

PERSISTENCIA DE LAS LESIONES CAUSADAS AL ADN POR AGENTES ALQUILANTES, INVOLUCRADAS EN LA PRODUCCIÓN DE INTERCAMBIOS EN LAS CROMÁTIDAS HERMANAS

Regina Guadalupe Rodríguez Reyes*

RESUMEN

El estudio de la persistencia de lesiones involucradas en la producción de intercambios en las cromátidas hermanas (ICH), podría contribuir al conocimiento del significado biológico y al del mecanismo de formación de este fenómeno. Numerosas evidencias indican que los agentes alquilantes (AA) son buenos inductores de ICH, y aunque se conocen las lesiones que producen los AA sobre los sitios nucleofílicos del ADN, no se ha esclarecido de manera concluyente cuáles están involucradas en la generación de ICH. Dichas lesiones son altamente persistentes, ya que producen ICH varios días después del tratamiento en células en reposo. En células en división pueden trascender la etapa G₁ y varias divisiones celulares, incluso pueden dar lugar a ICH en el mismo locus en dos ciclos de división celular subsecuentes. Esto ha sido evaluado mediante diferentes protocolos que se describen en este trabajo. La persistencia de la inducción de ICH posiblemente está relacionada con la de aductos producidos por alquilación, así como con otros eventos como transformación celular, tolerancia al daño causado por ciertos AA y alteraciones en el proceso de metilación del ADN.

Palabras Clave: ICH, lesiones, persistencia, agentes alquilantes.

ABSTRACT

The study of lesion persistence that elicit sister chromatid exchanges (SCE) would provide an approach to the biological significance of SCE and to the mechanism(s) of formation. Much evidence indicates that alkylating agents (AA) efficiently induce SCE in several biological systems. Lesions produced on DNA by alkylation of nucleophilic sites are well known, although it has not been elucidated which are involved in SCE formation. These lesions are persistent in that they induce SCE in non-dividing cells several days after treatment, and in proliferating cells, even persisting along the G₁ phase or various cell cycles; in addition, they could cause SCE at the same locus in two successive cell divisions. These observations have been carried on employing different protocols that are described in this review. The persistence of SCE induction is possibly related with the persistence adducts, cellular transformation, damage tolerance, and DNA methylation disturbances.

Key Words: SCE, lesions, persistence, alkylating agent.

ARTÍCULO RECIBIDO EL 17 DE OCTUBRE DEL 2000 Y ACEPTADO EL 13 DE DICIEMBRE DEL 2000.

INTRODUCCIÓN

Los agentes ambientales físicos como la radiación ionizante o la luz ultravioleta y los químicos, entre ellos los alquilantes, causan diversos tipos de lesiones primarias en el ADN, tales como rompimientos de banda, dímeros de pirimidina, aductos en diferentes sitios de la molécula, enlaces cruzados inter e intrabanda, etc. (Fig. 1). Entre las consecuencias que se derivan del daño al ADN, se pueden mencionar los siguientes eventos: letalidad, apoptosis, reparación, mutación, transformación y la expresión de índices citogenéticos: aberraciones cromosómicas e intercambios en las cromátidas hermanas¹.

Los intercambios en las cromátidas hermanas (ICH), son transposiciones simétricas y equivalentes en las cromátidas de un mismo cromosoma. Son manifestaciones citogenéticas de rompimientos de doble banda en el ADN e intercambio a nivel de sitios homólogos en las dos cromátidas de un cromosoma² (Fig. 2). Usualmente son visualizados mediante el empleo de técnicas de tinción diferencial de las cromátidas hermanas, las que se basan en la incorporación al ADN de análogos como la bromodesoxiuridina (BrdU), durante dos ciclos de división celular sucesivos (Fig. 3). Aunque la BrdU induce ICH³ y puede afectar la producción de este fenómeno por los mutágenos^{4,5}, hay reportes que indican que este evento se produce de manera espontánea a una tasa muy baja⁶⁻⁸.

* Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.
E-mail: rrr@nuclear.inin.mx

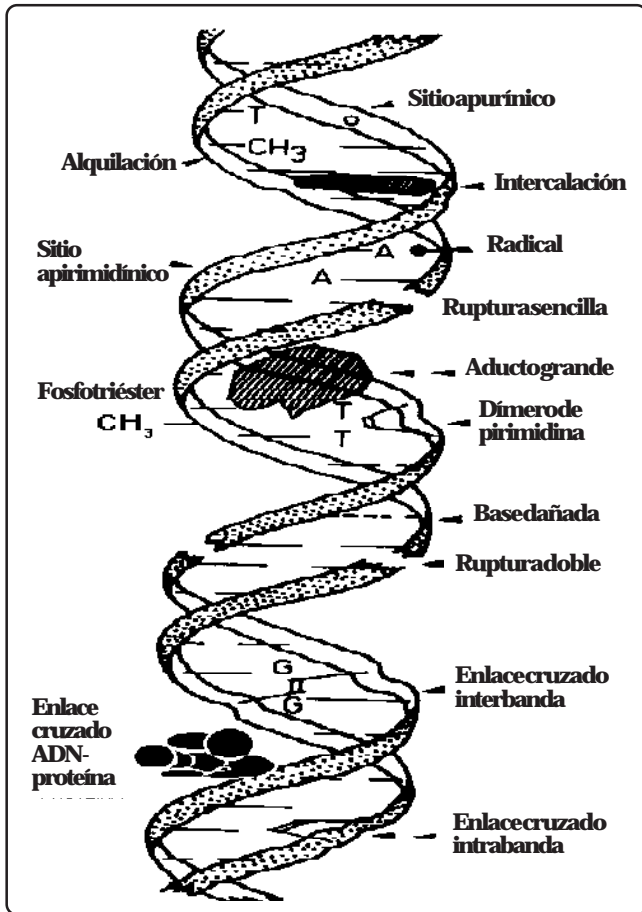


Figura 1. Diferentes tipos de lesiones en el ADN (modificado de Vogel, 1991).

El análisis del ICH ha sido considerado como un ensayo sensible para estudiar los efectos genotóxicos de mutágenos ambientales en modelos experimentales, e incluso, como dosímetro de la exposición humana⁹. Sin embargo, aún no se conoce la naturaleza de las lesiones causantes de este evento, a pesar de que se han realizado numerosos trabajos tratando de descartar entre monoaductos y enlaces cruzados^{10,11}, dímeros de pirimidinas¹², rompimientos de banda sencilla¹³ o doble¹⁴. A la fecha no existen resultados que permitan obtener conclusiones definitivas, y dada la variedad de mutágenos inductores de ICH y de las interacciones que éstos tienen con el ADN, se ha propuesto que este fenómeno no es el resultado de una lesión específica, sino de varios tipos¹⁵.

Aunque no se han podido esclarecer los mecanismos moleculares a través de los cuales las lesiones dan lugar a ICH, ni se ha determinado el significado biológico de este evento, existen evidencias claras de que los ICH ocurren durante la síntesis (S) del ADN¹⁶, e incluso en o cerca de la horquilla de duplicación¹⁷, y como consecuencia de lesiones o de la inhibición de la síntesis del ADN¹⁸.

El hecho de que los ICH sean intercambios de banda doble de ADN, implica que ocurren a través de un proceso de

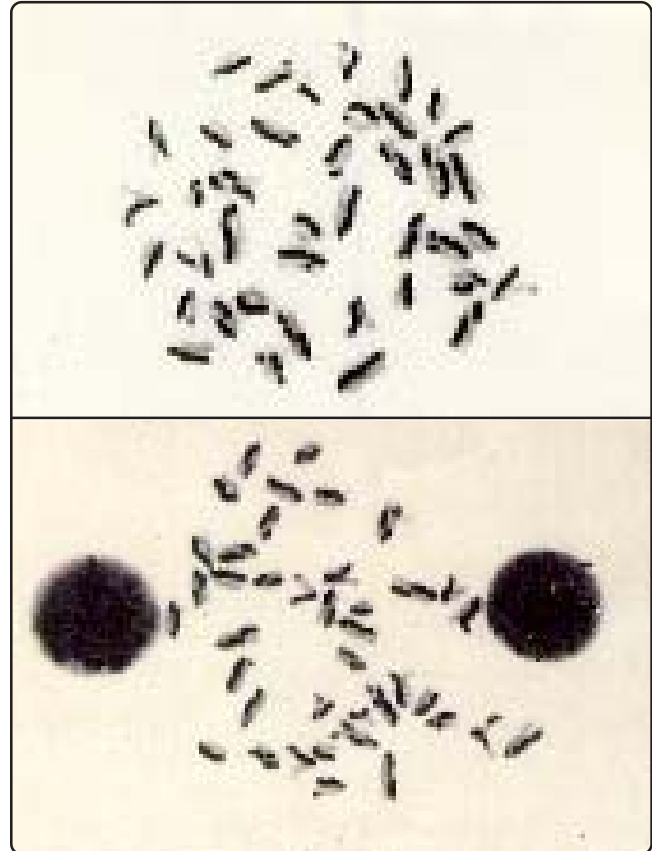


Figura 2. Fotomicrografías de cromosomas metafásicos de una célula de la médula ósea de un ratón, en la cual se puede ver la presencia de intercambios en las cromátidas hermanas (ICH) de varios de los cromosomas.

recombinación. En el caso de las lesiones inductoras de ICH, este proceso podría dar lugar a que éstas fueran eliminadas o a que fueran toleradas durante la duplicación, para ser reparadas en la interfase subsecuente. Si la lesión persiste y puede inducir ICH en divisiones sucesivas, se puede considerar que, en este caso, los ICH serían la consecuencia de la tolerancia de las lesiones^{19,20}.

El estudio de la persistencia de lesiones inductoras de ICH resulta interesante, ya que podría contribuir al conocimiento del significado biológico de este indicador de daño genotóxico.

Dentro de la gama de agentes inductores de ICH están los agentes alquilantes (AA), de los cuales se conocen ampliamente el tipo de lesiones que producen en el ADN. En el presente trabajo, se revisará el tema de la persistencia de las lesiones causadas por los AA e involucradas en la producción de ICH.

INTERACCIÓN DE LOS AGENTES ALQUILANTES CON EL ADN

Los AA son un grupo de mutágenos y carcinógenos que reaccionan fácilmente con el ADN, ya sea directamente o después de su activación metabólica. Durante esa reacción, en la que participan los radicales alquilo y sitios nucleofílicos del ADN, se forman aductos. Los radicales generados por los AA

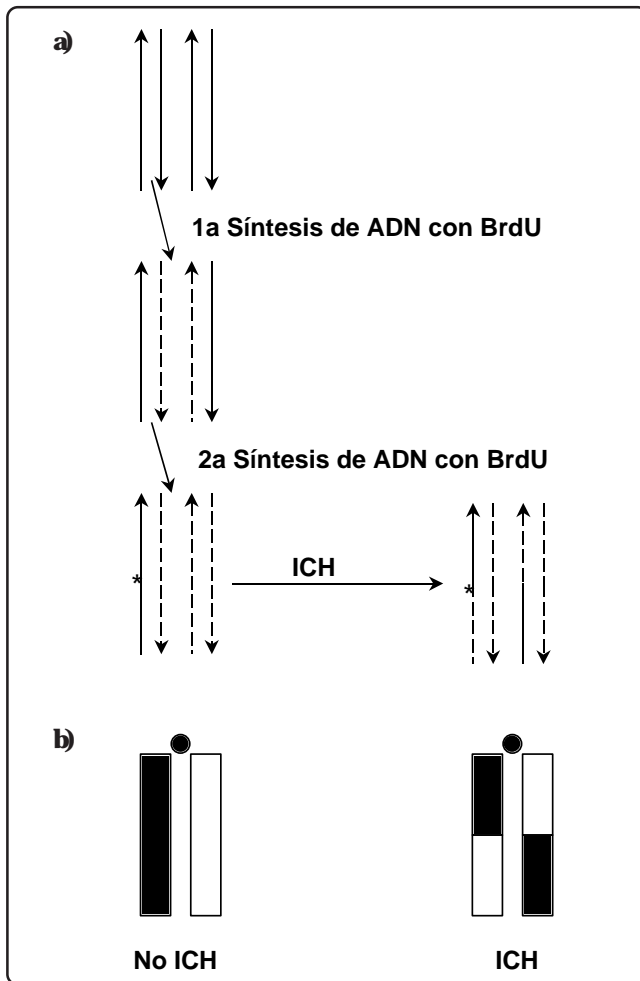


Figura 3. Esquema que muestra el protocolo de incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) durante la síntesis del ADN, en dos ciclos sucesivos de división celular: a) las líneas continuas simbolizan las cadenas originales de ADN y las líneas discontinuas las que han incorporado BrdU; el asterisco representa la presencia de una lesión en el ADN; b) aspecto al microscopio de dos cromosomas que muestran sus cromátidas hermanas con tinción diferencial, debida a la incorporación de BrdU, tal como se ilustra en a. A la derecha se observa un cromosoma en el que ha ocurrido un ICH.

pueden ser de estructura sencilla como metilos, etilos o más compleja, como grupos epóxido. Los AA se clasifican de acuerdo con el número de sus grupos activos en: monofuncionales como el metil y el etil metanosulfonatos (MMS y EMS), la metil y la etilnitrosoureas (MNU y ENU), la dimetil y la dietilnitrosaminas (DMN y DEN) y la metil y la etil-N-nitrosoguanidinas (MNNG y ENNG); bifuncionales o polifuncionales como la mitomicina C (MMC), la ciclofosfamida (CP), las cloro y bis(cloroetil)nitrosoureas (CENU y BCNU) y la 3(4-amino-2metil-5-pirimidinil)metil-1-2(cloroetil)-1-nitrosourea (ACNU), y la trietilenmelamina (TEM)¹ (Cuadro I).

Estudios de dosimetría molecular y de reacciones cinéticas, han permitido conocer los patrones de alquilación que AA conocidos producen en el ADN. Los AA son moléculas

Monofuncionales (ungrupoactivo)	Bifuncionalesopolifuncionales (másdeungrupoactivo)
MMS, EMS	MMC
MNU, ENU	CP
DMN, DEN	CENU, BCNU, ACNU
MNNG, ENNG	TEM

Cuadro I. Clasificación de los agentes alquilantes de acuerdo con su número de grupos activos.

electrofilicas, las cuales, durante la interacción con las bases del ADN, que son nucleofílicas, forman radicales que se unen mediante enlaces covalentes a los átomos de nitrógeno (N) y a los átomos de oxígeno (O) de las bases y enlaces fosfodiéster. El N3 de la adenina y, sobre todo el N7 de la guanina, son los sitios más nucleofílicos, y por lo tanto, los más reactivos con los AA, a excepción de la ENU. La reacción de los AA con el O⁶ de la guanina, ocurre con una frecuencia varias veces menor que la que se ha observado con el N7 de la misma base. Algunos AA como la ENU, la CENU, la BCNU, la MNU, la DMN y la MNNG, alquilan con más preferencia el O⁶ y esto se debe a que tienen un valor bajo de *s* (medida de la sensibilidad de los AA a la fuerza de los nucleófilos). Los átomos O de los enlaces fosfodiéster son también alquilados en un porcentaje bajo, en comparación con la alquilación en el N7 de la guanina, y son también preferidos por AA que tienen un valor bajo de *s*, como la ENU, que en este sitio causa el porcentaje más alto de alquilación, tanto *in vivo* como *in vitro*^{4,21}.

Se conocen por lo menos 12 sitios del ADN, en los que reaccionan los AA. Dichos sitios se localizan en átomos de O y N de las cuatro bases y de los fosfatos de la molécula. Los productos resultantes de tal reacción se denominan con el nombre del átomo participante, el del radical alquilo y el de la base o fosfato alquilados; por ejemplo, N3-metiladenina, N7-etilguanina, O⁶-metilguanina, etc.²¹

Los productos de alquilación tienen importancia en los efectos biológicos causados por los AA; por ejemplo, la mutagenicidad o carcinogenicidad relativa de la ENU y la DMN se correlacionan con su capacidad para unirse a los átomos de O, no solamente al O⁶ de la guanina, sino también al O⁴ de la timina²², y la inhibición de la síntesis del ADN y la citotoxicidad se vinculan con la producción de 3-alquilpirimidinas y 1-alquilpurinas por diferentes agentes²³.

Los monoadductos son reparados básicamente a través de dos procesos. Uno consiste en la remoción del aducto por la O⁶-alquilguanina-DNA alquiltransferasa (AGT), quedando unido a la enzima, ocurre sin que se afecte la estructura de la base o del grupo fosfato¹; por lo tanto, es un mecanismo libre de error. El otro proceso es la reparación por escisión, el que mediante la acción de glicosilasas específicas remueve las bases modificadas por la alquilación y posteriormente reconstruye la estructura original del ADN¹. El daño al ADN causado por AA

bifuncionales, además de alquilación simple, se puede formar de enlaces cruzados intra e interbanda en el ADN, o de esta molécula con proteínas. Estas últimas lesiones representan un daño mayor al ADN y son reparadas a través de otras vías como la reparación por escisión de nucleótidos.

Las alquilaciones en los átomos de O son removidas por la proteína AGT, y las que se producen en los átomos de N son reparadas por glicosilasas. Las enzimas involucradas en la remoción de los grupos alquilo, actúan más eficientemente sobre derivados metilo que sobre derivados etilo^{1,21,24}.

Los aductos formados en los diferentes sitios nucleofílicos del ADN tienen vidas medias distintas, lo que sugiere una variabilidad en las tasas de reparación, así el alquilo en el N3 de la adenina, es removido a una tasa más alta que en el N7 de la guanina²¹.

Además, se ha observado que en el caso de las alquilaciones en el O⁶ de la guanina, cuando no son reparadas por la proteína AGT, pueden ser removidas durante la duplicación inmediata o la inmediata posterior a la inducción de daño, a través de la reparación de errores de apareamiento^{25,26}. Por otro lado, se ha determinado que la reparación mediante glicosilasas puede provocar efectos clastogénicos secundarios, ya que genera sitiosapurínicos o apirimidínicos, los cuales, si no son reparados, pueden dar lugar a la escisión de la cadena de ADN y eventualmente a rompimientos de banda doble⁴. Esto fue puesto en evidencia mediante la sobreexpresión del gen de la N-metilpurina-DNA-glicosilasa (MPG) en células transfectadas, que después de la exposición a MMS produjo un exceso de sitiosapurínicos y un subsecuente incremento de ICH y de aberraciones cromosómicas^{27,28}.

En resumen, el daño causado al ADN por agentes alquilantes, puede ser removido a través de diferentes vías de reparación, como son: la remoción directa del grupo alquilo, la reparación por escisión de bases, la reparación por escisión de nucleótidos y la reparación de errores de apareamiento.

AGENTES ALQUILANTES COMO INDUCTORES DE ICH

La efectividad de un agente para inducir respuestas genotóxicas depende de varios factores como su vida media *in vivo*, su activación metabólica y su reparabilidad por las células.

Como se ha mencionado, es bien conocida la interacción que los AA tienen con el ADN y es probable que por esto se hayan empleado constantemente en los estudios relacionados con el fenómeno de ICH; además, por el hecho de que algunos son carcinógenos y mutágenos muy eficientes¹.

Entre los agentes causantes de ICH, los AA han sido los más ampliamente probados, tanto *in vivo*^{20,29-33} como *in vitro*^{27,28,34-36}.

Se ha observado que los AA presentan diferentes grados de eficiencia para inducir ICH, y los resultados de gran número de

trabajos, indican que los AA bifuncionales son más efectivos que los monofuncionales. Agentes bifuncionales como la MMC y la mostaza nitrogenada son extremadamente potentes inductores de ICH en células CHO y los monofuncionales como MMS y EMS son menos eficaces³⁴. En un estudio *in vivo* en células fetales y maternas se observó que la MMC y la CP fueron más capaces que la ENU y la DMN, con base en sus respectivos valores de eficiencia (número de ICH producidos por mg de dosis del agente). La MMC induce 40 y 60 veces más ICH que la ENU y la DMN, mientras que la CP 18 y 24 veces, respectivamente²⁹. Los resultados en células de la médula ósea de ratón *in vivo* expuestas a agentes monofuncionales y bifuncionales, indican que la MMC es 13.5 veces más eficiente que el MMS y 500 veces más que el EMS; en tanto que la CP lo es 3 y 90 veces, respectivamente⁵. Por otro lado, se observó que *in vitro* la MMC induce hasta casi el doble de ICH que el EMS y la ENU a una dosis 100 veces menor³⁷.

Entre los diferentes compuestos monofuncionales se observa que, tanto *in vivo*⁵ como *in vitro*^{34,38} el MMS es más potente inductor de ICH que el EMS y que la ENU es más eficiente que el EMS^{37,38}. *In vivo* la DMN y el EMS tienen una efectividad similar^{5,29}.

La comparación de la eficiencia entre los diversos agentes puede resultar difícil, ya que las dosis y las condiciones experimentales como el tiempo de administración del mutágeno y su relación con la incorporación de BrdU, etc. varían en los diferentes experimentos.

La correlación de la eficiencia en la inducción de ICH con las tasas de alquilación de los AA indica que los bifuncionales ACNU y CENU son 55 y 630 veces más eficientes para inducir ICH que la ENU, respectivamente, bajo condiciones equivalentes de alquilación. Asimismo, la CENU causa un ICH por cada 116 alquilaciones, en tanto que la ENU uno por 8500. Por lo que se sugiere que la formación de enlaces inter e intrabanda de ADN causados por la CNU, son los responsables de la mayor efectividad de los AA bifuncionales para inducir ICH^{39,40}.

LESIONES CAUSADAS AL ADN POR AGENTES ALQUILANTES E INVOLUCRADAS EN LA PRODUCCION DE ICH

Como ya se ha mencionado, no se conocen las lesiones que están involucradas en la formación de los ICH. En los primeros trabajos con AA se trató de descartar entre monoadductos y enlaces cruzados. Se observó que la descarbamitoil mitomicina C fue más eficiente para inducir ICH que la MMC, y como la primera produce sólo monoadductos y la última, además, enlaces cruzados, se propuso que éstos son la lesión más eficaz para producir ICH⁴⁰. La modulación del tratamiento combinado de metoxipsoralén y luz láser permitió saber que los monoadductos fueron más eficientes para inducir ICH que los enlaces cruzados, ya que con un pulso sencillo de luz, se producen monoadductos e incrementos altos de ICH y con más pulsos se forman enlaces cruzados e incrementos bajos de ICH⁴¹.

Los resultados anteriores demostraron que los monoaductos son más eficientes para inducir ICH; no obstante, como no hubo una correlación entre el número de aductos y el de ICH producidos por el tratamiento con metoxipsoralén más luz UV, se propuso que este evento representa sólo una pequeña fracción del total de aductos que se producen por el tratamiento⁴¹, por lo tanto, es probable que uno o algunos aductos específicos sean la lesión inductora de los ICH.

Mientras, se propuso que los enlaces ADN-proteína son las lesiones que están más relacionadas con la inducción de ICH, con base en dos observaciones: i) que el tratamiento con MMC a células deficientes en la reparación de monoaductos o deficientes en la reparación de enlaces cruzados de ADN, produce inducción normal de ICH; ii) que la MMC presenta una reactividad alta con las proteínas asociadas al ADN⁴².

En trabajos posteriores, se plantea que el aducto O⁶-alquil-G generado por los AA puede ser el responsable de la producción de ICH, lo cual resulta interesante, ya que es la lesión premutagénica y precarcinogénica más conocida. No obstante, esta suposición no se sustentó, debido a la falta de correlación entre la cantidad de estos aductos y la frecuencia de ICH⁴³⁻⁴⁵.

Recientemente, se han desarrollado nuevas estrategias para demostrar correlaciones entre lesiones específicas causadas por AA y la inducción de ICH. Lesiones como la O⁶-alquil-G, la N7-alquil-G y la N3-alquil-A han sido las más estudiadas^{15,27,28,46,54}. Para ello, se emplearon la clonación y transfección de genes que codifican para las enzimas que reparan los aductos mencionados en células CHO, células deficientes en la reparación de glicosilasas, linfocitos humanos y células tumorales humanas. Entre los genes clonados se encuentran: el gen humano de la enzima O⁶-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT), el gen de la actividad O⁶-alquilguanina-DNA-alquiltransferasa (AGT), el de la O⁶-alquilguanina alquilfosfotriester alquiltransferasa (Atasa) y el de la N-metilpurina-DNA-glicosilasa (MPG). Los resultados de estos experimentos, en los que se probó el efecto de la actividad de estas enzimas en la inducción de ICH causada por diferentes AA tanto monofuncionales como bifuncionales, permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

1. La protección notablemente alta de estas enzimas contra la inducción de ICH causada por la MNU, la MNNG y más baja contra la causada por el EMS, el MMS, y la ENU, indica que los ICH producidos por la MNU y la MNNG son inducidos en gran parte por la O⁶-metil-G, que es el aducto que estos agentes producen con la tasa más alta, en relación con la lesión más abundante (N7-metil-G). Por otra parte, estos datos demuestran que los ICH que ocurren por la exposición a EMS, MMS y ENU, se deben sobre todo a otras lesiones^{27,47}.
2. El hecho de que MGMT repare ineficientemente la O⁶-etil-G causada por ENU, en comparación con la O⁶-metil-G

inducida por MNU (25% vs 88%) y que cause una disminución muy leve de ICH por ENU, indica que esta pequeña proporción de ICH fue generada por O⁶-etil-G⁴⁹.

3. El efecto protector mayor de la MGMT o la AGT contra la inducción ICH por la BCNU, la CCNU y la ACNU, y menor contra la causada por AA monofuncionales como la MNNG, implica que la reparación eficaz del aducto O⁶-cloroetil-G evita la formación de enlaces cruzados interbanda en el ADN^{46,53}.
4. La falta de protección de AGT contra la inducción de ICH por MNNG en líneas celulares humanas linfoblastoides transformadas, sugiere la existencia de factores celulares, involucrados en la sensibilidad para generar ICH.
5. La protección adicional de la actividad de AGT contra la capacidad de la BCNU para producir ICH, tanto en linfocitos humanos en reposo como en proliferación, indicó que dicha protección es dependiente de la proliferación celular⁴⁵.
6. El incremento significativo de ICH, producido en células deficientes en la N3-metil-A DNA glicosilasa por la exposición a un AA que produce casi exclusivamente este aducto, indicó que éste está involucrado en la inducción de ICH^{54,55}.
7. El hecho de que niveles altos de la enzima MPG, que escinde el aducto N7-alquil-G, no causara una reducción, sino incluso un notable incremento de ICH en células CHO expuestas a MMS y MNNG, es evidencia de la falta de reparación de sitiosapurínicos y huecos en el ADN causados por la escisión. Este hecho permitió sugerir que la sobreexpresión del gen MPG, causó un desequilibrio en la reparación de esos sitios y huecos, los cuales pueden ser intermediarios en el proceso de formación de ICH^{27,28}.

De todo lo antes mencionado se puede concluir que: **i)** diferentes lesiones específicas causadas al ADN por los AA producen ICH; **ii)** tales lesiones son los aductos O⁶-alquil-G, N3-alquil-A y N7-alquil-G y los enlaces cruzados interbanda O⁶-cloroetil-G; **iii)** la reparación de estos aductos puede reducir la frecuencia de ICH; **iv)** es probable que existan factores celulares que modulen la actividad de las enzimas participantes en dicha reparación. Finalmente, es pertinente mencionar que estos estudios no descartan la posibilidad de que otras lesiones puedan estar involucradas en el evento de ICH.

PERSISTENCIA DE LAS LESIONES CAUSADAS AL ADN POR AGENTES ALQUILANTES E INVOLUCRADAS EN LA PRODUCCIÓN DE ICH

El estudio de la persistencia o de la ausencia de reparación de lesiones inductoras de ICH resulta interesante, ya que se ha asociado con la posibilidad de transformación celular a largo

plazo⁵⁶, además, dicho estudio puede contribuir al conocimiento del mecanismo y al del significado biológico de este fenómeno. Se sabe que los ICH ocurren durante o inmediatamente después de la síntesis del ADN^{16,17}, y que las lesiones que los causan pueden persistir durante las etapas del ciclo celular previas a S, o más aún, trascender la duplicación del ADN, incluso por varios ciclos^{33,57}.

La persistencia se ha estudiado en diferentes sistemas biológicos, mediante el empleo de diversos protocolos, tanto *in vitro*^{36,38,58} como *in vivo*^{20,31,32,57,59,60} y en distintas condiciones de incorporación de la BrdU. El análisis del efecto de este análogo de la timidina en la inducción y persistencia del fenómeno de ICH puede ser un tema muy vasto, que probablemente requeriría de una revisión particular, por lo tanto, no se considera en la presente.

Algunos protocolos evalúan el tiempo que dura el incremento de la frecuencia de ICH a partir del tratamiento con los mutágenos, a células que no se están dividiendo^{59,61}. Otros emplean diferentes estrategias para estudiar la persistencia de lesiones en células en proliferación, como son: la determinación de las variaciones en la frecuencia de ICH por el tratamiento en diferentes ciclos sucesivos³⁸. Algunos estudios analizan la persistencia de las lesiones inductoras de ICH a lo largo de la etapa G₁ del ciclo celular, puesto que los ICH se producen en S, la diferencia entre las frecuencias inducidas en G₁ tardía y G₁ temprana indica la cantidad de lesiones que fueron reparadas durante G₁^{32,33}. Finalmente, se han desarrollado protocolos que analizan la frecuencia de ICH en cada uno de dos o tres ciclos sucesivos postratamiento^{20,35,36,62}.

Se ha demostrado que las frecuencias de ICH, producidas por el tratamiento con MMC y CP en linfocitos humanos^{63,64} y en linfocitos de conejo^{59,60}, se mantienen altas varios días después del tratamiento *in vivo*. En linfocitos de sangre periférica y de bazo en ratones se encontró inducción significativa de ICH, aun a 172 días después del tratamiento con ENU⁶⁵.

En células fetales de criceto Sirio *in vitro*, se detectó un incremento en el número de ICH causado por AA varios ciclos de división después del tratamiento⁶¹. En otro trabajo se observaron frecuencias altas de ICH en el tercer ciclo de división posterior al tratamiento con MMS de células CHO; dichas frecuencias fueron incluso mayores que las que se produjeron en los ciclos anteriores⁴.

Los resultados del tratamiento tres, dos o un ciclo de división antes del análisis de ICH con MNU, MNNG, EMS, ENU, MMS y MMC, indicaron que las lesiones causadas por los AA monofuncionales son muy persistentes, pues dieron lugar a ICH preferentemente cuando el tratamiento se dio, dos o tres ciclos de división antes del análisis. En cambio, la MMC, que es un AA bifuncional, indujo lesiones que producen ICH principalmente en el ciclo previo al análisis, sugiriendo que dichas lesiones son más reparables³⁸.

Estudios de la persistencia *in vitro* a lo largo de G₁, han demostrado que la MMC induce lesiones de vida corta⁶⁶ y que el MMS produce lesiones mucho más persistentes⁵⁸. En el sistema *in vivo* de células de glándula salival de ratón sincronizadas, se determinó que de las lesiones inductoras de ICH producidas por la MMC, la MNU y la ENU, el 65%, 50% y 100%, respectivamente, persisten durante G₁^{32,33}.

El análisis de ICH sencillos y gemelos en células tetraploides es un protocolo que permite determinar en ellas su persistencia en dos ciclos de división subsecuentes. Con este protocolo, se encontró persistencia de lesiones causadas por el tratamiento con EMS, MMS o MMC^{67,62}. No obstante, este ensayo ha sido cuestionado por la dificultad de interpretación⁶², además de que se requiere de un tratamiento adicional para inducir tetraploidía, el cual posiblemente influye en la respuesta observada.

La inducción de ICH producida en tres ciclos de división sucesivos pudo ser evaluada mediante el análisis de ICH recíprocos y no recíprocos, para lo cual, las células se dividen tres veces en presencia de BrdU. El tratamiento con los agentes se da en el primero o segundo ciclo a partir de la administración de BrdU o en el previo. Se detectó que muchas de las lesiones productoras de ICH causadas por la MMC, etil carbamato, BCNU y CP persisten al menos por tres ciclos⁶⁸⁻⁷¹. En uno de estos estudios, en el que se empleó tratamiento con BCNU o etil carbamato, también se pudo detectar el fenómeno de cancelación de ICH, el cual es debido a la ocurrencia de ICH en el mismo locus en dos ciclos de división sucesivos⁷².

Recientemente se desarrolló un ensayo que también permite la determinación de la frecuencia de ICH en cada uno de tres ciclos de división celular sucesivos; éste se lleva a cabo en células endoreduplicadas que completan tres ciclos de división antes del análisis y el ciclo en que ocurren los ICH se infiere de la posición de los ICH en los cromosomas homólogos. Así, se detectó claramente que las lesiones causadas por la MMC son muy reparables, ya que sólo fueron capaces de producir ICH en el primero de los tres ciclos. En cambio, las inducidas por MNNG son altamente persistentes, puesto que dieron lugar a ICH durante las tres divisiones³⁶.

Protocolos *in vitro*⁷³ e *in vivo*⁴⁹, mediante la tinción diferencial de las cromátidas hermanas en tres tonos (TDTT), han sido desarrollados para estudiar la persistencia de ICH a través de tres ciclos de división celular sucesivos (Fig. 4), los cuales se basan en la administración de una dosis muy baja de BrdU en el primero de tres ciclos y una dosis similar a la empleada en el protocolo de dos tonos en los dos subsiguientes⁵. Como las células completan tres ciclos de duplicación semiconservadora del ADN en presencia de BrdU, la mitad de sus cromosomas tienen una cromátida unifilarmente sustituida y la otra bifilarmente sustituida; ambas con una incorporación alta de BrdU; la primera se tiñe intensamente y la otra no se tiñe. La otra mitad de cromosomas está constituida por cromátidas bifilarmente sustituidas, sólo que una de ellas tiene una

cadena con una incorporación baja de BrdU, por lo que se tiñe de un color intermedio. En estos cromosomas es posible distinguir los ICH que ocurrieron en cada una de los tres ciclos de división que dura el protocolo (Fig. 5). Es posible determinar si las lesiones producen ICH en el mismo sitio en dos ciclos sucesivos (ver Fig. 4), ya que cuando el mutágeno se aplica en el segundo ciclo de división se observa un incremento inesperado de los ICH del tipo de los que ocurren en el primer ciclo⁷⁴. En el protocolo de dos tonos esto tendría como consecuencia la cancelación, por lo que no se podrían observar^{20,31,57}.

En células CHO se observó que tanto la MMC como el EMS fueron capaces de inducir ICH a través de ciclos celulares sucesivos; las lesiones producidas por EMS fueron más persistentes⁷⁵. Los linfocitos humanos mostraron una respuesta variable con MMC, en cambio con el EMS mostraron la presencia de lesiones claramente persistentes, que dieron lugar a ICH durante ciclos celulares sucesivos³⁵.

Mediante el protocolo *in vivo* se demostró que las lesiones inducidas por MMC y CP produjeron lesiones persistentes, que con base en un marco teórico de probabilidades²⁰, se estimó que dieron lugar a ICH en cada uno de dos ciclos de división celular sucesivos con un 50% de probabilidad. Las lesiones generadas por la exposición a MMS, EMS y DMN también son muy persistentes pero produjeron frecuencias de ICH muy altas en el segundo ciclo postratamiento. Esto puede ser explicado con base en la inducción de lesiones frescas durante el segundo ciclo postratamiento o de lesiones secundarias originadas a partir de lesiones no inductoras de ICH, que requieren de otro ciclo de duplicación para transformarse en inductoras^{31,57}. Esto último ya había sido propuesto en estudios previos, administrando el mutágeno a diferentes tiempos antes del análisis, empleando el protocolo de tinción diferencial de las cromátidas hermanas en

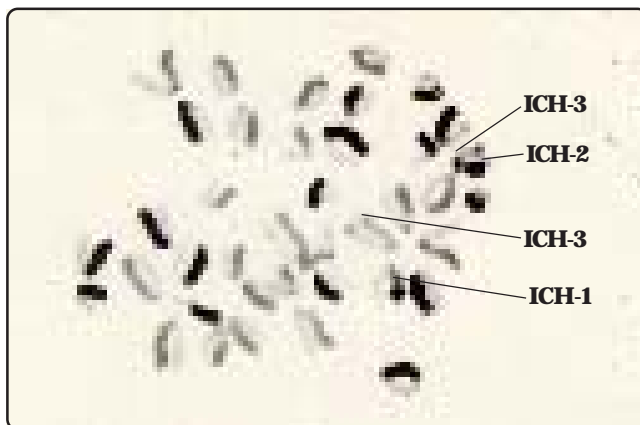


Figura 4. Fotomicrografía de cromosomas metafásicos de una célula de la médula ósea de ratón, que muestran la tinción diferencial de las cromátidas hermanas en tres tonos (TDTT), lo cual indica la incorporación en el ADN, de BrdU, a diferentes niveles, durante tres ciclos de división celular sucesivos. En algunos cromosomas se observa la presencia de intercambios que ocurrieron en diferentes ciclos de división celular de los tres que comprende el protocolo de TDTT (tomada de Morales-Ramírez *et al.*, 1988).

dos tonos³⁸. Sin embargo, la imposibilidad de discriminar el efecto de las subsecuentes incorporaciones de BrdU y del fenómeno de cancelación no permiten sustentar su conclusión.

La conclusión que se puede obtener de los diferentes estudios realizados con respecto a la persistencia de las lesiones inducidas por agentes alquilantes, que están relacionadas con la producción de ICH, es que las causadas por los bifuncionales como la MMC o la CP son menos persistentes en comparación con las lesiones que producen los monofuncionales como el MMS, el EMS, la MNU, la ENU y la DMN, de los cuales, los etilantes parecen producir lesiones más persistentes. Se ha establecido que en general las lesiones inducidas por agentes alquilantes monofuncionales en los sitios nucleofílicos del ADN, son muy persistentes tanto *in vivo* como *in vitro*, con una clara tendencia a ser removidas más rápidamente *in vivo*, sobre todo los derivados metilo respecto a los etilo²¹.

Entre las lesiones que se han asociado con la inducción de ICH, los aductos N7-alkil-G y O⁶-alkil-G son muy persistentes, ya que se ha detectado que su vida media es de 12 h *in vivo* y 9 días *in vitro* y de 4.8 h *in vivo* y 10 días *in vitro*, respectivamente. Por otra parte, el aducto N3-alkil-A, persiste menos tiempo, pues su vida media es de 2.4 h *in vivo* y de 38 h *in vitro*²¹.

Aunque resulta difícil establecer correlaciones entre la persistencia de los aductos e ICH causados por AA, se observa un cierto paralelismo entre ambos eventos. Así, el hecho de que agentes etilantes como el EMS y la ENU producen aductos O⁶-etil-G con vida media muy larga y también lesiones inductoras de ICH muy persistentes^{57,33}; o la observación de que la frecuencia de ICH causada por agentes metilantes como la MNU y la MNNG es reducida por la actividad de MGMT, que selectivamente elimina el aducto O⁶-metil-G²⁷. No obstante, estas consideraciones no permiten obtener conclusiones generales; es probable que diseños experimentales en los que se puedan determinar simultáneamente la persistencia de lesiones específicas y de ICH permitirá obtener aproximaciones al respecto.

Aunque no se conocen las consecuencias finales de la persistencia de las lesiones, resulta interesante la observación de que las células puedan sobrevivir con lesiones en su ADN, e incluso dividirse, es decir, que presentan una tolerancia al daño. Al respecto, se ha observado que ciertas líneas celulares deficientes en la reparación de O⁶-alq-G son resistentes a los efectos citotóxicos de mutágenos como la MNU y la ENU^{49,76-78}.

Como se mencionó, la persistencia de lesiones ha sido relacionada con la transformación celular^{56,70}. Es posible que la permanencia de lesiones pueda favorecer la producción de mutaciones, las que subsecuentemente podrían desencadenar el proceso de malignización de las células^{61,63}. Datos relacionados con esto indicaron que la tasa de reparación de lesiones inductoras de ICH es inversamente proporcional a la actividad tumorigénica de algunos mutágenos⁷¹.

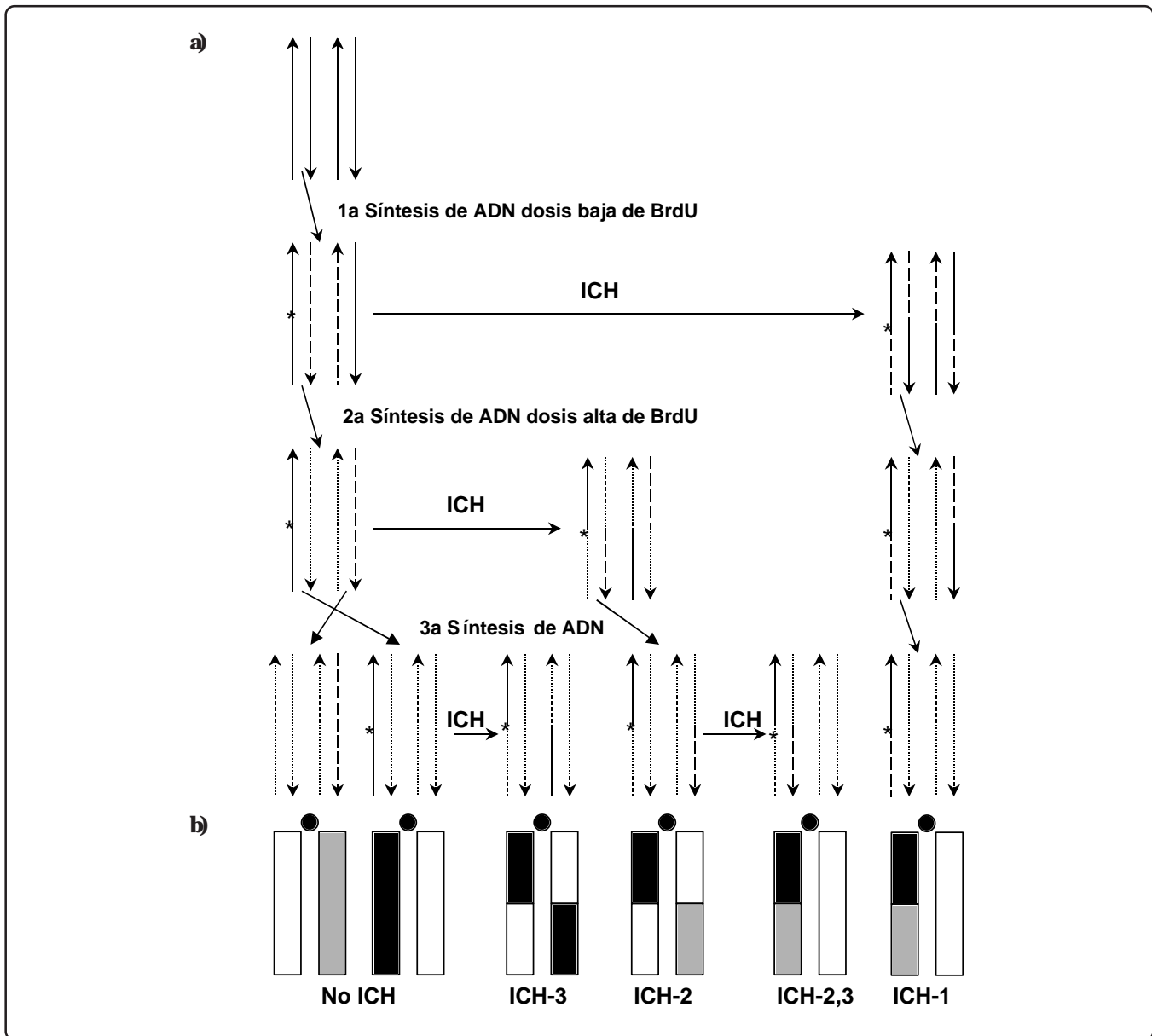


Figura 5. Esquema que muestra el protocolo de incorporación de BrdU durante la síntesis del ADN en tres ciclos de división celular sucesivos: a) las líneas continuas simbolizan las cadenas originales de ADN, las líneas discontinuas las cadenas de ADN, que han incorporado BrdU a dosis baja y las líneas punteadas las cadenas de ADN, que han incorporado BrdU a dosis alta; b) aspecto al microscopio de cromosomas que muestran sus cromátidas hermanas con tinción diferencial en tres tonos, debida a la incorporación de BrdU, tal como se ilustra en a. Se observan cromosomas en los que han ocurrido ICH en la primera (ICH-1), en la segunda (ICH-2) o en la tercera divisiones (ICH-3). Así como los ICH que se producen en el mismo sitio en la segunda y tercera divisiones, cuando los agentes se aplican en la segunda división, los cuales tienen la misma apariencia de los que se generan en el primer ciclo.

Estudios recientes muestran que la demetilación del ADN también está relacionada con la persistencia de ICH por varios ciclos de división celular^{79,81}. Agentes demetilantes, como la L-etionina (ETH) que inhibe la metiltransferasa y la 5-azacitidina (AZA) que se incorpora al ADN en lugar de la citosina y no puede ser metilada, inducen ICH en células CHO; este incremento se observa hasta 10 ciclos de división celular después del tratamiento⁷⁹. La observación de este efecto de persistencia tan notable, causado por demetilación al ADN, permitió considerarlo como un cambio epigenético heredable. La relación entre ICH y

demetilación, fue puesta de manifiesto por el hecho de que ETH y AZA sólo indujeron ICH cuando se administraron dos ciclos antes del análisis, que son los necesarios para lograr la demetilación de las bandas parentales. Esto sustentó la hipótesis de que la demetilación en la banda parental al momento de la duplicación, es la causa de un aumento en uniones erróneas de las bases de ADN que tienen lesiones, lo que subsecuentemente produce ICH⁸¹. Un efecto aditivo o sinérgico se produce si después del pulso con estos demetilantes, se expone a las células a mutágenos y cancerígenos como la MMC y la luz UV⁸⁰.

Se ha determinado que muchos carcinógenos interfieren la metilación del ADN⁷⁹, por lo que existe la posibilidad de que la relación entre persistencia de ICH y actividad tumorígena^{61,71} pueda explicarse a través de alteraciones en dicho proceso. Sin embargo, como la demetilación no ha sido relacionada directamente con la actividad tumorígena de los cancerígenos⁷⁹, es probable que la persistencia de ICH se relacione con otros procesos, los cuales, al igual que la demetilación, sean transmitidos a través de varias generaciones celulares.

CONCLUSIONES

Aunque no se ha esclarecido la naturaleza de las lesiones involucradas en la producción de ICH, la información que se ha derivado del empleo de agentes alquilantes ha permitido saber que más de un tipo de lesiones participan en el fenómeno. Dichas lesiones permiten el crecimiento y la reproducción de las células, es decir, son compatibles con la supervivencia celular y son capaces de producir ICH hasta por varios ciclos de división celular. Resulta interesante estudiar la persistencia de estas lesiones porque es posible que esté relacionada con diferentes procesos como la transformación celular, tolerancia al daño y alteraciones en la metilación del ADN. Además, podría aportar una aproximación al conocimiento del mecanismo de formación y del significado biológico de los ICH.

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Pedro Morales Ramírez, Sandra Gómez Arroyo y Mario Altamirano Lozano por su críticas atinadas que contribuyeron a enriquecer este trabajo.

REFERENCIAS

- Vogel EW. Genotoxic Chemicals: An introduction into basic principles of Genetic Toxicology. Manual del "Curso Internacional de Genética Toxicológica, Molecular y Aplicada". Facultad de Ciencias UNAM, 1991.
- Latt SA, Allen J, Bloom SE, Carrano A, Falke E, Kram D, Schneider E, Schreck R, Tice R, Whitfield B, Wolff S. Sister chromatid exchanges: A report of the Gene-Tox program. *Mutat Res* 1981; 87: 17-62.
- Morris SM. The genetic toxicology of 5-bromodeoxyuridine in mammalian cells. *Mutat Res* 1991; 258: 161-188.
- Ockey CH. Methyl methane-sulphonate (MMS) induced SCEs are reduced by the BrdU used to visualise them. *Chromosoma* 1981; 84: 243-256.
- Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Rodríguez-Reyes R. Detection of SCE in rodent cells using the activated charcoal bromodeoxyuridine system, *Basic Life Sci* 1984; 29B: 599-611.
- Pinkel D, Thompson LH, Gray JW, Vanderlaan M. Measurement of sister chromatid exchanges at very low bromodeoxyuridine substitution levels using a monoclonal antibody in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 1985; 45: 5795-5798.
- Morales-Ramírez P, Rodríguez-Reyes R, Vallarino-Kelly T. Analysis of spontaneous sister-chromatid exchanges *in vivo* by three-way differentiation. *Mutat Res* 1987; 178: 49-56.
- Piñero J, Daza P, Escalza P, Cortés F. Influence of low doses of BrdU and estimation of spontaneous SCE in CHO chromosomes: three-way differential staining and an immunoperoxidase method. *Chromosoma* 1992; 102: 66-70.
- Yager JW, Hines CJ, Spear RC. Exposure to ethylene oxide at work increases sister chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes. *Science* 1983; 219: 1221-1223.
- Carrano AV, Thompson LH, Stetka DG, Minkler JL, Mazrimas JA, Fong S. DNA crosslinking, sister-chromatid exchange and specific-locus mutations. *Mutat Res* 1979; 63: 175-188.
- Cassel DM, Latt SA. Relationship between DNA adduct formation and sister chromatid exchange induction by (³H)8-methoxypsoralen in Chinese hamster ovary cells. *Exp Cell Res* 1980; 128: 15-22.
- Taft SA, Ling SY, Griffiths TD. Effect of UV light on sister-chromatid exchanges, activation of alternative sites of replication initiation and thymidine incorporation in CHO AA8, UV61 and UV5 cells. *Mutat Res* 1991; 255: 257-264.
- Speit G, Hochsattel R, Vogel W. The contribution of DNA single-strand breaks to the formation of chromosome aberrations and SCEs. *Basic Life Sci* 1984; 29A: 229-244.
- Morgan WF, Chung HW, Phillips JW, Winegar RA. Restriction endonucleases do not induce sister chromatid-exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 1989; 226: 203-209.
- Trey JE, Gerson SL. The role of O6-alkylguanine DNA alkyltransferase in limiting nitrosourea-induced sister chromatid exchanges in proliferating human lymphocytes. *Cancer Res* 1989; 49: 1899-1903.
- Wolff S, Bodycote J, Painter RB. Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by UV irradiation at different stages of the cell cycle: the necessity for cells to pass through S. *Mutat Res* 1974; 25: 73-81.
- Kato H. Evidence that the replication points is the site of sister chromatid exchange. *Cancer Genet Cytogenet* 1980; 2: 69-77.
- Ishii Y, Bender MA. Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light induced sister-chromatid exchanges in chinese hamster cells. *Mutat Res* 1980; 79: 19-32.
- Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Rodríguez-Reyes R. A three way differential staining protocol for SCE analysis during three successive cell divisions in murine bone marrow cells *in vivo*. *Contam Ambient* 1988; 4: 57-63.
- Morales-Ramírez P, Rodríguez-Reyes R, Vallarino-Kelly T. Fate of DNA lesions that elicit sister-chromatid exchanges. *Mutat Res* 1990; 232: 77-88.
- Beranek DT. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* 1990; 231: 11-30.
- Singer B. N-nitroso alkylating agents: Formation and persistence of alkyl derivatives in mammalian nucleic acids as contributing factors in carcinogenesis. *JNCI* 1979; 62: 1329-1339.
- Saffhill R, Margison GP, O'Connor PJ. Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents. *Biophys Acta* 1985; 823: 111-145.
- Brent TP, Dolan ME, Fraenkel-Conrat H, Hall J, Karran P, Laval F, Margison GP, Montesano R, Pegg AE, Potter PM, Singer B, Swenberg JA, Yarosh DB. Repair of O-alkylpyrimidines in mammalian cells: A present consensus. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85: 1759-1762.

25. Rasouli-Nia A, Sibghat-Ullah, Mirzayans R, Paterson MC, Day RS 3rd. On the quantitative relationship between O⁶-methylguanine residues in genomic DNA and production of sister-chromatid exchanges, mutations and lethal events in a Mer-human tumor cell line. *Mutat Res* 1994; 314: 99-113.
26. Armstrong MJ, Galloway SM. Mismatch repair provokes chromosome aberrations in hamster cells treated with methylating agents or 6-thioguanine, but not with ethylating agents. *Mutat Res* 1997; 373: 167-178.
27. Kaina B, Fritz G, Coquerelle T. Contribution of O⁶-alkylguanine and N-alkylpurines to the formation of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and gene mutations: New insights gained from studies of genetically engineered mammalian cell lines. *Environ Mol Mutagen* 1993; 22: 283-292.
28. Coquerelle T, Dosch J, Kaina B. Overexpression of N-methylpurine-DNA glycosylase in Chinese hamster ovary cells renders them more sensitive to the production of chromosomal aberrations by methylating agents—a case of imbalanced DNA repair. *Mutat Res* 1995; 336: 9-17.
29. Sharma RK, Jacobson-Kram D, Lemmon M, Bakke J, Galperin I, Blazak WF. Sister-chromatid exchange and cell replication kinetics in fetal and maternal cells after treatment with chemical teratogens. *Mutat Res* 1985; 158: 217-231.
30. Neft RE, Conner MK. Induction of sister chromatid exchange in multiple murine tissues in vivo by various methylating agents. *Teratog. Carcinog. Mutagen* 1989; 9: 219-237.
31. Morales-Ramírez P, Rodríguez-Reyes R, Vallarino-Kelly T. *In vivo* fate of MMS-induced DNA lesions that elicit SCE. *Mutat Res* 1992; 272: 215-221.
32. Morales-Ramírez P, Cruz-Vallejo VL, Vallarino-Kelly T, Rodríguez-Reyes R. Persistence during G₁ of gamma-ray- or mitomycin C-induced lesions eliciting SCE in murine salivary gland cells in vivo. *Som. Cell and Mol Genet* 1995; 21: 33-41.
33. González-Beltrán F, Morales-Ramírez P. *In vivo* repair during G₁ of DNA lesions eliciting sister chromatid exchanges induced by methyl nitrosourea or ethyl nitrosourea in BrdU substituted or unsubstituted DNA in murine salivary gland cells. *Mutat Res* 1999; 425: 31-38.
34. Perry P, Evans HJ. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature (London)* 1975; 258: 121-125.
35. Daza P, Escalza P, Mateos S, Cortés F. Mitomycin C, 4-nitroquinoline-1-oxide and ethyl methanesulphonate induce long-lived lesions in DNA which result in SCEs during successive cell cycles in human lymphocytes. *Mutat Res* 1992; 270: 177-183.
36. Wolff S, Afzal V. Segregation of DNA polynucleotide strands into sister chromatids and the use of endoreduplicated cells to track sister chromatid exchanges induced by crosslinks, alkylations, or x-ray damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5765-5769.
37. Vijayalaxmi, Evans HJ. Induction of 6-thioguanine-resistant mutants and SCEs by 3 chemical mutagens (EMS, ENU and MMC) in cultured human blood lymphocytes. *Mutat Res* 1984; 129: 283-289.
38. Kaina B, Aurich O. Dependency of the yield of sister-chromatid exchanges induced by alkylating agents on fixation time. Possible involvement of secondary lesions in sister-chromatid exchange induction. *Mutat Res* 1985; 149: 451-461.
39. Bodell WJ, Aida T, Rasmussen J. Comparison of sister-chromatid exchange induction caused by nitrosoureas that alkylate or alkylate and crosslink DNA. *Mutat Res* 1985; 149: 95-100.
40. Bodell WJ. Molecular dosimetry for sister-chromatid exchange induction and cytotoxicity by monofunctional and bifunctional alkylating agents. *Mutat Res* 1990; 233: 203-210.
41. Sahar E, Kittrel C, Fulghum S, Feld M, Latt SA. Sister-chromatid exchange induction in Chinese hamster ovary cells by 8-methoxypsoralen and brief pulses of laser light. *Mutat Res* 1981; 83: 91-105.
42. Ishii Y. Nature of the mitomycin C induced lesion causing sister chromatid exchange. *Mutat Res* 1981; 91: 51-55.
43. Bonatti S, Abbondandolo A. The search for the molecular lesions responsible for the induction of chromosomal damage by alkylating agents. *Ann Ist Super Sanita* 1989; 25: 205-12.
44. Morris SM, Beranek DT, Heflich RH. The relationship between sister-chromatid exchange induction and the formation of specific methylated DNA adducts in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 1983; 121: 261-266.
45. Natarajan AT, Simons JW, Vogel EW, van Zeeland AA. Relationships between cell killing, chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and point mutations induced by monofunctional alkylating agents in Chinese hamster cells: A correlation with different ethylation products in DNA. *Mutat Res* 1984; 128: 31-40.
46. Preuss I, Thust R, Kaina B. Protective effect of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) on the cytotoxic and recombinogenic activity of different antineoplastic drugs. *Int J Cancer* 1996; 65: 506-512.
47. White GRM, Ockey CH, Brennand J, Margison GP. Chinese hamster cells harbouring the Escherichia coli O⁶-alkylguanine alkyltransferase gene are less susceptible to sister chromatid exchange induction and chromosome damage by methylating agents. *Carcinogenesis* 1986; 7: 2077-2080.
48. Bignami M, Terlizze M, Zijno A, Calcagnile A, Frosina G, Abbondandolo A, Dogliotti E. Cytotoxicity, mutations and SCEs induced by methylating agents are reduced in CHO cells expressing an active mammalian O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Carcinogenesis* 1987; 8: 1417-1421.
49. Bignami M, Dogliotti E, Aquilina G, Zijno A, Wild CP, Montesano R. O⁶-methyltransferase-deficient and -proficient CHO cells differ in their responses to ethyl- and methyl-nitrosourea-induced DNA alkylation. *Carcinogenesis* 1989; 10: 1329-1332.
50. Aquilina G, Frosina G, Zijno A, Di Muccio A, Dogliotti E, Abbondandolo A, Bignami M. Isolation of clones displaying enhanced resistance to methylating agents in O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase-proficient CHO cells. *Carcinogenesis* 1988; 9: 1217-1222.
51. Kaina B, Fritz G, Mitra S, Coquerelle T. 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* 1991; 12: 1857-1867.
52. Chen J, Zhang Y, Wang C, Sun Y, Fujimoto J, Ikenaga M. O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase activity in human tumors. *Carcinogenesis* 1993; 13: 1503-1507.

53. Schwarts JL, Turkula T, Sagher D, Strauss B. The relationship between O⁶-alkylguanine alkyltransferase activity and sensitivity to alkylation-induced sister chromatid exchanges in human lymphoblastoid cell lines. *Carcinogenesis* 1989; 10: 681-685.
54. Engelward BP, Dreslin A, Christensen J, Huszar D, Kurahara C, Samson L. Repair-deficient 3-methyladenine DNA glycosylase homozygous mutant mouse cells have increased sensitivity to alkylation-induced chromosome damage and cell killing. *EMBO J* 1996; 15: 945-952.
55. Engelward BP, Allan JM, Dreslin AJ, Kelly JD, Wu MM, Gold B, Samson LD. A chemical and genetic approach together define the biological consequences of 3-methyladenine lesions in the mammalian genome. *J Biol Chem* 1998; 273: 5412-5418.
56. Margison GP, Kleihues P. Chemical carcinogenesis in the nervous system: preferential accumulation of O⁶ methylguanine in rat brain deoxyribonucleic acid during repetitive administration of N-methyl-N-nitrosourea. *Biochem J* 1975; 148: 521-525.
57. Morales-Ramírez P, Rodríguez-Reyes R, Vallarino-Kelly T. Fate of lesions that elicit sister chromatid exchanges (FLE-SCE) produced in DNA by alkylating agents *in vivo*. *Mutat Res* 1995; 344: 13-26.
58. Lambert B, Sten M, Hellgren D, Francesconi D. Different SCE-inducing effects of HN2 and MMS in early and late G₁ in human lymphocytes. *Mutat Res* 1984; 139: 71-77.
59. Stetka DG, Minkler J, Carrano AV. Induction of long-lived chromosome damage, as manifested by sister-chromatid exchange, in lymphocytes of animals exposed to mitomycin-C. *Mutat Res* 1978; 51: 383-396.
60. Huff V, DuFrain R, Littlefield G. SCE frequencies in rabbit lymphocytes as a function of time after an acute dose of cyclophosphamide. *Mutat Res* 1982; 94: 349-357.
61. Popescu NC, Amsbaugh SC, DiPaolo JA. Persistence of sister chromatid exchanges and *in vitro* morphological transformation of Syrian hamster fetal cells by chemical and physical carcinogens. *Carcinogenesis* 1985; 6: 1627-1630.
62. Speit G, Vogel W, Mehnert K. Do the frequencies of sister chromatid exchanges in endoreduplicated mitosis provide a measure for lesion persistence and repair? *Chromosoma* 1985; 91: 369-371.
63. Raposa T. Sister chromatid exchange studies for monitoring DNA damage and repair capacity after cytostatics *in vitro* and in lymphocytes of leukaemic patients under cytostatic therapy. *Mutat Res* 1978; 57: 241-251.
64. Littlefield LG, Colyer SP, DuFrain RJ. Physical, chemical and biological factors affecting sister-chromatid exchange induction in human lymphocytes exposed to mitomycin C prior to culture. *Mutat Res* 1981; 81: 377-386.
65. Tucker JD, Strout CL, Christensen ML, Carrano AV. Sister chromatid exchange induction and persistence in peripheral blood and spleen lymphocytes of mice treated with ethylnitrosourea. *Environ Mutagen* 1986; 8: 345-55.
66. Linnainmaa K, Wolff S. Sister chromatid exchange induced by short-lived monoadducts produced by the bifunctional agents mitomycin C and 8-methoxypsoralen. *Environ Mutagen* 1982; 4: 239-247.
67. Wolff S. Mutagen induced chromosome damage in man. Edinburgh: Evans HJ y Lloyd DC (Eds), Edinburgh University Press, 1978: 208-215.
68. Ishii Y, Bender MA. Factors influencing the frequency of mitomycin C-induced sister-chromatid exchanges in 5-bromodeoxyuridine substituted human lymphocytes in culture. *Mutat Res* 1978; 51: 411.
69. Conner MK, Cheng M. Persistence of ethyl carbamate-induced DNA damage *in vivo* as indicated by sister chromatid exchange analysis. *Cancer Res* 1983; 43: 965-971.
70. Biegel JA, Conner MK, Boggs SS. Cellular replication kinetics and persistence of sister chromatid exchange-inducing lesions in normal and lymphoma AKR cells following exposure to 1,3-bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Cancer Res* 1982; 42: 2816-2820.
71. Takeshita T, Conner MK. Persistence of cyclophosphamide-induced damage in bone marrow as indicated by sister chromatid exchange analysis. *Carcinogenesis* 1985; 6: 1097-1102.
72. Conner MK, Cheng M, Biegel JA. A path probability model for sister-chromatid exchanges induced by alkylating agents. *Mutat Res* 1984; 126: 35-46.
73. Schwartzman JB, Goyanes V. A new method for the identification of SCE's per cycle in BrdUrd-substituted chromosomes. *Cell Biol Int Rep* 1980; 4: 415-423.
74. Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Rodríguez-Reyes R. Occurrence *in vivo* of sister chromatid exchanges at the same locus in successive cell divisions caused by nonrepairable lesions induced by gamma rays. *Environ Mol Mutagen* 1988; 11: 183-193.
75. Escalza P, Daza P, Piñero J, Cortés F. Different effectiveness of 4-nitroquinoline-1-oxide, mitomycin C and ethylmethanesulphonate to induce lesions in DNA leading to sister chromatid exchange throughout successive cell cycles in Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis* 1992; 7: 137-140.
76. Aquilina G, Giammarioli AM, Zijno A, Di mucchio A, Dogliotti E, Bignami M. Tolerance to O⁶-methylguanine and 6-thioguanine cytotoxic effects: A cross-resistant phenotype in N-methyl nitrosourea-resistant Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 1990; 50: 4248-4253.
77. Aquilina G, Flumicino S, Zijno A, Martinelli S, Ovekamp WJ, Zdzienicka M, Z. Oshimura, M., Wild, C.P. y Bignami, M. Reversal of methylation tolerance by transfer of human chromosome 2. *Mutat Res* 1997; 385: 115-126.
78. Kaina B, Ziouta A, Ochs K, Coquerelle T. Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O⁶-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. *Mutat Res* 1997; 381: 227-241.
79. Perticone P, Cozzi R, Gustavino B. Sister chromatid exchanges induced by DNA demethylating agents persist through several cell cycles in mammalian cells. *Carcinogenesis* 1987; 8: 1059-1063.
80. Perticone P, Gensabella G, Cozzi R. Damage proneness induced by genomic DNA demethylation in mammalian cells cultivated *in vitro*. *Mutagenesis* 1997; 4: 259-264.
81. Albanesi T, Polani S, Cozzi R, Perticone P. DNA strand methylation and sister chromatid exchanges in cells *in vitro*. *Mutat Res* 1999; 429: 239-248.