (1.8)	7.1 \pm 0.7 (2.0)	7.4 \pm 0.83 (3.2)	5.1 \pm 0.26	4.2 \pm 0.43
Third	7.4 \pm 0.7 (3.2)	7.3 \pm 0.8 (3.1)	6.4 \pm 0.88 (2.8)	4.2 \pm 0.68	3.6 \pm 0.5
n	6	6	4	6	4

All values were statistically significant with respect to their current controls by Student's *t*-test, $P < 0.05$. C1 and C2 represent the different matching control groups. x-C(1 or 2) represent the increase with respect to its respective matching control.

Table III. Effect of subsequent BrdU incorporation into DNA on SCE induction by ENU

Division	BrdU incorporation	SCE/cell
First	0.4	2.3
Second	4.2	8.7
Third	6.1	10.6

The 30 h exposure was used for the SCE-3 comparison.

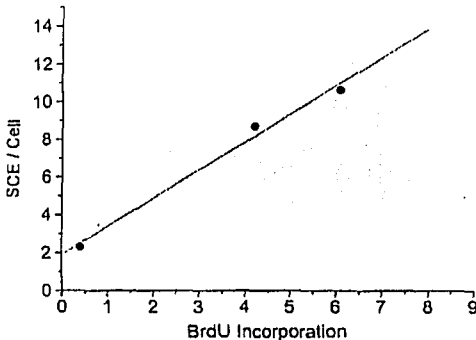


Fig. 4. Dose-response curve of BrdU incorporation versus SCE/cell. The plotted data correspond to the higher SCE induction in each cell division. The incorporation was indirectly estimated considering the number of substituted strands (Figure 3) multiplied by the BrdU dose, i.e. low 0.2 and high 2.0.

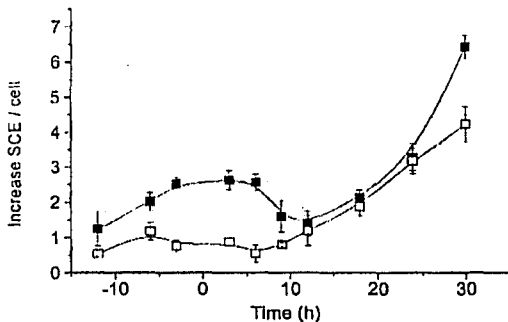


Fig. 5. Induction of SCE-3D (■) and SCE-3P (□) derived from the unsubstituted and the BrdU-substituted strands, respectively, at different times before and after first BrdU administration (time 0).

the frequency remains constant, then falls at the time at which the first DNA duplication occurs, according to the previously mentioned model of cell division; this could be explained by a lower probability of SCE induction, resulting from a 50% reduction in the number of unsubstituted strands per cell. SCE-3D frequency rises again at the time at which the second DNA duplication occurs, in the presence of the high BrdU dose. Then the frequency of SCE-3D increases at a similar rate to SCE-3P; this suggests that mid-lasting lesions are not dependent on BrdU incorporation, perhaps because the difference in substitution between the two kinds of strands is minor. However, at 30 h the frequency of SCE-3D is substantially higher than that of SCE-3P. This latter behavior is not easily explained; the fact that SCE-3P and SCE-3D were scored in the same cell implies that all experimental conditions were the same and that the only difference between the dark and the pale chromosomes is the unsubstituted DNA strand of the dark chromosome and the slightly substituted strand in the pale chromosome.

Discussion

SCE-1, SCE-2 and SCE-3 induction as a function of the course of successive cell divisions

There is evidence relating SCE production to the process of DNA synthesis (Kato, 1974; Wolff *et al.*, 1974) and to the inhibition of enzymes involved in this process (Ishii and Bender, 1980; Nishi *et al.*, 1982), even suggesting that the replication fork is the site of SCE production (Kato, 1980; Cortés *et al.*, 1993).

The results presented here indicate that the bone marrow cell subset under study could be considered synchronized, because the maximum SCE induction in each cell division corresponds to the minimum SCE frequencies of the other divisions and the maximum increases seem to occur at nearly regular periods. This synchrony is due to the fact that we selected metaphases showing TWDS derived from cells which incorporated two different BrdU doses at specific times during three cell divisions and were in metaphase at the moment of colchicine administration. The estimated duration of the bone marrow cell cycle of ~9 h agrees with a previous study in rat (Schneider *et al.*, 1977).

The fact that SCE induction by ENU decreases as DNA duplication progresses, while the yield of SCE in the subsequent division rises, is direct evidence that the replication fork is the site of SCE production. This implies that the production of SCE-inducing lesions increases behind the duplication fork as DNA division elapses, reducing SCE occurrence in the current division and increasing SCE induction in the next.

Table IV. Increase in SCE frequency (mean \pm SD) in third division chromosomes derived from unsubstituted (3D) and BrdU-substituted (3P) DNA strands

	-12 h	-6 h	-3 h	3 h	6 h	9 h	12 h	18 h	24 h	30 h
3D										
Treated	4.0 \pm 0.8	3.7 \pm 0.6	4.2 \pm 0.4	4.9 \pm 0.6	4.6 \pm 0.6	3.8 \pm 0.8	3.6 \pm 0.7	4.3 \pm 0.5	5.6 \pm 0.9	8.5 \pm 0.7
Control	1.8 \pm 0.3	1.7 \pm 0.6	1.7 \pm 0.3	2.3 \pm 0.5	2.2 \pm 0.2	2.2 \pm 0.2	2.2 \pm 0.2	2.2 \pm 0.2	2.3 \pm 0.5	2.1 \pm 0.4
Increase	2.2	2.0	2.5	2.6	2.4	1.6	1.4	2.1	3.3	6.4
3P										
Treated	2.4 \pm 0.2	3.7 \pm 0.6	3.3 \pm 0.4	2.4 \pm 0.2	2.6 \pm 0.7	2.5 \pm 0.1	2.9 \pm 0.8	4.1 \pm 0.5	4.7 \pm 0.8	6.5 \pm 1.0
Control	1.9 \pm 0.3	2.5 \pm 0.6	2.5 \pm 0.6	1.5 \pm 0.2	2.1 \pm 0.4	1.7 \pm 0.2	1.7 \pm 0.2	2.3 \pm 0.4	1.5 \pm 0.2	2.3 \pm 0.5
Increase	0.5	1.2	0.8	0.9	0.5	0.8	1.2	1.8	3.2	4.2
n	4	6	6	5	5	3	4	5	5	4

All values were significantly different with respect to the current controls, with the exception of the value in **italic** (3P at 6 h). The differences in SCE increases between dark (3D) and pale (3P) chromosomes were significant ($P < 0.05$) by paired *t*-test, with the exception of values in **bold**.

The fact that SCE takes place at the site where there is a lesion refutes the models of SCE induction caused by multiple lesions (Painter, 1980; DuFrain, 1981) and supports that which assumes that SCE occurs as a result of discreet lesions (Comings, 1975; Kato, 1977; Shafer, 1977; Dillehay *et al.*, 1989; Holden *et al.*, 1989; Morales-Ramírez *et al.*, 1990).

Persistent and tenacious SCE-inducing lesions

The two-tone BrdU protocol of differential staining of sister chromatids requires two cell divisions and does not allow one to detect the occurrence of SCE in each of the divisions. In addition, SCEs occurring at the same locus in subsequent divisions could be cancelled, which means that they cannot be scored because the chromosome appears as not having a SCE (Stetka, 1979); therefore, this introduces additional uncertainty in the interpretation. In fact, there are several studies in which the interpretation was based on the comparison of SCE induction by exposure to mutagens in the first division with that in the second division, inferring by difference SCE induction in each cell cycle (Ockey, 1981; Conner *et al.*, 1984; Kaina and Aurich, 1985). However, the SCE obtained by exposure of unsubstituted DNA in the first cell division represent SCE induction during two cycles and the possibility of cancellation is open, while exposure in the second division represents SCE produced during one cell division but in unifilarly BrdU-substituted DNA. This underlines the importance of developing protocols that allow one to distinguish SCE occurring in each of the cell divisions, such as the TWDS method (Schvartzman and Goyanes, 1980) and others (Ishi and Bender, 1978; Latt and Loveday, 1978; Linnainma and Wolff, 1982).

The TWDS protocol introduces uncertainty in interpretation when it is applied to asynchronous, continuously dividing cells, due to the fact that lesions produced behind the replication fork will not cause SCE until the next cell division. This is particularly important when a single time is used to infer the fate of the DNA lesions involved in successive divisions (Morales-Ramírez *et al.*, 1990, 1992, 1995). The present study allows us to determine the occurrence of SCE in successive cell divisions and to relate SCE induction to progress of the cell cycle, since most of the lesions eliciting SCE are of immediate expression. In fact, the results presented here indicate that ENU does not induce 'SCE-1 like' SCE as a result of SCE produced in the second and third divisions at the same locus by persistent and tenacious lesions. Under such circumstances, an unexpected increase in 'SCE-1' should be produced by a treatment during the second division. The fact that ENU does not cause SCE in the same locus contradicts

our earlier results obtained by exposure to other agents. Those results showed a slight but significant increase in 'SCE-1 like' SCE, although the possibility of recent lesion induction was also considered (Morales-Ramírez *et al.*, 1988, 1990, 1992, 1995). However, such studies were carried out by inducing SCE after a single mutagen treatment, at 12 h after the first BrdU dose; we assumed that at this time the first cell division had ended and therefore a true SCE-1 could not be induced. Nevertheless, the present experiment indicates that at this time there exists the possibility of causing true SCE-1. In light of the present study, 18 h is the most appropriate time for mutagen exposure so that one may study the possibility that lesions are able to cause SCE in the same locus in subsequent divisions. The fact that there is no SCE induction at the same locus in the second and third divisions implies that SCE-eliciting lesions induced by ENU do not transcend SCE occurrence. Perhaps the lesions are repaired by virtue of SCE occurrence; in fact, SCE have been related to post-replication repair (Cleaver *et al.*, 1999; Limoli *et al.*, 2000). Another possibility is that SCE are repaired during the interphase of the subsequent division. The data support the view that lesions are not able to cause SCE in several divisions, but contrast with earlier results in hamster cells *in vitro* and bone marrow *in vivo*, in which the level of SCE remains high throughout multiple divisions after exposure (Latt and Loveday, 1978; Morales-Ramírez *et al.*, 1984). This could be explained by cell subpopulations having different cell cycle durations or, in the case of experiments *in vivo*, by the emergence of defective stem cell division, which replaces the cells killed.

Another explanation for this contradiction could be that the lesions caused by psoralen plus UV and γ -rays, which were the agents used in the previously mentioned studies, display a behavior different from those caused by ENU. However, a study carried out in bone marrow cells of mice, using ENU as the mutagen, indicated that this agent is able to increase SCE frequency when it was given even four cell divisions prior to analysis. These results are more in agreement with our observations that mutagen treatment of cells with unsubstituted DNA with ENU can produce SCE even up to five cell divisions later. This implies that other agents than ENU can also generate long-lasting increases in SCE, not by persistent lesions in DNA, but rather by another mechanism (Charles *et al.*, 1986).

Our data indicate that in addition to the ENU-induced lesions which elicit SCE immediately, i.e. during the same cell division as mutagen exposure, ENU is capable of a constant induction of SCE-2 and SCE-3 by exposure in the first division or even two cell cycles prior to the first division. This could

be interpreted as ENU induction of long-lived lesions in unsubstituted DNA. There is earlier evidence of persistent DNA lesions induced by ENU that are related to SCE production. Proof of such an event was obtained in unsubstituted DNA during G₁ in salivary gland cells (González-Beltrán and Morales-Ramírez, 1999) and for even longer periods in murine peripheral blood and spleen lymphocytes (Tucker *et al.*, 1986), as well as in bone marrow cells (Charles *et al.*, 1986). The aforementioned data obtained in bone marrow cells imply that besides being persistent, ENU-induced lesions are capable of transcending cell division. However, the data presented here demonstrate the induction of a nearly constant frequency of SCE in each of the three successive divisions. The fact that the damage induced in the unsubstituted DNA strands was able to cause SCE even four or five cell cycles later is relevant to the biological meaning of the SCE phenomenon. The topic of lesions causing SCE several divisions later is interesting because, besides its association with cancer (Marginson and Kleihues, 1975), it has basic implications worth mentioning. The most important ones are that the original lesion must be compatible with DNA duplication and that a secondary lesion must be produced (Kaina and Aurich, 1985). A secondary lesion capable of inducing SCE in a subsequent division could be an attractive alternative, but there remains the problem of how to explain the persistence or even the increase in SCE frequency over several divisions.

With regard to this point, it was shown that agents that inhibit DNA methylation are the only ones so far reported that cause an inheritable increment in SCE which remains constant in subsequent divisions (Perticone *et al.*, 1997; Albanesi *et al.*, 1999). Although the mechanism is not known, it has been suggested that SCEs are associated with DNA demethylation by increasing misligation, due to a decreased ability of DNA polymerase to discriminate between the parental and newly synthesized strands. In the case of ENU, the constant induction of SCE in subsequent divisions could be produced by the indirect demethylation of DNA caused by the removal of methylated cytosines during repair. If this process of SCE induction can be generalized to other alkylating agents, the fact is relevant because DNA methylation has been related to several events, such as regulation of gene expression, cell differentiation, aging, etc. (Holliday, 1985; Jones and Vogt, 2000). Because the analysis of SCE induction by demethylating agents was carried out using the usual two-tone protocol, it would be important to determine actual SCE induction during each cell cycle and the manner in which subsequent BrdU substitution affects this induction using the protocol employed in the present study.

The conclusions regarding the relationship between SCE induction and repair of DNA lesions involved in this process in subsequent divisions are as follows: (i) SCE induction by ENU is mainly expressed in the division in which the exposure occurs, indicating that lesions are repaired before the subsequent division; (ii) ENU does not cause lesions capable of inducing SCE at the same site in subsequent divisions in BrdU-substituted DNA, indicating that they are repaired as a consequence of SCE or during the subsequent cell division; (iii) ENU gives rise to long-lasting induction of SCE in unsubstituted DNA, producing a nearly constant increase even five cell divisions after exposure, an event which could not be explained by DNA lesions, but by DNA demethylation, i.e. caused during repair.

Effect of BrdU incorporation into DNA on the induction and persistence of SCE-eliciting lesions

The use of BrdU simplified and permitted accurate scoring of SCE, but it has introduced uncertainty regarding the effect of incorporating this analog on SCE induction by mutagens. The results of the present study, as of our earlier investigations using the TWDS protocol, clearly indicate that BrdU incorporation into DNA increases the sensitivity of cells to SCE induction by exposure to mutagens (Morales-Ramírez *et al.*, 1990, 1992, 1995) and that there is a direct relationship between the number and degree of BrdU substitutions in the strands and the frequency of SCE. BrdU incorporation plays an important role in the sensitivity of cells to SCE induction by ENU, particularly in lesions of immediate expression. Mitomycin C and BrdU substitution have shown an additive effect on SCE induction, yet evidence has been reported that BrdU also sensitizes DNA to the effects of mutagens (Schvartzman and Tice, 1982; Morgan and Wolff, 1984; González-Beltrán and Morales-Ramírez, 1999). In contrast, an inhibitory effect of BrdU substitution was reported for MNNG (Popescu *et al.*, 1980) and for MMS (Ockey, 1981). With respect to ENU in particular, a recent report indicated that BrdU incorporation sensitizes DNA to the induction of SCE by ENU in salivary gland cells, however, these lesions were efficiently repaired during G₁ (González-Beltrán and Morales-Ramírez, 1999). The mechanism of BrdU sensitization has not been established, but it is probably related to reaction of ENU with the additional nucleophilic site represented by the bromine atom.

Although there seems to be a direct relationship between SCE induction by ENU and BrdU incorporation, it was possible to infer that ENU is able to induce SCE in the BrdU-unsubstituted strand. This refutes the idea that BrdU is responsible for all SCE induction by the agents.

The conclusions with respect to the effect of BrdU incorporation on the expression of lesions as SCE are as follows: (i) ENU induces SCE in BrdU-unsubstituted DNA; (ii) BrdU incorporation into DNA increases the sensitivity to SCE induction by ENU and this seems to be directly proportional to BrdU substitution; (iii) ENU increased SCE in BrdU-substituted chromosomes slightly but significantly, even when the treatment occurred before BrdU incorporation.

Acknowledgements

We wish to thank Perfecto Aguilar Vargas, Angel Reyes Pozos and Felipe Beltrán Bibiana for their excellent technical assistance and Rosa María Noriega for English editing. This study was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Project PN-33167-N.

References

- Albanesi, T., Polani, S., Cozzi, R. and Perticone P. (1999) DNA strand methylation and sister chromatid exchanges in mammalian cells *in vitro*. *Mutat. Res.*, **429**, 239-248.
- Chao, C.C., Rosenstein, R.B. and Rosenstein, B.S. (1985) Induction of sister-chromatid exchanges in ICR 2A frog cells exposed to 265-313 nm monochromatic ultraviolet wavelengths and photoactivating light. *Mutat. Res.*, **149**, 443-450.
- Charles, J.L., Jacobson-Kram, D., Condie, L.W., Borzellec, J.F. and Carchman, R.A. (1986) The kinetics of *in vivo* sister chromatid exchange induction in mouse bone marrow cells by ethylnitrosourea and methylnitrosourea. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **84**, 56-65.
- Cleaver, J.E., Afzal, V., Feeney, L. *et al.* (1999) Increased ultraviolet sensitivity and chromosomal instability related to P53 function in the xeroderma pigmentosum variant. *Cancer Res.*, **59**, 1102-1108.

- Conner, M.K., Cheng, M. and Biegel, J.A. (1984) A path probability model for sister-chromatid exchanges induced by alkylating agents. *Mutat. Res.*, **126**, 35-46.
- Cortés, F., Piñero, J. and Ortiz, T. (1993) Importance of replication fork progression for the induction of chromosome damage and SCE by inhibitors of DNA topoisomerases. *Mutat. Res.*, **303**, 71-76.
- Cortés, F., Daza, P., Piñero, J. and Escalza, J. (1994) Evidence that SCEs induced by mutagens do not occur at the same locus in successive cell cycles: lack of cancellation in three-way stained CHO chromosomes. *Environ. Mol. Mutagen.*, **24**, 203-207.
- Cummings, D.E. (1975) Implications of somatic recombination and sister chromatid exchange in Bloom's syndrome and cells treated with mitomycin C. *Hungaricae Genet.*, **28**, 191-196.
- Dillehay, L.E., Jacobson-Kram, D. and Williams, Jr (1989) DNA topoisomerases and models of sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.*, **215**, 15-23.
- Dressler, D. and Potter, H. (1982) Molecular mechanisms in genetic recombination. *Annu. Rev. Biochem.*, **51**, 727-761.
- Dufraix, R.J. (1981) A conformation based hypothesis for the mechanism of sister chromatid exchange formation. *Mamm. Chromosom. Newslett.*, **22**, 1-2.
- Escalza, P., Piñero, J. and Cortés, F. (1989) A standardized method for the three-way differential staining of plants chromosomes and the scoring of SCE per cell cycle. *Mutat. Res.*, **216**, 203-209.
- González-Beltrán, F. and Morales-Ramírez, P. (1999) *In vivo* repair during G1 of DNA lesions eliciting sister-chromatid exchanges by methylnitrosourea or ethylnitrosourea in BrdU substituted or unsubstituted DNA in murine salivary gland cells. *Mutat. Res.*, **425**, 239-247.
- Goto, K., Akematsu, T., Shimazu, H. and Sugiyama, T. (1975) Simple differential Giemsa staining of sister chromatids after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining. *Chromosoma*, **53**, 223-230.
- Holden, J.L.E., Barrett, J.F., Huntington, C.M., Muehlbauer, P.A. and Waldenburg, M.G. (1989) Genetic profile of a malidixic acid analog: a model for mechanism of sister chromatid exchange induction. *Environ. Mol. Mutagen.*, **13**, 238-252.
- Holliday, R. (1985) The significance of DNA methylation in cellular aging. *Basic Life Sci.*, **35**, 269-283.
- Ishi, Y. and Bender, M.A. (1978) Factor influencing the frequency of mitomycin-C-induced sister chromatid exchanges in 5-bromodeoxyuridine substituted human lymphocytes in culture. *Mutat. Res.*, **51**, 411-418.
- Ishi, Y. and Bender, M. (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.
- Iveti, J.L. and Tice, R.R. (1982) Average generation time: a new method of analysis and quantitation of cellular proliferation kinetics. *Environ. Mutagen.*, **4**, 358.
- Jones, P.A. and Vogel, P.K. (2000) *DNA Methylation and Cancer*. Springer-Verlag, New York, NY, p. 170.
- Kaina, B. and Aurich, O. (1985) Dependency of the yield of sister-chromatid exchanges induced by alkylating agents on fixation time. Possible involvement of a secondary lesion in sister-chromatid exchange induction. **149**, 451-461.
- Kato, H. (1974) Possible role of DNA synthesis in formation of sister chromatid exchanges. *Nature*, **252**, 739-741.
- Kato, H. (1977) Mechanisms of sister chromatid exchanges and the relation to 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.
- Latt, S.A. and Loveday, K.S. (1978) Characterization of sister chromatid exchange induction by 8-methoxypsoralen plus near UV light. *Cytogenet. Cell Genet.*, **21**, 184-200.
- Lavin, M.F. (1978) Post-replication repair in mammalian cells after ultraviolet irradiation: a model. *Biophys. J.*, **23**, 247-256.
- Limoli, C.L., Giedzinski, E., Morgan, W.F. and Cleaver, J.E. (2000) Inaugural article. Polymerase eta deficiency in the xeroderma pigmentosum variant uncovers an overlap between the S phase checkpoint and double-strand break repair. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 7939-7946.
- Linnainmaa, K. and 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.
- Marginson, G.P. and Kleihues, P. (1975) Chemical carcinogenesis in the nervous system: preferential accumulation of O⁶-methylguanine in rat brain deoxyribonucleic acid during repetitive administration of N-methyl-N-nitrosourea. *Biochem. J.*, **148**, 521-525.
- Morales-Ramírez, 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. and Rodríguez-Reyes, R. (1984a) *In vivo* persistence of sister chromatid exchange (SCE) induced by gamma rays in mouse bone marrow cells. *Environ. Mutagen.*, **6**, 529-537.
- Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T., Rodríguez-Reyes, R. (1984b) In Tice, R.R. and Hollaender, A. (eds), *Sister Chromatid Exchange*. Plenum Press, New York, NY, pp. 599-611.
- Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T. and Rodríguez-Reyes, R. (1988) Occurrence *in vivo* of sister chromatid exchanges at the same locus in successive cell divisions caused by nonrepairable lesions induced by gamma rays. *Environ. Mol. Mutagen.*, **11**, 183-193.
- Morales-Ramírez, P., Rodríguez-Reyes, R. and Vallarino-Kelly, T. (1990) Fate of DNA lesions that elicit sister-chromatid exchanges. *Mutat. Res.*, **232**, 77-88.
- Morales-Ramírez, P., Rodríguez-Reyes, R. and Vallarino-Kelly, T. (1992) *In vivo* fate of MMS-induced DNA lesions that elicit SCE. *Mutat. Res.*, **272**, 215-221.
- Morales-Ramírez, P., Rodríguez-Reyes, R. and Vallarino-Kelly, T. (1995) Fate of lesions that elicit sister chromatid exchanges (FLE-SCE) produced in DNA by alkylating agents *in vivo*. *Mutat. Res.*, **344**, 13-26.
- Morgan, W.F. and Wolff, S. (1984) Effect of 5-bromodeoxyuridine substitution on sister chromatid exchange induction by chemicals. *Chromosoma*, **89**, 285-289.
- Nishi, Y., Hasegawa, M.M., Inui, N., Ikegami, S. and Yamada, M.-A. (1982) Effect of post-treatment with aphidicolin - a specific inhibitor of DNA polymerase α - on sister-chromatid exchanges induced by ethyl methanesulfonate. *Mutat. Res.*, **103**, 155-159.
- Oekey, C.H. (1981) Methyl methane-sulphonate (MMS) induced SCEs are reduced by the BrdU used to visualize them. *Chromosoma*, **84**, 243-256.
- Perry, P. and Wolff, S. (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, **251**, 156-158.
- Perlicone, P., Gensibella, G. and Cozzi, R. (1997) Damage proneness induced by genomic DNA demethylation in mammalian cells cultivated *in vitro*. *Mutagenesis*, **12**, 259-264.
- Popescu, N.C., Amshaugh, S.A. and DiPaolo, J.A. (1980) Reduced N-methyl-N-nitrosoguanidine sister chromatid exchange induction in Chinese hamster V79 cells pre-exposed to 5-bromodeoxyuridine. *Chromosoma*, **76**, 329-338.
- Schneider, E.L., Sternberg, H. and Tice, R.R. (1977) *In vivo* analysis of cellular replication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **74**, 2041-2044.
- Schwartzman, J.B. and Goyanes, V. (1980) A new method for identification of SCE's per cell cycle in BrdUrd substituted chromosomes. *Cell Biol. Int. Rep.*, **4**, 415-423.
- Schwartzman, J.B. and Tice, R.R. (1982) 5-Bromodeoxyuridine and its role in the production of sister chromatid exchange. In Sandberg, A.A. (ed.), *Sister Chromatid Exchange*. Alan R. Liss, New York, NY, pp. 123-134.
- Schwartzman, J.B., Goyanes, V.J., Campos, A., Lage, A.M., Veiras, C., Silva, M.C. and Ramos, S. (1985) Persistence of DNA lesions and the cytological cancellation of sister chromatid exchanges. *Chromosoma*, **92**, 7-10.
- Shafer, D.A. (1977) Replication bypass model of sister chromatid exchanges and implications for Bloom's syndrome and Fanconi's anemia. *Hum. Genet.*, **39**, 177-190.
- Stetka, D.G., Jr (1979) Further analysis of the replication bypass model for sister chromatid exchange. *Hum. Genet.*, **49**, 63-69.
- Sonoda, E., Susaki, M.S., Morrison, C., Yamaguchi-Iwai, Y., Takata, M. and Takeda, S. (1999) Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 5166-5169.
- Tucker, J.D., Strout, C.L., Christensen, M.L. and Carrano, A.V. (1986) Sister chromatid exchange induction and persistence in peripheral blood and spleen lymphocytes of mice treated with ethylnitrosourea. *Environ. Mutagen.*, **8**, 345-355.
- Wei, L.Y., Hou, R.F., Jan, K.Y. and Wang, T.C. (1993) Factors affecting zero background frequency of sister-chromatid exchange in mosquito cells. *Mutagenesis*, **8**, 179-182.
- Wolff, S., Bodycote, J. and Painter, R.B. (1974) Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by U.V. irradiation at different stages of cell cycle: the necessity for cell to pass through S. *Mutat. Res.*, **25**, 73-81.

Received on May 30, 2002; revised on August 22, 2002;
accepted on August 26, 2002

78

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN