

00381



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**REPARABILIDAD DURANTE G1 DE LAS LESIONES
INDUCTORAS DE INTERCAMBIOS EN LAS CROMÁTIDAS
HERMANAS INDUCIDOS POR AGENTES ALQUILANTES EN
ADN SUSTITUIDO Y NO SUSTITUIDO CON BrdU,
EN CÉLULAS DE LA GLÁNDULA SALIVAL DE RATÓN *IN VIVO*.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

PRESENTA:

M. en C. FRANCISCO GONZÁLEZ BELTRÁN

DIRECTOR DE TESIS:

DR. PEDRO ROSENDO MORALES RAMÍREZ

MÉXICO, D.F.

JULIO DE 2004



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.

EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN EL
LABORATORIO DE CITOGÉNICA DE MAMÍFEROS DEL DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
NUCLEARES Y ES PARTE DEL PROYECTO 33167-N FINANCIADO POR
CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Pedro R. Morales Ramírez, por la asesoría brindada para la realización de este trabajo, por el apoyo que siempre me ha ofrecido y por el interés que en todo momento aportó para la culminación de esta tesis. Mi reconocimiento al investigador con profunda vocación para generar conocimiento.

Expreso mi agradecimiento a los miembros del jurado:

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Dra. Patricia Ramos Morales

Dr. Pedro Rosendo Morales Ramírez

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Dra. Elia Roldan Reyes

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

Por su atención e interés para mejorar en lo posible este trabajo con sus comentarios y sugerencias.

Agradezco el gran apoyo y colaboración de mis compañeros del laboratorio:
Teresita Vallarino K., Vicky Cruz V., Regina Rodríguez R., Mary Tere Mendiola C.
y Pedro Morales R.

Agradezco el valioso apoyo técnico de mis compañeros Perfecto Aguilar V, Angel
Reyes P, Miguel Angel García y Felipe Beltrán V.

Mi agradecimiento a los compañeros del Centro de Información y Documentación
del ININ, por el servicio de la búsqueda de la información científica solicitada.

Agradezco a las autoridades del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares
las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

Dedico con especial cariño y amor esta tesis a mi esposa Tere por haber compartido juntos parte de nuestras vidas, por apoyarme en todo momento, por confiar en mí y por prodigar amor a mí y a nuestros hijos.

A mis adorados hijos: Sandy y Paco

Por darme la felicidad de sentirme padre de dos seres especiales, que han colmado de amor mi existencia, comparto con ustedes este logro y espero que compartamos muchos más.

A mí querida madre Guille

A mis queridos hermanos Lupita, Vicky, Rosa, Gloria y Toño por mostrar siempre su confianza, amarnos como familia y apoyarnos para seguir adelante.

A la memoria de mi padre Sr. Onésimo González por haberme guiado por el camino de la unión familiar, el respeto y principios que en todo momento estarán presentes en mi recuerdo.

A la memoria de mi hermano Marcelino con quien me hubiera gustado compartir estos logros.

A mis sobrinos con mis mejores deseos, para que logren sus propósitos.

A mis compañeros del Departamento de Biología.

Con estimación a mi amigo Felipe.

JULIO, 2004

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| Abreviaturas | 1 |
| 1. Resumen | 4 |
| 2. Introducción | 5 |
| 2.1. Daño al ADN | 7 |
| 2.2. Estrés Celular | 9 |
| 2.3. Estrés Oxidativo | 12 |
| 2.4. Agentes Alquilantes | 13 |
| 2.5. Reparación del Daño al ADN | 19 |
| 2.5.1 Reparación por Alquilguanina Transferasa | 20 |
| 2.5.2 Reparación por Escisión de Bases (BER) | 22 |
| 2.5.3 Reparación por Escisión de Nucleotidos (NER) | 23 |
| 2.5.4 Reparación por Apareamiento Erróneo (MMR) | 25 |
| 2.5.5 Reparación de Rompimientos Dobles en el ADN | 29 |
| 2.5.5.1 Recombinación Homóloga | 30 |
| 2.5.5.2 Reparación por Unión de Extremos no Homólogos (NHEJ) | 31 |
| 2.6 Lesiones en el ADN que inducen ICH _s | 32 |
| 2.6.1 Formación de los ICH _s | 34 |
| 2.7 Efecto de la BrdU | 34 |
| 2.8 Farmacocinética de los AA | 35 |
| 3. Marco Teórico | 37 |
| 3.1. Antecedentes | 37 |
| 3.2. Pregunta | 37 |
| 3.3. Hipótesis Alternativas | 37 |
| 3.4. Hipótesis de Trabajo | 38 |
| 3.5. Justificación | 38 |
| 3.6. Objetivos | 38 |
| 3.6.1 Objetivo Principal | 38 |
| 3.6.2 Objetivos Particulares | 39 |
| 4. Materiales y Métodos | 40 |

| | | |
|------|--|-----|
| 4.1. | Protocolo | 40 |
| 4.2. | Preparación de las laminillas | 41 |
| 4.3. | Tinción diferencial | 42 |
| 4.4. | Análisis estadístico | 42 |
| 5. | Resultados | 43 |
| 5.1. | Toxicidad de los compuestos | 43 |
| 5.2. | Inducción de ICH _s por la exposición a los AA en G1 temprana y tardía | 43 |
| 5.3. | Eficiencia de los AA para inducir ICH _s por célula | 46 |
| 5.4. | Efecto de la sustitución de BrdU en una cadena sobre la eficiencia de los AA para inducir ICH _s | 48 |
| 5.5. | Comparación de la reparación de lesiones inductoras de ICH _s en 1 ^a y 2 ^a división | 49 |
| 5.6. | Análisis de la susceptibilidad a la inducción y reparación de lesiones inductoras de ICH _s en las poblaciones celulares | 55 |
| 6. | Discusión | 61 |
| 6.1. | Eficiencia inductora de ICH _s de los AA en células con ADN sustituido y no con BrdU | 61 |
| 6.2. | Efecto de la incorporación de BrdU en el ADN, sobre las lesiones inductoras de ICH _s | 65 |
| 6.3. | Probabilidad de expresión de las lesiones inductoras de ICH _s durante G1 en ADN sustituido y no con BrdU | 70 |
| 6.4. | Reparación de las lesiones inductoras de ICH _s | 73 |
| 6.5. | Estrés Celular | 85 |
| 6.6. | Apoptosis | 87 |
| 7. | Conclusiones | 90 |
| 8. | Referencias | 91 |
| 9. | Apéndice | 116 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| AA | Agentes Alquilantes |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| AGT | O6 Alquilguanina ADN alquiltransferasa |
| AMMN | Acetoximetil-metilnitrosamina |
| BER | Reparación por Escisión de Bases |
| BrdU | 5-Bromo-2-desoxiuridina |
| DSB | Rompimientos dobles en el ADN |
| ENU | N-Etil-N-Nitrosourea |
| EMS | Etil metanosulfonato |
| HCl | Ácido clorhídrico |
| H ₂ O | Agua |
| HR | Reparación por recombinación homóloga |
| ICH _s | Intercambios Entre Cromátidas Hermanas |

| | |
|---|--|
| KCl | Cloruro de potasio |
| KH_2PO_4 | Fosfato de potasio monobásico |
| 3-MeA | N3-metiladenina |
| 3-MeG | N3-metilguanina |
| Me-Lex | Metil-lexiprosin |
| MGMT | O6-metilguanina metil transferasa |
| MMR | Reparación por error de apareamiento |
| MMS | Metil metanosulfonato |
| MNNG | N-Metil-N-Nitro-N-Nitrosoguanidina |
| MNU | N-Metil-N-Nitrosourea |
| NMUR | Nitrosometil uretano |
| $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | Citrato de sodio |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| NaHCO_3 | Bicarbonato de sodio |
| NHEJ | Reparación por recombinación no homóloga |

| | |
|---|--|
| NaH ₂ PO ₄ | Fosfato de sodio monobásico |
| Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O | Fosfato de sodio dibásico heptahidratado |
| NaOH | Hidróxido de sodio |
| N7-MeG | N7-metilguanina |
| NER | Reparación por escisión de nucleotidos |
| O ⁶ -EtG | O6-etilguanina |
| O ⁴ -EtT | O4-etiltimina |
| O ⁶ -MeG | O6-metilguanina |
| O ⁴ -MeT | O4-metiltimina |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| SSB | Rompimientos sencillos en el ADN |

1. RESUMEN

En este trabajo se determinó la reparación de las lesiones inductoras de Intercambios entre Cromátidas Hermanas (ICH_s) generadas en las células de la glándula salival de ratón, por el tratamiento con la N-Metil-N-Nitrosourea (MNU), la N-Etil-N-Nitrosourea (ENU), el Metil metanosulfonato (MMS) y el Etil metanosulfonato (EMS) en G1 temprana y tardía de la primera y la segunda división celular, es decir antes y después de que las células incorporaron 5-Bromo-2-Desoxiuridina (BrdU) en el ADN. Se incluyeron grupos testigo no tratados con mutágeno.

Las células de la glándula salival repararon parcialmente las lesiones generadas por la MNU, el MMS y el EMS en la 1^a división, y sólo las lesiones inducidas por la ENU y MMS fueron reparadas parcialmente en la 2^a división. La ENU generó lesiones que no se repararon en la 1^a división y las producidas por el EMS fueron poco reparadas en la 2^a división. Los agentes metilantes generaron más ICH_s que los etilantes.

Se observó que la BrdU hace a la molécula del ADN más susceptible al daño generado por los agentes alquilantes que inducen la formación de los ICH_s. Esta susceptibilidad se incrementó alrededor del 150% por el tratamiento con la MNU, la ENU y el MMS, en cambio para el EMS fue 3 veces menor. Se propone que el átomo electronegativo de este análogo de la timina podría funcionar como un centro nucleofílico con el cual reaccionan los compuestos electrofílicos.

2. INTRODUCCIÓN

Los Intercambios entre Cromátidas Hermanas (ICH_s) son manifestaciones celulares de rompimientos en la doble cadena con intercambio recíproco del ácido desoxirribonucleico (ADN) en sitios homólogos de las dos cromátidas de un cromosoma (Meschini y col., 1996). Este evento se puede presentar en cualquier célula eucariótica o línea celular que se encuentre en continua división y también en las que se pueda inducir la división celular. Los ICH_s (figura 1) se han observado en una gran variedad de especies eucarióticas de plantas a insectos peces y mamíferos (Tucker y col., 1993). Las bases moleculares de formación de los ICH_s no se conocen (Stephanou y col., 1996) aunque se han propuesto algunos modelos que tratan de explicar este fenómeno (Tucker y col., 1993). Si bien no hay argumentos que conduzcan a aceptar o rechazar un modelo en particular, el esclarecimiento de este mecanismo ayudará a entender su significado biológico.



Figura 1. Foto micrografía de una célula de glándula salival de ratón en metafase no tratada con AA, la flecha indica un ICH_s.

El ensayo de los ICH_s se ha usado como un indicador sensible del daño ocasionado en el ADN de las células, cuando estas han sido expuestas a agentes mutagénicos o carcinogénicos físicos, químicos o biológicos (Perry y Evans, 1975; Nishi, y col., 1984) ver figura 2. Se cree que es un proceso recombinacional que puede presentarse espontáneamente, o bien que se origina por lesiones en el ADN que persisten antes del período de síntesis del ADN (Wolff y col., 1974; Kato, 1980) o que incluso podrían originarse en la horquilla de la replicación (Painter, 1980) como consecuencia de errores de la replicación del ADN. Se han obtenido evidencias de que este evento es también causado por la inhibición de la síntesis del ADN o de las enzimas involucradas en este proceso (Rainaldi y Mariani, 1982). Recientemente se ha propuesto que los ICH_s se forman principalmente por la vía de la recombinación homóloga (Sonoda y col., 1999; Dronkert y col., 2000; Wang y col., 2003).

Por otro lado, no hay mucha evidencia sistematizada de que las células sean capaces de reparar las lesiones que originan los ICH_s (Lambert y col., 1984). Sin embargo estudios recientes muestran que algunas de las lesiones que han sido relacionadas con la formación de los ICH_s pueden ser eliminadas por los sistemas de reparación de las células (Pegg, 2000; Mates y col., 1996; Engelward y col., 1998).

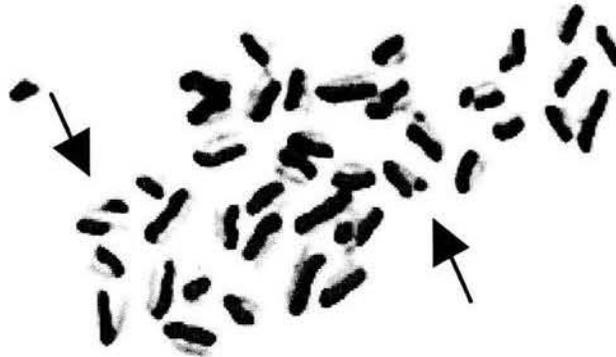


Figura 2. Foto micrografía de una célula de la glándula salival de ratón en metafase tratada con AA, las flechas indican algunos ICH_s.

Se ha sugerido que las lesiones en el ADN que no fueron reparadas durante G1 podrían causar ICH_s en la siguiente división (Morimoto, 1983), y si ellas trascienden el período de síntesis del ADN pueden causar ICH_s en divisiones sucesivas (Morales-Ramírez y col., 1984a, 1988, 1990, 1992, 1995a) a menos que fueran reparadas durante la subsecuente G1. El estudio de la persistencia de las lesiones en el ADN es importante porque hay evidencia de que ésta podría estar relacionada con transformación celular y cáncer (Marginson y Kleihues, 1975). Estas lesiones podrían ser consideradas como eventos iniciales de la interacción de los carcinógenos con el ADN y parecen ser un indicador de mutagénesis y carcinogénesis (Popescu y col., 1981).

2.1 Daño al ADN

El daño al ADN no es evitable por completo, aunque hay un número de estrategias de defensa que minimizan el riesgo de que estas alteraciones sean permanentes.

Estos sofisticados sistemas de protección han sido altamente conservados por el proceso evolutivo (Hart y Frame, 1996).

El ADN es blanco de muchos agentes endógenos y exógenos que lo dañan de diferentes formas, los principales tipos de daño ya se han revisado (Norbury y Hickson, 2001; Lees-Miller, 2004) de los cuales se pueden citar: a) despurinización hidrolítica es la pérdida de las bases púricas por incisiones en las uniones glicosídicas, lo cual crea sitios abásicos. Esto puede ocurrir espontáneamente debido a las condiciones fisiológicas de la célula, b) desaminación hidrolítica es la pérdida de los grupos amino de las bases, por ejemplo la citosina se transforma a uracilo, la 5 metilcitosina y la adenina a hipoxantina; lo anterior también puede ser debido a las condiciones fisiológicas de la célula, c) oxidación es la formación de especies de oxígenos muy reactivos como: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical súper óxido (O_2^*) y el radical hidroxilo (OH^*); que reaccionan con el ADN y son producto del metabolismo oxidativo.

El daño oxidativo altera las bases formando la 7,8-dihidro-8-oxoguanina comúnmente llamada 8-oxoguanina, ésta es una lesión más estable y frecuente en las purinas, también es altamente mutagénica porque puede aparearse erróneamente casi con igual eficiencia con la adenina y la citosina durante la replicación, produciendo transversiones GC:TA y TA:GC (Linhahl y Wood, 1999; Slupphaug y col., 2003); este daño también causa rompimientos de cadena sencillos y dobles; otra lesión que se presenta en las bases pirimidicas es la 5,6-dihidro-5,6-dihidroxitimina también conocida como glicoles de timina, esta alteración bloquea la replicación del ADN lo cual es letal para las células, d) alquilación, las células vivas contienen una gran variedad de moléculas reactivas que pueden causar daño al ADN y actúan como agentes genotóxicos. La mejor caracterizada es la *S*-adenosilmetionina, que es una molécula donadora de metilos para un número de procesos celulares de biometilación, cuya reacción es similar a un débil agente alquilante (Kleibl, 2002).

En trabajos recientes se ha sugerido que el origen más importante de la alquilación endógena en el ADN es la nitrosación bacteriana de aminoácidos y péptidos por la vía de la formación de óxido nítrico. También mutagénos potentes incluyendo las nitrosaminas y compuestos relacionados, bisulfitos e hidroxilaminas son sintetizados por los humanos como resultado de procesos metabólicos normales, a menudo en cantidades muy considerables. De particular importancia es el daño causado por compuestos alquilantes naturales y sintéticos presentes en alimentos, bebidas, tabaco, etcétera. Otra fuente la constituye la contaminación generada por las actividades humanas en la industria y/o la agricultura y por el tratamiento de enfermedades (Kleibl, 2002).

2.2 Estrés Celular

Los agentes que dañan al ADN estimulan una compleja respuesta celular que consiste de una cascada de señales de trasducción y activación de factores que inducen la expresión de muchos genes que están involucrados en funciones celulares tales como: reparación del ADN, cambios en la estructura de la cromatina en el sitio dañado, arresto del ciclo y muerte celular. El retraso o arresto de las células en la transición de las fases del ciclo de G1 a S o de G2 a M, y la sobre regulación de las proteínas involucradas en la reparación, esta determinado por los puntos de control del ciclo celular, que modulan estas actividades hasta que el daño al ADN se ha reparado (Rouse y Jackson, 2002; Yan y col., 2004).

La célula está constituida por una batería de proteínas que funcionan como sensores y que se unen preferencialmente a ciertas clases de lesiones en el ADN como MutS, que se une a las bases erróneamente apareadas y el heterodímero Ku que se une a rompimientos de cadena doble (Rouse y Jackson, 2002). p53 es el regulador primario de G1 en células de humanos y de ratones que puede prevenir el inicio de la fase S; para evitar problemas de replicación del ADN dañado. Chk1 parece ser el principal efector de G2 a M, así como también p53, que retrasan la transición de las células a mitosis, preservando la oportunidad de

usar la reparación por recombinación y reducir la posibilidad de segregación errónea de pequeños fragmentos de cromosomas (Aguda, 1999; McGowan, 2003).

Después de la acción de los sensores se activa el sistema de los transductores (compuesto por una cascada de proteincinasas) los cuales amplifican y diversifican las señales que transducen a las moléculas efectoras de la respuesta del daño al ADN (Yan y col., 2004).

Los AA monofuncionales una vez activados también inducen diversos aspectos de estrés celular severo incluyendo: aberraciones cromosómicas, intercambios entre cromátidas hermanas y otros efectos, que se analizarán más adelante. Agentes tales como: la acetoximetil-metilnitrosamina (AMMN), el nitrosometil-uretano (NMUR), el MMS, la MNU y la N-Metil-N-Nitro-Nitrosoguanidina (MNNG) inducen un programa específico de expresión génica que se conoce como respuesta al estrés celular, la cual es activada comúnmente por una variedad de factores ambientales como agentes químicos carcinógenos y radiación ultravioleta. Este programa incluye activación de la actividad JNK/SAPK y p38 requerida para la activación transcripcional de los genes *c-fos* y *c-jun* para los cuales se ha propuesto que son requeridos en la defensa celular contra agentes genotóxicos como la radiación ultravioleta (Wilhelm y col., 1997; Wichmann y col., 2003).

La proteincinasa mitogeno-activada (MAPKs) realiza un papel central en la transmisión de las señales inducidas por el estrés, estimulando a blancos celulares específicos causados por los agentes genotóxicos. Los estudios indican que se inducen dos subclases de estas cinasas p46/54 JNK/SAPKs y p38, la proteincinasa JNK (proteincinasa Jun N-terminal), que también se conoce como SAPK (proteincinasa estrés-activada) y otra proteincinasa reguladora de la señal extracelular (ERK) son los tres miembros principales de la familia MAPK. Una de las reacciones primarias de la célula en respuesta al tratamiento con los agentes metilantes y el estrés celular es la activación del proto-oncogene *c-jun* que es

miembro de una familia de multiproteínas que ha sido implicado con un número de señales de trasducción asociadas con: el crecimiento celular, diferenciación, excitación neuronal y estrés celular. Además se considera que también se requiere para la defensa celular contra toxicidad (Wilhelm y col., 1997).

El MMS y MNNG, son potentes activadores de la actividad JNK/SAPK y p38, la cual esta muy relacionada con que ambos compuestos tienen una afinidad muy similar por los sitios nucleofílicos. En tanto que la ENU otro mutágeno estudiado por estos autores ataca a sitios nucleofílicos diferentes, por lo que los productos de la alquilación difieren de los agentes metilantes mencionados. Sin embargo la ENU fue incapaz de activar la actividad JNK/SAPK (Wilhelm y col., 1997).

Los compuestos AMMN, NMUR y MNU estimulan la activación de ERK, aunque estos tres compuestos inducen la O⁶-MeG los resultados indican que no hay una relación entre los niveles de formación de este aducto y los niveles de activación de MAPK (Wichmann y col., 2003).

Se ha propuesto que probablemente el MMS metila directamente las proteínas implicadas en la señal de trasducción como MEKK1, PAKs, Cdc42, Rho y/o Rac1, y de esta forma las activa cambiando su conformación (Wilhelm y col., 1997).

Las especies sobreviven y se reproducen bajo un amplio rango de condiciones ambientales debido a su habilidad para adaptarse. Por ejemplo los cambios adaptativos suceden cuando los organismos son expuestos crónicamente a: ácidos, privación de alimento, calor excesivo, radiación, daño por estrés, ejercicio físico y otros más. Aunque los estresores son muy diferentes amenazan el potencial reproductivo de las especies, sin embargo su habilidad a normalizar estos eventos ha proveído a algunas especies de ventajas selectivas. Aunque también los cambios adaptativos a menudo ocurren a largo tiempo y este proceso puede alterar el comportamiento, la reproducción, la susceptibilidad a las enfermedades y la vida (Hart y Frame, 1996).

2.3 Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo es un estado en el cual las especies reactivas de oxígeno (ROS) también conocidas como radicales libres, exceden la capacidad del sistema de defensa antioxidante en células y tejidos causando daño a las biomoléculas como lípidos, proteínas y ADN (Slupphaug y col., 2003; Wilson 3rd y col., 2003). Estas ROS tales como el peróxido de hidrógeno, súper óxido y radicales hidroxilo son productos intermediarios del metabolismo del oxígeno dentro de las células en todos los organismos aerobios. Este proceso se realiza en mitocondria donde la cadena respiratoria combina oxígeno y electrones generando esencialmente energía (ATP) (Hagen y col., 1999; Wilson 3rd y col., 2003). Se han identificado más de 20 diferentes tipos de daño a las bases después de la exposición al estrés oxidativo (Slupphaug y col., 2003). Sin embargo cuando este daño es transitorio y moderado, no es letal y los radicales pueden ser desintoxicados dentro de pocas horas, por esto el concepto de “estrés oxidativo.” (Morel y Barouki, 1999).

El ataque oxidativo por radicales OH a las desoxirribosas permite la liberación de bases del ADN, generando rompimientos de cadena y sitios abásicos que representan uno de los mayores daños causado por ROS. Sin embargo estas alteraciones son corregidas por dos líneas de defensa que poseen las células, la primera la constituyen las enzimas antioxidantes como: las súper óxido dismutasas, las glutatión peroxidasas y catalasas; así como también moléculas antioxidantes de bajo peso molecular como las vitaminas A y E, el ácido ascórbico y glutatión. La segunda línea de defensa son los mecanismos de reparación del ADN: escisión de bases (BER), por error de apareamiento (MMR), recombinación homóloga (HR), recombinación no homóloga (NHEJ), genoma global (GGR), y transcripción acoplada (TCR) (Slupphaug y col., 2003). Las lesiones sencillas causadas por oxidación de las bases son eliminadas esencialmente por el sistema BER mediante las glicosilasas y en procesos más complejos que involucran lesiones que contienen oligonucleótidos son reparadas por escisión de nucleótidos (NER) (Cooke y col., 2003).

BER es la principal ruta de remoción de lesiones del ADN endógenas que causan distorsiones menores a la doble hélice (Lindahl T., 1993). También es requerida para reparar tipos de daño a las bases similar al causado por agentes ambientales, tales como alquilación de nitrosaminas y de radiación ionizante. El daño de origen endógeno incluye el causado por procesos hidrolíticos, tales como la desaminación de la citosina, adenina y guanina; la pérdida hidrolítica de bases (principalmente purinas), y la oxidación (Slupphaug y col., 2003).

La apoptosis funciona como otra estrategia de las células para minimizar el daño (Steller, 1995). Este proceso puede ser estimulado en algunos tipos celulares como respuesta al estrés celular, sin embargo este evento no ha sido bien estudiado en el contexto de la toxicología porque los bioensayos se han enfocado tradicionalmente sobre un rango de dosis altas; donde la necrosis celular es la medida patológica común (Hart y Frame, 1996). El estrés oxidativo tiene una fuerte influencia sobre el ciclo celular en algunos tipos celulares de mamíferos, en los que se observó que concentraciones macromoleculares de peróxido de hidrógeno (que no inducen apoptosis) indujeron arresto temporal y alargamiento del ciclo celular (Morel y Barouki, 1999)

La apoptosis no sólo es importante como mecanismo de defensa, sino que también es esencial para conservar constante el número de células en los tejidos, porque opera dentro del rango que es consistente con homeostasis lo cual es benéfico (Hart y Frame, 1996).

Cuando cambian las condiciones ambientales a menudo se estimula la respuesta de las proteínas del estrés a nivel celular e involucra la estimulación de la reparación del ADN, cambios del ciclo celular, y muerte celular programada para eliminar las células dañadas (Hart y Frame, 1996).

2.4 Agentes Alquilantes

Los agentes alquilantes (AA) representan un grupo grande de compuestos que difieren en sus reacciones químicas y que causan diversos efectos biológicos en los organismos vivos, entre esos se incluyen: reparación de ADN, inducción de mutaciones, carcinogénesis, clastogénesis, muerte celular, arresto del ciclo celular y teratogénesis (Kleibl, 2002; Margison y Santibáñez-Korev, 2002). Estudios recientes han demostrado que los agentes metilantes también pueden estimular señales de trasducción lo cual puede afectar el destino y la función celular (Wilhelm y col., 1997).

Los AA son compuestos electrofílicos (deficientes en electrones) capaces de reaccionar con átomos ricos en electrones (sitios nucleofílicos) que se encuentran en las moléculas biológicamente importantes ADN, ácido ribonucleico (ARN) y proteínas, a las cuales se unen covalentemente (Carlson, 1990). Durante este proceso se realiza la transferencia de los grupos alquilo de los AA, a los diferentes sitios nucleofílicos de los ácidos nucleicos, originando con esto una variedad de lesiones a las bases y los fosfotriésteres (Beranek, 1990), los aductos formados son numerosos y están ilustrados en la figura 3. Se ha sugerido que esta reacción de sustitución nucleofílica es mediante la formación de un ión alquilcarbonio intermediario el cual rápidamente reacciona con los sitios nucleofílicos para producir la alquilación (Valanis y col., 1994). Si esta reacción sigue el primer orden de la cinética, la velocidad de la reacción depende sólo de la concentración del agente alquilante (electrófilo) y es independiente de la concentración del sustrato, proceso que se conoce como mecanismo S_N1 , o bien, que las reacciones sigan el segundo orden de la cinética y dependan de las concentraciones del agente alquilante y de la nucleofilicidad del sitio con el cual reaccionan; a este proceso se le llama mecanismo S_N2 (Hemminiki, 1983; Hemminiki y Ludlum, 1984).

Agentes como las nitrosoureas que siguen reacciones del tipo S_N1 , son aptas para sustituir los átomos de oxígeno del ADN y esterificar los grupos fosfato de la cadena polinucleotídica (Singer, 1976). Los agentes alquilantes que reaccionan

por el mecanismo S_N2 tienen una alta preferencia hacia los sitios más nucleofílicos, tales como el N7 de la guanina (Hemminiki, 1983).

El grado de reacción de los agentes alquilantes por uno u otro mecanismo está definido por la constante de Swain-Scott, que permite comparaciones de la reactividad química de varios agentes alquilantes y también compara la reactividad del agente con la reactividad del ión hidróxido (Swain y Scott, 1953). En el mecanismo S_N1 al incrementar la reacción también aumenta la reactividad hacia los átomos oxígeno, mientras la tendencia a reaccionar vía mecanismo S_N2 disminuye.

Los compuestos químicos con una potencia carcinogénica alta tienen una baja selectividad nucleofílica y por lo tanto actúan a través de alquilaciones de los átomos de oxígeno. Estos agentes como la MNU y la ENU, tienen una constante de Swain Scott (s) baja 0.42 y 0.26, respectivamente comparada con los metanosulfonatos como el MMS y el EMS que es de 0.83 y 0.67 respectivamente (Beranek, 1990). Así la proporción O^6 -/N7-alquilguanina decrece si incrementa s como los agentes MMS y EMS (Vogel y Nivard, 1994).

Al comparar la eficiencia para reaccionar con el átomo O^6 de la guanina de los agentes del tipo S_N1 como la MNU se observó que este AA fue 100 veces más eficiente que el MMS (Bignami y col., 2000).

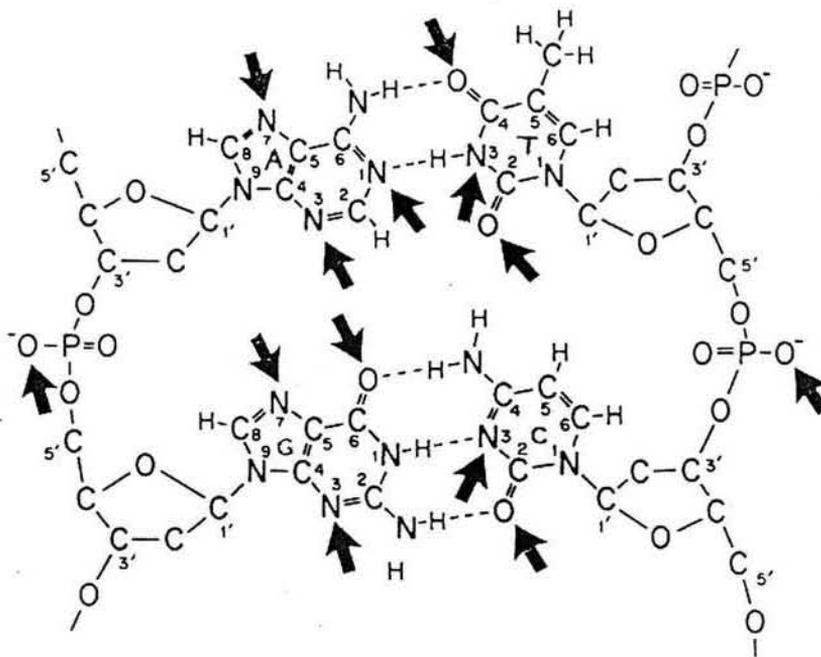


Figura 3. Principales sitios de alquilación, tomados de Samson, (1992).

Desde el punto de vista biológico, la alquilación de los ácidos nucleicos es un proceso particularmente importante, ya que los agentes alquilantes bajo ciertas condiciones introducen modificaciones en todos los átomos oxígeno y nitrógeno de las bases nitrogenadas (Singer, 1976); generando una variedad de aductos entre los cuales están, la O^2 -etilimina (O^2 EtT) que parece ser una lesión mutagénica responsable de transversiones A:T a T:A en un 47% (vanZeeland y col., 1995).

La O^6 -alquilguanina es considerada como una de las lesiones premutagénicas más importantes que se originan por compuestos carcinogénicos y quimioterapéuticos tales como: nitrosaminas, nitrosoureas y compuestos relacionados. Esta lesión en particular, tiene una importante acción citotóxica y participa significativamente en mutagénesis y carcinogénesis (Loveless, 1969). La O^6 -metil guanina (O^6 -MeG) es una lesión en el ADN menos abundante, alrededor del 8 % de las metilaciones son causadas por este aducto (Beranek, 1990), no obstante lo anterior es la que causa mayor muerte celular por apoptosis (Kaina y

col., 1993; Tominaga y col., 1997; Meikrantz y col., 1998) y también es recombinogénica (Zhang y col., 2000).

La habilidad de la O⁶-MeG para aparearse con la timina en lugar de la citosina durante la replicación es responsable del incremento en la frecuencia de mutaciones por transición después del tratamiento con los AA. El apareamiento erróneo de O⁶-MeG:T en el primer ciclo de replicación, promueve las mutaciones por la transición G:C a A:T en el segundo ciclo de replicación (Loechler y col., 1984; Kawate y col., 1998; Kaina y Christmann, 2002; Kleibl, 2002). Estas se originan en los sitios donde se formó la O⁶-MeG después de dos ciclos de replicación (Margison y Santibáñez-Koref, 2002). Lo último propicia la formación de lesiones secundarias que interfieren con la subsecuente ronda de replicación, dando lugar a rompimientos de cadena dobles, lo cual ha sido demostrado experimentalmente en células MGMT-/MMR+ (Ochs y Kaina, 2000) estos rompimientos preceden al evento de apoptosis.

Las mutaciones se originan cuando la ADN polimerasa encuentra la O⁶-MeG, dando lugar a un apareamiento erróneo de O⁶-meG:T en el primer ciclo de replicación, si la O⁶-MeG no es reparada antes de la replicación por una proteína metil transferasa (MGMT) origina la mutación por la transición G:C a A:T en el subsecuente ciclo de replicación. La O⁶-MeG genera un efecto citostático por la vía que involucra el sistema de reparación MMR como se muestra en la figura 4. Este tipo de mutación es la que predomina por el tratamiento con agentes metilantes (Singer y Essigmann, 1991). Sin embargo la O⁶-MeG es capaz de aparearse con la citosina en cuyo caso no produce mutación (Kleibl, 2002) Estudios previos demostraron que el apareamiento O⁶-MeG:C es más estable ya que se establecen dos puentes de hidrógeno en un alineamiento bamboleante y en el apareamiento de O⁶-MeG:T las uniones de hidrógeno son mucho más débiles y permiten el acomodo en una geometría más consistente (Basu y Essigmann, 1990).

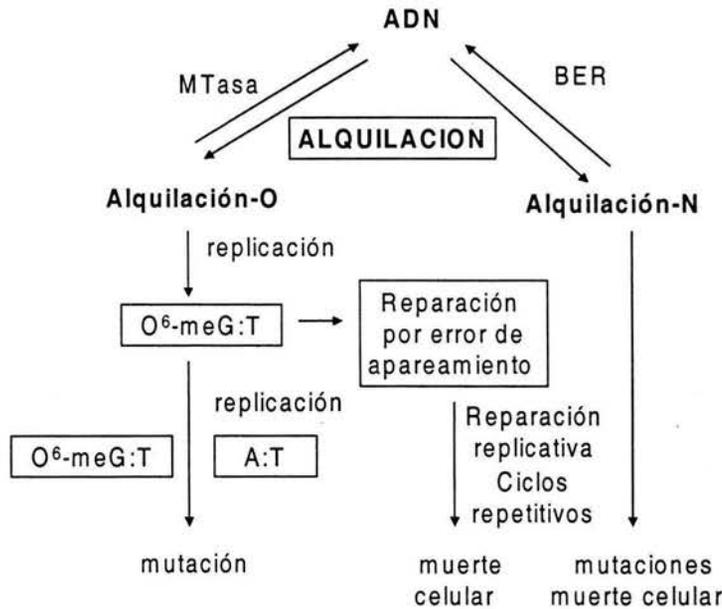


Figura 4. Ruta del daño al ADN generado por agentes metilantes y reparación, tomado de Kleib, (2002).

Los efectos tóxicos (que pueden afectar la viabilidad celular pero no bloquea la replicación) y recombinogénicos de la O⁶-MeG los determina la acción del sistema de reparación postreplicativa por error de apareamiento (Kaina y Christman, 2002).

La O⁴-alquilimidina, es otro aducto importante que puede aparearse erróneamente con la base guanina y propiciar la transición A:T a G:C (Swann, 1990) lo cual puede ocasionar mutagénesis y carcinogénesis (Saffhill y col., 1985). Sobre la base de que esta lesión es potencialmente mutagénica y que es más persistente que la O⁶-MeG, es posible que ésta sea biológicamente tan significativa como la O⁶-MeG o aún más (Encell y Loeb, 1999).

Otras lesiones biológicamente importantes son las N-alquilpurinas que son altamente citotóxicas y clastogénicas. Producen aberraciones cromosómicas y eventos de recombinación que son visiblemente expresados como ICH_s lo cual ha

sido materia de debate por algunos años (Kaina y col., 1993). Entre estas lesiones se puede mencionar: la N7-metilguanina (N7-MeG), la N3 metiladenina (3-MeA) y la 3-metilguanina (3-MeG). La N7-MeG no es una lesión directamente premutagénica pero puede favorecer la despurinización espontánea a un pH neutro, debido a que sus uniones glucosídicas son muy lábiles, lo que origina sitios apurínicos que se pueden transformar en mutaciones si trascienden la replicación (Margison y O'Connor, 1981), por la inserción de una base equivocada (Michaels y col., 1991). Esta lesión no interfiere con la replicación del ADN (Prakash y Strauss, 1970).

La 3-MeA bloquea la síntesis del ADN *in vitro* y en células de ratón inhibe la replicación del ADN *in vivo* (Larson y col., 1985; Engelward y col., 1998). La 3-alquiladenina también es una lesión potencialmente citotóxica (Klungland y col., 1992).

2.5 Reparación del Daño al ADN

Se han presentado evidencias que indican que las células para enfrentar a la gran variedad de lesiones que dañan al ADN cuentan con múltiples sistemas de reparación del ADN que operan con distintos mecanismos. Entre estos se pueden mencionar: reparación por escisión de nucleótidos (NER), reparación por escisión de bases (BER), reparación por apareamiento erróneo (MMR) y recombinación. Cada uno de estos mecanismos de reparación muestran especificidad para los sustratos, pero también hay evidencias de que éstos cubren parcialmente el daño generado en las células (Swanson y col., 1999). NER, BER y MMR realizan la escisión de las bases dañadas; el principio de estos tres mecanismos es: reconocimiento del daño, eliminar la región alterada, insertar las bases nuevas para llenar la brecha y reunión de las secciones (Friedberg, 2003).

La reparación prereplicativa de las lesiones O⁶-MeG, O⁴-metiltimina (O⁴-MeT) y las alquilaciones en el átomo de nitrógeno causadas al ADN por los agentes

alquilantes, son reparadas básicamente por el sistema BER que elimina las bases alteradas por la acción de las ADN glicosilasas para varios tipos de daño al ADN y el sistema de reparación por la proteína alquil guanina transferasa (AGT) (Kleibl, 2002).

2.5.1 Reparación por Alquilguanina Transferasa

El sistema AGT es el más simple y protege a las células de los efectos biológicos del aducto O⁶-alquilguanina, que incluyen toxicidad, mutación, aberraciones cromosómicas, ICH_s y recombinación generados por los AA (Margison y Santibáñez-Korev, 2002). Este mecanismo también se le conoce como O⁶-metilguanina ADN metiltransferasa (MGMT). La alquilación del ADN en la posición O⁶ de la guanina es un paso importante en la formación de mutaciones que originan cáncer, debido a la tendencia de la O⁶-metilguanina de aparearse con la timina durante la replicación (Loetchler y col., 1984). AGT realiza su función removiendo los grupos alquilo de las posiciones O⁶ de la guanina y O⁴ de la timina, y los transfiere a un residuo interno de la cisteína de la misma molécula, ésta forma alquilada de la proteína es separada del ADN, y degradada por el sistema proteosómico. La reacción conduce a la irreversible inactivación de la proteína y la restauración de la guanina y timina en el ADN, por lo tanto esta reacción es libre de error (Pegg, 2000). La capacidad de reparación de este sistema puede depender de la cantidad de moléculas de la enzima alquiltransferasa presentes en la célula (Kawate y col., 1998).

El nivel de actividad de las enzimas alquiltransferasas varía grandemente entre las especies, por ejemplo el hígado de ratón y de criceto tienen niveles de actividad más bajos que en ratas o humanos (Gerson y col., 1986). Los tejidos tienen diferencias en el nivel de actividad AGT con relación al contenido de ADN; el hígado de ratón tiene la actividad más alta, la médula ósea y el bazo la más baja (Gerson y col., 1986). Por la misma situación la médula ósea elimina más lentamente los aductos O⁶-MeG (Valanis y col., 1994). Las células humanas y de

ratón tienen un solo tipo de MGMT que las protegen de los efectos mutagénicos, tumorigénicos y citotóxicos de los agentes S_N1 (Kawate y col., 1998; Bignami y col., 2000).

La proteína AGT remueve los grupos metilos y más lentamente los etilos en la posición O^6 de la guanina (Pegg, 1990). Las alquiltransferasas reparan eficientemente los aductos O^6 -EtG inducidos por la ENU (Liem y col., 1994), lo cual explica la baja incidencia de transiciones G:C a A:T en células expuestas a este agente.

La reparación del aducto O^4 -MeT es menos eficientemente que el O^6 -MeG. Una posible explicación a lo anterior es que el apareamiento entre las bases O^4 -MeT:A aumenta el grado de curvatura en el ADN lo cual podría ser responsable de la menor actividad de la MGMT sobre el O^4 -MeT (Encell y Loeb, 1999).

El aducto en la posición O^4 de la timina es el más reactivo hacia la MNU, pero la presencia de alquilaciones en la posición O^2 y N-3 inhibieron el reconocimiento y la reparación del O^4 -MeT (Encell y Loeb, 1999). En otro estudio se observó que esta lesión generada por AA etilantes contribuye a cáncer. Además hay certidumbre de que la alquiltransferasa de humanos puede reparar la O^4 -MeT, más lentamente que la O^6 -MeG (Gerson y col., 1994).

Hay datos que sugieren que las células deficientes en reparación entran en apoptosis y también indican que la lesión O^6 -alquilguanina estimula el arresto de las células en la fase S del ciclo celular. Las lesiones O^6 -MeG que no fueron reparadas, pueden causar directamente a las células un arresto en la fase S por inhibición de la replicación del ADN o indirectamente por la activación de un mecanismo de control de la fase S y posteriormente sufren apoptosis (Meikrantz y col., 1998). Las líneas celulares deficientes en la actividad metil transferasa pueden morir por apoptosis después de un arresto en G2/S en el segundo ciclo de proliferación celular (Tominaga y col., 1997; Kawate y col., 1998). No obstante lo

anterior la proteína MGMT elimina virtualmente el proceso de apoptosis, y se demuestra con esto que la O⁶-MeG es una de las lesiones iniciadoras de este proceso aunque también es eficientemente reparada por la MGMT (Zak y col., 1994).

Recientemente se ha demostrado que células deficientes en actividad MGMT son más sensibles a la inducción de apoptosis que las eficientes, lo cual indica que la alquilación induce muerte celular por apoptosis y que la O⁶-MeG actúa como un estimulador de esta respuesta tóxica (Kaina y col., 1997; Tominaga y col., 1997; Meikrantz y col., 1998).

2.5.2 Reparación por Escisión de Bases (BER)

El sistema de reparación BER es el protector más eficiente de las células de mamíferos, elimina pequeñas lesiones causadas en el ADN por AA y agentes oxidantes, desaminación, o pérdida espontánea de bases. Entre los aductos principales que causan alquilación se encuentran la N7-MeG, 3-MeA, 3-MeG. Este sistema opera por dos subrutinas: el de parche corto que reemplaza un solo nucleótido y el de parche largo de 2 a 15 aproximadamente, ambas se inician por la acción de una ADN glicosilasa que hidroliza las uniones N-glicosídicas (Bernstein y col., 2002).

El primer paso de BER es el reconocimiento y remoción del daño o de la base incorrecta. Las ADN glicosilasas remueven las bases dañadas o modificadas por hidrólisis de las uniones N-glicosídicas. En células de mamífero se han identificado 11 diferentes glicosilasas agrupadas en el subgrupo tipo I, que remueven las bases modificadas dejando un sitio apurínico y las glicosilasas del tipo II eliminan las bases y subsecuentemente realizan una incisión en el sitio apurínico por una actividad endógena 3'-endonucleasa, dando lugar a un rompimiento de cadenas sencillo (Christmann y col., 2003). Una ADN polimerasa β realiza la inserción del nucleótido tanto en el sistema de parche corto como largo.

El paso crítico en la decisión de cual de los dos sistemas realizará la actividad BER es la remoción de 5'dRP sobre la inserción del primer nucleótido. Además la actividad de polimerización de la polimerasa β que ejerce una actividad AP liasa y por lo tanto es capaz de catalizar la liberación de 5'dRP del sitioapurínico por eliminación β (Christmann y col., 2003).

El sistema de parche largo escisa y reemplaza los nucleótidos por las acciones combinadas de una ADN polimerasa δ o ϵ (aparentemente estimulados por la polimerasa β), del antígeno nuclear de la proliferación celular (PCNA), factor C de la replicación (RF-C) y una endonucleasa (FEN1) estimulada por PCNA, que remueve la estructura colgante (5'dRP) (Norbury y Hickson 2001). El paso de sellado lo realizan las ADN ligasas I y III. La proteína XRCC1 dirige específicamente la interacción de polimerasa β y la ADN ligasa III. Para BER parche largo la brecha es probablemente sellada por la ligasa I (Norbury y Hickson, 2001). El sistema de parche corto no requiere de PCNA o FEN1 y usa a la polimerasa β y la ligasa III estimuladas por XRCC1 (Slupphaug y col., 2003).

Las células deficientes en la ADN polimerasa β son hipersensibles a los AA y responden con una alta frecuencia de apoptosis similar a la que dispara la O⁶-MeG (Kaina, 2003).

2.5.3 Reparación por Escisión de Nucleotidos (NER).

El sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER) es quizás el más flexible de los sistemas de reparación del ADN considerando la diversidad de las lesiones sobre las que actúa. Las más significativas son los dímeros de timina causados por la radiación ultravioleta. Otros sustratos de NER son aductos químicos abultados tales como aductos de benzo (a) pireno, enlaces cruzados intrabanda del ADN y algunas formas de daño oxidativo. Una característica común de estas lesiones es que causan una distorsión de la hélice de la doble cadena del ADN así como modificaciones en su composición química (Hess y col., 1997).

Bioquímicamente este sistema es complicado, ya que en células humanas requiere de la acción de más de 30 proteínas que funcionan como un gran complejo llamado reparisoma. Este proceso se realiza en varios pasos que incluyen: reconocimiento del daño, abrir la doble cadena del ADN alrededor de la lesión, una incisión en la cadena del ADN dañada, reparación por síntesis de la brecha y ligación de la banda (Friedberg, 2003). El fragmento removido es aproximadamente de 30 de nucleótidos de longitud.

NER consiste de dos rutas distintas conocidas como reparación global de genoma (GGR) y reparación por transcripción-acoplada (TCR). La primera corrige el daño en zonas transcripcionalmente silenciosas del genoma y la segunda cuando el daño está localizado en regiones del genoma que están pasando por una expresión génica activa; el daño bloquea la elongación de la ARN polimerasa. Estas dos subrutas son fundamentalmente idénticas sólo difieren en el mecanismo de reconocimiento del sitio dañado (Cline y Hanawalt, 2003). En el sistema GGR el reconocimiento del daño por radiación ultravioleta se efectúa mediante el complejo proteínico XPC/HHR23B, en tanto que TCR se auxilia con el complejo RPA-XPA, y se supone que ocurre cuando la maquinaria de la transcripción está instalada en el sitio de la agresión. Este mecanismo reconoce los enlaces cruzados generados con el tratamiento con cisplatino. Después la ARN polimerasa se desplaza para permitir el acceso de las proteínas de NER al sitio del daño (Christmann y col., 2003).

Cuando se ha realizado el reconocimiento del sitio dañado, el factor de la transcripción (TFIIH) es reclutado en este lugar y lo más probable es que esto se realice por el complejo XPC-HR23B. TFIIH ampara la actividad helicasa ejercida por la subunidad XPB y XPD lo cual es responsable del desenrollamiento del ADN alrededor del sitio dañado. La escisión de la lesión se realiza por una doble incisión: la 3' es realizada por el complejo XPG y la 5' por el complejo XPF-ERCCI. La brecha es llenada por una polimerasa δ y el sellado por una ADN ligasa I (Christmann y col., 2003).

2.5.4 Reparación por Apareamiento Erróneo (MMR).

La función de MMR es mantener la fidelidad del genoma reparando los errores de apareamiento generados durante la replicación y la recombinación. Los defectos en este sistema pueden desestabilizar al genoma y esto predisponer a tumores (Li, 1999).

Este sistema es mejor conocido por su papel en la reparación postreplicativa de los errores de la polimerización del ADN, realiza la remoción de las bases erróneamente apareadas causadas por: desaminación espontánea e inducida, oxidación, metilación y errores en la replicación (Christmann y col., 2003). Los principales sustratos de MMR son los apareamientos erróneos O⁶-MeG:T originados por lesiones inducidas por alquilación (Duckett y col., 1996), aductos generados por cisplatino, aductos de benzo(a) pireno así como 8-OxoG (Christmann y col., 2003).

En *Escherichia coli* la bioquímica de MMR está bien definida, estas actividades se resumen en tres pasos: iniciación, escisión y resíntesis. El primero, es la detección del apareamiento erróneo de O⁶-MeG:T, o de O⁶-MeG:C por un homodímero de MutS, seguido de la interacción con un homodímero de MutL, que en presencia de ATP en la cadena sencilla activa la endonucleasa MutH. Esta última enzima incisa la cadena de ADN que lleva el error de la replicación, en la secuencia GATC más cercana localizada hasta 1-2 Kb de distancia en el apareamiento erróneo 5' ó 3'. En *E. coli* la metilación del ADN es usada como una señal discriminatoria: MutH identifica la nueva cadena por su pérdida transitoria de la metilación de la adenina en el sitio GATC (Bellacosa, 2001).

Después de la replicación de un ADN metilado sólo las cadenas parentales transportan los grupos metilo y es durante el período en el cual la cadena recién sintetizada espera la introducción de los grupo metilo, por esto se pueden distinguir las dos cadenas, lo cual en *E. coli* incluye a la proteína MutH unida al

sitio hemimetilado por el gene *dam* que codifica una metilasa cuyo blanco es una adenina de la secuencia GATC/CTAG. El estado hemimetilado se utiliza para distinguir el origen replicado del origen no replicado, lo anterior no se ha observado en eucariotes y la mayoría de bacterias (Modrich y Lahue, 1996; Marti y col., 2002). Por estas características MMR es definido como un sistema metilo-dirigido, postreplicativo o MMR de parche largo. Durante el paso de escisión, en presencia de la helicasa II (MutU), las exonucleasas de cadena sencilla Exo I (5'>3'), Exo X y RecJ (3'<5') remueven la muesca de ADN entre la incisión, el sitio GATC hemimetilado y el error de apareamiento. La resíntesis es mediante la ADN polimerasa III, que une la proteína a la cadena sencilla, y finalmente la ADN ligasa sella la melladura (Bellacosa, 2001).

El modelo anterior presenta un problema ya que si el rompimiento de cadena y el apareamiento están muy distantes ¿cómo los reconoce MutS α ? En otros estudios se ha planteado que el complejo MutS α -ADP reconoce y se une al apareamiento erróneo, esto dispara la transición ADP→ATP que estimula la actividad ATP-asa (Berardini y col., 2000). MutS α utiliza la energía ganada por la hidrólisis del ATP para traslocar a lo largo del ADN desde sitio de reconocimiento del apareamiento erróneo al sitio responsable de la señalización, que es muy probable que sea el del rompimiento de cadena sencillo (Christmann y col., 2003). La escisión de la cadena del ADN que contiene la base mal apareada se realiza por la exonucleasa I y la nueva síntesis por la polimerasa δ .

En mamíferos el reconocimiento específico de MSH2-MSH6 (MutS α) y MSH2-MSH3 (MutS β) es muy similar al correspondiente en levaduras, el primer complejo reconoce sustituciones de bases, y MutS β es más específico para inserciones y deleciones (Palombo y col., 1995; Marti y col., 2002).

Si el apareamiento erróneo de la O⁶-MeG con la T durante la replicación no se repara correctamente, puede procesarse por el sistema MMR lo cual estimula la

muerte celular por un mecanismo que aún no está bien caracterizado (Pepponi y col., 2003).

La persistencia de O⁶-MeG en el ADN causa citotoxicidad en células deficientes en MMR, y también son más resistentes a los agentes metilantes, aunque estas células no expresen la actividad MGMT se acumula el daño en el ADN pero no se estimula la muerte celular. Por esta razón a este evento se le ha denominado "tolerancia" a la alquilación o metilación (Ochs y Kaina, 2000; Bellacosa, 2001). El papel de MMR en la tolerancia a la alquilación puede ser explicado por el reconocimiento y unión de O⁶-MeG y S⁶-MeG por hMutS α . Además ambas lesiones pueden incorporar erróneamente la T durante la síntesis del ADN, resultando O⁶-MeG:T y S⁶-MeG:T que son más eficientemente reconocidas por MMR, y efectivamente O⁶-MeG:T estimula la actividad ATPasa del heterodímero MSH2-MSH6. (Bellacosa, 2001).

Los encuentros apuntan a la O⁶-MeG como la lesión crítica generadora de daño primario en el ADN y para reparar estas alteraciones es necesaria la activación eficiente de los sistemas MGMT (prereplicativo) y MMR (postreplicativo) los que determinarán el grado de muerte celular por la vía de un proceso de apoptosis y daño cromosómico (Meikrantz y col., 1998; Ochs y Kaina, 2000). El mecanismo por el cual este sistema induce apoptosis no está bien definido, aunque se ha formulado una hipótesis basada sobre observaciones con lesiones metilantes: durante el primer ciclo de replicación del ADN se produce el apareamiento de las bases O⁶-MeG:T o posiblemente O⁶-MeG:C; estudios *in vivo* demostraron que preferentemente el apareamiento se realiza con la timina (Loechler y col., 1984), lo cual causa la transición G:C a A:T después del segundo ciclo de replicación. Esto es reconocido por MutS α , un complejo de MSH2 y MSH6; posiblemente como parte del daño BASC, otros componentes del sistema MMR generan entonces una brecha grande en la cadena nueva replicada, la cual es llenada por reparación por síntesis otra vez se incorpora timina opuesta a la O⁶-MeG (Margison y Santibáñez-Koref, 2002).

Estos eventos cíclicos pueden ocasionar rompimientos de cadena sencillos en el sitio donde está la O^6 -MeG, lo cual producirá rompimiento de cadena doble cuando se realice la replicación. Este erróneo apareamiento causa un defectuoso, repetitivo ciclo de MMR que puede llevar a críticas lesiones secundarias, rompimientos de cadena dobles, los cuales pueden finalmente desencadenar genotoxicidad y muerte celular por apoptosis (Kaina y col., 1997).

El daño en el ADN puede ser reparado por escisión de bases o de nucleótidos. Sin embargo cuando la reparación por escisión no es eficaz o hay demasiado daño para ser reparado, el genoma de las células está en riesgo de acumular un número grande de mutaciones. Bajo estas condiciones una célula puede escoger entre el suicidio o sobrevivir con muchas mutaciones en su genoma, el sistema MMR estimula a las células a cometer el suicidio. Esto junto con el papel de MMR en la fidelidad de la replicación y recombinación del ADN explica porque un sistema MMR defectuoso predispone a la célula a cáncer y porque las células con un sistema MMR deficiente son tolerantes a muchos agentes que dañan al ADN. Por lo tanto este sistema mantiene la integridad del genoma por una dualidad de funciones: corrige el error de apareamiento generado durante el metabolismo del ADN e inicia la muerte celular por apoptosis cuando el daño al ADN no puede ser reparado (Li, 1999).

Estudios recientes indican que la resistencia adquirida a los AA de las líneas celulares de mamíferos que son deficientes en actividad metiltransferasa Me^+ , está asociada con la pérdida de la capacidad de reparación por error de apareamiento, a este fenómeno se le conoce como tolerancia a la metilación (Kat y col., 1993). Se ha propuesto que la acumulación de bases alquiladas en el ADN puede provocar una reparación por error de apareamiento frustrada, por lo tanto conduce a muerte celular. Las células Me^+ expuestas a AA mueren en la segunda vuelta de replicación del ADN (Tominaga y col., 1997) y esto es acompañado por un incremento de la frecuencia de ICH_s (Rausouli-Nia y col., 1994).

La proteína humana MutS α reconoce eficientemente los pares de bases O⁶-MeG:C, O⁶-MeG:T y O⁴-MeT:A. (Duckett y col., 1996). El reconocimiento de O⁶-MeG por MutS α induce apoptosis (Hickman y Samson, 1999) y la pérdida de MMR confiere resistencia a los AA (Kat y col., 1993).

2.5.5 Reparación de Rompimientos Dobles en el ADN.

El daño espontáneo puede ser eficientemente reparado, pero si éste no se repara antes de que la célula progrese hacia la próxima etapa del ciclo celular, la naturaleza del daño se puede alterar y esto originará lesiones secundarias. Por ejemplo una célula que lleva en su genoma un rompimiento de cadena sencilla (SSB) puede pasar a la fase de síntesis y esta lesión se transformará en una lesión secundaria que sería un rompimiento de cadena doble (DSB) en las cromátidas hermanas. Similarmente algunos tipos de bases covalentemente modificadas arrestan la replicación del ADN, causando huecos en las cadenas hijas que abarca el daño en la cadena molde. Además estudios en bacterias indican que ese bloqueo en la horquilla de replicación es activamente convertido a DSB (Sonoda y col., 2001).

Los DSB pueden originarse por diferentes conductos que incluyen: exposición a radiaciones ionizantes y compuestos químicos radio miméticos, interacción de la horquilla de replicación con rompimientos sencillos de la cadena molde; también endógenamente durante la replicación o como iniciadores de un proceso programado como recombinación e intercambio genético. Los DSB son potentes inductores de efectos genotóxicos (rompimientos cromosómicos e intercambios) y muerte celular, en eucariotes superiores un DSB no reparado puede inactivar a un gene esencial, lo cual es suficiente para inducir muerte celular por la vía de apoptosis, arresto permanente del ciclo celular, o muerte de células mitóticas causada por pérdida de material genómico (Christmann y col., 2003; Rothkamm y col., 2003). Si no es reparado correctamente, puede conducir a cáncer a través de translocaciones, inversiones, o deleciones (Rothkamm y col., 2003).

Se ha propuesto que las radiaciones ionizantes inducen deleciones en células arrestadas en G1 o G2 y que estos eventos probablemente resultan de la inducción directa de DSB. En contraste con otros tipos de daño, tales como (SSB), radiación ultravioleta o alquilación del ADN que requieren de la replicación para convertir ese daño hacia sustratos recombinogénicos. Por lo tanto la reparación por HR probablemente es un efecto secundario del daño que inicialmente bloquea la horquilla de replicación (Bishop y Shiestl, 2000).

Se han planteado dos rutas primarias para la reparación de los DSB las cuales dependen sobre la fase del ciclo en la que operan: la recombinación homóloga (HR) se efectúa sobre la fase S tardía y G2, este mecanismo opera principalmente en eucariotes simples y el mecanismo unión de extremos no-homólogos (NHEJ) que ocurre principalmente en las fases G0/G1 y predomina en mamíferos, sin embargo es dependiente del ciclo celular (Christmann y col., 2003).

2.5.5.1 Recombinación Homóloga.

La recombinación homóloga es un proceso de intercambio genético entre secuencias de ADN que son homólogas. Este proceso se ha observado de bacterias a humanos y evidencias recientes sugieren que la recombinación homóloga mitótica es esencial para la replicación fiel de células de vertebrados (Helleday, 2003).

Durante la HR, el cromosoma dañado entra en contacto físico con una molécula de ADN no dañada con la cual compartirá secuencia homóloga y la usará como molde para reparar (copiar la información). El proceso de la recombinación se inicia por un acortamiento nucleolítico del DSB en la dirección 5'-3' por el complejo MREII-Rad50-NBSI. El extremo 3' resultante es atado por un complejo heptamérico formado por proteínas Rad52, el cual lo protege contra la digestión exonucleolítica. Rad52 compite con el complejo Ku para unir los extremos del ADN, esto puede determinar si el DSB es reparado por HR o NHEJ. Rad52

interactúa con Rad51 estimulando los intercambios de la cadena de ADN, actividad de Rad51 (Christmann y col., 2003).

La proteína humana Rad 51 es la homóloga de la recombinasa polimerasa RecA de *E. coli* que forma un filamento nucleoproteínico, éste une la cadena sencilla y doble de ADN e interactúa con la molécula de ADN no dañada. En seguida Rad51 cataliza los eventos de los intercambios de cadena con la cadena complementaria, por los cuales la molécula dañada invade la otra molécula no dañada de ADN dúplex, desplazando una cadena como un anillo en forma de D. En levaduras, Rad54 despliega los ADN de doble cadena dependiente de la actividad de ATPasa y usa la energía para el desenrollamiento del ADN de doble cadena, así se estimulan los intercambios de cadena del ADN. Estos eventos son influenciados por los otros miembros del grupo de proteínas RAD50 y por otros factores tales como RPA que se supone estabiliza a Rad51 mediante apareamiento del ADN por unión de la cadena de ADN desplazada. Después del reconocimiento del DSB e intercambio de cadena realizado por las proteínas Rad, las estructuras resultantes son resueltas por el intermediario de Holliday (Modesti y Kanaar, 2001; Jackson, 2002; Christmann y col., 2003).

2.5.5.2 Reparación por Unión de Extremos no-Homólogos (NHEJ)

Este sistema une los dos extremos de un DSB y no es requisito que haya secuencia homóloga entre ellos, por lo mismo el apareamiento puede ser poco o estar ausente. En vertebrados este mecanismo consta de las proteínas Ku70 y Ku80 que es un complejo que une los extremos rotos, forma un heterodímero que inicialmente se une al extremo del ADN de doble cadena para protegerlo de la acción de la exonucleasa, después Ku se asocia con la subunidad catalítica de ADN dependiente de la proteincinasa (ADN-PKcs) que tiene una actividad de endonucleasa y que abre la horquilla y otras estructuras que no pueden fácilmente ser reunidas; la ADN ligasa IV que funciona de manera conjunta con la proteína XRCC4 realizan la ligación. La adición de los grupos fosfato es catalizado por la

cinasa (PNK). Las mutaciones en cualquiera de estos componentes pueden hacer a las células de los eucariotas más sensibles a la radiación. Algunos genes de estas proteínas están mutados en pacientes de enfermedades debidas a deficiencias en la reparación del ADN (Norbury y Hickson, 2001; Helleday, 2003).

La proteína Rad 54 esta involucrada en la reparación de rompimientos dobles in vivo (Dronkert y col., 2000).

2.6 Lesiones en el ADN que inducen ICH_s.

Se ha establecido que los agentes alquilantes actúan en varios sitios del ADN generando diferentes lesiones, algunas de las cuales pudieran estar vinculadas con la formación de los ICH_s; ya que hay evidencias de que pueden ser más de una las lesiones que originan este evento (Painter, 1980; Swenson y col., 1980; Jostes Jr., 1981; Conell y Medcalf, 1982; Heflish y col., 1982; Morris y col., 1983; Vijayalaxmi y Evans, 1984) y estas son inducidas por diferentes agentes. Numerosos estudios señalan a la O⁶-alquilguanina como la lesión principal que origina la formación de los ICH_s (Goth-Goldstein, 1977; Carrano y col., 1979; Swenson y col., 1980; Duncan y Evans, 1982; Wolff, 1982; Day y col., 1987; Kaina y col., 1991).

Por otro lado la N7-MeG también parece ser responsable de la formación de los ICH_s inducidos por la MNU (Conell y Medcalf, 1982), y por la ENU (Jostes Jr, 1981).

La 3-MeA es probablemente otra lesión generadora de los ICH_s (Swenson y col., 1980; Conell y Medcalf, 1982; Vijayalaxmi y Evans, 1984), así como también la 3-etiladenina (Jostes Jr, 1981; Heflish y col., 1982). En un estudio en el cual se utilizaron células deficientes a la enzima 3-metiladenina ADN glicosilasa, se observó que fueron sensibles a la inducción de ICH_s por el metil-lexiproxin (Me-Lex) y MMS, los autores observaron que los ICH_s inducidos por el tratamiento con

Me-Lex fueron generados por la 3-MeA. La conclusión fue tomada sobre la base de que el Me-Lex induce 1000 veces más 3-MeA que O⁶-MeG (Engelward y col., 1998).

Las etilaciones en los fosfodiésteres también son lesiones importantes en la generación de los ICH_s (Painter, 1980; Heflish y col., 1982; Vijayalaxmi y Evans, 1984). Estas lesiones tuvieron mayor relación con la inducción de ICH_s (Morris y col., 1983). La ENU induce una alta proporción de etilfosfotriésteres, por lo cual se podría especular que cause la formación de ICH_s, sin embargo hay evidencias de que esta lesión así como la O⁴-etilimina (O⁴-EtT) probablemente no están involucradas en la generación de los ICH_s (Kaina y col., 1993).

Una fuerte evidencia a favor de la O⁶-MeG como lesión inductora de los ICH_s fue que cuando el gene de la proteína AGT de *E. coli* al expresarse en células de mamífero, aparentemente incrementó la habilidad celular para reparar la lesión O⁶-MeG, esto fue suficiente para reducir la sensibilidad celular a la inducción de ICH_s por MNNG que es un eficiente generador de O⁶-MeG (Samson y col., 1986).

Por otro lado, se ha intentado relacionar la efectividad que tienen la O⁶-MeG y algunas N-alquilaciones de las purinas (3-metiladenina y 3-metilguanina) para generar diversos efectos biológicos, con su capacidad para inducir ICH_s, pero estos estudios no han sido concluyentes (Kaina y col., 1991). Sin embargo hay una fuerte evidencia que involucra a la O⁶-MeG en mutaciones, muerte celular e inducción de ICH_s que deriva de trabajos realizados con líneas celulares transgénicas (Kaina y col., 1991). La mayoría de los ICH_s causados por el MNNG fueron generados por la O⁶-MeG y sólo alrededor del 10% por otras lesiones, similares resultados fueron encontrados para la MNU ya que también este aducto ocasionó la mayoría de los ICH_s (Kaina y col., 1991), además de que ambos agentes inducen casi el mismo patrón de alquilación en el ADN (Beranek, 1990).

Otra evidencia que apoya a la O⁶-MeG como lesión que produce los ICH_s es el estudio realizado en células deficientes en reparación Mer⁻ A1235 de glioblastoma humano, donde se demostró que se produce un intercambio por cada 42 lesiones O⁶-MeG (Rasouli-Nia y col., 1994), estos autores concluyeron que esta lesión es muy recombinogénica. Lo que está de acuerdo con el significado biológico que se le ha asignado a los ICH_s como la expresión de la reparación por recombinación homóloga (Sonoda y col., 1999).

2.6.1 Formación de los ICH_s

Recientemente se han acumulado evidencias con relación a que los ICH_s se originan de rompimientos de cadena sencilla persistentes en células que no los reparan, como son células deficientes en XRCC1 o Parp-1 las cuales mostraron un incremento en los niveles espontáneos de ICH_s (Caldecott y col., 1992; Menissier de Murcia y col., 1997). Se ha reportado que los ICH_s se forman principalmente por la vía de la recombinación homóloga (Sonoda y col., 1999; Dronkert y col., 2000; Helleday, 2003; Wang y col., 2003). También se concluye que los genes requeridos para HR están también involucrados en promover los ICH_s (Dronkert y col., 2000). Además, nunca se ha observado un ICH después de la reparación de un rompimiento doble producto de la HR (Helleday, 2003).

2.7 Efecto de la BrdU.

Un aspecto importante en la metodología de los ICH_s es el uso de la BrdU (5-Bromo-2-desoxiuridina) que es un análogo sintético que sustituye a la base timina (Figura 5). En este proceso, el pesado átomo de bromo reemplaza al grupo metilo en la posición 5' de la timina. Cuando se realiza la replicación del ADN, este análogo puede ser incorporado en el sitio que ocupa la timina si se encuentra en el medio endógeno de la célula, por lo que cada cromátida hermana de un cromosoma contiene una cadena polinucleotídica ligera y una nueva cadena pesada con BrdU (Wolff y Afzal, 1996).

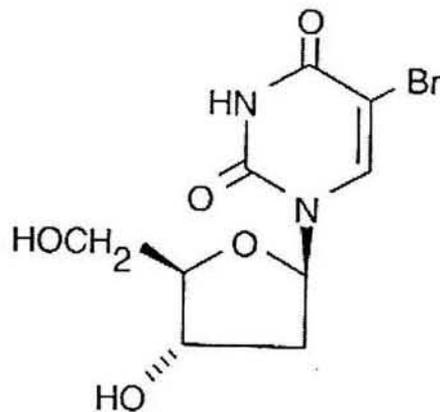


Figura 5. Fórmula de la BrdU

La BrdU se ha empleado para la detección de los ICH_s, ya que cuando este compuesto se encuentra incorporado en el ADN permite la tinción diferencial de las cromátidas de los cromosomas (Wolff y Perry, 1974), aunque también se ha observado que interfiere con la inducción de los ICH_s incrementando la frecuencia de éstos, como es el caso del agente alquilante MNNG, o por agentes inhibidores de la replicación como la camptotecina (Popescu y col., 1980; Zhao y col., 1992), o también reduciendo la frecuencia de éstos cuando las células se trataron con MMS (Okey, 1981). La BrdU no es un compuesto inerte; cuando está incorporada en el ADN produce susceptibilidad celular a la irradiación, aunque los mecanismos de este efecto no han sido completamente dilucidados (Djorjeric y Szybalsky, 1960; Szybalsky, 1974). Uno de los efectos que tiene la BrdU es su capacidad para potenciar la acción de ciertos agentes quimioterapéuticos, como también de la radiación (Ackland y col., 1988; Mancini y col., 1999) e incrementa la susceptibilidad a la inducción de ICH_s por agentes alquilantes (González-Beltrán y Morales-Ramírez, 1999), aunque los mecanismos de sensibilización al daño por agentes químicos no están entendidos claramente (Morris, 1991).

2.8 Farmacocinética de los AA.

Estos agentes se distribuyen rápidamente en todos los tejidos y no requieren de activación metabólica. Las observaciones realizadas en cuanto al tiempo de

duración de la vida media de las nitrosoureas reportan que es más corta que la de los metanosulfonatos (Swann, 1968; Swann y Magee, 1971). Las evidencias indican que la corta vida media de algunos AA es debida a su rápida reacción con las moléculas nucleofílicas incluyendo al agua y por lo tanto desaparecen rápidamente del sitio de administración (Sanderson y Shield, 1996).

Además presentan vidas medias *in vivo* relativamente cortas de 5 a 8 minutos para la ENU y la MNU (Charles y col., 1986), y menos de una hora para el EMS (Murthy y col., 1984) o de 1.5 horas para el MMS (Swann, 1968). Estos compuestos son estructuralmente similares, aunque difieren en sus propiedades químicas y patrones de alquilación. Las nitrosoureas tienen mayor selectividad por los átomos de oxígeno que los metanosulfonatos, la ENU reacciona más eficientemente con los átomos de oxígeno que la MNU y ambas funcionan mediante el mecanismo S_N1 (Beranek, 1990). El EMS y el MMS tienen mayor selectividad por los sitios más nucleofílicos como el N7 de la guanina. El MMS reacciona a través del mecanismo S_N2 , en tanto que el EMS lo realiza por un mecanismo mixto S_N1/S_N2 (Beranek, 1990; Segal, 1984).

En el presente trabajo se compara la potencia relativa para inducir ICH_s por la exposición aguda de cuatro compuestos alquilantes modelo, los metanosulfonatos: MMS y EMS, y las nitrosoureas: MNU y ENU. Los cuatro son de acción directa y se distribuyen con cierta uniformidad en el cuerpo.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Antecedentes

La tinción diferencial de las cromátidas hermanas de un cromosoma involucra la sustitución de la base timina del ADN por la BrdU; las formas para administrar este análogo son diversas. Morales-Ramírez y col. (1984b) desarrollaron un método *in vivo* basado en la inyección intraperitoneal de BrdU adsorbida a carbón activado, para detectar el daño en el ADN que genera ICH_s causado por mutagénos, en células de la médula ósea, glándula salival y espermatogonia. Las lesiones inducidas por mutagénos que no son reparadas antes de la replicación del ADN pueden ocasionar la producción de ICH_s. Sin embargo la reparación de las lesiones relacionadas con los ICH_s no ha sido ampliamente estudiada *in vitro* y menos *in vivo* por la dificultad de obtener células sincronizadas (González-Beltrán y Morales-Ramírez, 1999).

En un estudio previo se desarrollo un método en células sincronizadas de la glándula salival de ratón que permite establecer la reparación del daño durante la fase G1 del ciclo celular, el cual está basado en el empleo del isoproterenol que tiene la capacidad de inducir una división celular sincrónica por cada administración (Morales-Ramírez y col., 1995b).

3.2 Pregunta

¿Pueden las células de la glándula salival de ratón reparar durante G1 las lesiones inductoras de ICH_s causadas por agentes metilantes y etilantes monofuncionales?

3.3 Hipótesis Alternativas

3.3.1 Las células de la glándula salival de ratón son capaces de reparar las lesiones causadas durante la etapa G1 del ciclo celular, inducidas por el tratamiento con agentes alquilantes.

3.3.2 Las células de la glándula salival de ratón no son capaces de reparar las lesiones causadas durante la etapa G1 del ciclo celular, inducidas por el tratamiento con agentes alquilantes.

3.4 Hipótesis de trabajo

Dado que los ICH_s ocurren en la etapa S del ciclo celular, las células pueden reparar el daño ocasionado al ADN durante G1 evitando la formación de los ICH_s. El tratamiento con AA en G1 temprana permitirá a las células tener tiempo para reparar el daño causado en el ADN, en comparación con las células tratadas en G1 tardía.

3.5 Justificación

Los AA estudiados son mutágenos y carcinógenos que dañan directamente al ADN. Durante G1 las células pueden corregir las lesiones mediante los sistemas de reparación, lo cual lleva a subsanar el daño antes de la etapa de síntesis y de esta forma mantener la integridad genética. El estudio en sistemas *in vivo* la reparación de esas alteraciones es un tema muy importante de la investigación toxicológica. Lo anterior justifica el empleo del sistema de la glándula salival como modelo para el estudio de las lesiones inducidas al ADN de las células, y si estas alteraciones pueden o no ser eliminadas por los sistemas de reparación.

3.6 OBJETIVOS

3.6.1 Objetivo Principal:

Determinar si las lesiones capaces de inducir los ICH_s son reparadas durante la etapa G1 del ciclo celular.

3.6.2 Objetivos Particulares:

3.6.2.1 Comparar la eficiencia relativa para inducir ICH_s de los agentes alquilantes: MNU, ENU, MMS y EMS.

3.6.2.2 Determinar si las células de la glándula salival de ratón reparan durante G1 el daño en el ADN capaz de producir ICH_s, inducido por estos agentes alquilantes *in vivo*.

3.6.2.3 Determinar y comparar cuál es el efecto de la incorporación de la BrdU al ADN en la producción de daño por los agentes alquilantes y la reparación del mismo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Protocolo.

Las células de la glándula salival de ratón (de los grupos de ratones testigo y experimentales) se estimularon para iniciar la primera división celular sincrónica inyectando intraperitonealmente (300 µg/g de peso) de isoproterenol en solución acuosa, la segunda división celular fue inducida a las 48 horas inyectando localmente isoproterenol (150 µg/g de peso) en cada glándula salival ver (figura 6). Catorce horas después de la primera estimulación celular se administró intraperitonealmente una solución de BrdU-carbón activado (600 µg BrdU/g de peso) en la primera división celular. A los grupos de ratones experimentales se les administró una dosis aguda de los mutágenos MNU (0.05 µM/g de peso), ENU (0.2 µM/g de peso), MMS (0.27 µM/g de peso) y EMS (1.2 µM/g de peso) 6.0 horas ó 13.5 horas (G1 temprana o tardía respectivamente) después de la primera o la segunda estimulación celular. Veintiocho horas después de la segunda estimulación celular se inyectó (subcutáneamente en el lomo del animal) colchicina 3.75 mg/kg de peso, 3 horas después los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. Se incluyeron sus respectivos grupos testigos no tratados con mutágeno.

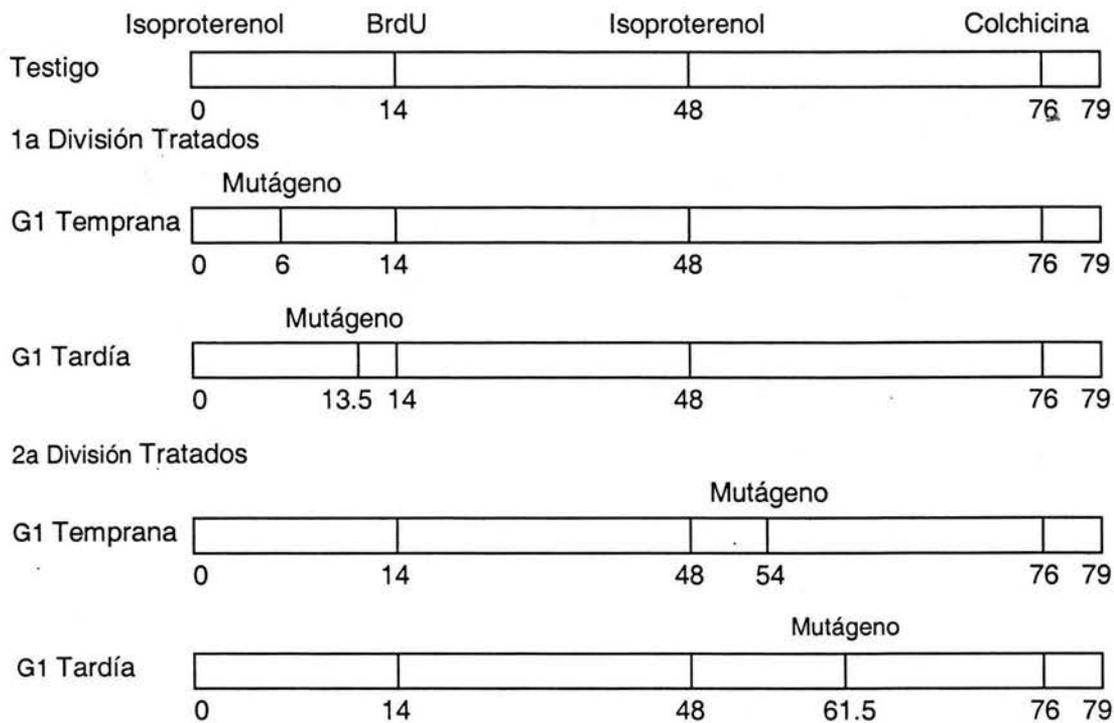


Figura 6. Protocolo experimental con los tiempos de tratamiento de los cinco grupos de ratones: el testigo no tratado y los grupos tratados con agentes alquilantes en la G1 temprana y tardía de la 1ª y 2ª división celular.

Los ratones utilizados en los experimentos fueron de la línea BALB/c de 30 g de peso, los cuales se mantuvieron en cajas de plástico bajo condiciones controladas de temperatura y períodos de luz y oscuridad. Éstos se alimentaron con croquetas de Purina para pequeños roedores y agua *ad libitum*.

4.2 Preparación de las laminillas.

Las glándulas salivales se disectaron y se les liberaron del tejido adiposo, así como de los ganglios que se encuentran asociados con éstas. Posteriormente se cortaron en pequeños fragmentos en solución salina balanceada. Se trataron con solución hipotónica (0.075 M), y con fijador (3 partes de metanol y una de ácido acético) por 15 minutos, después se mantuvieron en refrigeración por 72 horas. Los fragmentos de tejido se disociaron en una gota de ácido acético al 60 % sobre

la superficie de una laminilla de cristal, en la cual quedó distribuida la suspensión celular.

4.3 Tinción diferencial.

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

4.4 Análisis estadístico.

Considerando que el método utilizado para obtener las metafases no es muy eficiente para obtener completo el número de cromosomas por célula. Los ICH_s se contaron en cuando menos 1200 cromosomas por ratón, que es el equivalente a 30 células. Quince cromosomas fue el número mínimo contado por célula (Morales-Ramírez y col., 1995b). La significancia estadística entre los grupos se determinó con la prueba t de student, usando el programa excel para computadora personal.

5. RESULTADOS

5.1 Toxicidad de los compuestos

En un estudio previo las células de la glándula salival de ratón fueron estimuladas con isoproterenol para entrar en división celular, un alto porcentaje de ellas pasaron por síntesis como se demostró con autorradiografía (Morales-Ramírez y col., 1984b) aunque también se presentaron variaciones en la proliferación celular. La estimulación con isoproterenol también se afectó con los tratamientos adicionales de los mutágenos y la BrdU.

Debido a que la división celular no fue muy homogénea entre los animales tratados con isoproterenol, los estudios de toxicidad no se realizaron en el tejido de la glándula salival. Además, de lo anterior es posible que haya presencia de otros tejidos asociados a estas glándulas, lo que puede afectar en menor grado las estimaciones para viabilidad celular.

Para establecer las dosis de los agentes alquilantes que producen el efecto deseado sin ser tóxica para las células, se hicieron los estudios de toxicidad en las células de la médula ósea, en cuyo caso se determinaron los indicadores de daño: índice mitótico (IM) y tiempo de generación promedio (TGP). Las dosis encontradas no reportaron efectos importantes en la viabilidad celular. Por lo que se tomaron éstas como referencia para ser empleadas en las células de la glándula salival de ratón.

5.2 Inducción de ICH_s por la exposición a los AA en G1 temprana y tardía.

Como se muestra en la tabla 1, la inducción de los ICH_s en las células de la glándula salival de ratón por la exposición aguda con los mutágenos: MNU, ENU, MMS y EMS; fue estadísticamente significativa con respecto a sus testigos paralelos no tratados, tanto en la etapa G1 temprana y tardía de la primera, como

de la segunda división, es decir, antes o después de que las células incorporaron BrdU.

Los ICH_s inducidos por el tratamiento con la MNU durante la etapa G1 tardía de la primera división, fue el doble de los inducidos en la G1 temprana, esta diferencia se dedujo cuando a las frecuencias de los grupos tratados, se restó la frecuencia de los ICH_s de su testigo respectivo, esta diferencia fue estadísticamente significativa. Lo anterior indica que, hubo una eliminación del 50% de las lesiones inducidas en G1 tardía que generaron ICH_s, etapa durante la cual hubo oportunidad para que se repararan las lesiones. Hay que tener en cuenta que en esta 1^a división el ADN aún no está sustituido con BrdU. En la segunda división, se observó sólo una ligera diferencia entre las frecuencias de ICH_s producidas en la etapa G1 temprana y la tardía. Además hubo una diferencia significativa en las frecuencias de ICH_s causadas por los tratamientos en 1^a y 2^a división, lo cual indica que se generaron lesiones adicionales en la 2^a división que probablemente fueron debidas a la incorporación de la BrdU.

La frecuencia de los ICH_s inducidos por el tratamiento con la ENU en la G1 temprana de la 1^a división, fue alrededor de un 20% más alta que la inducida en la G1 tardía. Esta diferencia estadísticamente significativa indica que este AA generó durante G1 lesiones inductoras de ICH_s que fueron persistentes y que además se incrementaron durante la G1 de la 1^a división. En la 2^a división se observó que la frecuencia de ICH_s inducidos en la G1 tardía fue más alta que la causada en G1 temprana y estadísticamente significativa. Lo cual indica que las lesiones adicionales producidas por la incorporación de la BrdU fueron reparadas.

TABLA 1. FRECUENCIA DE ICH_s/célula INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON MNU, ENU, MMS, y EMS

| | | 1ª división (Antes de BrdU) | | 2ª división (Después de BrdU) | |
|-----------------------|---------|--------------------------------|-------------------|----------------------------------|--------------------|
| | Testigo | G1 temprana | G1 tardía | G1 temprana | G1 tardía |
| MNU | | | | | |
| x±S Incremento | 4±0.6 | 4.9±0.5 (0.9) | 5.8±0.7 (1.8) | 6.7±0.1 (2.7) | 7.1±0.6 (3.1) |
| n | 10 | 6 | 6 | 4 | 5 |
| p: Tratado vs testigo | | 0.0031 | 0.00021 | 1.0 e-07 | 0.000127 |
| Temp. vs tard. | | | 0.03 | | 0.28 |
| Temp. vs temp. | | | | 0.00021 | |
| Tard. vs tard. | | | | | 0.018 |
| ENU | | | | | |
| x±S Incremento | 3.6±0.7 | 9.15±0.9 (5.5) | 8.17±0.2 (4.6) | 8.5±0.5 (4.9) | 11.56±0.8 (7.9) |
| n | 7 | 10 | 8 | 5 | 5 |
| p: Tratado vs testigo | | 1.4 e-09 | 1.2 e-06 | 6.7 e-07 | 3.0 e-06 |
| Temp. vs tard. | | | 0.04 | | 0.000183 |
| Temp. vs temp. | | | | 0.11 | |
| Tard. vs tard. | | | | | 4.06e-04 |
| MMS | | | | | |
| x±S Incremento | 2.9±0.5 | 4.7±0.4 (1.8) | 6.9±0.7 (4.0) | 6.6±0.7 (3.7) | 10.0±0.5 (7.1) |
| n | 8 | 7 | 5 | 5 | 6 |
| p: Tratado vs testigo | | 1.5 e-06 | 1.4 e-05 | 1.5 e-05 | 2.8 e-12 |
| Temp. vs tard. | | | 0.002 | | 5.2 e-05 |
| Temp. vs temp. | | | | 1.1 e-04 | |
| Tard. vs tard. | | | | | 6.2 e-05 |
| EMS | | | | | |
| x±S Incremento | 3.9±0.3 | 5.1±0.2 (1.2) | 7.0±0.4 (3.1) | 6.3±0.8 (2.4) | 7.7±0.4 (3.8) |
| n | 8 | 5 | 6 | 6 | 6 |
| p: Tratado vs testigo | | 2.7e-06 | 7.3 e-08 | 0.00028 | 3.7 e-08 |
| Temp. vs tard. | | | 6.3 e-06 | | 0.0057 |
| Temp. vs temp. | | | | 0.0163 | 0.0159 |
| Tard. vs tard. | | | | | |

Significancia prueba t de Student, p=probabilidad. n=número de animales.
Incremento = incremento con respecto al testigo.

El MMS indujo una frecuencia de ICH_s en la G1 tardía muy cercana al doble de los inducidos en la G1 temprana, tanto en la 1ª como en la 2ª división celular. Estas

diferencias fueron estadísticamente significativas, lo cual indica que en ambas divisiones hubo reparación de las lesiones inductoras de ICH_s cercana al 50%.

Por su parte el EMS generó una frecuencia de ICH_s que fue 2.5 veces más alta en la G1 tardía que en la G1 temprana de la 1^a división. En la 2^a división se observó una frecuencia de lesiones inductoras de ICH_s en G1 temprana que fue dos tercios de la obtenida en la G1 tardía. Estos resultados indican que durante la G1 las células eliminaron parcialmente las lesiones inductoras de ICH_s, aunque aquellas causadas después de la incorporación de BrdU se eliminaron menos eficientemente.

5.3 Eficiencia de los AA para inducir ICH_s por célula.

En la tabla 2 se presentan las estimaciones de la eficiencia de los diferentes mutágenos para inducir ICH_s, la cual se reportó como la frecuencia de ICH_s por célula inducida por estos compuestos menos la frecuencia basal observada en los grupos testigo, dividida entre la Dosis (D) de los mutágenos (Morales-Ramírez y col., 1984b, 2001). Se consideraron los resultados obtenidos en las células expuestas en las G1 tardías de la 1^a y 2^a división, dado que a estos tiempos de exposición es poco probable la reparación de las lesiones y la inducción de ICH_s depende únicamente de la eficiencia de estos agentes para inducir lesiones productoras de ICH_s. La eficiencia de los compuestos, antes y después de incorporar BrdU fue en orden decreciente MNU, ENU, MMS y EMS. Estos resultados sugieren que las nitrosoureas generaron más ICH_s que los metanosulfonatos.

En cuanto al tipo de alquilación, parece ser que los AA metilantes también generaron más ICH_s que los etilantes, lo mismo para las células con su ADN sustituido con BrdU como en las que no lo está. Las observaciones realizadas en

la presente tesis con relación a que el EMS fue 9 veces menos eficiente que la ENU y 14 veces menos que la MNU.

| TABLA 2 EFICIENCIA DE INDUCCIÓN DE ICH_s POR MNU, ENU, MMS Y EMS ANTES O DESPUES DE BrdU. | | | | | | |
|--|--------------------------------|--|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | Dosis (D) (μmol/kg de peso) | Incremento (I) ICH _s tratado- ICH _s testigo | | Eficiencia (E) | | Aumento de E % |
| | | Antes de BrdU | Después de BrdU | Antes de BrdU | Después de BrdU | |
| MNU | 0.05 | 1.8 | 3.1 | 36.0 | 62.0 | 72 |
| ENU | 0.2 | 4.6 | 7.9 | 22.8 | 39.7 | 74 |
| MMS | 0.27 | 4.0 | 7.1 | 14.8 | 26.3 | 77 |
| EMS | 1.2 | 3.1 | 3.8 | 2.6 | 3.2 | 23 |

Incremento=Frecuencia de ICH_s inducidos con los AA -la frecuencia de los ICH_s de los grupos testigo.

$$E = \frac{\text{ICH}_s \text{ inducidos} - \text{ICH}_s \text{ testigo}}{\mu\text{mol/kg peso}}$$

En esta tabla adicionalmente se puede observar que aumentó la eficiencia de los AA para inducir lesiones, que se expresaron como ICH_s, cuando el tratamiento fue durante la 2ª división, es decir en células que tenían su ADN sustituido unifilarmente con BrdU. En el caso de la MNU la eficiencia se incrementó el 72%, para la ENU fue alrededor del 74% y para el MMS fue de 77%. En el caso del EMS sólo se observó un incremento del 23%, probablemente este aumento en la eficiencia fue debido a que la BrdU tuvo un efecto sensibilizador sobre la molécula de ADN, que la hizo más susceptible al ataque de los AA. Hay que considerar que el nivel de sustitución de la BrdU al parecer fue similar en todos los experimentos, ya que la frecuencia basal de ICH_s en los diferentes grupos testigos fue muy parecida.

5.4 Efecto de la sustitución de BrdU en una cadena sobre la eficiencia de los AA para inducir ICH_s.

Los resultados antes mencionados sugieren que la incorporación de la BrdU al ADN incrementa la sensibilidad a la inducción de ICH_s y que dicha incorporación puede alterar la susceptibilidad de reparación de las lesiones inducidas por los mutágenos. Sin embargo para poder establecer la magnitud del efecto, se tiene que tomar en cuenta que no se pueden hacer inferencias directas a partir de los datos de la inducción en la 2^a división, como se calculó en la tabla 1, porque en estas células sólo una cadena está sustituida.

En la tabla 3 se muestran los datos de la eficiencia de la MNU, la ENU, el MMS y el EMS para inducir ICH_s por cadena de ADN, estimada mediante el cálculo de la inducción de los ICH_s en una cadena no sustituida, la cual se le resta a la inducción en la 2^a división, para determinar la inducción de los ICH_s en la cadena sustituida.

La eficiencia se estimó como la inducción de ICH_s/μmola y el aumento de la Eficiencia se calculó como la Eficiencia después de BrdU menos la Eficiencia antes de BrdU en porcentaje. El efecto de este análogo de base se puede ver al comparar los ICH_s inducidos por estos agentes cuando una de las cadenas ya está sustituida con la BrdU, esto se observa claramente en la última columna de la tabla 3, los mutágenos: MNU, ENU y MMS produjeron un incremento en la cadena unifilarmente sustituida de aproximadamente el 150%, en tanto que el EMS incrementó sólo el 45%. Lo anterior sugiere que este análogo hizo más susceptible al ADN al daño inducido por los AA incrementando las lesiones que eventualmente se transformaron en ICH_s. La evidencia anterior permite suponer que la BrdU podría funcionar como un sitio nucleofílico adicional, el cual sería blanco de los grupos electrófilos de los mutágenos, ocasionando con ello que la reacción entre la MNU, la ENU, el MMS y la BrdU fuese similar, excepto para el EMS cuya reacción fue menor.

TABLA 3 EFICIENCIA DE INDUCCIÓN DE ICH_s POR MNU, ENU, MMS Y EMS ADN SUSTITUIDO CON BrdU.

| | Dosis (D) (μ mol/Kg de peso) | Incremento (I) ICH tratado-ICH testigo | | Eficiencia (E) I/D | | Incremento de la Eficiencia (%) |
|-----|---|---|------------------|-----------------------|----------------|--|
| | | *Cadena N.S. | **Cadena U.S. | Cadena N.S. | Cadena U.S. | |
| MNU | 0.05 | 0.9 | 2.2 | 18 | 44 | 144 |
| ENU | 0.2 | 2.25 | 5.65 | 11.3 | 28.3 | 150 |
| MMS | 0.27 | 2.0 | 5.1 | 7.4 | 18.9 | 155 |
| EMS | 1.2 | 1.55 | 2.25 | 1.3 | 1.9 | 46 |

* Estimada como la mitad de la frecuencia en 1^a división.

**Estimada a partir de ICH_s total- ICH_s en cadena no sustituida= ICH_s cadena sustituida.

N.S. No sustituida, U.S. unifilarmente sustituida.

5.5 Comparación de la reparación de lesiones inductoras de ICH_s en 1^a y 2^a división.

Para el caso de la determinación de la reparación en cadenas sustituidas o no con la BrdU, hay varias circunstancias que son importantes de tomarse en cuenta para el análisis de los resultados. Además de la condición de sustitución con BrdU, la que puede afectar la sensibilidad a la inducción de los ICH_s, es el número de ciclos que pasan antes del análisis, que puede afectar la expresión de los ICH_s en caso de que por ejemplo ocurra el fenómeno de cancelación. Stetka, (1979) señaló que si una lesión inductora de ICH_s en el ADN no es reparada antes de la fase S, su persistencia puede inducir otro ICH en el mismo locus del cromosoma en el 50 % de los casos, lo que llevaría a una situación de que si dos ICH_s consecutivos ocurren en un locus particular estos eventos no se observarán en la mitad de los cromosomas de la siguiente mitosis. También se estimó la

probabilidad de expresión de una determinada lesión como ICH_s (Morales-Ramírez y col., 1990).

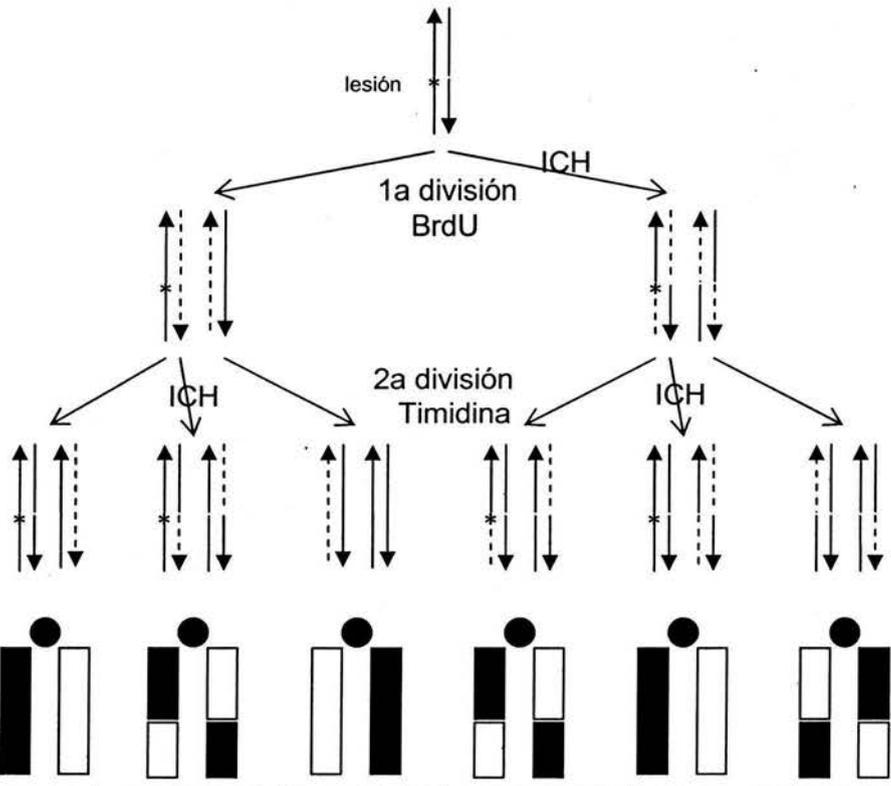
Las circunstancias analizadas son importantes porque pueden afectar directamente la frecuencia de los ICH_s. La exposición en la 1ª división implica que la exposición al mutágeno fue en ausencia de sustitución con la BrdU, pero requiere el paso de dos ciclos de división antes del análisis. Por otra parte la exposición en el segundo ciclo implica el paso de sólo un ciclo antes del análisis, pero también la sustitución unifilar del ADN con la BrdU. Con el objeto de hacer predicciones sobre la forma en que estas variables pueden afectar las frecuencias de los ICH_s, se hace el análisis de la frecuencia de los ICH_s que se esperaría dependiendo del número de ciclos y de la posibilidad de que ocurra el fenómeno de cancelación o no y de la probabilidad de expresión de una determinada lesión como ICH_s, como se muestra en la figura 7.

También se predice la frecuencia, probabilidad y proporción de ICH_s en la 1ª o la 2ª división, causados por la exposición al mutágeno en el 1º ó 2º ciclo de división, para diferentes probabilidades de expresión de los ICH_s y en presencia o ausencia del fenómeno de cancelación. Suponiendo que no hubiera un efecto de la incorporación de la BrdU sobre la inducción de los ICH_s.

Los cálculos indican que la frecuencia de los ICH_s inducidos por la exposición en primera o segunda división es casi igual, es decir produce una proporción 1:1, con la excepción de cuando la probabilidad de expresión es 1 y se presenta el fenómeno de cancelación. En ese caso la inducción de los ICH_s en la 2ª división es el doble que en la 1ª. Es decir que la frecuencia de los ICH_s en la 2ª división sólo es mayor que en la 1ª, cuando: las lesiones que se producen son 100% persistentes y siempre dan lugar a ICH_s en el mismo locus en divisiones sucesivas. Suponiendo que éste no es el caso y por lo tanto la inducción de los

ICH_s por exposición en el 1^{er} acto es igual que en el segundo, a partir del análisis anterior se puede estimar la frecuencia de ICH_s en la cadena sustituida con la BrdU del 2^o ciclo, por diferencia, basándose en la frecuencia de los ICH_s inducidos en la 1^a división, es decir en las cadenas de ADN no sustituidas.

Figura 7



| Division de Exposición | p Exprs | Mismo Locus | | | | | | | Probabilidad de inducción de ICH | Proporción ICH-1:ICH-2 |
|------------------------|---------|-------------|-------|-------|------|-------|-------|------|----------------------------------|------------------------|
| 1 | 1.0 | N | | | | 0.5 | | 0.5 | 1.0 | 1:1 |
| 2 | 1.0 | N | | 1.0 | | | | | 1.0 | |
| 1 | 0.5 | N | 0.125 | 0.125 | 0.25 | 0.125 | | 0.25 | 0.5 | 1:1 |
| 2 | 0.5 | N | 0.5 | 0.5 | | | | 0.5 | 0.5 | |
| 1 | 1.0 | S | | | | | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 1:2 |
| 2 | 1.0 | S | | 1.0 | | | | | 1.0 | |
| 1 | 0.5 | S | 0.125 | 0.125 | 0.25 | 0.125 | 0.125 | 0.25 | 0.5 | 1:1 |
| 2 | 0.5 | S | 0.5 | 0.5 | | | | 0.5 | 0.5 | |

En la tabla 4 se analizó el efecto de la BrdU en el ADN con cadenas sustituidas y no sustituidas con el análogo, comparando las frecuencias de los ICH_s inducidos por los mutágenos en las G1 tardías del 1^o y 2^o ciclos celulares es decir antes y después de la incorporación de BrdU. Al final de G1, las lesiones que fueron originadas por los agentes alquilantes, muy probablemente no tuvieron la posibilidad de ser reparadas y por lo tanto representan la inducción real.

Con fines de comparación y dado que la inducción en la cadena no sustituida se estima directamente de los datos de la exposición en 1^a división, los resultados se pueden analizar más fácilmente en las dos últimas columnas de la tabla 4.

De acuerdo con este análisis las lesiones inductoras de los ICH_s producidas por la MNU en el ADN no sustituido fueron reparadas en un 50%, en cambio ninguna de las inducidas en la cadena sustituida con la BrdU fue reparada. En el caso de la ENU ocurrió lo contrario, las lesiones en el ADN no sustituido no fueron reparadas, incluso éstas se incrementaron ligeramente, posiblemente porque se formaron nuevas lesiones a partir de las ya inducidas y las lesiones de la cadena sustituida sólo se repararon en un 60%.

En el caso del MMS, las lesiones en ADN sustituido como en la cadena no sustituida fueron reparadas con una eficiencia de aproximadamente el 50%. Por su parte el EMS causó lesiones inductoras de ICH_s que se repararon en un 60% en el ADN no sustituido y sólo en un 20% en la cadena sustituida.

TABLA 4 DIFERENCIAS EN LA INDUCCIÓN Y REPARACIÓN DURANTE G1 DE LAS LESIONES PRODUCTORAS DE ICH_s INDUCIDAS POR MNU ENU MMS y EMS EN LAS CADENAS DEL ADN SUSTITUIDAS Y NO SUSTITUIDAS CON BrdU

| | LESIONES INDUCTORAS DE ICH _s / CELULA | | | |
|---------------------|--|-------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| | 1 ^a División | 2 ^a División | | |
| | ADN no sustituido con BrdU | Total | Cadena* ADN no sustituida con Brdu | Cadena** ADN Sustituida con BrdU |
| MNU | | | | |
| Total | 1.8 | 3.1 | 0.9 | 2.2 |
| ***No reparadas (%) | 0.9 (50) | 2.7 | 0.45 | 2.25 (100) |
| ***Reparadas (%) | 0.9 (50) | 0.4 | 0.45 | 0 (0) |
| ENU | | | | |
| Total | 4.5 | 7.9 | 2.25 | 5.65 |
| ***No reparadas (%) | 5.5 (100) | 4.9 | 2.75 | 2.15 (38) |
| ***Reparadas (%) | -1 (0) | 3 | -0.5 | 3.5 (62) |
| MMS | | | | |
| Total | 4.0 | 7.1 | 2.0 | 5.1 |
| ***No reparadas (%) | 1.8 (45) | 3.7 | 0.9 | 2.8 (55) |
| ***Reparadas (%) | 2.2 (55) | 3.4 | 1.1 | 2.3 (45) |
| EMS | | | | |
| Total | 3.1 | 3.8 | 1.55 | 2.25 |
| ***No reparadas (%) | 1.2 (39) | 2.4 | 0.60 | 1.8 (80) |
| ***Reparadas (%) | 1.9 (61) | 1.4 | 0.95 | 0.45 (20) |

*Estimada como la mitad de la frecuencia en 1^a división.

**Estimada a partir de ICH_s total-ICHs en cadena no sustituida= ICH_s cadena sustituida.

***Las reparadas y no reparadas fueron calculadas a partir de los datos de la tabla 1

5.6 Análisis de la susceptibilidad a la inducción y reparación de lesiones inductoras de ICH_s en las poblaciones celulares.

La susceptibilidad a la inducción de los ICH_s y la reparación de las lesiones también se analizó en las poblaciones celulares, comparando las curvas de la frecuencia acumulada de las células con respecto al número de ICH_s (figuras 8, 9, 10 y 11). En la figura 8 se muestran las curvas de las frecuencias de los animales expuestos a la MNU, se observa que hubo un incremento de células con frecuencias de ICH_s más altas tanto en la G1 temprana como la tardía con respecto al grupo testigo, la inducción de los ICH_s fue más alta en la 2^a división y en esta situación la sensibilización del ADN por la incorporación de BrdU tuvo un papel importante. Los porcentajes aproximados de células de más de 3 ICH_s por célula fueron de 55% en los dos grupos testigo antes y después de la incorporación de la BrdU. Para las células tratadas con este agente los porcentajes aproximados de células con más de 3 ICH_s fue 75% en la etapa temprana de la 1^a división y de 85% en la etapa tardía. Los porcentajes aproximados de células con más de 3 ICH_s fueron 88% en la etapa temprana de la 2^a división y de 92% en la etapa tardía, se observó que hubo una diferencia mínima de células con más de 3 ICH_s.

Como se puede apreciar hubo una diferencia en el porcentaje de las células que tuvieron más de 3 ICH_s el cual fue mayor en la 1^a división que en la 2^a. Esto sugiere que las células repararon más eficientemente las lesiones inductoras de ICH_s cuando el ADN estuvo sustituido con la BrdU y que la inducción de los ICH_s fue mayor cuando el ADN estaba unifilarmente sustituido con el análogo.

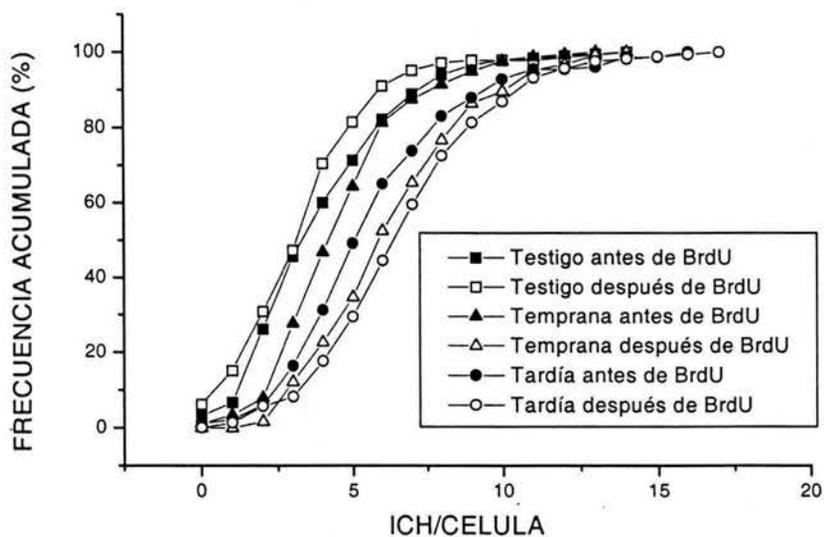


Figura 8. Curvas de la frecuencia acumulada en porcentaje de células con respecto al número de ICH_s por célula de la glándula salival de ratón tratadas y no con MNU.

En la figura 9 se observa un incremento de células con frecuencias de ICH_s más altas en las curvas de los animales expuestos a la ENU tanto en la G1 temprana como la tardía, con relación a sus testigos correspondientes. Se observó que la inducción de ICH_s fue más alta en la 2^a división cuando el ADN está sustituido unifilarmente con la BrdU, lo que apoya un efecto sensibilizador de este análogo al ADN. Los porcentajes aproximados de células con más de 6 ICH_s fueron 11% en el grupo testigo antes de BrdU de la 1^a división y de 6% después de BrdU en la 2^a división. En la 1^a división los porcentajes de células con más de 6 ICH_s fueron 75%, y 65% en la etapa temprana y en la etapa tardía, respectivamente. El número de células con más de 6 ICH_s en la etapa temprana fue ligeramente mayor que en la etapa tardía. Los porcentajes aproximados de células con más de 6 ICH_s fueron 72% en la etapa temprana de la 2^a división y de 92% en la etapa tardía. Lo anterior sugiere que las lesiones inductoras de los ICH_s generadas por la ENU fueron reparadas parcialmente por las células en la 2^a división. La ligera diferencia

en el porcentaje de células con más de 6 ICH_s en la 1^a división, sugiere que estas lesiones no se repararon y son persistentes.

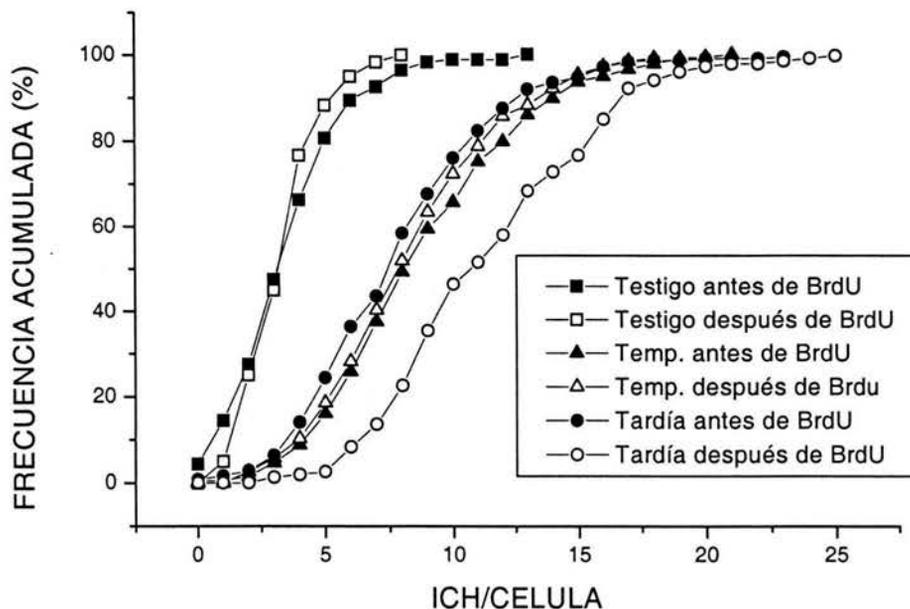


Figura 9. Curvas de la frecuencia acumulada en porcentaje de células con respecto al número de ICH_s por célula de la glándula salival de ratón tratadas y no con ENU.

En la figura 10 se puede apreciar un incremento de células con frecuencias de ICH_s más altas tanto en la G1 temprana como la tardía de la 1^a y 2^a división, con respecto a sus testigos, como resultado de la exposición al MMS. La inducción de ICH_s fue más alta en la 2^a división cuando el ADN está sustituido unifilarmente con BrdU, lo que también apoya el efecto sensibilizador de este análogo de base. Los porcentajes aproximados de células con más de 6 ICH_s fueron 7% en el grupo testigo para el tratamiento antes de BrdU y de 3% en el testigo para la exposición después de BrdU. Los porcentajes de células con más de 6 ICH_s fueron de 20% en la etapa temprana de la 1^a división y 48% en la etapa tardía. Para las células tratadas después de la incorporación de BrdU en la 2^a división los porcentajes

aproximados de células con más de 6 ICH_s fueron 42% en la etapa temprana de la 2^a división y de 88% en la G1 tardía. Lo anterior sugiere que hubo una reparación parcial de las lesiones inductoras de ICH_s inducidas por el tratamiento con el MMS en ambas divisiones celulares.

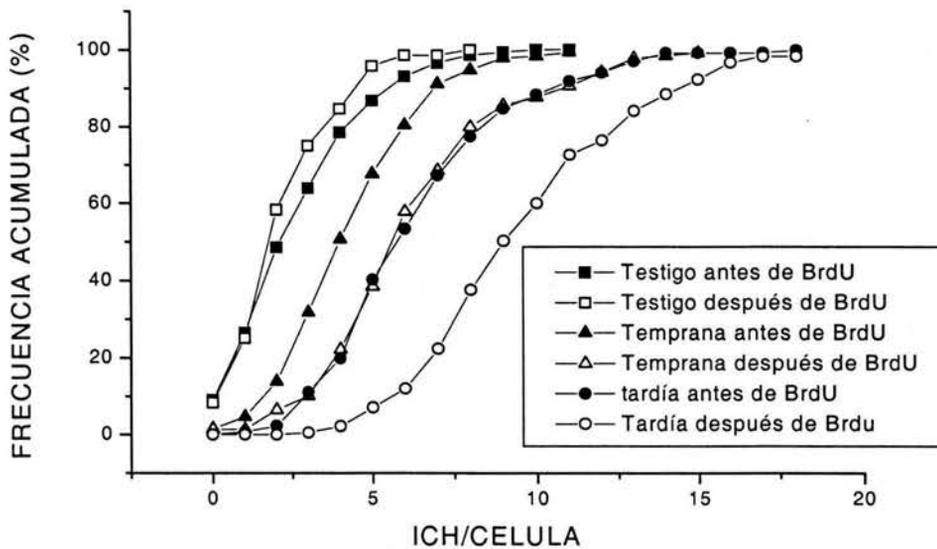


Figura 10. Curvas de la frecuencia acumulada en porcentaje de células con respecto al número de ICH_s por célula de la glándula salival de ratón tratadas y no con MMS.

En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos por la exposición a EMS en la que se observa un incremento de células con frecuencias de ICH_s más altas tanto en la G1 temprana como la tardía de la 1^a y 2^a división, con respecto a sus testigos. También se puede apreciar que la inducción de ICH_s fue más alta en la 2^a división cuando el ADN está sustituido unifilarmente con BrdU, con este mutágeno el efecto sensibilizador de la BrdU aparentemente fue menor que el encontrado con MNU, ENU y MMS. Los porcentajes aproximados de células con más de 6 ICH_s fue de 12% en el grupo testigo antes de la incorporación de BrdU en la 1^a división y de 13% en la 2^a división después de BrdU. Los porcentajes de células con más de 6 ICH_s fue de 20% en la etapa temprana de la 1^a división y de 45% en

la etapa tardía. Es decir que el número de células con más de 6 ICH_s en la etapa temprana es menor con respecto a la etapa tardía.

Para las células tratadas en la 2^a división los porcentajes aproximados de células con más de 6 ICH_s fue de 38% en la etapa temprana y 48% en la etapa tardía. Se observó una mayor inducción de células con más de 6 ICH_s durante la 1^a división, con respecto a la 2^a división. Del análisis anterior se puede inferir que las lesiones inductoras de ICH_s generadas por el EMS fueron parcialmente reparadas en la 1^a división y estas lesiones fueron más persistentes en la 2^a división.

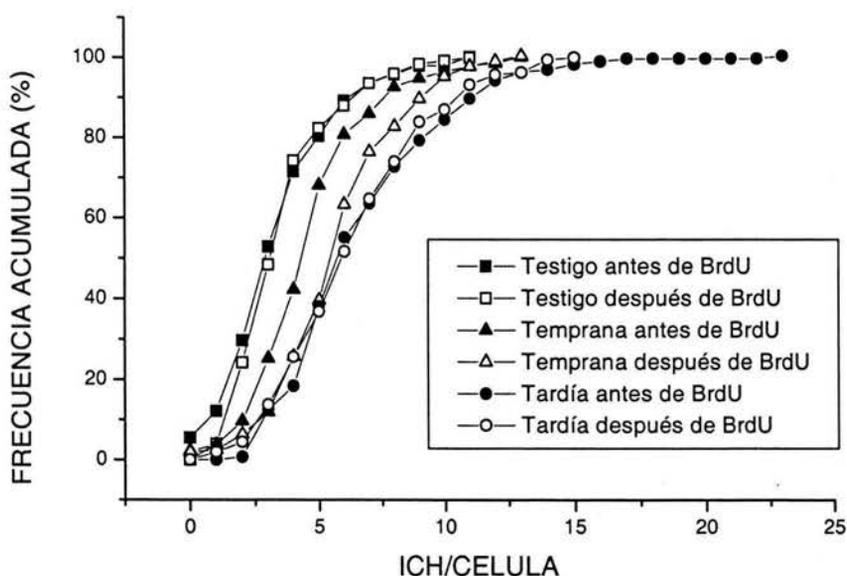


Figura 11. Curvas de la frecuencia acumulada en porcentaje de células con respecto al número de ICH_s por célula de la glándula salival de ratón tratadas y no con EMS.

El análisis efectuado en términos de las poblaciones celulares sugiere que la respuesta de las células de la glándula salival, a los tratamientos con los mutágenos es el resultado de un efecto generalizado y no de un efecto en particular en algunas células. Estas evidencias están acordes con los análisis

realizados por animal en las tabla 1. También confirman que la susceptibilidad al daño aumenta en las células que tienen su ADN unifilarmente sustituido con BrdU.

6. DISCUSIÓN

6.1 Eficiencia inductora de ICH_s de los AA en células con ADN sustituido y no con BrdU.

Está bien establecido que los tratamientos que dañan al ADN originan la formación de ICH_s con diferentes eficiencias (Kaina y col., 1993). La eficiencia de los compuestos para inducir una determinada respuesta celular es muy variable y probablemente ésta dependerá de varios factores como son: sus propiedades químicas, su farmacocinética, y la factibilidad de la reparación del daño ocasionado por estas moléculas (Escalza y col., 1992; Sanderson y Shield, 1996). En esta tesis se analizaron dos de los aspectos mencionados anteriormente que son: 1) la eficiencia de estos AA y 2) la reparación del daño ocasionado a las células de la glándula salival.

En el siguiente análisis se examinará la efectividad de estos AA para inducir ICH_s. Se consideró a la eficiencia como un índice para evaluar la capacidad de estos compuestos para inducir ICH_s en las células, con relación a la dosis empleada.

Se infiere que las nitrosoureas generaron más ICH_s que los metanosulfonatos y que los AA metilantes también fueron más eficientes que los etilantes. Al respecto los estudios realizados por Nishi y col. (1984) mostraron que los AA metilantes originaron más ICH_s que los etilantes.

En otro estudio donde se hizo una comparación *in vivo* de tres tipos celulares se observó que la eficiencia de las nitrosoureas para inducir ICH_s fue mayor en las células de la médula ósea que en las espermatogonias y en las células de la glándula salival de ratón. Comparando esos resultados con los reportados en esta tesis, en ambos se observó que la MNU tuvo una mayor eficiencia para inducir ICH_s que la ENU. Aunque se observó que las células de la glándula salival y las células de la médula ósea son más sensibles que las espermatogonias al daño

productor de ICH_s inducido por la MNU y la ENU (Morales-Ramírez y col., 2001), no obstante que la concentración micromolar para la MNU varió poco en los tres tipos de células; la concentración micromolar para la ENU fue la misma. En una revisión realizada por Shibuya y Morimoto, (1993) se mencionó que la ENU es menos reactiva con el ADN que la MNU, esta evidencia puede apoyar los resultados de esta tesis donde se infiere que la MNU es el agente que tiene mayor reactividad con el ADN.

En un estudio realizado por Nishi y col. (1984) en células V79 de criceto chino se observó inducción de ICH_s y mutaciones en el locus hipoxantina guanina fosforribosil transferasa con diferentes agentes químicos y físicos, también se notó que la MNU fue el agente inductor de ICH_s más potente de los compuestos N-nitroso seguido por la ENU. Posiblemente esto se debe a que la mayoría de las lesiones inductoras de estos intercambios son debidas a la O⁶-MeG, como también fue propuesto por Kaina y col. (1991), y por otro lado también la MNU originó una proporción más alta de lesiones en el N7 de la guanina que la ENU (Beranek, 1990), la N7-MeG está relacionada con la formación de los ICH_s generados por la MNU de acuerdo con Conell y Medcalf, (1982).

En nuestros resultados encontramos que la MNU tiene una mayor eficiencia inductora de ICH_s y esto puede estar basado en que produce más alquilaciones en el O6 de la guanina además de que este aducto está relacionado con la producción de lesiones secundarias (Kaina y Christmann, 2002). Los aductos originados por este mutágeno son de distribución relativamente uniforme en los diferentes tejidos (Valanis y col., 1994).

En estudios realizados *in vivo* se observó que la sensibilidad de las células de la médula ósea al MMS fue mayor que al EMS (Morales-Ramírez y col., 1984b), aunque la concentración del MMS utilizada por ellos fue más alta que la que se usó en el presente estudio y la concentración del EMS fue la misma en ambos

trabajos, sin embargo la eficiencia para inducir ICH_s fue más alta en las células de la médula ósea que en las células de la glándula salival.

También en el estudio realizado por Nishi y col. (1984) se observó que el MMS fue el más potente inductor de ICH_s de los metanosulfonatos seguido por el EMS. Se ha reportado que ambos agentes inducen la lesión 3-alquiladenina (Swenson y col., 1980; Heflich y col., 1982) estos autores sugirieron que esta lesión originó la formación de los ICH_s. Por otro lado otro factor que puede influir en la mayor eficiencia del MMS para inducir ICH_s es el que está relacionado con la mayor producción de la 3-MeA tres veces más que el EMS (Beranek, 1990).

Como se puede observar en la tabla 2 al comparar la eficiencia entre los agentes metilantes, la de la MNU fue mayor que la del MMS. En otro estudio se comparó la inducción de ICH_s en linfocitos de bazo de ratón, con la misma concentración de MNU y MMS, la frecuencia encontrada fue más alta con la MNU que con el MMS (Neft y Conner, 1989). Estos resultados están acorde con los resultados presentados en esta tesis. Un factor que puede determinar la mayor eficiencia para inducir lesiones generadoras de ICH_s, de la MNU sobre el MMS puede ser debido a que este AA causa una baja o imperceptible cantidad de O6-MeG (Swenson y col., 1980; Beranek, 1990), como ya se mencionó, ésta es una lesión importante en la generación de los ICH_s y por otro lado origina un bajo porcentaje de alquilaciones en los fosfotriésteres (Beranek, 1990). Lo anterior sugiere que posiblemente son otras las lesiones involucradas en la formación de los ICH_s inducidos por el MMS, lo cual concuerda con lo planteado por Morris y col. (1983), y por Day III y col. (1987).

Por lo que se refiere a la mayor eficiencia inductora de ICH_s de la ENU sobre el EMS, nuestras observaciones contrastan con otros reportes. En linfocitos de sangre periférica de humanos se evidenció que el EMS fue un inductor de ICH_s más eficiente que la ENU (Vijayalaxmi y Evans, 1984), y en otro estudio en células CHO también el EMS fue más potente que la ENU (Duncan y Evans, 1982;

Heflish y col., 1982). El EMS generó un bajo porcentaje de alquilaciones en la posición O6 de la guanina y no originó aductos en las posiciones O2, O4 de la timina y poca cantidad de fosfotriésteres 12%, contra 56% que originó la ENU (Beranek, 1990). Este último mutágeno causó un menor porcentaje de alquilaciones en la posición N7 de la guanina (Beranek, 1990).

La 3-etiladenina inducida por los mutágenos EMS y ENU se relacionó con la formación de los ICH_s (Heflishy col., 1982). Lo anterior puede explicar su mayor participación en la generación de los ICH_s inducidos por metanosulfonatos (Morris.y col., 1983).

Algunos estudios han reportado que los AA producen alquilaciones en varios sitios de la molécula del ADN y que estas se pueden transformar en lesiones inductoras de ICHs (Swenson y col., 1980; Jostes Jr., 1981; Heflish y col., 1982; Morris y col., 1983; Kaina y col., 1991) y aunque hay evidencias que señalan que los ICH_s inducidos por la MNU son debidos a la lesión O6-alquilguanina (Kaina y col., 1991) para otros mutágenos como MMS, EMS y ENU pueden ser otras las lesiones generadoras de este evento.

Es evidente que las nitrosoureas fueron más eficientes que los metanosulfonatos para generar lesiones inductoras de ICH_s, hecho derivado principalmente de las alquilaciones en el O6 de la guanina y aunque los metanosulfonatos producen muy poca cantidad de esta última lesión, generan otro tipo de lesiones que están ligadas con la formación de los ICH_s (Glaab y col., 1999). Para fines de comparación, las evidencias son claras en el sentido de que las nitrosoureas fueron más eficientes que los metanosulfonatos para inducir lesiones generadoras de ICH_s y que los agentes metilantes también fueron más inductores de estos eventos que los etilantes (tabla 2). El EMS generó la eficiencia más baja como inductor de ICH_s y con relación a la dosis empleada que fue la más alta de los compuestos estudiados, lo anterior se relaciona con la observación de Frei y col. (1978) los cuales sugirieron que este AA, tiene la reactividad con el ADN más baja

que la MNU y la ENU. Los autores argumentaron que lo anterior se puede explicar por: 1) que la velocidad de la reacción del EMS es más baja que las nitrosoureas y 2) eliminación de los grupos etilos del EMS por una detoxificación enzimática por las enzimas glutatión transferasas.

6.2 Efecto de la incorporación de BrdU en el ADN, sobre las lesiones inductoras de ICH_s.

Aunque la BrdU produce efectos adversos en las células (Morris, 1991) también ha sido empleada como base análoga de la timina, para la diferenciación de las cromátidas junto con el Hoechst para el análisis de los ICH_s (Latt, 1973). Sin embargo se ha reportado que la frecuencia de los ICH_s es proporcional a la incorporación de la BrdU (Escalza y col., 1985; Rodríguez-Reyes y Morales-Ramírez, 2003). También se observó que interfirió con la inducción de los ICH_s incrementando la frecuencia de éstos, cuando el tratamiento con el agente alquilante MNNG fue antes de la incorporación del análogo (Popescu y col., 1980), o también reduciendo su frecuencia cuando las células se trataron con MMS o cuando las células se incubaron con la BrdU antes del tratamiento con MNNG (Okey, 1981; Popescu y col., 1980). La explicación dada a esta observación fue que cuando este análogo está incorporado en el ADN, puede reducir el número de sitios de unión (timina o citocina) o sea que altera la estructura del ADN en tal forma que se reduce la formación de los aductos.

Hay evidencias que indican que la inducción de ICH_s fue más alta cuando la banda progenitora de ADN está sustituida con BrdU (Albanesi y col., 1999). Cuando este análogo se encuentra en el ADN produce susceptibilidad celular a la irradiación e incrementa la susceptibilidad a la inducción de ICH_s por agentes alquilantes.

Se ha reportado que ciertos agentes químicos interaccionan sinérgicamente con la BrdU y producen frecuencias de ICH_s más elevadas que las esperadas (Stetka y Carrano, 1977; Speit y col., 1980). Esto puede ser debido a que también la BrdU

es mutagénica. Nuestras observaciones sugieren que este análogo de base aumenta las frecuencias de los ICH_s de los cuatro AA, cuando las células han sustituido unifilarmente su ADN con BrdU. El posible mecanismo por cual se incrementaron las lesiones inductoras de los ICH_s se analizará más adelante.

Cuando el ADN está unifilarmente sustituido con la BrdU favorece que esta molécula, sea más sensible al daño originado por los mutágenos. Este fenómeno conlleva a que la eficiencia de estos agentes revisado en la sección 6.1 para inducir daño aumente.

Con respecto al efecto que puede tener la BrdU sobre la eficiencia inductora de ICH_s de los mutágenos: MNU, ENU, y MMS los resultados son consistentes, no así para el EMS cuya eficiencia fue más baja (Tabla 3). En el estudio realizado por Morales-Ramírez y col. (2001) en donde compararon la eficiencia inductora de ICH_s de las nitrosoureas, se observó mayor eficiencia de la MNU sobre la ENU y aparentemente mayor sensibilidad de las células de la médula ósea sobre las de la glándula salival y espermatogonias. Con respecto a lo anterior hay que considerar que las células de la glándula salival tenían su ADN unifilarmente sustituido y que las células de la médula ósea y espermatogonia bifilarmente sustituido.

Por lo anterior se puede decir que el incremento en la eficiencia de estos mutágenos para inducir lesiones generadoras de ICH_s puede resultar de la reacción de la BrdU con el ADN. Consecuentemente se pueden originar más sitios nucleofílicos a los cuales se unan los grupos electrofílicos de los AA. En los datos reportados por Morales-Ramírez y col. (2001) se observaron diferencias en la eficiencia inductora de ICH_s de las nitrosoureas, la cual aumentó después de la incorporación de BrdU en el ADN de las células de la glándula salival y médula ósea, con respecto a la eficiencia de estos AA en células que aún no habían incorporado el análogo.

Un aspecto importante que no se ha revisado es comparar la eficiencia de los AA antes y después de la incorporación de la BrdU. El análisis realizado en la última columna de la tabla 3 muestra que esta eficiencia aumenta considerablemente en la cadena unifilarmente sustituida con el análogo, este hecho resulta por demás interesante y aunque el posible mecanismo por el cual esto se realiza aún no está claro, aunque se han propuesto algunas evidencias para tratar de entender su significado.

Hay certidumbre de que la exposición simultánea de la BrdU y del agente mutagénico da lugar a un incremento en la frecuencia de los ICH_s, lo cual no es indicador de la genotoxicidad del agente empleado (Djorjervic y Szybalsky, 1960; Bruggeman y van der Hoeven, 1984; Van der Hoeven y col., 1984). Como se mencionó en la introducción se sabe que la BrdU se incorpora al ADN en el lugar de la timina, lo cual puede ocurrir no sólo en la forma ceto usual sino también en la forma tautomérica enol formando uniones de hidrógeno con la guanina en lugar de la adenina, que es el par normal de la timina (Anisimov, 1994). Sin embargo este análogo tiene propiedades de apareamiento que son ambiguas y esto conduce a que se originen diferentes efectos biológicos algunos de ellos ya han sido estudiados y otros aún no, como es el caso del incremento de la sensibilidad del ADN al daño inducido por compuestos químicos (Anisimov, 1994; González-Beltrán y Morales-Ramírez, 1999, 2003).

La hipótesis que se plantea aquí es que el átomo electronegativo de Bromo sería un sitio de reacción para los AA que son compuestos electrofílicos. Lo anterior contrasta con la propuesta de Popescu y col. (1980) quienes sugirieron que la BrdU puede reducir el número de sitios en el ADN con los cuales reaccionan los aductos generados por el MNNG. Esta hipótesis puede estar mejor sustentada con los argumentos planteados por Mancini y col. (1999) con relación al aumento en la reactividad de la posición de ciertos aductos, la cual es modificada por la vecindad con algunas bases. El átomo electronegativo de bromo que se ubica en la posición 5 de la timina puede cambiar la distribución local electrónica, creando sitios más

favorables de alquilación sobre la guanina en secuencias adyacentes con bromouracilo. La misma razón puede ser aplicada para incluir al bromouracilo como un sitio de alquilación.

Hay sitios de alquilación que son producidos por los AA en menor proporción con relación a otros aductos (Beranek, 1990). Desde el punto de vista de Mancini y col. (1999) ciertos sitios sobre el bromouracilo que incluyen a la posición O⁴ de la timina, pueden ser más susceptibles al ataque electrofílico debido a la electronegatividad del átomo de bromo. La posición N7 de la guanina puede ser ligeramente más reactiva en aquellas secuencias que contienen BrdU por lo cual resultaría más daño al ADN sin que necesariamente se incremente el nivel de aductos. Cualquier base próxima que aumente la electronegatividad en el N7 de la guanina ocasionará que este sitio sea más susceptible al ataque nucleofílico. Se ha demostrado que bases vecinas a la guanina y timina decrecen la formación del aducto en la posición N7 de la guanina (Hartley y col., 1986; Briscoe y Duarte, 1988; Briscoe y col., 1990).

Con relación al efecto sensibilizador de la BrdU sobre el ADN, éste se puede inferir del incremento de los ICH_s en la cadena sustituida con el análogo por los tratamientos con la MNU, la ENU, y el MMS. Aunque el incremento que se observó con el EMS fue menor que los otros AA se puede decir que, probablemente se debe al mecanismo SN₁/SN₂ con el que funciona este mutágeno. Lo anterior está sustentado en las observaciones realizadas cuando el ADN estuvo unifilarmente sustituido con la BrdU, esta situación pudo propiciar la formación de lesiones inductoras de ICH_s adicionales generadas por la MNU, la ENU y el MMS lo que implicó que incrementara su eficiencia inductora de ICH_s alrededor del 150%, debido a que la molécula de ADN quedó sensibilizada por la BrdU y fue más susceptible para que se generaran lesiones que se transformaron en ICH_s. De lo anterior se puede inferir que hubo sustitución de timina por BrdU.

Con relación a la menor reactividad del EMS (Frei y col., 1978) consideramos que esta es una de las causas por las que este AA fue el inductor de ICH_s menos eficiente de los compuestos estudiados en esta tesis.

El presente protocolo permite examinar en cual de los ciclos se originaron los ICH_s, ya que cuando el tratamiento con los mutágenos fue antes de BrdU en el 1^{er} ciclo habilitó la posibilidad de que se efectuara algún tipo de reparación, en ausencia del análogo y muy posiblemente se descartó alguna interacción de este con los mutágenos. Por otro lado, cuando el tratamiento fue en el 2^o ciclo cuando el ADN estaba sustituido unifilarmente con la BrdU, probablemente el átomo de bromo del bromouracilo ya ubicado en la molécula modificada de ADN, originó cierto tipo de daño que aún se incrementó por el efecto del mutágeno.

En otro estudio se analizó el efecto de la sustitución de la BrdU; cuando se dio un pretratamiento con BrdU a células V79 de criceto chino se observó una sustitución de la timina del 16% con lo que se acrecentó la citotoxicidad de los agentes quimioterapéuticos probados (Russo y col., 1986). Sería importante correlacionar el nivel de sustitución de la timina por la BrdU en el ADN y la inducción de ICH_s, ya que como se reportó (Escalza y col., 1985; Rodríguez-Reyes y Morales-Ramírez, 2003) esta inducción fue proporcional a la incorporación del análogo.

Sin embargo en otro estudio no se encontró una relación directa entre el nivel de sustitución de BrdU en el ADN y la inducción de ICH_s, durante el análisis de tres ciclos consecutivos (Piñero y Cortés, 1993). Cuando la BrdU está presente en altas cantidades en la banda progenitora, potencia la ocurrencia de los ICH_s (Escalza, y col., 1985).

El efecto de la BrdU sobre la inducción de ICH_s probablemente no es en forma circunstancial; debido a que si se redujeran sustancialmente los sitios de alquilación como lo propuso Popescu y col. (1980), de darse esta situación, se pueden reducir los sitios nucleofílicos de reacción de los AA. Considerando que la

condición de sustitución se realiza durante la síntesis, el efecto interacción bromodesoxiuridina-agentes alquilantes se dará antes de que se realice otra nueva síntesis. Lo último puede llevarnos a considerar que probablemente la menor inducción de ICH_s más bien sea derivada de la eficiencia de los sistemas de reparación.

Aunque existen algunas evidencias de que la BrdU sensibiliza de algún modo al ADN los mecanismos no están aún bien definidos y hay una propuesta que analizó la interacción sinérgica entre el análogo y agentes químicos (Schvartzman y Tice, 1982). No obstante que se han realizado diversas observaciones sobre el efecto que tiene la BrdU en la inducción de los ICH_s éste continúa siendo un punto de mucha importancia y quizás en los estudios realizados no se han asentado las bases que expliquen satisfactoriamente este fenómeno el cual se ha relacionado con efectos de sinergia y antagonismo.

El presente protocolo examinó las posibilidades de inducir ICH_s en ADN sustituido y no, así como también discernir si las lesiones inductoras de los ICH_s son objeto de reparación por las células lo cual se discute en la siguiente sección. El término de la sensibilización del ADN por la BrdU referido por algunos autores (Schvartzman y Tice 1982, Natarajan y col., 1983, Morales-Ramírez y col., 1984b) y la consideración de la BrdU como un centro nucleofílico analizado en esta sección quizás aportan nuevas evidencias con relación a la incorporación de la BrdU, en el ADN y los efectos de los AA en el ADN sustituido con este análogo.

6.3 Probabilidad de expresión de las lesiones inductoras de ICH_s durante G1 en ADN sustituido y no con BrdU.

Un problema importante en relación con el análisis de la reparación de lesiones inductoras de ICH_s es el discernimiento de cual es el ciclo celular en el que se forman los ICH_s cuando la exposición a los mutágenos se hace en el 1º de 2 ciclos. Estudios previos demostraron que para la inducción de la mayoría de los ICH_s generados por la ENU y la MNNG en células Mex⁻ de criceto chino se

requirieron de dos ciclos de replicación después de la alquilación (Kaina y Aurich, 1985).

Como se mencionó en la introducción la tinción diferencial de las cromátidas requiere de dos divisiones celulares y es muy probable que en los protocolos que utilizan dos tonos de tinción diferencial, los ICH_s que se analizan sean la acumulación de los ICH_s inducidos en las dos divisiones. Para cumplir con lo anterior es necesaria la presencia de la BrdU durante la síntesis de las dos divisiones y por lo tanto el ADN estará bifilarmente sustituido. El presente protocolo no cumple con la condición anterior ya que el ADN sólo está unifilarmente sustituido por la BrdU debido a que la incorporación del análogo ocurrió únicamente durante la primera de dos divisiones consecutivas.

En orden de aprovechar el efecto de los factores previamente mencionados, en la figura 7 se hicieron las proporciones teóricas de la inducción de los ICH_s por la exposición durante la 1^a y 2^a división, se estimó la probabilidad de expresión para una lesión como 0.5 ó 1.0 (Morales-Ramírez y col., 1990), y para la persistencia y ocurrencia de los ICH_s en el mismo locus en sucesivas divisiones (Morales-Ramírez y col., 1988,1990,1992, 1995a) o para otras circunstancias (Schvartzman y col., 1985). Lo último es relevante porque abre la posibilidad de que la cancelación ocurra. También se muestra la probabilidad de producir diferentes clases de ICH_s en los cromosomas, considerando sólo aquellos que se pueden inducir bajo distintas circunstancias. Por la exposición solamente en la segunda división, se consideraron los descendientes de la cadena dañada unifilarmente sustituida con BrdU, en los cuales las lesiones deberían causar ICH_s con 0.5 ó 1.0 de acuerdo a su probabilidad de expresión.

Las proporciones esperadas de ICH_s-1 e ICH_s-2 deberían ser casi las mismas para todas las condiciones con la excepción de las lesiones obtenidas con la probabilidad de expresión de 1.0 y con la posibilidad de ocurrencia de los ICH_s en el mismo locus. Bajo tales circunstancias los ICH_s-2 deberían de ser el doble de

los ICH_s-1. Los resultados presentados aquí indican que con la exposición al MMS la frecuencia de los ICH_s-2 es más del doble tanto como los de los ICH_s-1, pero sólo es ligeramente más alta después de la exposición con EMS.

En el caso de las nitrosoureas como la MNU y la ENU inducen una frecuencia ICH_s-2 más del doble de los ICH_s-1. Esto podría implicar que el MMS, la MNU y ENU inducen una proporción más alta de lesiones que se expresan como ICH_s en presencia de BrdU o que muestra la posibilidad de causar un ICH en el mismo locus. En el caso de la ENU, recientemente se obtuvo evidencia clara mediante tinción diferencial de tres tonos de que este agente no causa lesiones en el mismo locus (Rodríguez-Reyes y Morales-Ramírez, 2003), es decir que no produce el fenómeno de cancelación. En el mismo contexto, el EMS puede inducir principalmente lesiones que originen ICH_s que son persistentes pero con una baja probabilidad de expresión o incapacidad de producir ICH_s en el mismo locus en divisiones subsecuentes.

En estudios previos usando el protocolo de tres tonos de diferenciación se observó que solamente una fracción de lesiones que generan los ICH_s fueron capaces volver a originarlos en divisiones subsecuentes. Un tercio de las lesiones inductoras de ICH_s causadas por el MMS fueron capaces de inducir los ICH_s en el mismo locus (Morales-Ramírez y col., 1992), se ha propuesto también que este mutágeno genera aductos que persisten por más de un ciclo celular y que son capaces de inducir ICH_s en una segunda vuelta de replicación (Natarajan y col., 1983), en tanto que sólo una sexta parte de las lesiones inducidas por EMS cumplen con la condición anterior (Morales-Ramírez y col., 1995a). Sin embargo las condiciones del protocolo usado no eliminan otras posibilidades.

Bajo estas circunstancias la frecuencia más alta de ICH_s-2 con respecto a ICH_s-1 pudiera no ser explicada por el fenómeno de cancelación, o al menos no totalmente, aunque puede ser interpretado como la exposición de las cadenas sustituidas por BrdU a los mutágenos durante la segunda división.

La persistencia de las lesiones inducidas originalmente en la cadena no sustituida con BrdU pueden expresarse como lesiones secundarias (Kaina y Aurich, 1985) en la 2ª división celular subsecuente, pero quizás no explicaría satisfactoriamente el incremento de frecuencia de los ICH_s en otros ciclos de división posteriores como en el caso de la ENU (Rodríguez-Reyes y Morales-Ramírez, 2003). Con respecto a lo anterior se ha demostrado que agentes que inhiben la metilación del ADN causan un incremento en la frecuencia de los ICH_s que permanece constante en divisiones subsecuentes como un factor heredable (Perticone y col., 1997; Albanesi y col., 1999).

Aunque el mecanismo propuesto por Perticone y Albanesi no ha sido demostrado está asociado con la desmetilación del ADN. En las observaciones realizadas por Rodríguez-Reyes y Morales-Ramírez, (2003) se obtuvo evidencia de que la ENU fue capaz de generar ICH_s por largo tiempo en ADN no sustituido con BrdU y que esta constante inducción en divisiones subsecuentes puede ser debida a una desmetilación indirecta del ADN, causada por remoción de citocinas metiladas durante la reparación. En nuestros resultados el incremento de los ICH_s en la cadena no sustituida con BrdU ocasionados por la ENU puede tener un mejor sustento en el planteamiento realizado por los autores referidos. La metilación del ADN ha sido relacionada con algunos eventos, tales como regulación de la expresión génica, diferenciación celular, edad, etc. Si este proceso de inducción de ICH_s se puede generalizar a otros AA sería relevante por la relación que tiene con los eventos antes mencionados (Rodríguez-Reyes y Morales-Ramírez, 2003). Lo anterior puede ser un punto importante a considerar en los otros AA probados en la presente tesis.

6.4 Reparación de las lesiones inductoras de ICH_s.

En esta sección se analizará el planteamiento de dos de los objetivos de esta tesis los cuales son: 1) determinar si las células de la glándula salival de ratón reparan durante G1 el daño en el ADN capaz de producir ICH_s, inducidos por los AA: MNU,

ENU, MMS y EMS *in vivo*, 2) determinar y comparar cual es el efecto de la incorporación de BrdU al ADN en la producción de daño por los AA y la reparación del mismo.

La reparación prereplicativa de las lesiones inducidas por agentes metilantes como la O⁶-MeG, la O⁴-MeT y las metilaciones en los átomos de nitrógeno se realizan preferentemente por dos procesos que son BER y MGMT (Kleibl, 2002). La O⁶-MeG es una de las lesiones menos abundantes causadas por los AA metilantes como la MNU, pero también es una de las que causa más efectos adversos a las células. Esta alteración es reparada principalmente por la MGMT (Pegg, 2000).

En la introducción se mencionó que las lesiones que no son reparadas antes de entrar a síntesis se transforman en ICH_s. Recientemente se presentó evidencia de que las lesiones que se forman atrás de la horquilla de replicación pueden erróneamente ser consideradas como lesiones persistentes (Rodríguez-Reyes y Morales-Ramírez, 2003). Con el presente protocolo se analizaron las lesiones que se originaron durante el ciclo de tratamiento antes y después de la administración de la BrdU y las estimaciones de su expresividad ya se analizaron en la sección anterior.

Se analizó la reparación de las lesiones inductoras de los ICH_s (Tabla 4) generadas por los AA en las cadenas del ADN sustituidas y no con BrdU. Las lesiones inducidas por la MNU en la 1^a división fueron parcialmente eliminadas. Los resultados indican que la susceptibilidad del ADN a la inducción de los ICH_s se incrementó el 144% en la cadena sustituida con BrdU con respecto a la que no lo estaba (Tabla 3) y no se repararon las lesiones en la cadena del ADN sustituida con BrdU; en tanto que la reparación del daño que genera ICH_s en la cadena no sustituida fue del 50% durante la 1^a división, este tipo de lesiones al parecer no son muy persistentes y son susceptibles de ser reparadas. Kaina y Aurich, (1985) reportaron que la mayoría de los ICH_s inducidos por la MNU son originados por

lesiones secundarias que fueron producidas en el primer ciclo de replicación. En nuestros resultados probablemente también se presentó el efecto descrito por los autores mencionados. La situación observada durante la 1ª división quizás también pueda ser explicada en términos de una dilución del daño y que en el caso de la 2ª división, este efecto no sea posible observarlo porque ya no hay otro ciclo celular subsecuente lo que dificulta el análisis.

La O⁶-MeG tiene una vida media de 20-45 horas y se elimina más rápido en el hígado, tejido que tiene el mayor contenido de AGT en rata (Valanis y col., 1994). Además hay evidencias que indican que la O⁶-MeG no parece bloquear la replicación ya que esta continúa sobre el sitio donde se encuentra ubicada esta lesión, insertándose una citosina o una timina opuesta a la base metilada, lo que propicia las mutaciones por transición (Kawate y col., 1998). Además si esta lesión no es desmetilada por la MGMT puede ser procesada por MMR, que es el mecanismo por el cual la O⁶-MeG causa sus efectos citotóxicos y genotóxicos (Christmann y Kaina 2000).

Además la O⁶-MeG es una lesión que originó débilmente ICH_s en el primer ciclo de replicación post-tratamiento, pero fue potente inductora en el segundo ciclo (Lips y Kaina, 2001). Si se aplica la condición anterior a nuestros resultados se esperaría una inducción alta de ICH_s en el segundo ciclo post-tratamiento, aunque como ya se mencionó, si hubo reparación parcial de las lesiones generadas por las O-metilaciones y N-metilaciones. Cuando el tratamiento con MNU fue en el segundo ciclo después de BrdU, posiblemente las lesiones no se repararon prereplicativamente y es probable que los ICH_s se originaron a partir de lesiones secundarias como se mencionó anteriormente. Sin embargo se sabe que la AGT puede remover las alteraciones O⁶-MeG arriba del 90% pero deja intactas las N-alquilaciones, además de que es un sistema que se satura fácilmente (Lindahl y col., 1982).

Más del 75% de las alquilaciones producidas por la MNU son N7-MeG y 3-MeA, estos aductos son álcali-lábiles y son reparados por el proceso de reparación por escisión (LeDoux y col., 1991). En el caso de la reparación de las lesiones inductoras de ICH_s causadas por la MNU durante la G1 de la 2^a división quizás la N7-MeG, fue reparada más lentamente por las glicosilasas, como ya lo reportó Kyrtopoulos, (1998), quien además mencionó que la vida media de este aducto que fue de 55-60 horas en hígado de rata y en linfocitos humanos.

El sistema AGT juega un papel central en la reparación de las lesiones inducidas por los AA como la MNU, sin embargo tejidos y células deficientes en esta actividad fueron generalmente más propensas a cáncer (Gerson y col., 1994). Ésta deficiencia se puede manifestar de dos formas: una célula puede tener bajos niveles de esta actividad y no reparar bajos niveles de estos aductos, como en el caso de la susceptibilidad de células de cerebro de rata a la ENU que indujo gliomas y en tejido mamario de rata y timo de ratón por la MNU (Gerson y col., 1994). La otra forma es que el ADN de las células sea dañado quizás por la activación metabólica de un carcinógeno, y que los niveles de alquiltransferasa no sean suficientes para reparar adecuadamente estas lesiones.

Como se ha mencionado, las alquiltransferasas reparan eficientemente las lesiones O⁶-MeG, sin embargo también se ha observado que algunas lesiones en el ADN pueden ser reparadas por diferentes rutas que compiten por la misma lesión. Algunos estudios han demostrado que los sistemas AGT y reparación por escisión de nucleótidos (NER) participan eficientemente, en la remoción de los aductos O⁶-EtG inducidos por la ENU en las líneas celulares linfoblastoides humanas: GM0130B (células N "normales"), GM 2250C (células X deficientes en reparación por escisión) y células TK6 (células A deficientes en reparación AGT) en estos casos participan ambos sistemas (Bronstein y col., 1992).

También se ha reportado que la reparación por NER puede participar en la reparación de O⁶-MeG y O⁴-MeT, en *E. coli* deficiente en la actividad MGMT y en

células de mamífero. Evidencias recientes apuntan a que estas dos vías coexisten para reparar las lesiones O⁶-alquilguanina y O⁴-alquiltimina (Singer y Hang, 1997). Aunque también se ha demostrado que la unión de la metiltransferasa a su sustrato puede interferir con NER (Samson y col., 1997). No obstante, la mayoría de las lesiones O⁶-MeG son reparadas por las metiltransferasas (Samson y col., 1988). Por otro lado, se ha reportado que el aducto O⁴-MeT puede ser reparado por la AGT (Pegg, 2000).

En la última columna de la tabla 3 también se puede observar el incremento de la susceptibilidad del ADN al daño generado por el tratamiento con la ENU, que fue del 150% en la cadena sustituida con BrdU con respecto a la no sustituida y la reparación de las alteraciones en la cadena del ADN sustituida con BrdU fue del 60%. No se observó reparación de estas en la 1^a división (González-Beltrán y Morales-Ramírez, 1999) y además se detectó un ligero incremento en G1 temprana con respecto a la G1 tardía, esta situación puede tener dos vertientes: 1) que sean alteraciones que se expresan en el 2^o ciclo como lesiones secundarias (Kaina y Aurich, 1985), 2) que sean persistentes y puedan inducir lesiones en el mismo locus en divisiones celulares subsecuentes (Morales-Ramírez y col., 1988, 1990).

Con relación al segundo punto del párrafo anterior hay datos en la literatura que refieren que las lesiones inducidas por este mutágeno se transformaron en ICH_s y persistieron por varios ciclos de división (Charles y col., 1986). Aunque esta última alternativa es menos probable que suceda como ya se analizó en la sección anterior. Por otro lado cuando el ADN está unifilarmente sustituido con BrdU (en la 2^a división) se observó una reparación del 60% de las alteraciones inductoras de ICH_s esto podría tener sustento en las deducciones anteriores, ya que si se cumple con la condición mencionada, las lesiones originadas después del tratamiento con BrdU son examinadas inmediatamente, por lo que si, éstas se expresan como lesiones secundarias o cuya persistencia induzca ICH_s en ciclos subsecuentes, no existe la posibilidad de examinarlo ya que el protocolo sólo

permite el análisis de dos ciclos subsecuentes de división y por consiguiente sería necesario el empleo de un tercer ciclo de división lo cual técnicamente no ha sido posible realizar en este modelo experimental. También es posible que el daño producto de la sensibilización del ADN por el análogo puede ser más eficientemente reparado.

Se reportó previamente que el nivel de protección de las lesiones inductoras de ICH_s por el sistema AGT generadas por el tratamiento con ENU fue bajo (15%) (Kaina y col., 1993). En los resultados analizados en esta tesis se puede argumentar que la ausencia de reparación de las alteraciones generadoras de ICH_s causadas por el tratamiento con la ENU, antes de la incorporación de BrdU puede estar en función de que los aductos como la O⁶-EtG no se repararon o se repararon más lentamente. Como se mencionó en la introducción estas lesiones se reparan más lentamente por la AGT, lo que hace suponer que estas se hayan transformado en secundarias.

Así también se ha propuesto que la persistencia de los aductos O⁶-EtG varía en diferentes órganos (Den Engelse y col., 1987; Bronstein y col., 1992).

El efecto de la BrdU analizado en la última columna de la tabla 3 muestra que incrementó 155% la susceptibilidad del ADN a las lesiones generadas por el tratamiento con MMS en la cadena sustituida con este análogo respecto a la que no lo está, la reparación de las lesiones en la cadena del ADN sustituida con BrdU, y no sustituida fue aproximadamente del 50%, la reparación de las lesiones fue parcial en la cadena no sustituida con el análogo durante el 1^{er} ciclo, y esto puede ser debido a que un porcentaje bajo de lesiones se expresaron en el mismo locus en el subsiguiente ciclo, como también se ha reportado (Morales-Ramírez y col., 1992). Una situación similar en cuanto a la reducción de la frecuencia de ICH_s se observa en los estudios de Kaina y Aurich, (1985), cuando células V79 de criceto chino que ya habían incorporado BrdU fueron expuestas a este mutágeno por un ciclo antes de llevar a cabo la fijación, sugirieron que provocó lesiones primarias y

secundarias, pero que la reducción de las primeras fue debido a que hay una dilución y reparación. En linfocitos humanos se encontró que la frecuencia ICH_s fue más alta en la G1 tardía que en la G1 temprana por lo que los autores concluyeron que la eliminación de las lesiones inductoras de ICH_s se efectuó durante esta fase del ciclo celular (Lambert y col., 1984).

En otro estudio se evidenció que las lesiones inductoras de ICH_s causadas por el benzo[a]pireno (BP), cis-platino (II) diaminodicluro (cis Pt II), MMS y MNU fueron parcialmente eliminadas a las 48 horas después de la exposición, que fue el tiempo en el cual las células pasaron por cuatro ciclos de replicación (Popescu y col., 1985). Lo anterior apoya las observaciones realizadas en esta tesis con respecto a la reparación parcial de las lesiones inductoras de ICH_s en el 1º y 2º ciclo de división.

Se sabe que el MMS reacciona casi exclusivamente con los anillos de nitrógeno de las bases púricas, particularmente con el N7 de la guanina, el N3 de la adenina y en un porcentaje bajo con los fosfotriesteres (Beranek, 1990). Por lo tanto se infiere que la mayoría de las lesiones son inducidas directa o indirectamente por metilación de los nitrógenos; en particular la contribución de los aductos 3-MeA y N7-MeG que parecen ser los de mayor importancia. Menos del 1% de las lesiones inducidas por este mutágeno son alquilaciones en los átomos de oxígeno. Estos aductos formados en los átomos de nitrógeno son sustrato para las N-glicosilasas, las cuales remueven las bases dañadas dejando sitiosapurínicos. La actividad alquilguanina ADN transferasa no fue clara en líneas de células linfoblastoides humanas, en la 244B que tuvo una baja actividad AGT fue relativamente más sensible a la inducción de ICH_s por MMS, sin embargo no se encontró una relación entre la actividad AGT y la sensibilidad al MMS (Schwartz y col., 1989). En estudios posteriores se demostró que la inactivación de la proteína AGT por este mutágeno es responsable de la pérdida de la reparación de las lesiones inducidas por este AA *in vivo* (Sledziewka-Gódcza y Torzewska, 1997). Por lo que la

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

estrecha inactivación de la AGT por el MMS puede jugar un papel importante en la modulación de la reparación del ADN alquilado *in vivo*.

El sistema de reparación por escisión de nucleótidos elimina eficientemente los aductos de nitrógeno metilados inducidos por el MMS (Nivard y col., 1993; Sledziewka-Gójska y Torzewska, 1997). Estas lesiones pueden ser eficazmente reparadas por la proteína Ada, lo cual constituye un proceso complementario a la inactivación de la AGT por este AA en *E.coli* (Sledziewka-Gójska y Torzewska, 1997). La 3-alquiladenina que es generada por este mutágeno tiene una vida media corta 2 a 3 horas (Brent, 1979; Medcalf y Lawley, 1981) y probablemente se repara en este tiempo (Sneyder y Regan, 1982). La N7-MeG es una lesión que se repara muy lentamente por las glicosilasas en la mayoría de los tejidos, (Kyrtopoulos, 1998). Debido a que más del 90% de las alquilaciones inducidas por el MMS son generadas por la 3-MeA y la N7-MeG (Beranek, 1990), es muy probable que no todas las lesiones inductoras de ICH_s generadas por el MMS sean reparadas, como se observó en los resultados obtenidos en esta tesis. También es posible que la N7-MeG debido a su larga vida media trascienda la división celular y se procese como una lesión inductora de ICH_s en el siguiente ciclo de replicación. Se ha mencionado que las lesiones causadas por el MMS se reparan por reparación post-replicativa (Smirnova y Klein, 2003), pero también se puede estimular la recombinación homóloga lo cual sugiere que el daño se cubre parcialmente incluso el ciclo celular juega un papel importante en determinar cual ruta será usada para la reparación.

La 3-MeA es eficientemente reparada por todas las células que reparan o no los aductos O⁶-MeG (Day y col., 1984). *E. coli* tiene dos genes que codifican para la 3-metiladenina glicosilasa, el gene *tag* que es altamente especializado para la escisión de la 3-MeA y el gene *AlkA* que codifica para otra 3-metiladenina glicosilasa, que remueve la 3-MeA, la N7-MeG y un número menor de aductos, esta glicosilasa es inducible como parte de la respuesta Ada (Mates y col., 1996; Sedgwick y Lindahl, 2002). Estas proteínas están presentes de bacterias a

humanos e inician la reparación por escisión de bases. En mamíferos estas proteínas tienen un amplio sustrato que también incluye a la N7-MeG (Engelward y col., 1998). La citada glicosilasa hidroliza la unión glicosídica C1-N liberando las bases dañadas del ADN con lo que resultan sitios abásicos que son reparados por escisión (Laban y col., 1996).

Las N-metilaciones inducidas por el MMS difícilmente cuentan con propiedades bloqueadoras de la replicación. Por lo tanto la recombinación entre cromosomas homólogos puede ser inducida por este AA en la horquilla de la replicación, cuando los huecos de la cadena sencilla del ADN actúan como intermediarios durante la reparación de las N-alkilaciones o lesiones secundarias tales como, sitios abásicos producto de la reparación por BER que son convertidos en DSB (Wijnhoven y col., 2003).

En tanto que con el tratamiento con EMS el incremento de la susceptibilidad del ADN al daño generado por este AA fue sólo del 45% en la cadena sustituida con BrdU con respecto a la no sustituida, ver última columna de la tabla 3. Alrededor del 60% de las lesiones producidas por este mutágeno fueron eliminadas de la cadena no sustituida con el análogo, lo cual indica que éstas fueron más eficientemente reparadas por las células y probablemente sólo una pequeña fracción de estas lesiones originaron ICH_s en el ciclo celular subsecuente, como también se ha reportado (Morales-Ramírez y col., 1995a) una sexta parte de las lesiones inducidas por EMS fueron capaces de inducir ICH_s en el mismo locus. La situación en la cadena sustituida con BrdU difiere un poco de lo anterior ya que el porcentaje de lesiones reparadas fue sólo del 20% por lo tanto puede ser que este tipo de lesiones sean persistentes.

El efecto que tiene la BrdU sobre el ADN y la sensibilización al daño que induce este análogo es muy similar para los mutágenos MNU, ENU, y MMS sin embargo difieren en el tipo de daño que se ocasionan al reaccionar con la molécula modificada de ADN, así como en su reparabilidad.

Por lo que respecta al EMS, alrededor del 74% del total de alquilaciones inducidas por este AA son generadas por la 3-alquiladenina y la N7-EtG; en cuanto a la reparación de las lesiones inductoras de ICH_s, las generadas en la 1^a división fueron reparadas más eficientemente que las de la 2^a división y esto probablemente se debe a que el tipo de lesiones que genera tienen vida media más corta como la 3-alquiladenina o más largas como la N7-MeG lo cual se revisó anteriormente y que por lo mismo no fueron reparadas eficientemente.

No hay una correlación clara entre la producción de O⁶-MeG y el nivel de protección de la proteína. Lo anterior se puede inferir de los datos de Kaina y col. (1993) obtenidos en las líneas Tk40-AT8 de células CHO. Ellos observaron que el nivel de protección de lesiones inductoras de ICH_s fue 92% para la MNU, 54% en el caso del EMS, 52% para el MMS y 15% para la ENU, y que por otro lado la cantidad de O⁶-MeG inducida por estos AA *in vivo* expresada como porcentaje total de alquilación fue 0.3% para el MMS, 8.2% para la MNU, 2.6% en el caso del EMS y 12.7% para la ENU (Beranek, 1990).

Por lo referido en el párrafo anterior los autores dedujeron que las lesiones generadas por la MNU tuvieron la protección más alta y la ENU la más baja, sin embargo agentes como el MMS que produce una imperceptible cantidad de O⁶-alquilguanina no tuvieron una protección total. Las observaciones de Liem y col. (1994) referente a la eficiente reparación de los aductos O⁶-EtG generados por la ENU, contrastan con las de Kaina y col. (1993) y con las observaciones realizadas en esta tesis (Tabla 4). En otro estudio realizado en ratas transgénicas que expresan Ada-C se detectó que fueron sensibles a la inducción de tumores generados por la ENU y probablemente el efecto observado haya sido por la lenta reparación de los aductos O⁶-EtG (Pegg, 1990; Engelbergs y col., 1998).

No todas las lesiones en el genoma pueden ser reparadas eficientemente, aunque los sistemas de reparación son capaces de remover todos los tipos de lesiones a tiempo para que se realice la replicación; pero puede ocurrir que en células

eficientes como en las deficientes en reparación, que si el daño en el ADN no ha sido reparado antes de llegar a la horquilla de replicación puede bloquear la síntesis del ADN, lo que puede conducir a apoptosis. Las células pueden evitar esto por medio de los mecanismos de la síntesis de ADN por translesiones (TLS) que es el proceso por el cual se lleva a cabo la síntesis pasando por estas alteraciones (Masutani y col., 2000; Sarasin, 2003). Este es un proceso alternativo que restaura los sitios abásicos.

Una de las funciones primarias de MMR es corregir la persistencia de errores que aún continúan hasta la replicación del ADN para evitar la acumulación de mutaciones deletéreas. Este sistema que reconoce los apareamientos erróneos de la O⁶-MeG trata de corregirlos con intentos repetitivos lo cual origina rompimientos en la cadena nuevamente sintetizada, opuesta a la cadena en donde se encuentra la O⁶-MeG. Estos rompimientos son convertidos en rompimientos dobles por el proceso de MMR que los transforma en lesiones secundarias en la próxima fase S, que es la segunda después del tratamiento y lo cual puede estimular el proceso de apoptosis (Ochs y Kaina, 2000). Esta deficiencia en este sistema de reparación incrementa la resistencia o tolerancia a los AA (Lindahl y Wood, 1999).

Las lesiones O⁶-MeG inhiben la reparación por replicación de la polimerasa β que es probable que replique, a través de la persistencia de la O⁶-MeG *in vivo*, cuando la reparación por MGMT está saturada o se ha perdido. Aunque se ha reportado que esta enzima fue incapaz de replicar a través de esta lesión, después se demostró que si lo realiza deficientemente (Singh y col., 1996).

Cuando se presentan mutaciones en las proteínas de la replicación o bloqueo de la progresión de la horquilla de replicación por aductos exógenos, pueden resultar lesiones en el ADN e intermediarios mutagénicos de la replicación. Para sobrevivir las células cuentan con sistemas como BER, NER y HR para detener esos eventos, pero si estos mecanismos de reparación que son libres de error son incapaces de reparar las lesiones; las células cuentan con otras rutas alternativas

que les permiten tolerar y estabilizar las perturbaciones del genoma. Por ejemplo la activación del punto de control de la fase S que se ha demostrado suprime la inestabilidad genómica en levaduras y es requerida para tolerar las lesiones irreparables, estabilizándolas y permitiendo que la horquilla de replicación pase por ellas, dado que las células cuentan con un repertorio de ADN polimerasas translesión, especializadas que las asisten. Aunque muchas de estas polimerasas son propensas a error y causan mutaciones (Kai y Wang, 2003).

En la sección 5.6 se analizaron los datos de la frecuencia acumulada de los ICH_s por célula de las poblaciones. Se observó que en general la mayoría de las células son susceptibles al daño generado por los AA y que éste puede variar en mayor o menor grado lo cual probablemente, también está en función de los sistemas de protección que tienen las células.

Es importante señalar que el efecto a nivel celular (Tabla 1) se puede observar en las poblaciones celulares como se observa en la figura 8 los datos obtenidos de las células tratadas con MNU en G1 temprana de la 1^a división dieron valores de ICH_s más bajos que los encontrados en la G1 tardía lo cual está de acuerdo con las estimaciones realizadas en la primera columna de la tabla 4, y con respecto a la reparación de las lesiones inductoras de los ICH_s se aprecia que hubo eliminación parcial de éstas, lo cual se deduce de los valores de la G1 temprana. En la 2^a división la situación no está tan clara como en la 1^a; la curva de la G1 temprana no se desplazó hacia valores de ICH_s más bajos y prácticamente esta curva es igual a la curva de G1 tardía, lo cual también indica la menor eficiencia de las células para reparar el daño. Una situación similar fue observada también durante G1 en células de la glándula salival de ratón que fueron tratadas con mitomicina C (MMC), en la 1^a división hubo una reparación parcial de las lesiones inductoras de ICH_s y no hubo diferencias en la generación de ICH_s en la G1 temprana y tardía de la 2^a división (Morales-Ramírez y col., 1995b).

En la figura 9 se muestran las curvas de la frecuencia acumulada de las células tratadas con ENU, es notable observar como en la de G1 temprana de 1ª división dio valores de ICH_s más altos que los obtenidos para la de G1 tardía esto también es acorde con lo que se analizó en la primera columna de la tabla 4, es decir no se repararon las lesiones en la G1, incluso éstas se incrementaron más en la G1 temprana. En cambio las lesiones inducidas en la 2ª división fueron reparadas parcialmente, esto se puede ver claramente al comparar las curvas G1 temprana y tardía, este mismo efecto se notó en la última columna de la tabla 4.

En la figura 10 se aprecian las curvas de la frecuencia acumulada de las células tratadas con MMS en este caso las de G1 tardía de la 1ª y 2ª división se desplazaron a valores de ICH_s más altos que los de las curvas de la G1 temprana lo cual se puede interpretar como una reparación parcial de las lesiones en ambas divisiones.

En la figura 11 se observan las curvas obtenidas por la exposición al EMS, estas indican que la inducción de ICH_s antes y después de la incorporación de BrdU fue casi idéntica pero que hay diferencias en cuanto a la reparación de las lesiones inducidas antes y después de la incorporación del análogo. Las lesiones inducidas durante la 1ª división fueron más eficientemente reparadas que las inducidas en la 2ª. La misma observación se realizó en la primera y última columna de la tabla 4 respecto a la reparación de lesiones por célula.

6.5 Estrés celular

No está muy claro porque el daño inducido por metilación estimula señales que no se inducen con la etilación, en los estudios de Wilhelm y col. (1997) y Wichmann y col. (2003) no se midieron los niveles de alquilación celular por lo que esto dificulta en parte la interpretación. Aunque en las observaciones realizadas por estos autores indican que la metilación vía el intermediario metanodiazodinium realizó un papel importante en la modulación de MAPKs.

El MMS modifica la actividad JNK/SAPK inducida por este agente inhibiendo el nivel intracelular de glutatión (GSH) y NAC. GSH y otros tioles realizan un papel crucial en la desintoxicación de compuestos carcinogénicos (Wilhelm y col., 1997). Este AA causa un rápido decrecimiento en el contenido celular de GSH.

Las observaciones indican que las diferencias encontradas en cuanto a la capacidad de respuesta al estrés celular pueden ser debidas a varios factores inclusive el tipo de reacción S_N1 típica de las nitrosoureas y S_N2 que opera en los alcanosulfonatos, aunque también se ha propuesto la participación de algunos complejos proteínicos que modulan las señales en la trasducción y que ayudan en la desintoxicación celular inducida por algunos compuestos estresantes. Sin embargo hay que tener cautela cuando se asocia el daño al ADN y la activación de las señales, ya que en la mayoría de los estudios realizados este daño no se midió directamente, lo cual complica la interpretación (Wichmann y col., 2003).

Los mecanismos de toxicidad se estudiaron en hepatocitos de rata cultivados y tratados con MMS, se determinó que este AA puede propiciar que los niveles de glutatión (GSH) bajen abruptamente con lo cual se sensibilizan estas células a las especies de oxígeno parcialmente reducidas, este estrés oxidativo normalmente es desintoxicado por el mecanismo GSH. Cuando se activan estas especies de oxígeno son tóxicas para las células, el MMS mata a las células por un mecanismo oxidativo que depende del origen del ión hierro y es acompañado de peroxidación lipídica que hace a las membranas de las células propensas a este daño (Mizumoto y col., 1993).

La MNU es un compuesto carcinogénico que causa estrés en ratas, sin embargo fueron necesarias altas dosis (50 mg/kg de peso) para inducir desde reacciones inflamatorias severas en pulmón y piel, hasta adenocarcinomas en colon, en cuatro de seis animales tratados (Mabrouk y col., 2003).

6.6 Apoptosis

Muchos estudios han demostrado que la respuesta inicial de las células cuando se presenta daño en el ADN es repararlo, sin embargo si el nivel del daño incrementa se estimulan otros eventos como son el arresto del ciclo celular o apoptosis. La proteína p53 modula algunas funciones celulares tales como transcripción génica, síntesis de ADN, arresto del ciclo celular, vejez y apoptosis (Slee y col., 2004). Los niveles de p53 se incrementan dramáticamente en respuesta a estresores como: radiaciones ionizantes, radiación ultravioleta, hipoxia, shock por calor, activación oncogénica y drogas citotóxicas (Slee y col., 2004). Apoptosis es el mecanismo dominante por el cual p53 inhibe el desarrollo de tumores (Slee y col., 2004). El arresto celular puede ser algunas veces permanente, pero también puede ser reversible permitiendo a las células reparar el daño al ADN. El mecanismo de apoptosis previene la expansión clonal de las células que no repararon el daño que puede conducir a eventos de mutación y carcinogénesis (Berstein y col., 2002).

Las células del intestino delgado del ratón son ideales para estudios de apoptosis y frecuencia de mutación inducidos por agentes que dañan el ADN tales como los agentes alquilantes y la radiación γ . Se reportó que una dosis de 100 mg/kg de MNU causó apoptosis en estas células de intestino delgado de ratones (Toft y col., 2000), aunque como se sabe la AGT protege a las células de los efectos de la O⁶-MeG (Pegg, 2000) también se ha observado que los AA son capaces de inactivar a la AGT reduciendo el contenido celular de esta proteína (Pegg y Byers, 1992). Las evidencias indican que la reducción de la actividad AGT no elevó los niveles de apoptosis en células de intestino delgado después del tratamiento con AA metilantes (Toft y col., 2000).

En la introducción se mencionó que las células deficientes en sistemas de reparación MGMT son más sensibles a la inducción de apoptosis que las que son eficientes (Kaina y col., 1997; Tominaga y col., 1997; Meikrantz y col., 1998).

Además, se ha reportado que los tratamientos con AA *in vivo* reducen parcialmente la actividad MGMT (Toft y col., 2000). Pero también numerosos estudios indican que la AGT repara eficientemente la lesión O⁶-meG (Pegg, 2000).

La habilidad de p53 para inducir apoptosis en células cultivadas es bien conocida. Sin embargo esta respuesta no siempre se refleja en estudios *in vivo* porque varía de tejido a tejido cuando se exponen a radiación gamma. En estudios realizados en ratones este tipo de radiación causó activación de p53 en tejidos tales como: bazo, timo, médula ósea, intestino y riñón. En otro segundo grupo de tejidos, los cuales incluyen: miocardio, glándulas salivales, glándulas adrenales y osteocitos, mostraron altos niveles de p53 pero no se estimuló el proceso de apoptosis (Slee y col., 2004). Las evidencias anteriores sugieren que aún es necesario clarificar más los eventos de apoptosis, principalmente porque la mayor parte de los estudios que hay al respecto se han realizado *in vitro* lo que dificulta más el análisis. La respuesta a estos eventos probablemente dependerá de la dosis empleada y el tratar de establecer comparaciones entre sistemas *in vivo* e *in vitro* complica la interpretación, por lo cual hay que ser cautelosos.

Desde luego que las observaciones realizadas en esta tesis no descartan la posibilidad de que se hayan presentado algunos eventos que no se identificaron, como apoptosis, pero también las dosis empleadas fueron las adecuadas para generar lesiones en el ADN que se transformaron en ICH_s.

Se observó que las células progenitoras de médula ósea y de epitelio de ratones son extraordinariamente sensibles a los AA por la persistencia de O⁶-MeG, estas se dividen rápidamente y pueden morir por apoptosis después de arresto en G₂/M en el segundo ciclo de proliferación celular; lo anterior puede conducir a estos órganos vitales a una disfunción (Kawate y col., 1998). Los AA inducen muerte celular por apoptosis en líneas celulares embrionarias deficientes en actividad metiltransferasa (Tominaga y col., 1997).

Se ha sugerido que la apoptosis es un proceso de respuesta tardía ya que no se presenta antes de 2 ó 3 días después del tratamiento con MNNG, y la máxima producción se induce de 96 a 120 horas. Por lo tanto es altamente improbable que la unión de las proteínas de MMR a la lesión O⁶-MeG pueda directamente proveer la señal activadora de la cascada apoptótica (Ochs y Kaina, 2000; Kaina y Christmann, 2002). Los efectos tóxicos de los AA causarán la eliminación de células con niveles más altos de daño en el ADN y las células dañadas subletalmente, no obstante que lleven la O⁶-MeG en su ADN sobrevivirán y entrarán a una hiperplasia restaurativa reemplazando las células muertas en los tejidos (Margison y col., 2002).

BER repara las N-alquilaciones como la N7-MeG, N3-MeA y N3-MeG del ADN. Las células que son deficientes en la actividad ADN polimerasa β son hipersensibles a los AA y responden con una alta frecuencia de apoptosis similar a la estimulada por la O⁶-MeG (Kaina, 2003).

Tomando en consideración que la señal apoptótica se determina por la presencia de lesiones en el ADN durante la síntesis, las células analizables para ICH_s son aquellas que no entran en apoptosis. Además, las dosis empleadas de los AA son subtóxicas por lo que la inducción de este proceso seguramente es muy baja en las células de la glándula salival estudiadas en este trabajo.

7. CONCLUSIONES

Por lo que se refiere al objetivo principal de este trabajo se puede concluir que:

- 1) Las lesiones inductoras de ICH_s generadas por la exposición a la MNU, el MMS y el EMS, fueron reparadas parcialmente por las células de la glándula salival en tanto que las originadas por la ENU no fueron reparadas por estas células durante la G1 de la 1^a división.
- 2) Estas células sólo repararon parcialmente las lesiones inducidas por la ENU y el MMS en la cadena de ADN sustituida con BrdU. Las lesiones inducidas por el EMS fueron levemente reparadas y las originadas por la MNU no fueron reparadas por las células durante la G1 de la 2^a división.

Las conclusiones que se obtuvieron para los objetivos particulares son:

- 1) Los compuestos motivo de estudio, como las nitrosoureas generaron más ICH_s que los metanosulfonatos en las células de la glándula salival y entre éstos los metilantes como la MNU y el MMS fueron más eficientes inductores de ICH_s que los etilantes como la ENU y el EMS. La MNU fue la más eficiente inductora de ICH_s y el EMS fue menos inductor de lesiones generadoras de dichos eventos.
- 2) Las células de la glándula salival repararon parte de las lesiones inductoras de ICH_s durante G1, que fueron generadas por la MNU, el MMS y el EMS durante la G1 de la 1^a y 2^a división; pero no repararon las inducidas por la ENU y la MNU durante la G1 de la 1^a y 2^a, división respectivamente. Esto se debe básicamente a que los compuestos referidos generan lesiones que son más persistentes.
- 3) La BrdU tuvo un efecto sensibilizador sobre la molécula de ADN, que la hizo más susceptible al daño generado por los compuestos estudiados, lo que ocasionó lesiones inductoras de ICH_s producto de la reacción del análogo con el ADN. Se determinó que este efecto fue igual para la MNU, la ENU y el MMS y 3 veces menor para el EMS.

8. REFERENCIAS

Ackland S.P. R.L.Schilsky, M.A.Becket y R.Weichselbaum (1988) Synergistic Cytotoxicity and DNA Strand Break Formation by Bromodeoxyuridine and Bleomycin in Human Tumor Cells, *Cancer Res.*, 48:4244-4249.

Aguda B.D. (1999) A quantitative analysis of the kinetics of the G2 DNA damage checkpoint system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96: 11352-11357.

Albanesi T., S.Polani, R.Cozzi y P.Perticone (1999) DNA strand methylation and sister chromatid exchanges in mammalian cells *in vitro* *Mutat. Res.*, 429:239-248.

Anisimov V.N. (1994) The Sole DNA Damage Induced by Bromodeoxyuridine Is Sufficient for Initiation of Both Aging and Carcinogenesis *in Vivo*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 79:494-501.

Basu A.K. y J.M.Essigmann (1990) Site-specifically alkylated oligodeoxynucleotides: Probes for mutagenesis, DNA repair and the structural effects of DNA damage, *Mutat. Res.*, 233:189-201.

Bellacosa A. (2001) Functional interactions and signaling properties of mammalian DNA mismatch repair proteins, *Cell Death Diff.*, 8:1076-1092.

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

Berardini M., A.Mazurek y R.Fishel (2000) The Effect of O⁶-Methylguanine DNA Adducts on the Adenosine Nucleotide Switch Functions of hMSH2-hMSH6 and hMSH2-hMSH3, *J. Biol. Chem.*, 275:27851-27857.

Bernstein C., H.Bertein, C.M.Payne y H.Garewal (2002) DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis, *Mutat. Res.*, 511:145-178.

Bignami M., M.O'Driscoll, G.Aquilina y P.Karran (2000) Unmasking a killer: DNA O⁶-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents, *Mutat., Res.* 462:71-82.

Bishop A.J.R. y R.H.Schiestl (2000) Homologous recombination as a mechanism for genome rearrangements: environmental and genetic effects, *Hum. Mol. Genet.*, 9:2427-2434.

Brent T. (1979) Partial purification and characterization of a human 3-methyladenine DNA glycosylase, *Biochemistry*, 18:911-916.

Briscoe W.T. y S.P.Duarte (1988) Preferential alkylation by 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) of guanines with guanines as neighboring bases in DNA, *Biochem. Pharmacol.*, 37:1061-1066.

Briscoe W.T., S.P.Anderson y H.E.May (1990) Base sequence specificity of three 2-chloroethylnitrosoureas, *Biochem. Pharmacol.*, 40:1201-1209.

Bronstein S.M., T.R.Skopek y J.A.Swenber (1992) Efficient repair of O⁶-ethylguanine, but not O⁴-ethylthymine or O²-ethylthymine, is dependent upon O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase and nucleotide excision repair activities in human cells, *Cancer Res.*, 52:2008-2011.

Bruggeman I.M. y J.C.M.van der Hoeven (1984) Lack of activity of the bacterial mutagen emodin in HPHRT and SCE assay with V79 Chinese hamster cells, *Mutat. Res.*, 138:219-224.

Caldecott K.W. J.D.Tucker y L.H.Thompson (1992) Construction of human *XRCC1* minigenes that fully correct the CHO DNA repair mutant EM9, *Nucleic Acids Res.*, 20:4575-4579.

Carlson R.M. (1990) Assessment of the Propensity for Covalent Binding of Electrophiles to biological substrates, *Environ. Health Perspect.*, 87:227-232.

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

Charles J.L., D.Jacobson-Kram, L.W.Condie, J.F.Borzelleca y R.A.Carchman (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.

Christmann M. y B.Kaina (2000) Nuclear translocation of Mismatch Repair Proteins *msh2* and *msh6* as a Response of Cells to Alkylating Agents, *J. Biol. Chem.* 275:36256-36262.

Christmann M., M.T.Tomicic, W.P.Roos y B.Kaina (2003) Mechanisms of human DNA repair: an update, *Toxicol.*, 193:3-34.

Cline S.D. y P.C.Hanawalt (2003) Who's on first in the cellular response to DNA damage?, *Nature Rev.*, 4:361-372.

Connell J.R. y A.S.C.Medcalf (1982) The induction of SCE and Chromosomal aberrations with relation to specific base methylati3n of ADN in Chinese hamster cells by *N*-methyl-*N*-nitrosourea and dimethyl sulfate, *Carcinogenesis*, 3:385-390.

Cooke M.S., M.D.Evans, M.Dizdaroglu y J.Lunec (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease, *FASEB J.*, 17:1195-1214.

Day R.S.III, D.B.Yarosh y C.H.J.Ziolkowski (1984) Relationship of methyl purines produced by MNNG in adenovirus 5 DNA to viral inactivation in repair-deficient (Mer⁻) human tumor cell strains, *Mutat. Res.*, 131:45-52.

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

Den Engelse L., A.De Graaf, R.J.De Brij y G.J.Menkveld (1987) O²- O⁴-ethylthymine and the ethylphosphotriester dTp(Et)dt are highly persistent DNA modifications in slowly dividing tissues of the ethylnitrosourea-treated rat, *Carcinogenesis*, 8:751-757.

Djordjevic B. y W.Sybalski (1960) Genetics of human cell lines, III. Incorporation of 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine into the desoxyribonucleic acid of human cells and its effect on radiation sensitivity, *J. Exp. Med.*, 112:509-531.

Dronkert M.L.G., H.B.Beverloo, R.D.Johnson, J.H.Jhoeijmakers, M.Jasin y R.Kanar (2000) Mouse *RAD54* Affects DNA Double-Strand Break Repair and Sister Chromatid Exchange, *Mol. Cell Biol.*, 20:3147-3156.

Duckett D.R.,J.T.Drummond, A.I.H.Murchie, J.T.Reardon, A.Sancar, D.M.J.Lilley y P.Modrich (1996) Human MutS α recognizes damaged DNA base pairs containing O⁶-methylguanine, O⁴-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:6443-6447.

Duncan A.M.V. y H.J.Evans (1982) Molecular lesions involved in the induction of sister-chromatid exchange, *Mutat. Res.*, 105:423-427.

Encell L.P. y L.A.Loeb (1999) Redesigning the substrate specificity of human O⁶-Alkylguanine-DNA-Alkyltransferase. Mutants with enhanced repair of O⁴-Methylthymine, *Biochemistry*, 38:12097-12103.

Engelbergs J., J.Tomale, A.Galhoff y M.F.Rajewsky (1998) Fast repair of O⁶-ethylguanine, but not O⁶-methylguanine, in transcribed genes prevents mutation of H-*ras* in rat mammary tumorigenesis induced by ethylnitrosourea in place of methylnitrosourea, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95:1635-1640.

Engelward B.P., J.M.Allan, J.A.Dreslin, J.D.Kelly, B.Gold y L.D.Samson (1998) A chemical and genetic approach together define the biological consequences of 3-methyladenine lesions in the mammalian genome, *J. Biol. Chem.*, 273:5412-5418.

Escalza P., F.Cortes y J.B.Schvartzman (1985) Induction of sister chromatid exchanges (SCE_s) by 5-fluorodeoxyuridine The role of 5-bromodeoxyuridine incorporated into parental DNA, *Mutat. Res.*, 151:77-82.

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

Frei J.V., D.H.Swenson, W.Warren y P.D.Lawley (1978) Alkylation of Deoxiribonucleic Acid *in vivo* in Various Organs of C577BL Mice by Carcinogens N-methyl-N-Nitrosourea, N-ethyl-N-Nitrosourea and Ethyl Methanesulfonate in Relation to Induction of Thymic Lymphoma, *Biochem. J.*, 174:1031-1044.

Friedberg E.C. (2003) DNA damage and repair, *Nature*, 421:436-440.

Gerson S.L., J.E.Trey, K.Miller y N.A.Berger (1986) Comparison of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues, *Carcinogenesis*, 7:745-749.

Gerson S.L., N.H.Saidi, L.L.Dumenco, E.Allay, C.Y.Fan, L.Liu y P.J.O'Connor (1994) Alkyltransferase transgenic mice: probes of chemical carcinogenesis, *Mutat. Res.*, 307:541-555.

Glaab W.E., K.R.Tindall y T.R.Skopek (1999) Specificity of mutations induced by methyl methanesulfonate in mismatch repair-deficient human cancer cell lines, *Mutat. Res.*, 427:67-78.

González-Beltrán F. y P.Morales-Ramírez (1999). In vivo repair during G1 of DNA lesions eliciting sister chromatid exchanges induced by methylnitrosourea or ethylnitrosourea in BrdU substituted or unsubstituted DNA in murine salivary gland cells. *Mutat. Res.*, 425:239-247.

González-Beltrán F. y P.Morales-Ramírez (2003) Reparability during G1 of lesions eliciting sister chromatid exchanges induced by methylmethanesulfonate or ethylmethanesulfonate in bromodeoxyuridine-substituted and unsubstituted DNA strands, *Mutagenesis*, 18:13-17.

Goth-Goldtein R. (1977) Repair of DNA damaged by alkylating carcinogens is defective in Xeroderma pigmentosum fibroblasts, *Nature (London)*, 267:81-82.

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

Hagen T.M., R.T.Ingersoll, J.Lykkefeldt, J.Liu, C.M.Wehr, V.Vinarsky, J.C.Bartholomew y B.N.Ames (1999) (*R*)- α -lipoic acid-supplemented old rats have

improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate, *FASEB J.*, 13:411-419.

Hart R.W. y L.Frame (1996) Toxicological defense mechanisms and how they may affect the nature of dose-response relationships, *Belle Newsletter*, 5:1-27.

Hartley J.A., N.W.Gibson, K.W.Kohn y W.B.Mattes (1986) DNA sequence selectivity of guanine-N-7 Alkylación by three antitumor chloroethylating agents, *Cancer Res.*, 46:1943-1947.

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

Helleday T. (2003) Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells, *Mutat. Res.*, 532: 103-115.

Hemminiki K. (1983) Nucleic Acid Adducts of Chemical Carcinogens and Mutagens, *Arch. Toxicol.*, 52:249-285.

Hemminiki K. y D.B.Ludlum (1984) Covalent Modification of DNA by Antineoplastic Agents, *J. Natl. Cancer Inst.*, 73:1021-1028.

Hess T., U.Schwitler, M.Petretta, B.Giese y H.Naegeli (1997) Bipartite substrate discrimination by human nucleotide excision repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:6664-6669.

Hickman M., y L.Samson (1999) Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling Induction of apoptosis by alkylating agents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:10764-10769.

Jackson S.P. (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks, *Carcinogenesis*, 23:687-696.

Jostes Jr R.F. (1981) Sister-chromatid exchanges but not mutations decrease with time in arrested Chinese hamster ovary cells after treatment with ethylnitrosourea, *Mutat. Res.*, 91:371-375.

Kai M. y T.S.F.Wang (2003) Checkpoint responses to replication stalling: inducing tolerance and preventing mutagenesis, *Mutat. Res.*, 532:59-73.

Kaina B. y O.Aurich (1985) 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.*, 149:451-461.

Kaina B., G.Fritz, S.Mitra y T.Coquerelle (1991) Transfection and expression of human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents, *Carcinogenesis*, 12:1857-1867.

Kaina B., G.Fritz, S.Mitra y T.Coquerelle (1993) Contribution of O⁶-alkylguanine and N-alkylpurinas to the formation of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and gene mutations, *Environ. Molec. Mutagen.*, 22:283-292.

Kaina B., A.Ziouta y T.Coquerelle (1997) Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O⁶-methylguanine in Mex⁻, Mex⁺ and methylación-tolerant mismatch repair compromised cells facts and models, *Mutat. Res.*, 381:227-241.

Kaina B. y M.Christmann (2002) DNA repairs in resistance to alkylating anticancer drugs, *Int. J. Clin.Pharm. Ther.*, 40:354-367.

Kaina B. (2003) DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair double-strand breaks, cell proliferation and signaling, *Biochem. Pharmacol.*, 66:1547-1554.

Kat A., W.G.Thilly, H.W.Fang, M.J.Longley, M.G.Li y P.Modrich (1993) An alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6424-6428.

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

Kawate H., K.Sakumi, T.Suzuki, Y.Nakatsuru, T.Ishikawa, S.Takahashi, H.Takano, T.Noda y M.Sekiguchi (1998) Separation of killing and tumorigenic effects of an alkylating agent in mice defective in two of the DNA repair genes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:5116-5120.

Kleibl K. (2002) Molecular mechanisms of adaptive response to alkylating agents in *Escherichia coli* and some remarks on O⁶-methylguanine DNA-methyltransferase in other organisms, *Mutat. Res.*, 512:67-84.

Klungland A., L.Fairbairn, A.J.Watson, G.P.Margison y E.Seeberg (1992) Expression of the *E.coli* 3-methyladenine DNA glycosilase I gene in mammalian cells reduces the toxic and mutagens effects of the methylating agents, *EMBO J.*, 11:4439-4444.

Kyrtopoulos S.A. (1998) DNA adducts in humans after exposure to methylating agents, *Mutat. Res.*, 405:135-143.

Labahn J., O.D.Schärer, A.Long, K.Ezaz-Nikpay, G.L.Verdine y T.E.Ellenberger (1996) Structural Basis for the Excision Repair of Alkylation-Damaged DNA, *Cell*, 86:321-329.

Lambert B., M.Sten, D.Hellgren y D.Francesconi (1984) Different SCE-inducing effects of HN_2 and MMS in early and late G_1 in human lymphocytes, *Mutat. Res.*, 139:71-77.

Larson K., J.Sahm, R.Shenkar y B.Strauss (1985) Methylation induced blocks *in vitro* DNA replication, *Mutat. Res.*, 150:77-84.

Latt S.A. (1973) Microfluorometric analysis of DNA synthesis in human metaphase chromosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70:3395-3399.

LeDoux S, M.Thangada, V.A.Bohr y G.L.Wilson (1991) Heterogeneous Repair of Methylnitrosourea-induced Alkali-labile Sites in Different DNA Sequences, *Cancer Res.*, 51:775-779.

Lees-Miller S.P. (2004) DNA damage, DNA Repair and Cancer, <http://www.bio.ucalgary.ca/undergrad/courses/cmmb561/LM2.pdf>

Li, G.M. (1999) The role of mismatch repair in DNA damage-induced apoptosis, *Oncol. Res.*, 11:393-400.

Liem L.K., A.Lim y B.F.Li (1994) Specificities of human rat and E. Coli O^6 -methylguanine-DNA transferases towards the repair of O^6 -methyl and O^6 -ethylguanine in DNA, *Nucleic Acids Res.*, 22:1613-1619.

Lindahl T., B.Demple y P.Robins (1982) Suicide inactivation of the E. coli O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase, *EMBO J.*, 1:1359-63.

Lindahl T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA, *Nature*, 362:709-715.

Lindahl T. y R.D.Wood (1999) Quality control by DNA repair, *Science*, 286:1897-1905).

Lips J. y B.Kaina (2001) Repair O⁶-methylguanine is not affected by thymine base pairing and the presence of MMR proteins, *Mutat. Res.*, 487:59-66.

Loetchler E.L., C.L.Green y J.M.Essigmann (1984) In vivo mutagenesis by O⁶-methylguanine built into a unique site in a viral genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6271-6275.

Loveless A. (1969) Possible relevance of O⁶-alkylation of deoxiguanosine to mutagenicity of nitrosamines and nitrosamides, *Nature (London)*, 23:206-208.

Mabrouk G.M., S.S.Moselhy, S.F.Zohny, E.M.Ali, T.E.Helal, A.A.Amin y A.A.Khalifa (2003) Inhibition of methylnitrosourea (MNU) induced oxidative stress and carcinogenesis by orally administered honey and *Nigella* grains in Sprague Dawely rats, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 21:341-346

Mancini W.R., E.R.Glaze, P.L.Stetson y H.S.Greenberg (1999) Sensitization of 1,3-bis(2-Chloroethyl)-1-nitrosourea and Cisplatin Cytotoxicity by 5-Bromo-2'-deoxyuridine in Human Glioma, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 289:1404-1409.

Marginson G. P. y P.Kleihues (1975) Chemical carcinogenesis in the nervous system: preferential accumulation of O⁶ methylguanine in rat brain deoxyribonucleic acid during repetitive administration of N-methyl-N-nitrosourea, *Biochem. J.*, 148:521-525.

Marginson G.P. y P.J.Connor (1981) Nucleic acid modification by nitroso compounds. In Philip L. Grover, CRC Press, Inc. (Eds): *Chemical Carcinogens and DNA*, 111-159.

Margison G.P. y M.F.Santibáñez-Koref (2002) O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase: role in carcinogenesis and chemotherapy, *Bioessays*, 24:255-266.

Margison G.P., M.F.Santibáñez-Koref y A.C.Povey (2002) Mechanisms of carcinogenicity/chemotherapy by O⁶-methylguanine, 17:483-487.

Marti T.M., C.Kunz y O.Fleck (2002) DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways, *J. Cell Physiol.*, 191:28-41.

Masutani Ch., R.Kasumoto, S.Iwai y F.Hanaoka (2000) Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase η , *EMBO J.*, 19:3100-3109.

Mates W.B., C.S.Lee, J.Laval y T.R.O'Connor (1996) Excision of DNA adducts of nitrogen mustards by bacterial and mammalian 3-methyladenine-DNA glycosilases, *Carcinogenesis*, 17:643-648.

McGowan C.L. (2003) Running into problems: how cells cope with replicating damaged DNA, *Mutat. Res.*, 532:75-84.

Medcalf A.S.C. y P.D.Lawley (1981) Time course of O⁶-methylguanine removal from DNA of N-methyl-N-nitrosourea-treated human fibroblast, *Nature*, 289:796-798.

Meikrantz W., M.A.Bergom, A.Memisoglu y L.Samson (1998) O⁶-Alquilguanine DNA lesions trigger apoptosis, *Carcinogenesis*, 19:369-372.

Menissier de Murcia J., C.Nierdergang, C.Truco, M.Ricoul, B.Dutrillaux, M.Marks, F.J.Oliver, M.Mason, A.Dierich, M.Lemur, C.Walztinger, P.Chambon y G. de Murcia, (1997) Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and the cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:7303-7307.

Meschini R., R.Bastianelli y F.Paliti (1996) The diplochromosome of endoreduplicated cells: a new approach to highlight the mechanism of sister chromatid exchange, *Chromosoma*, 105:50-54.

Michaels M.L., L.Pham, C.Cruz y J.H.Miller (1991) MutM a protein that prevents G:C • T:A transversions, is formamidopyrimidine-DNA glycosilase, *Nucleic Acids Res.*, 19:3629-3632.

Mizumoto K., P.A.Glascott y J.L.Farber (1993) Roles for oxidative stress and Poly(ADP-ribosyl)ation in the killing of culture hepatocytes by methyl methanesulfonate, *Biochem. Pharmacol.*, 46:1811-1818.

Modesti M. y R.Kanaar (2001) Homologous recombination: from model organisms to human disease, *Genome Biol.*, 2:1-5.

Modrich P. y R.Lahue (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology, *Ann. Rev. Biochem.*, 65:101-133.

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

Morales-Ramírez P., T.Vallarino-Kelly y R.Rodríguez-Reyes (1984b) Detection of SCE in rodent cells using the activated charcoal bromodeoxyuridine system. In Tice RR, Hollander (eds): *Sister Chromatid Exchanges*. London Plenum Press, 599-611.

Morales-Ramírez P., T.Vallarino-Kelly y R.Rodríguez-Reyes (1988) Occurrence In Vivo of Sister Chromatid Exchanges at the Same Locus in Successive Cell Divisions Caused by No repairable Lesions Induced By Gamma Rays, *Environ. Mol. Mutagen.*, 11:183-193.

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

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

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

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

Morales-Ramírez P., V.Cruz-Vallejo y R.Rodríguez-Reyes (2001) Differences in sensitivity of murine spermatogonia and somatic cells in vivo to sister-chromatid exchange induction by nitrosoureas, *Mutat. Res.*, 478:185-190.

Morel Y. y R.Barouki (1999) Repression of gene expression by oxidative stress, *Biochem. J.*, 342:481-496.

Morimoto K. (1983) Induction of sister chromatid exchanges and cell division delays in human lymphocytes by microsomal activation of benzene, *Cancer Res.*, 43:1330-1334.

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

Morris S.M. (1991) The genetic toxicology of 5-bromodeoxyuridine in mammalian cells, *Mutat. Res.*, 258:161-188.

Murthy M.S.S., C.J.Calleman, S.Osterman-Golkar, D.Segerback y K.Svensson (1984) Relationships between ethylation of DNA and administered amount of ethylmethanesulfonate in the mouse, *Mutat. Res.*, 127:1-8.

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

Neft R.E. y M.K.Conner (1989) Induction Sister Chromatid exchange in Multiple Murine Tissues In Vivo by Various Methylating Agents, *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 9:219-237.

Nishi Y., M.M.Hasegawa, M.Taketomi, Y.Ohkawa y N.Inui (1984). Comparison of 6-thioguanine resistant Mutation and Sister Chromatid Exchanges in Chinese Hamster V79 Cells with Forty Chemical and Physical Agents, *Cancer Res.*, 44:3270-3279.

Nivard M.J.M. A.Pastink y E.W.Vogel (1993) Impact of DNA nucleotide excision repair on methyl methanesulphonate-induced mutations in *Drosophila melanogaster*, *Carcinogenesis*, 14:1585-1590.

Norbury C.J. y I.D.Hickson (2001) Cellular responses to DNA damage, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 41:367-401.

Ochs K. y B.Kaina (2000) Apoptosis induced by DNA damage O⁶-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/-3 regulated and Fas/caspase-8 independent, *Cancer Res.*, 60:5815-5824.

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

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

Palombo F., P.Gallinari, I.Iaccarino, T.Lettieri, M.Hughes, A.D'Arrigo O.Truong, J.J.Hsuan y J.Jiricny (1995) GTBP, a 160-Kilodalton Protein Essential for Mismatch-Binding Activity in Human Cells, *Science*, 268:912-914.

Paul J (1961) *Cell and tissue culture*, The Williams and Wilkins Company, Baltimore.

Pegg A.E. (1990) Mammalian O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenesis and therapeutics agents, *Cancer Res.*, 50:6119-6129.

Pegg A.E. y T.L.Byers (1992) Repair of DNA containing O⁶-alkylguanine, *FASEB J.*, 6:2302-2310.

Pegg A.E. (2000) Repair of O⁶-alkylguanine by alkyltransferases, *Mutat. Res.*, 462:83-100.

Pepponi R., G.Marra, M.P.Fuggetta, S.Falcinelli, E.Pagani, E.Bonmassar, J.Jiricny y S.D'Atri (2003) The effect of O⁶-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase and mismatch repair activities on the sensivity of human melanoma cells to temozolomide, 1, 3-bis(Chloroethyl)1-nitrosourea, and cisplatin, *J. Pharmacol, Exp. Ther.*, 304:661-668.

Perticone P., G.Gensabella y R.Cozzi (1997) Damage prones induced by genomic DNA demethylation in mammalian cells cultivated *in vitro*, *Mutagenesis*, 12:259-264.

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

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

Piñero J. y F.Cortes (1993) Abnormally high incidence of SCE in three-way immunoperoxidase differential staining, *Mutat. Res.*, 292:205-211.

Popescu N.C., S.A.Amsbaugh y J.A.DiPaolo (1980) Reduced N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidine Sister chromatid exchange Induction in Chinese Hamster V79 Cells Pre-exposed to 5-Bromodeoxyuridine, *Chromosoma*, 76:329-338.

Popescu N.C., S.C.Amsbaugh y J.A.DiPaolo (1981) Relationship of carcinogen-induced sister chromatid exchange and neoplastic cell transformation, *Int. J. Cancer*, 28:71-77.

Popescu N.C., S.C.Amsbaugh y J.A.DiPaolo (1985) Persistence of sister chromatid exchanges and in vitro morphological transformation of Syrian hamster fetal cells by chemical and physical carcinogens, *Carcinogenesis*, 6:1627-1630.

Prakash L. y B.Strauss (1970) Repair of alkylation damage: stability of methyl groups in *Bacillus subtilis* treated with methyl methanesulphonate, *J. Bacteriol.*, 102:760-766.

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

Rasouli-Nia A., Sibghat-Ullah, R.Mirzayans, M.C.Paterson y R.S.Day III (1994) 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.*, 314:99-113.

Rodríguez-Reyes R. y P.Morales-Ramírez (2003) Sister chromatid exchange induction and the course of DNA duplication, two mechanisms of sister chromatid exchange induction by ENU and the role of BrdU, *Mutagenesis*, 18:65-72.

Rothkamm K., I.Kruger, L.H.Thompson y M.Lobrich (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle, *Mol. Cell. Biol.*, 23(16):5706-5715.

Rouse J. y P.Jackson (2002) Interfaces between the Detection, Signaling, and Repair of DNA Damage, *Science*, 297:547-551.

Russo A., W.DeGraff, T.J.Kinsella, J.Gamson, E.Glatstien y J.B.Mitchell (1986) Potentiation of chemotherapy cytotoxicity following iododeoxyuridine incorporation in Chinese hamster cells, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 12:1371-1374.

Saffhill R., G.P.Margison y P.J.O'Connor (1985) Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents, *Biochim. Biophys. Acta*, 823:111-145.

Samson L., B.Derfler y E.A.Waldstein (1986) Suppression of human DNA Alkylación-repair defects by *Escherichia coli* DNA -repair genes, *Proc. Natl. Acad. USA.*, 83:5607-5610.

Samson L., J.Thomale y M.F.Rajewsky (1988) Alternative pathways for the *in vivo* repair of O⁶-alkylguanine and O⁴-alkylthimine in *Escherichia coli*: the adaptative response and nucleotide excision repair, *EMBO J.*, 7:2261-2267.

Samson L.D. (1992) The repair of DNA alkylation damage by methyltransferases and glycosylases, *Essays Biochem.*, 27:69-78.

Samson L., S.Han, J. C.Marquis y L.J.Rasmussen (1997) Mammalian DNA repair methyltransferases shield O⁴MeT from nucleotide excision repair, *Carcinogenesis*, 18:919-924.

Sanderson B.J.S. y A.J.Shield (1996) Mutagenic damage to mammalian cells by therapeutic alkylating agents, *Mutat. Res.*, 355:41-57.

Sarasin A. (2003) An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis, *Mutat. Res.*, 544: 99-106.

Schwartzman J.B. y R.R.Tice (1982) 5-Bromodeoxyuridine and Its Role in the Production of Sister Chromatid Exchange. In Alan R. Liss, Inc.: *Sister Chromatid Exchange*, 123-134.

Schwartzman J.B., V.J.Goyanes, A.Camps, A.M.Lage, C.Veiras, M.C.Silva y S.Ramos (1985) Persistence of DNA lesions and the cytological cancellation of sister chromatid exchanges, *Chromosoma*, 92:7-10.

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

Sedgwick B y T.Lindahl (2002) Recent progress on the Ada responses for inducible repair of DNA alkylation damage, *Oncogene*, 21:8886-8894.

Sega G.A. (1984) A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate, *Mutat. Res.*, 134:113-142.

Shibuya T. y K.Morimoto (1993) A review of the genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea, *Mutat. Res.*, 297:3-38.

Singer B. (1976) All oxygens in nucleic acids react with carcinogenic ethylating agents, *Nature*, 264:333-339.

Singer B. y J.M.Essigman (1991) Site-specific mutagenesis: retrospective and properties, *Carcinogenesis*, 12:949-955.

Singer B. y B.Hang (1997) What Structural Features Determine Repair Enzyme Specificity and Mechanism in Chemically Modified DNA?, *Chem. Res. Toxicol.*, 10:713-732.

Singh J., L.Su y E.T.Snow (1996) Replication across O⁶-Methylguanine by Human DNA Polymerase β *in vitro*, *J. Biol. Chem.*, 271:28391-28398.

Sledziewska-Gójska E. y D.Torzewska (1997) Different repair of O⁶-methylguanine occurring in DNA modified by MMS *in vivo* or *in vitro*, *Mutat. Res.*, 383:31-37.

Slee E.A., D.J.O'Connor y X.Lu (2004) To die or not die: how does p53 decide?, *Oncogene*, 23:2809-2818.

Slupphaug G., B.Kavli y H.E.Krokan (2003) The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage, *Mutat. Res.*, 531:231-251.

Smirnova M. y H.L.Klein (2003) Role of the error-free damage bypass postreplication repair pathway in the maintenance of genomic stability *Mutat. Res.*, 532:117-135.

Snyder R.D. y J.D.Regan (1982) DNA repair in normal human and xeroderma pigmentosum group A fibroblast following treatment with various methanesulfonates and the demonstration of a long-patch (u.v.-like) repair component, *Carcinogenesis*, 3:7-14.

Sonoda E., M.S.Sasaki, C.Morrison, Y.Yamaguchi-Iwai, M.Takata y S.Takeda (1999) Sister Chromatid Exchanges Are Mediated Homologous Recombination in Vertebrate Cells, *Mol. Cell. Biol.*, 19:5166-5169.

Sonoda E., M.Takata, Y.M.Yamashita, C.Morrison y S.Takeda (2001) Homologous DNA recombination in vertebrate cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:8388-8394.

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

Steller H. (1995) Mechanisms and Genes of Cellular Suicide, *Science*, 267:1445-1449.

Stephanou G., D.Vlastos, D.Vlachodimitropoulos y N.A.Demopoulos (1996) A comparative study on the effect of MNU on human lymphocyte cultures in vitro evaluated by O⁶-mdG formation, micronuclei and sister chromatid exchanges induction, *Cancer Letters*, 109:109-114.

Stetka D.G. y A.V.Carrano (1977) The interaction of Hoechst 33258 and BrdU substituted DNA in the formation of sister chromatid exchanges, *Chromosoma*, 63:21-31.

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

Swain C.G. y C.B.Scott (1953) Quantitative correlation of relative rates. Comparison of hydroxide ion with other nucleophilic reagents toward alkyl halides, esters, epoxides and acyl halides, *J. Am. Chem. Soc.*, 75:141-147.

Swann P.F. (1968) The Rate of Breakdown of Methyl Methanesulphonate, Dimethyl Sulphate and *N*-Methyl-*N*-nitrosourea in the Rat, *Biochem. J.*, 110:49-52.

Swann P.F. y P.N.Magee (1971) Alkylation of N-7 guanine of nucleic acids of the rat by diethylnitrosamine, *n*-ethyl-*n*-nitrosourea and ethyl methanesulphonate, *Biochem. J.*, 125:841-847.

Swann P.F. (1990) Why do O⁶-alkylguanine and O⁴-alkylthymine miscode? The relationship between the structure of DNA containing O⁶-alkylguanine and O⁴-alkylthymine and the mutagenic properties of these bases, *Mutat. Res.*, 233:81-94.

Swanson R.L., N.J.Morey, P.W.Doetsch y S.Jinks-Robertson (1999) Overlapping specificities of base excision repair, nucleotide excision repair, recombination and translesion synthesis pathways for DNA base damage in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.*, 19:2929-2935.

Swenson D.H., P.R.Harbach y R.J.Trzos (1980) The relationship between alkylation of specific DNA bases and induction of sister chromatid exchange, *Carcinogenesis*, 1:931-936.

Szybalsky W. (1974) X-ray sensitization by halopyrimidines, *Cancer Chemother. Rep.*, 58:539-557.

Toft N.J., O.J.Samson, R.A.Brookes, M.J.Arends, M.Wood, G.P.Marginson, D.J.Winton y A.LR.Clarke (2000) *In vivo* administration of O⁶-benzylguanine does not influence apoptosis or mutation frequency following DNA damage in the murine intestine, but does inhibit P450-dependent activation of dacarbazine, *Carcinogenesis*, 21:593-598.

Tominaga Y., T.Suzuki, A.Shiraishi, H.Kawate y M.Sekiguchi (1997) Alkylation-induced apoptosis of embryonic stem cells in which the gene for DNA-repair,

methyltransferase, had been disrupted by gene targeting, *Carcinogenesis*, 18:889-896.

Tucker J.D., A.Auletta, M.C.Cimino, K.L.Dearfield, D.Jacobson-Kram, R.R.Tice y A.V.Carrano. (1993) Sister chromatid exchange: second report of the gene program, *Mutat. Res.*, 297:101-180.

Valanis Ch., V.L.Souliotis y S.A.Kyrtopoulos (1994) Differential effects of procarbazine and methylnitrosourea on the accumulation of O⁶-methylguanine and the depletion and recovery of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase in rat tissues, *Carcinogenesis*, 15:1681-1688.

Van der Hoeven J.C.M., I.M.Bruggeman y F.M.H.Debets (1984) Genotoxicity of quercetin in cultured mammalian cells, *Mutat. Res.*, 136:9-21.

Van Zeeland A.A., J.G.Jansen, A.de Grot, S.van Hees, C.M.M.van Teijlingen, C.W.op het Veld, M.Zdzienicka, P.H.M.Lohman y H.Vrieling (1995) Mechanisms and Biomarkers of genotoxicity. Molecular dosimetry of chemical mutagens, *Toxicol. Lett.*, 77:49-54.

Vijayalaxmi y H.J.Evans (1984) Induction of 6-thioguanine-resistant mutants and SCE_s by 3 chemical mutagens (EMS, ENU and MMC) in cultured human blood lymphocytes, *Mutat. Res.*, 129:283-289.

Vogel E.W. y M.J.M.Nivard (1994) The subtlety of alkylating agents in reactions with biological macromolecules, *Mutat. Res.*, 305:13-32.

Wang W., M.Seky, Y.Narita, T.Nakagawa, A.Yoshimura, M.Otsuki, Y.Kawabe,S.Tada, H.Yagi, Yishii y T.Enomoto (2003) Functional relation among RecQ family helicases RecQL1, RecQL5, and BLM in cell growth and sister chromatid exchange Formación, *Mol. Cell. Biol.*, 23:3527-3535.

Wichmann A.E., N.M.Thomson, L.A.Peterson y E.W.Wattenberg (2003) Genotoxic Methylating Agents Modulate Extracellular Signal Regulated Kinase Activity through MEK-Dependent, Glutathione-, and DNA Methylation-Independent Mechanisms in lung Epithelial Cells, *Chem. Res. Toxicol.*, 16:87-94.

Wijnhoven S.W.P., E.Sonneveld, H.J.M.Kool, C.M.M.van Teijlingen y H.Vrieling (2003) Chemical carcinogens induce varying patterns of LOH in mouse T-lymphocytes, *Carcinogenesis*, 24:139-144.

Wilhelm D, K.Bender, A.Knebel y P.Angel (1997) The level of intercellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including Jun N-Terminal protein kinases and p38 kinase by alkylating agents, *Mol. Cell. Biol.*, 17:4792-4800.

Wilson 3rd D.M., T.M.Sofinowsky y D.R.McNeill (2003) Repair mechanisms for oxidative DNA damage, *Front. Biosci.*, 8:963-981.

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

Wolff S. y P. Perry (1974) Differential Giemsa Staining of Sister Chromatids and the Study of Sister Chromatid Exchanges without Autoradiography, *Chromosoma*, 48:341-353.

Wolff S. (1982) Chromosome aberrations, sister Chromatid exchange, and the lesions that produce them. *In: Wolff (ed.), Sister Chromatid Exchanges*, New York: Wiley-Interscience Publication. 41-57.

Wolff S. y V.Afzal (1996) Segregation of DNA polynucleotide strands into sister chromatids and the use of endoreduplicated cells to track sister chromatid

exchanges induced by crosslink's, or x-ray damage, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:5765-5769.

Yang J. Z.P.Xu, Y.Huang, H.E.Hamrick, P.J.Duerksen-Hughes y Y.N.Yu (2004) ATM and ATR: sensing DNA damage, World J. Gastroenterol., 10:155-160.

Zak P., K.Kleibl y F.Laval (1994) Repair of O⁶-methylguanine and O⁴-methylthymine by the human and rat O⁶-methylguanineDNA methyl-transferases, J. Biol. Chem., 269:730-733.

Zhang H., G.Marra, J.Jiricny, V.M.Maher y J.J.McCormick (2000) Mismatch repair is required for O⁶-methylguanine-induced homologous recombination in human fibroblasts, Carcinogenesis, 21:1639-1646.

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

9. APÉNDICE

Preparación de las soluciones

| Solución salina balanceada (Gey) | |
|---|---|
| Reactivo | Gramos por cada litro de agua bidestilada |
| NaCl | 8.0 |
| KCl | 0.355 |
| Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O | 0.225 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.07 |
| NaHCO ₃ | 0.250 |
| Dextrosa | 2.0 |
| Ajustar a pH 7.4, guardar a 4 °C | |

Paul, 1961.

| Solución hipotónica 0.075 M | |
|------------------------------------|---|
| Reactivo | Gramos por cada litro de agua bidestilada |
| KCl | 5.592 |

| Tamizado del Carbón Activado (vegetal) | |
|--|-----------------------------|
| Carbón Activado | |
| HCl | 1N |
| NaOH | 1N |
| Malla para tamizar (200) | Abertura por pulgada 0.0029 |
| Malla para tamizar (350) | Abertura por pulgada 0.0017 |
| <p>Hacer lavados al carbón activado con HCl, después hacer lavados con NaOH y eliminar el sobrenadante, posteriormente hacer varios lavados con agua bidestilada hasta obtener un pH de 6-7 en el sobrenadante.</p> <p>Secar a 60° C hasta deshidratar y después a 120° C por dos horas.</p> <p>Tamizar en malla (200) y después en malla (350).</p> | |

| Preparación de la solución de BrdU (0.6 mg/g de peso) | |
|--|--------|
| BrdU | 20 mg |
| Carbón activado | 100 mg |
| H ₂ O bidestilada estéril | 1 ml |
| <p>La cantidad de la solución a preparar dependerá del número de ratones del experimento.</p> <p>Disolver la BrdU en agua bidestilada, agregar el carbón activado previamente deshidratado a la flama y mezclar bien, mantener en oscuridad.</p> | |

| Preparación del Hoechst 33258 | |
|--------------------------------------|-------|
| Hoechst | 25 mg |
| H ₂ O bidestilada | 10 ml |
| Mezclar y proteger de la luz | |

| Preparación del amortiguador para diferenciación | |
|--|---------|
| Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ 2H ₂ O | 2.36 g |
| H ₂ O bidestilada | 100 ml |
| NaH ₂ PO ₄ H ₂ O | 0.221 g |
| H ₂ O bidestilada | 10 ml |
| Se ajusta el pH a 7.0 con el fosfato de sodio monobásico | |

| Preparación de solución salina de citrato 2X | |
|--|--------|
| NaCl | 1.75 g |
| Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ 2H ₂ O | 0.88 g |
| H ₂ O bidestilada | 100 ml |

Técnica para la tinción diferencial de las cromátidas hermanas

A 1 ml de Hoechst agregar 9 ml de agua bidestilada y diluir 1:1 con amortiguador para diferenciación. Agregar la cantidad necesaria de la solución anterior a las laminillas para poner sobre esto un cubreobjetos No 1 de 24x50 mm, cubrir de la luz y dejar 10 minutos a temperatura ambiente.

Diluir el amortiguador para diferenciación 1:1 con agua bidestilada alrededor del cubreobjetos para evitar la evaporación y poner las laminillas bajo lámpara de luz negra de 15 watts, dejar por 60 minutos, sacar las laminillas y enjuagar con agua bidestilada desgonzada.

En una caja de coplin poner solución salina de citrato 2X a 60° C, sumergir las laminillas y dejar por 15 minutos. Sacar las laminillas, sumergirlas en agua bidestilada a 60° C y enjuagar con agua bidestilada a temperatura ambiente.

Teñir con Giemsa por 30 minutos.

Amortiguador salino de fosfatos 0.01 M, pH 6.8

| | |
|---|--------|
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ | 0.70 g |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$ | 0.69 g |
| H_2O | 100 ml |
| Mezclar y ajustar el pH a 6.8 | |

| Preparación del colorante Giemsa | |
|--|--------|
| Azul de metileno (Merck) | 0.8 g |
| Glicerina | 50 ml |
| Metanol | 50 ml |
| Calentar la glicerina a 60° C, agregar el colorante mezclar y dejar a temperatura ambiente, después agregar el metanol lentamente y dejar en almacenamiento. | |
| Amortiguador de fosfatos | 1.0 g |
| H ₂ O bidestilada | 100 ml |
| Quitar 10 ml de la solución y agregar 10 ml de colorante | |

| Tinción de las laminillas con Giemsa |
|--|
| Tomar 90 ml del amortiguador salino de fosfatos 0.01 M y agregar 10 ml de colorante Giemsa. Teñir las laminillas por 30 minutos y enjuagar. |

| Fijador Carnoy | |
|--------------------------------------|--------|
| Ácido acético | 250 ml |
| Metanol | 750 ml |
| Mezclar y mantener en refrigeración. | |