



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“EL USO DE LA GENOTOXICOCINÉTICA Y LA
CITOTOXICOCINÉTICA PARA CARACTERIZAR LA ACCIÓN DE
RADIOSENSIBILIZADORES”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A:

M. EN C. VIRGINIA LETICIA CRUZ VALLEJO

CO-DIRECTORES:

DRA. ALDA ROCÍO ORTIZ MUÑIZ

DR. PEDRO ROSENDO MORALES RAMÍREZ

ASESORA.

DRA. ELSA CERVANTES RÍOS

CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTO PNPC.....	i
MIEMBROS DEL JURADO Y FIRMAS CORRESPONDIENTES.....	ii
MIEMBROS COMITÉ DE TUTORES.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIAS.....	v
ABREVIATURAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
ÍNDICE GENERAL.....	xviii

AGRADECIMIENTO PNPC

“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.”

El jurado designado por la Comisión Académica del posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, aprobó la tesis titulada “El uso de la genotoxicocinética y la citotoxicocinética para caracterizar la acción de radiosensibilizadores”, que presentó.

M. en C. Virginia Leticia Cruz Vallejo

El día 10 de diciembre de 2019



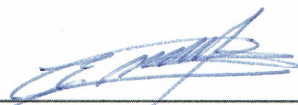
Dr. José Miguel Betancourt Rule
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Presidente



Dra. Elsa Cervantes Ríos
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Secretaria



Dra. María del Carmen García Rodríguez
Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza UNAM
Vocal



Dra. Edith Cortés Barberena
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Vocal

MIEMBROS COMITÉ DE TUTORES

Co-directores

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

Profesor Investigador de Tiempo Completo

Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dr. Pedro Rosendo Morales Ramírez

Investigador “E”

Laboratorio de Radiobiología Celular

Departamento de Biología

Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

Asesora

Dra. Elsa Cervantes Ríos

Profesor Titular de Tiempo Completo

Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, por permitirme completar mi formación académica.

Este estudio formó parte del proyecto “La genotoxicodinámica y la citotoxicodinámica como alternativa para caracterizar la acción de radiosensibilizadores y antineoplásicos”, apoyado por CONACYT (210116).

Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y en el laboratorio de Radiobiología Celular en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares dentro del proyecto CB 507.

Agradezco a mi comité tutorial, la Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz, el Dr. Pedro Rosendo Morales Ramírez y a la Dra. Elsa Cervantes Ríos, por compartir su invaluable experiencia y conocimientos, así como por haberme brindado su apoyo para que no dejara en mi objetivo y continuara con mi formación académica y profesional.

A los miembros de Jurado, el Dr. José Miguel Betancourt Rule, la Dra. María del Carmen García Rodríguez, a la Dra. Elsa Cervantes Ríos, a la Dra. Edith Cortés Barberena, y al Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano, por sus valiosas aportaciones para la consolidación de la presente tesis.

DEDICATORIAS

A mi madre Doña Albina, quién siempre me dio el ánimo y todo su apoyo para lograr mis objetivos. Aunque ya no te encuentres presente, mi amor y eterno agradecimiento siempre estarán contigo.

A mi padre Don Antonio, por ser ejemplo de tenacidad.

A mis hermanos, JCV y GCV quienes siempre me han apoyado bajo cualquier circunstancia.

A mi esposo, FCT por su incondicional amor, ternura y comprensión.

A mi F₁, FA y KL, a NE por hacer posible mi F₂, VX; por todo el amor que me han brindado.

A Doña Socorrito, quién siempre me vio como a una hija, aunque ya no pudo acompañarme en estos momentos, siempre estará en mis recuerdos.

A, Alicia y María Eugenia por ser parte de mi familia y a todos los de “la vía” que de cierta manera han influido en mi vida.....para bien.

A mis amigas, Norma, Teresita, Lolita, Rosario y Alicia, por su apoyo incondicional.

A mis compañeros de laboratorio presentes y ausentes.

A todos los excelentes maestros (as) que he tenido a lo largo de mi tránsito por las aulas.

A la Licenciada Angélica Ostos Sánchez (Angy), porque siempre tiene excelente disposición de apoyar a los alumnos del posgrado en Biología Experimental.

ABREVIATURAS

¹⁵³ Sm	¹⁵³ Samario-etilendiaminotetrametilenfosfonato
•OH	Radical hidroxilo
ABC	Área Bajo la Curva
ADN-OO••	Peroxiradical ADN
AP	Sitios apurínicos o apirimidínicos
APFB	Agarosa de punto de fusión bajo
anti-CD71-FITC	anticuerpo CD71 conjugado con isoticianato de fluoresceína
ATM	Ataxia telangiectasia mutada
ATR	Ataxia telangiectasia y <i>RAD3</i>
aza-C	Azacitidina
BBS	Solución salina bicarbonatada (por sus siglas en inglés)
BCNU	Bis-cloroetilnitrosourea
Br	Bromo
BrdU	Bromodesoxiuridina
BUS	Busulfán
BSO	Butionina sulfoximina
cis-Pt	Cisplatino
CF	Citómetro de flujo
CP	Ciclofosfamida (por sus siglas en inglés)
dFdC	Difluorodesoxicitidina
DMN	Dimetilnitrosamina
é _{aq}	Electrones hidratados

ENU	Etilnitrosourea
ERO	Especies reactivas de oxígeno
EUG	Electroforesis unicelular en gel
EPC	Eritrocitos policromáticos
EPC-MN	Eritrocitos policromáticos micronucleados
GSH	Glutación (por sus siglas en inglés)
Gy	Gray unidad de radiación absorbida
H•	Radicales hidrógeno
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HFO	Hipótesis de fijación del oxígeno
IGF1-R	Receptor que interviene en la activación del factor de crecimiento semejante a la insulina (por sus siglas en inglés)
IP	Intraperitoneal
IR	Índice de radiosensibilización
ICH	Intercambios en las cromátidas hermanas
MC	Migración de la cauda
MGMT	O ⁶ -metilguanina-ADN-metiltransferasa
MGd	Motexafin gadolinium
MN	Micronúcleos
MMC	Mitomicina C
MMR	Reparación de errores de apareamiento (por sus siglas en inglés)
MNU	Metilnitrosourea

NHEJ	Reparación por reunión de extremos no homólogos (por sus siglas en inglés)
NP's	Nanopartículas
NSCLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas (por sus siglas en inglés)
RI	Radiación ionizante
RET	Reticulocitos
RL	Radicales libres
RH	Recombinación homóloga
RR	Ribonucleótido reductasa
RT	Radioterapia
S	Fase de Síntesis
O ₂ •	Superóxido
TLE	Transferencia lineal de energía
TMZ	Temozolomida
T _{mi}	Tiempo relativo de máxima inducción
TrxR	Tioredoxina reductasa
VNB	Vinblastina
VCN	Vincristina

ÍNDICE DE FIGURAS		Página
Figura 1.	Bromodesoxiuridina (BrdU).....	15
Figura 2.	Cisplatino (cis-Pt).....	20
Figura 3.	Cinética de inducción de EPC-MN producida por clorofilina, radiación y clorofilina + radiación, en eritrocitos de sangre periférica de ratón <i>in vivo</i>	27
Figura 4.	Perfiles de las curvas de frecuencia de EPC-MN inducidos por diferentes agentes alquilantes bifuncionales.....	28
Figura 5.	Tiempo relativo de máxima inducción (Trmi) de diversos agentes.....	30
Figura 6.	Etapas que afectan la cinética de inducción de MN...	31
Figura 7.	Efecto genotóxico (a) y citotóxico (b), del pretratamiento con BrdU sobre el daño producido por el ¹⁵³ Samario.....	33
Figura 8.	Protocolo B, determinación del efecto de la radiación gamma en ratones pretratados con BrdU, mediante EUG.....	39
Figura 9.	Protocolo C, determinación de la cinética de inducción de daño al ADN producido por cis-Pt.....	40
Figura 10.	Protocolo D, para determinar de la cinética de inducción de MN y de citotoxicidad por radiación gamma en RET de ratones pre-tratados con BrdU...	42

Figura 11.	Protocolo E, para determinar de la cinética de inducción de MN y de citotoxicidad por radiación gamma en RET de ratones pre-tratados con cis-Pt...	44
Figura 12.	Forma incorrecta y correcta de fijar las muestras de acuerdo con el Manual Litron MicroFlow Mouse.....	52
Figura 13.	Fijación con dispositivo, la muestra queda depositada en el vórtice formado por la agitación del metanol.....	53
Figura 14.	La fijación con el dispositivo permite el análisis en el citómetro de flujo de al menos el 90 % de las células, ya que disminuye considerablemente la presencia de agregados celulares.....	54
Figura 15.	Marcaje de los eritrocitos: de sangre periférica de ratón: RET sin MN (CD71+/IP-), RET-MN (CD71+/IP+), Eritrocitos sin MN (CD71-/IP-) y Eritrocitos con MN (CD71-/IP+).....	55
Figura 16.	Migración de la cauda agrupada en rangos vs. (%) de células en cada rango. Células testigo de leucocitos de sangre periférica y células de la médula ósea de ratón.....	57
Figura 17.	Distribución de frecuencias de las células de la médula ósea agrupadas en rangos de migración de la cauda mayores a 20 μm	60
Figura 18.	Efecto de la radiación en el ADN substituido con	

	BrdU y en el ADN no substituido, en células de la médula ósea.....	63
Figura 19.	Cinética de inducción de RET-MN producida por BrdU, radiación y la combinación de ambos agentes en eritrocitos de sangre periférica de ratón.....	65
Figura 20.	Frecuencias de RET en porcentaje vs. tiempo, obtenido con el tratamiento con BrdU, radiación y ambos agentes.....	68
Figura 21.	Reducción del área bajo la curva de la frecuencia de RET, de los grupos tratados con BrdU, radiación y la combinación de ambos agentes.....	69
Figura 22.	Correlación entre el efecto genotóxico y citotóxico de los tratamientos con: a) BrdU, b) radiación y c) BrdU+radiación.....	71
Figura 23.	Efecto genotóxico (a) y citotóxico (b) producido por tres dosis de cisplatino.....	72
Figura 24.	Cinética de inducción de daño producido por cis-Pt en leucocitos de sangre periférica de ratón <i>in vivo</i>	73
Figura 25.	Cinética de inducción de RET-MN producida por cis-Pt, radiación y la combinación de ambos agentes en eritrocitos de sangre periférica de ratón.....	75
Figura 26.	Frecuencias de RET en porcentaje vs. tiempo, obtenido con el tratamiento con cis-Pt, radiación y ambos agentes.....	78

Figura 27.	Reducción del área bajo la curva de la frecuencia de RET, de los grupos tratados con cis-Pt, radiación y la combinación de ambos agentes.....	79
Figura 28.	Correlación entre el efecto genotóxico y citotóxico de los tratamientos con: a) cis-Pt, b) radiación y c) cis- Pt+radiación.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1.	Efecto de la incorporación de 0.125 mg/g de BrdU en el ADN sobre el daño inducido por 0.5 Gy de radiación gamma.....	62
Tabla 2.	Área bajo la curva total de la inducción de RET-MN y en el intervalo de 40-72 h, por el tratamiento con BrdU, radiación y ambos agentes.....	66
Tabla 3.	Área bajo la curva total del incremento de RET-MN y en los rangos del primer pico a las 24 h y del segundo pico a las 48 h para el tratamiento con cis-Pt, radiación y ambos agentes.....	77

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de dosis bajas de bromodesoxiuridina (BrdU) (0.125 mg/g) y cisplatino (cis-Pt) (1.0 $\mu\text{mol/Kg}$), sobre la radiosensibilización a dosis bajas de radiación (0.5 Gy) y caracterizar su forma de acción en células de la médula ósea en ratones *in vivo*. En ambos casos se utilizó la electroforesis unicelular en gel (EUG) y se determinaron las cinéticas de formación de reticulocitos micronucleados (RET-MN) y de reducción de reticulocitos (RET) mediante citometría de flujo. En el caso de la determinación del efecto radiosensibilizador de la BrdU, se probó el efecto mediante la EUG; los resultados indicaron que niveles bajos de incorporación de BrdU en el ADN incrementan la sensibilidad a la radiación gamma; particularmente durante la síntesis del ADN. Para el análisis de la cinética de inducción de RET-MN, se tomaron muestras de sangre periférica de los ratones antes (testigo) y después de cada tratamiento (cada 8 h hasta completar 72 h). Se estableció el tiempo y el número de picos de inducción de RET-MN, mismos que indican el número de mecanismos de genotoxicidad producidos con los tratamientos; así como la correlación entre genotoxicidad y citotoxicidad. La radiación gamma causa dos picos principales de inducción de MN en los animales tratados o no con BrdU. En los no tratados con BrdU, el primer pico no se asoció a citotoxicidad, pero sí en los tratados con BrdU. En las células irradiadas y substituidas con BrdU, en el segundo pico se observó un incremento en la inducción de MN y de citotoxicidad. El pretratamiento con BrdU parece favorecer una lesión radioinducida o el incremento en el número de lesiones difíciles de reparar; lo cual posiblemente sea

debido a la formación de enlaces cruzados como se ha descrito. En el caso de la determinación del efecto radiosensibilizador del cis-Pt; primero se determinó en leucocitos de sangre periférica mediante EUG, que a los 40 minutos se observó la máxima inducción de rupturas en el ADN. Con éste dato se hizo el análisis de la cinética de inducción de RET-MN; el cis-Pt se administró 40 minutos antes de la irradiación y se siguió el mismo procedimiento de determinación de la frecuencia de RET-MN que en el estudio con BrdU. El pretratamiento con bajas dosis de cis-Pt, incrementó la sensibilidad a bajas dosis de radiación y evidenció tres mecanismos de inducción de MN, siendo dos de ellos los principales, atribuibles a las fallas en la reparación por escisión y por recombinación, ambos efectos estuvieron asociados con un incremento en la citotoxicidad.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of low doses of bromodeoxyuridine (BrdU) (0.125 mg/g) or cisplatin (cis-Pt) (1.0 $\mu\text{mol/Kg}$), on radiosensitization at low doses of radiation (0.5 Gy) and characterize its form of action in bone marrow cells of mice *in vivo*. This by using single cell gel electrophoresis (SCGE), and the kinetics of micronucleated reticulocytes induction (RET-MN) and of the reduction of reticulocytes (RET) determined by flow cytometry. In the case of BrdU, the effect proved by SCGE, indicated that low levels of BrdU incorporation into the DNA, increase the sensitivity to gamma radiation; particularly during DNA synthesis. The kinetics of induction of RET-MN induction, in peripheral blood samples along 72 h, indicated that gamma radiation causes two main peaks of induction of MN in animals treated or not with BrdU. In those not treated with BrdU, the first peak was not associated with cytotoxicity, but in those treated with BrdU cytotoxicity this was associated. In the cells substituted with BrdU prior to irradiation the second peak showed, an increase in the induction of MN associated with an increase in cytotoxicity. The pretreatment with BrdU seems to favour a radioinduced kind of lesion or an increase number of lesions difficult to repair, possibly cross-links as previously described. In the case of the cis-Pt first, the timing of damage was determined in peripheral blood leukocytes by SCGE, the results indicated that at 40 minutes occurred the maximum induction of breaks in the DNA. With this data, the analysis of the kinetics induction of RET-MN was performed, by administering cis-Pt 40 minutes before irradiation. The pretreatment with a low dose of cis-Pt, increased sensitivity to low dose of

radiation and evidenced three mechanisms of induction of MN, two of them being, the main ones, attributable to failures in the excision and recombination repair, respectively, both effects were associated with an increase in cytotoxicity.

ÍNDICE GENERAL	Página
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Diferencia entre radiosensibilidad y radiosensibilización celular.....	3
1.1.1 Radiosensibilidad.....	3
1.1.2 Radiosensibilización.....	5
1.2 Mecanismos de radiosensibilización.....	6
1.2.1 Bromodesoxiuridina.....	14
1.2.2 Cisplatino.....	19
1.3 Modelos preclínicos utilizados en la evaluación de radiosensibilizadores.....	23
2 ANTECEDENTES.....	24
2.1 Del ensayo de micronúcleos para determinar daño en el ADN a los estudios genotoxicocinéticos y citotoxicocinéticos.....	24
2.2 La genotoxicocinética y la citotoxicocinética como estrategia para caracterizar el mecanismo de acción de agentes antineoplásicos y radiosensibilizadores <i>in vivo</i>	26
3 JUSTIFICACIÓN.....	33
4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	34
5 HIPÓTESIS.....	35
6 OBJETIVO GENERAL.....	35
6.1 Objetivos particulares.....	35
7 MATERIAL Y MÉTODOS.....	36

7.1	Protocolos.....	36
7.1.1	Electroforesis unicelular en gel.....	36
7.1.1.1	Bromodesoxiuridina.....	36
	<i>Protocolo A</i>	37
	<i>Protocolo B</i>	38
7.1.1.2	Cisplatino.....	40
	<i>Protocolo C</i>	40
7.1.2	Ensayo de Micronúcleos.....	41
7.1.2.1	Bromodesoxiuridina.....	41
	<i>Protocolo D</i>	41
7.1.2.2	Cisplatino.....	43
	<i>Protocolo E</i>	43
7.2	Agentes químicos.....	44
7.3	Animales.....	45
7.4	Administración de la bromodesoxiuridina y el cisplatino.....	45
7.4.1	Bromodesoxiuridina.....	45
7.4.2	Cisplatino.....	46
7.5	Irradiación.....	46
7.6	Procesamiento de las muestras.....	46
7.6.1	Preparación y análisis de las muestras para electroforesis unicelular en gel.....	46
7.6.1.1	Sangre periférica.....	47
7.6.1.2	Médula ósea.....	47
7.6.2	Electroforesis unicelular en gel.....	47

7.6.2.1	Análisis de las laminillas.....	49
7.6.2.1.1	Frecuencia basal de rupturas en el ADN de leucocitos de sangre periférica y en células de la médula ósea.....	49
7.6.2.1.2	Índice de daño al ADN en leucocitos de sangre periférica y en células de la médula ósea.....	50
7.6.3	Análisis de los reticulocitos micronucleados mediante citometría de flujo.....	50
7.6.3.1	Obtención, fijación y marcaje de muestras para el análisis celular en el citómetro de flujo.....	51
7.6.3.2	Análisis y cuantificación de los reticulocitos micronucleados.....	56
7.7	Análisis estadístico.....	56
8	RESULTADOS.....	57
8.1	Bromodesoxiuridina.....	57
8.1.2	Electroforesis unicelular en gel.....	57
8.1.3	Cinética de inducción de reticulocitos micronucleados producida por bromodesoxiuridina, radiación gamma y la combinación de ambos agentes.....	64

8.2	Cisplatino.....	72
8.2.1	Electroforesis unicelular en gel.....	73
8.2.2	Cinética de inducción de reticulocitos micronucleados producida por cisplatino, radiación gamma y la combinación de ambos agentes.....	74
9	DISCUSIÓN.....	82
9.1	Bromodesoxiuridina.....	82
9.1.1	Electroforesis unicelular en gel.....	84
9.1.2	Cinética de inducción de reticulocitos micronucleados.....	87
9.2	Cisplatino.....	92
9.2.1	Electroforesis unicelular en gel.....	93
9.2.2	Cinética de inducción de reticulocitos micronucleados.....	95
9.3	Bromodesoxiuridina vs. Cisplatino.....	99
10	CONCLUSIONES.....	101
10.1	Bromodesoxiuridina.....	101
10.2	Cisplatino.....	102
11	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
	ANEXO 1 (PUBLICACIÒN).....	133
	ANEXO 2 (ACTA DE DISERTACIÒN PÙBLICA).....	146

1. INTRODUCCIÓN

El término “cáncer” es utilizado para denominar a un grupo de enfermedades, que se caracterizan por un desequilibrio entre la proliferación y los mecanismos normales de muerte celular. Las células cancerosas tienen la capacidad de producir tumores sólidos y alteraciones hematológicas y/o linfáticas, además pueden invadir tejidos vecinos así como diseminarse hacia otras partes del cuerpo (Granados *et al.*, 2016). La radioterapia (RT) es uno de los principales tratamientos utilizados para combatir el cáncer; ya sea como tratamiento único o en asociación con cirugía y/o agentes químicos. En estos casos, la radiación puede administrarse antes durante o después de otros tratamientos; con el objetivo de mejorar las posibilidades de que la terapia funcione. La RT puede curar al paciente, permite preservar los órganos o es utilizada como terapia paliativa. Se puede incrementar la eficacia de la RT aumentando el daño producido por la radiación ionizante (RI) mediante el uso de agentes radiosensibilizadores, de los cuales algunos de ellos tienen actividad quimioterapéutica (Lenhert, 2015).

La radiación ionizante se utiliza debido a los efectos celulares que causa; entre los cuales se encuentra principalmente el daño al ADN; el cual conduce a mayores consecuencias biológicas debido al papel central que juega en la regulación de la actividad celular y la transferencia de la información genética, entre otras funciones. Se conoce que la RI puede causar daño en el material genético mediante dos mecanismos (Hall, 1994). Uno de ellos es directo, en donde la energía cinética generada por la radiación es depositada de forma

inmediata sobre la célula, transfiriendo parte de esta energía hacia las biomoléculas; las cuales la absorben, produciéndose ionización y excitación en las mismas. Esta transferencia de energía produce inestabilidad; por lo que las moléculas deben tener un rearrreglo, ya sea dentro de ellas mismas o a través de la interacción con otras, causando un cambio biológico. El otro mecanismo es indirecto, en donde el daño al material genético es producido por la interacción con los radicales libres (RL) formados por la ionización del agua (radiólisis). Estos RL se combinan fácilmente con el oxígeno, generando una serie de compuestos igualmente reactivos que son conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO); como son el superóxido ($O_2\bullet$), el radical hidroxilo ($\bullet OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El $\bullet OH$ es una de las ERO más reactivas, capaz de producir daño letal en las células (Altman *et al.*, 1970). La radiólisis del agua también produce radicales reductores, que son electrones solvatados también llamados electrones hidratados (e_{aq}), así como radicales hidrogeno ($H\bullet$). Los e_{aq} , no causan daño al ADN natural (Nabben *et al.*, 1984); sin embargo, existen estudios en los cuales utilizando técnicas de espectroscopía, se ha reportado que los electrones secundarios de baja energía denominados electrones prehidratados, precursores de los e_{aq} , pueden causar rupturas en el ADN en plásmidos y oligonucleótidos por resonancia y la formación de aniones (Alizadeh y Sanche, 2012; Lu, 2010; Ma *et al.*, 2017).

El daño producido por la RI en las células está en función del tipo de radiación, la intensidad de la energía y los niveles de exposición; así como la etapa del ciclo celular en la que se encuentren al momento de la exposición. La RI es de transferencia lineal de energía (TLE) baja y la relación entre la cantidad de

daño que induce de manera directa e indirecta es 1:3. Las reacciones químicas inducidas por la RI sobre el ADN, pueden causar daño en las bases nitrogenadas, afectar el esqueleto azúcar fosfato, producir rupturas de cadena sencilla o doble y enlaces cruzados ADN-ADN o ADN-proteína (Konigsberg, 2008; Lett *et al.*, 1961; Mahmoud *et al.*, 2012).

Con las rupturas de cadena doble se pierde la continuidad de las cadenas antiparalelas del ADN, éste tipo de rupturas son consideradas las lesiones más mutagénicas y carcinogénicas (Han y Yu, 2010). Los enlaces cruzados intercadena son lesiones que impiden la separación de las cadenas, bloqueando la transcripción y la replicación (Dextraze *et al.*, 2010; Deans y West 2011).

Un gray (Gy) de rayos x puede inducir aproximadamente 3000 lesiones en las bases, 1000 rupturas de cadena sencilla y 40 rupturas de cadena doble (Maier *et al.*, 2016). También la RI, puede causar lipoperoxidación en la membrana, arresto del ciclo y muerte celular (Hall, 1994; Wilson, 2004; Konigsberg, 2008).

1.1 Diferencia entre radiosensibilidad y radiosensibilización celular

1.1.1 Radiosensibilidad

La radiosensibilidad es una disminución de la capacidad de respuesta intrínseca de las células ante la exposición a la radiación, que puede ser diferente entre tejidos (Selman, 1983), e inclusive diferente entre subpoblaciones del mismo tipo celular (Hall, 1994; Bouffler, 2015).

El uso de los ensayos clonogénicos *in vitro* con células de mamífero (Puck y Marcus, 1956), permitió definir a la radiosensibilidad como la pérdida de la capacidad proliferativa (Foray *et al.*, 2012). El ensayo de clonogenicidad se convirtió en el método más utilizado para determinar la sensibilidad celular a la radiación, tanto en las células tumorales como en las no tumorales (Fertil y Lamaise, 1981; Foray *et al.*, 2012).

Se ha observado que la radiosensibilidad puede ser modificada por diversos factores que van a afectar la respuesta biológica. Cada tipo de radiación o partícula tiene una TLE, por lo que dosis iguales de diferentes tipos de radiación, no producen efectos biológicos iguales (Hall, 1994). Los rayos x, rayos gamma y los electrones tienen una TLE baja, en tanto que la radiación con neutrones y protones tienen una TLE alta. La radiosensibilidad también se puede afectar diferencialmente, si la dosis de radiación es administrada de forma aguda o fraccionada (Selman, 1983; Hall, 1994).

Se ha determinado que la presencia del oxígeno afecta la respuesta celular a la radiación (Cassaret, 1968, Hall, 1994; Lehnert, 2015). A la explicación de cómo el oxígeno aumenta el daño producido por la radiación se le conoce como hipótesis de fijación del oxígeno (HFO) (Lehnert, 2015). En la HFO se considera que la radiación en condiciones aerobias, puede producir RL formados con el ADN, los cuales pueden reaccionar con el O₂ disponible para formar peroxiradicales (ADN-OO••), lo que modifica químicamente al ADN fijando el daño, por lo que el ADN no puede ser restaurado. En condiciones de hipoxia, los radicales ADN pueden ser restaurados a través de reducción química por compuestos sulfidrilos,

regresando al ADN a su composición original (Johansen y Howard-Flanders, 1965; Lehnert, 2015; Liu *et al.*, 2015).

Otro factor que afecta la radiosensibilidad celular es la etapa del ciclo celular, siendo radiosensibles durante la mitosis (Wilson, 2004).

Se tiene conocimiento de que los puntos de control en el ciclo celular se correlacionan con la radiosensibilidad (Fernet *et al.*, 2010). Se ha observado que la pérdida de la proteína ubiquitina ligasa Rad 18, requerida para la activación del punto de control G2/M, incrementa la sensibilidad celular a la RI tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* (Sasatani *et al.*, 2015).

1.1.2 Radiosensibilización

Como se mencionó anteriormente, la radiación continúa siendo una alternativa para el tratamiento del cáncer; pudiéndose incrementar sus efectos mediante el uso concomitante de agentes capaces de inducir radiosensibilización (RS). Spalding y coautores (2006), dan una definición muy sencilla pero acertada de lo que es un radiosensibilizador; consideran que es un agente que disminuye la sobrevivencia clonogénica de las células después de la irradiación, bajo condiciones en las que la droga *per se* no produce citotoxicidad, o ésta es mínima.

Un radiosensibilizador ideal, es aquel agente que aumenta la muerte celular en los tumores, que tiene poco efecto en los tejidos normales y al mismo tiempo, mínima toxicidad por sí mismo (Kvols, 2005; Wardman, 2007). Citrin y

Mitchell (2014), consideran que un verdadero sensibilizador actúa de manera sinérgica con la radiación.

Entre los agentes radiosensibilizadores se encuentran algunos con actividad antineoplásica y también otros que no presentan efecto anticancerígeno directo. Como es el caso del óxido nítrico, que radiosensibiliza a las células en condiciones de hipoxia como las que predominan en los tumores, mimetizando el efecto que tiene el oxígeno (Lehnert, 2015; Kumar y Gupta, 2016).

Utilizar agentes que sensibilicen a las células tumorales para potencializar el efecto de la radiación sin dañar al organismo, constituye una opción atractiva para el diseño de los tratamientos para combatir el cáncer.

1.2 Mecanismos de radiosensibilización

Se conocen diversos agentes que pueden inducir radiosensibilización, por ejemplo, algunos de ellos se incorporan o alteran la estereoquímica del ADN y otros actúan inhibiendo alguna biomolécula blanco que participa en la respuesta a la radiación. Por lo tanto, los mecanismos de acción mediante los cuales inducen radiosensibilización son diversos, de los cuales se mencionarán algunos ejemplos a continuación.

La presencia de oxígeno ha mostrado efecto radiosensibilizador, esta característica fue aprovechada para investigar compuestos que mimetizan su efecto y que pudieran ingresar a los tumores los cuales se encuentran poco vascularizados y tienen condiciones hipóxicas, lo que los hace resistentes a la radiación (Hickson *et al.*, 2016). La mayoría de los agentes miméticos del oxígeno

que han sido estudiados, contienen estructuras nitroaromáticas con afinidad electrónica. Los grupos nitro reducidos reaccionan con los RL inducidos por la radiación y estabilizan las lesiones en el ADN bajo condiciones de hipoxia (Fowler *et al.*, 1976; Lehnert, 2015; Hickson *et al.*, 2016). Entre los radiosensibilizadores con ésta característica se encuentran el metronidazol y el misonidazol. Cabe señalar que, aunque en estudios de fase preclínica muestran propiedades radiosensibilizadoras, no todos estos compuestos han mostrado resultados alentadores en la fase clínica (Rockwell *et al.*, 2009; Hickson *et al.*, 2016).

La inhibición de enzimas que participan en la defensa antioxidante como la tioredoxina reductasa (TrxR) y el glutatión (GSH) también han mostrado efecto radiosensibilizador (Smart *et al.*, 2004; Selenius *et al.*, 2012).

El motexafin gadolinium (MGd), es un compuesto macrocíclico aromático con gran afinidad electrónica; su blanco molecular más importante es la TrxR y la inhibición de su actividad debilita al sistema antioxidante; haciendo a las células más susceptibles a la muerte celular (Hashemy *et al.*, 2006). En estudios *in vitro* con varias líneas celulares cancerosas tratadas con MGd, se observó incremento de ERO y aumento del efecto citotóxico de la RI; ésta respuesta también fue obtenida en xenotransplantes (Magda y Miller 2006).

La butionina sulfoximina (BSO), es un aminoácido sintético que disminuye los niveles endógenos del GSH mediante la inhibición irreversible de la γ glutamil-cisteína sintetasa, que es una enzima importante en la biosíntesis del GSH. Se ha observado que la BSO aumenta la radiosensibilidad en xenotransplantes con ratones atómicos con glioma y en cultivos de células de retinoblastoma (Lippitz *et al.*, 1990; Yi *et al.*, 1994).

También la alquilación del ADN producida por algunos agentes ha mostrado efecto radiosensibilizador. La temozolomida (TMZ) es un agente alquilante utilizado en melanoma metastásico y en glioma, que forma como productos del metabolismo la N⁷-metil guanina, la O⁶-metil guanina y la N³-metil adenina. Las alquilaciones en la adenina y en la guanina alteran su estereoquímica y modifican la unión entre las bases mediante los puentes de hidrógeno. En estudios en células de glioblastoma se ha observado efecto aditivo con la combinación de TMZ y radiación (Wedge *et al.*, 1997). En este mismo tipo celular, la administración de TMZ aumenta la respuesta a la radiación en células deficientes en O⁶-metilguanina-ADN-metiltransferasa (MGMT); mediante el incremento en la inducción de rupturas de doble cadena en el ADN inducidas por radiación (Chakravarti *et al.*, 2006). Considerando que la reparación de la O⁶-metil guanina se lleva a cabo por la MGMT, la reparación defectuosa es un componente esencial en la radiosensibilización producida por la alquilación del ADN (Kühne *et al.*, 2004; Chakravarti *et al.*, 2006; Thomas *et al.* 2013).

Así mismo se ha observado que el efecto radiosensibilizador puede ser producido por antimetabolitos halogenados del uracilo como el 5-fluorouracilo y la fluorodesoxiuridina; bajo condiciones no citotóxicas (Kjellström *et al.*, 2005; Ojima *et al.*, 2006). Algunos estudios indican que para que estos antimetabolitos produzcan efecto radiosensibilizador, es importante la acumulación de las células en la fase de síntesis (S) (Lawrence *et al.*, 1996), así como la disminución de la reparación de rupturas en el ADN producidas por la radiación (Davis *et al.*, 1995).

La difluorodesoxicidina (dFdC) también llamado gemcitabina, es un antimetabolito análogo de la desoxicidina. La dFdC tiene un rango de actividad

antineoplásica amplio y se utiliza en tratamientos de cáncer de seno, de cabeza y cuello, entre otros (Noble y Goa, 1997). Este agente ha mostrado acción radiosensibilizadora en sistemas *in vitro* e *in vivo* (Sangar *et al.*, 2004; Doyle *et al.*, 2001). Su efecto radiosensibilizador se ha asociado con la inhibición de la ribonucleótido reductasa (RR) y la deficiencia en la reparación de errores de apareamiento (MMR). Se ha sugerido que la disminución de desoxiadenosina trifosfato producido por la inhibición de la RR, produce errores de apareamiento en la replicación; los cuales, si no son reparados aumentan la muerte celular por RI. Además se ha observado aumento en la radiosensibilización en células HCT116 deficientes en las proteínas hMLH1 implicadas en la MMR (Flanagan *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2003). Por otra parte, se ha considerado que el mecanismo radiosensibilizador de la dFdC, está relacionado con el arresto que induce en la fase S temprana del ciclo celular el cual se ha observado que es dependiente de la dosis de dFdC (Pauwels *et al.*, 2003).

Otro antimetabolito que ha mostrado efecto radiosensibilizador mediante la alteración del ciclo celular, es la fluoroadenina arabinosida (fludarabina). Es un análogo de la desoxiadenosina que se usa en el tratamiento de leucemia linfática crónica. Su efecto radiosensibilizador se ha observado en sistemas *in vitro* (Kim *et al.*, 1986) y en el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello se han obtenido resultados alentadores (Grégoire *et al.*, 2002). Se ha sugerido, que la respuesta tumoral a la radiación en células expuestas a la fludarabina, puede ser debida a la contribución de los diversos efectos que tiene este agente en las células; como la inhibición de la reparación, la apoptosis inducida en las células que se encuentran en la fase S al momento de la exposición de la fludarabina, y a la sincronización

subsecuente de las células remanentes hacia la fase de mitosis al momento de la irradiación, siendo ésta, la fase del ciclo celular más radiosensible (Grégoire *et al.*, 1994).

Existen agentes anticancerígenos que tienen como blanco la tubulina, que también han mostrado efecto radiosensibilizador. Se ha observado en cultivo de células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), que el pretratamiento con vinorelbina a concentración de toxicidad mínima sensibiliza a las células a la acción de la radiación. Se ha propuesto que la radiosensibilización puede ser producida por la acumulación prolongada de las células en la transición de las fases G2/M, en conjunto con la poliploidización continua y la inducción de la apoptosis (Fukuokoa *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004).

Las moléculas que participan en la respuesta celular a la radiación, han generado interés en el desarrollo de estrategias basadas en la inhibición de blancos específicos para incrementar la radiosensibilidad tumoral (Tofilón y Camphausen, 2009). Las diversas lesiones en el material genético producidas por la RI, activan vías de respuesta al daño. La recepción de una señal o primer mensajero se traduce en una cascada de eventos moleculares que involucra a la red de proteínas cinasas Ataxia Telangiectasia Mutada/Ataxia Telangiectasia y *RAD3* (ATM/ATR). Cuando las rupturas de doble cadena inducidas por la RI son detectadas, se puede detener el ciclo celular, ya sea mediante la activación de ATM o de ATR. El arresto del ciclo celular facilita la reparación del ADN mediante recombinación homóloga (RH) y la reparación por reunión de extremos no homólogos (NHEJ) (Lehnert, 2008; Maier *et al.*, 2016). Se ha probado en cultivos celulares que la inhibición de ATM puede causar radiosensibilización. Hickson y

coautores (2004), determinaron que el inhibidor de ATM el 2-morfolina-4-il-6-triantreno-1-il-piran-4-uno (KU-55933), producía sensibilización significativa a los efectos citotóxicos de la RI. Se ha sugerido que la inhibición transitoria de ATM con CP466722 es suficiente para sensibilizar a las células a la RI y que esto podría aplicarse en la radiosensibilización terapéutica (Rainey *et al.*, 2008).

Se conoce que la RI induce arresto en el ciclo celular y con el retardo en los puntos de control puede prevenir la replicación del ADN dañado. La inhibición de biomoléculas que participan en los puntos de control, también se ha considerado como una vía de radiosensibilización. En cultivos de células de cáncer de colon, se observó que el XL-844 inhibe la proteína cinasa de punto de control Chk2 que participa en la transducción de señales para el arresto celular en G2. Se observó aumento en la radiosensibilidad celular, lo que fue asociado con inhibición de la reparación y aumento en la inducción de catástrofe mitótica, en la cual se produce segregación aberrante de los cromosomas, lo que conduce a apoptosis (Riesterer *et al.*, 2011).

Existen numerosas moléculas involucradas en la traducción de señales del ambiente a través del citoplasma hacia el núcleo y algunas de ellas han mostrado relevancia en la radiosensibilización. La farnesiltransferasa puede ser otro blanco molecular para obtener efecto radiosensibilizador. Esta proteína une al grupo farnesil a la cisteína en el extremo terminal de la proteína Ras, ocurriendo la farnesilación, lo que es esencial para su funcionamiento normal. Debido a que Ras se encuentra estrechamente relacionada con la transferencia de señales de crecimiento en la superficie celular; y las células cancerosas también dependen de la farnesilación, se ha propuesto que deteniéndola se podría detener la función

de Ras y desacelerar su crecimiento celular (Goodsell, 2003). En modelos xenográficos con células de carcinoma de páncreas, el tratamiento combinado con el inhibidor de la farnesiltransferasa L-778,123 y radiación, mostró efecto radiosensibilizador (Brunner *et al.*, 2005).

Muchos de los factores de crecimiento que regulan la proliferación celular son reconocidos por receptores transmembranales y algunos de estos receptores se han relacionado con la radiosensibilización. En células cancerosas de pulmón, páncreas, glioma y de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, la inhibición del receptor del factor de crecimiento epidermal con centuximab, que es un anticuerpo monoclonal (C225), sensibiliza a las células a la acción de la RI. Se observó inhibición de la reparación y apoptosis mediante aumento de la caspasa 3 (Dittmann *et al.*, 2005; Zhang, 2010).

IGF1-R es el receptor que interviene en la activación del factor de crecimiento semejante a la insulina y es un mediador importante en el crecimiento, diferenciación, transformación celular y protección contra la apoptosis (Baserga *et al.*, 1997; Zaidi *et al.*, 2009). En líneas celulares de cáncer de mama la tirfostina AG 1021, que es un inhibidor selectivo del IGF1-R, ha mostrado que inhibe la proliferación celular e induce apoptosis como respuesta a la radiación (Wen *et al.*, 2001).

La inhibición de la histona deacetilasa (HDAC) con vorinostato, también conocido como SAHA, ha mostrado en cultivos de células NSCLC que produce radiosensibilización. Los autores de este estudio consideran que probablemente se deba a que afecta la regulación de proteínas que participan en la reparación del daño en el ADN por RH y por NHEJ (Zhu *et al.*, 2015).

Otro de los mecanismos mediante los cuales se puede producir radiosensibilización, es aumentando la absorción de energía producida por la radiación. Ésta vía está basada en el efecto fotoeléctrico y Compton, que son dos de las formas mediante las cuales la radiación gamma interacciona con la materia para producir ionización. En el efecto fotoeléctrico, un fotón incide en un átomo y al transferir su energía expulsa un electrón del orbital externo, en donde la energía cinética del fotoelectrón resultante es igual a la energía del fotón que incide, menos la energía de enlace del electrón. En el efecto Compton, el fotón interactúa con un electrón del orbital externo de un átomo y le transfiere parte de su energía con lo cual lo expulsa, al mismo tiempo el fotón incidente continúa su curso, con una dirección de emisión diferente a la inicial y con energía menor. Los metales con alto número atómico absorben substancialmente más energía por unidad de masa que el tejido blando; lo que se traduce en un incremento significativo en la dosis local cuando, inclusive solo hay una pequeña cantidad de metal en el tumor (Lenhert, 2015). Se ha propuesto que introducir elementos con átomos pesados dentro de los tumores para producir daño celular, podría ser una ventaja terapéutica en la RT. Se han desarrollado nanopartículas (NP's) que contienen metal, como pueden ser hierro y zinc; plata; germanio; gadolinio, oro y platino (Meidanchi *et al.*, 2015; Bouras *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2014; Taupin *et al.*, 2015; Butterworth *et al.*, 2012; Rehman *et al.*, 2016). En varios estudios *in vitro* existe evidencia del efecto radiosensibilizador producido por las NP's de oro (Butterworth *et al.*, 2012). Éstas son altamente biocompatibles y las menores de 100 nanómetros pueden atravesar la membrana celular. Se ha observado en ratones con carcinoma mamario, que la acumulación de estas NP's se encuentra

preferentemente en el tumor, además de aumento en la supervivencia del 86 %, al año del tratamiento; en comparación con la supervivencia del 20% con el tratamiento solamente con radiación (Hainfeld *et al.*, 2004).

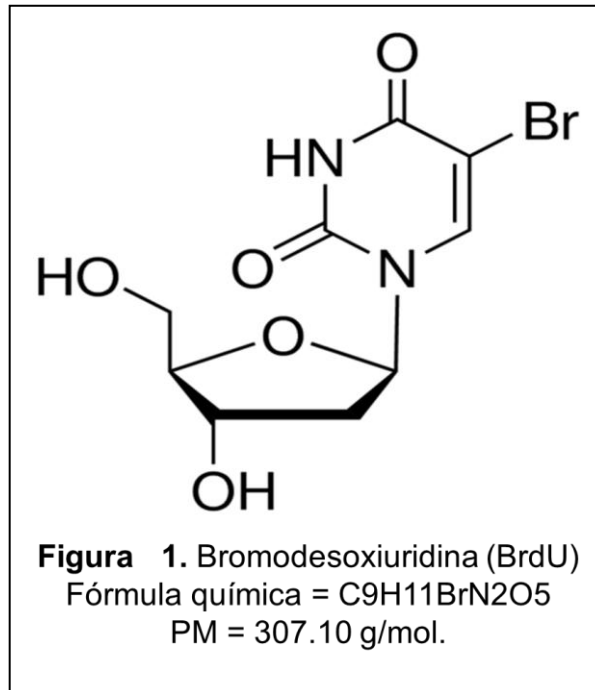
Aunque existen propuestas sobre los mecanismos de acción de los agentes capaces de producir radiosensibilización, estos mecanismos aún no se han establecido completamente. Algunos agentes tienen más evidencias de su efecto radiosensibilizador y otros las tienen más ambiguas; este es el caso de la bromodesoxiuridina (BrdU) y del cisplatino (cis-Pt).

1.2.1 Bromodesoxiuridina

La bromodesoxiuridina (Figura 1), es un antimetabolito que contiene un átomo de bromo (Br) en la posición 5, que substituye al grupo metilo de la desoxitimidina. Debido a que el radio de van der Waals del átomo de Br es similar al del grupo metilo de la timidina, puede reemplazarlo (Lawrence *et al.*, 1990). Por lo que la timidina halogenada es metabolizada en la misma vía que la timidina (Tubiara *et al.*, 1990; Shewach y Lawrence, 2007).

La BrdU ingresa a las células mediante proteínas transportadoras de nucleósidos ENT1 (Plotnik *et al.*, 2012). Posteriormente tiene que ser fosforilada a su derivado monofosfato (BdUMP) por la timidina cinasa, y con fosforilaciones secuenciales se obtiene su forma trifosfatada, misma que puede ser utilizada durante la fase S quedando incorporada en el ADN (Morris, 1991). La forma trifosfatada del análogo halogenado también es un inhibidor alostérico de la RR, lo que afecta la síntesis de los desoxiribonucleótidos (Meuth y Green, 1974). Una

vez incorporada la BrdU en el ADN, puede adoptar su estructura ceto o su forma enólica y formar apareamientos erróneos con la guanina (Hu *et al.*, 2004). Estos cambios pueden ser inducidos en cada ciclo de replicación celular si la BrdU se encuentra presente; por lo que la incorporación de BrdU afecta continuamente la secuencia del ADN (Lewin, 2000).



Las células que incorporaron BrdU en su ADN son funcionales y se ha observado que pueden duplicarse *in vivo*, por al menos 3 divisiones celulares sucesivas (Morales-Ramírez *et al.*, 1987) y en condiciones *in vitro*, por hasta 25 ciclos de división celular con su ADN sustituido casi en el 100 % (Bickl *et al.*, 1974).

La BrdU es utilizada para estudiar señalización celular y otros procesos asociados con la proliferación celular (Pozarowski y Darzynkiewicz, 2004), así como para cuantificar el daño producido por agentes físicos o químicos mediante

el análisis de intercambios en las cromátidas hermanas (ICH) (Morales-Ramírez *et al.*, 1984a).

No obstante que se ha reportado que la BrdU es clastógena (Hsu y Somers, 1961), también se ha reportado que la BrdU no induce daño *per se*. En un estudio en cultivos celulares de fibroblastos y de linfoblastos provenientes de personas normales y de pacientes con síndrome de Bloom, cuyas células presentan inestabilidad cromosómica; se observó que el tratamiento con diferentes dosis de BrdU no causaba diferencia en la frecuencia de ICH. Consideraron que las rupturas causantes de los ICH podrían deberse a la reparación de lesiones “espontáneas” y no al efecto de la BrdU (Van Wietmarschen y Lansdorp, 2016). Sin embargo, de acuerdo al principio de la causalidad que postula que todo efecto debe tener una causa; las lesiones que van a producir rupturas durante su reparación no se pueden producir espontáneamente. Por lo que los causantes del daño al ADN podrían ser algunos productos endógenos del metabolismo celular; por ejemplo, las especies reactivas de oxígeno. Se ha obtenido evidencia de que la BrdU amplifica el daño al ADN producido por estrés oxidante en el que participan los RL (Poot *et al.*, 1990). Se conoce que en la cadena de transporte de electrones mitocondrial se producen ERO y algunas de ellas son RL, por lo que éstos podrían ser los causantes del daño en el ADN que contiene BrdU.

Otro aspecto importante de la incorporación de BrdU en el ADN, es que puede sensibilizar a las células a la inducción de ICH producidos por agentes alquilantes como la metilnitrosourea (MNU) (González-Beltrán y Morales-Ramírez,

1999). También se ha observado que sensibiliza a las células de la médula ósea de ratón al efecto de la radiación (Morales-Ramírez *et al.*, 1984b).

En el efecto radiosensibilizador producido por la BrdU, se tiene que considerar que la RI también produce ERO durante la radiólisis del agua contenida en las células; en donde algunas ERO son radicales como el $\bullet\text{OH}$ y el $\text{O}_2\bullet$ y también se generan \acute{e}_{aq} . Tanto el $\bullet\text{OH}$ y los \acute{e}_{aq} se producen en proporción similar. Sin embargo, el radical $\bullet\text{OH}$ produce la mayoría del daño en el ADN, en tanto que los \acute{e}_{aq} no causan daño en ADN natural (Nabben *et al.*, 1984), pero si tienen una participación importante en el daño al ADN sustituido con BrdU (Webb *et al.*, 1993). En el ADN que contiene BrdU los \acute{e}_{aq} producidos por la radiación rompen la unión con el átomo de Br; produciendo conjuntamente el radical uridinil y la disociación electrofílica del ión Br. El radical uridinil puede oxidar a una base vecina o quitar el H de la desoxirribosa y producir rupturas en el ADN (Neta, 1972; Steenken, 1992). También puede aceptar un electrón de una base vecina generando una base oxidada, lo que eventualmente termina con la formación de un radical catión $\text{G}^{+\bullet}$, con lo que se puede formar la 8-oxoguanina, que es una lesión altamente mutagénica (Gantchev *et al.*, 2011).

Se ha reportado que la pérdida radiolítica del átomo de Br es suprimida, cuando el ADN se encuentra en doble cadena; lo que no sucede cuando se encuentra en cadena simple (Li *et al.*, 2003). Se considera que el ADN de cadena sencilla que contiene halouracil puede ser más vulnerable al ataque de electrones por la alta reactividad electrónica. Iliakis y coautores (1989), consideran que la estructura de la cromatina en las células con su ADN sustituido con BrdU al

momento de la irradiación, es un factor importante para la radiosensibilización, así como los cambios conformacionales post-radiación.

Gantchev y coautores (2011), presentan un modelo que muestra la formación de varios tipos de lesiones que puede producir la radiación en el ADN sustituido con BrdU; enlaces cruzados intercadena, enlaces cruzados intracadena, sitios abásicos y rupturas en las cadenas. Y proponen que algunas de estas lesiones pueden estar involucradas en el efecto radiosensibilizador. Cecchini y coautores (2004), construyeron oligonucleótidos artificiales con diferentes secuencias de ADN, en algunos de los cuales incluyeron bromouracil. Reportaron que la radiación gamma induce enlaces cruzados intercadena que parecen ser exclusivos en regiones de apareamientos erróneos. Sugirieron, que tanto las rupturas en el ADN como los enlaces cruzados fueron causados por la presencia de BrdU en el ADN al momento de la irradiación y que podrían formarse en regiones en donde el ADN se encuentre en cadena sencilla. Esto favorecería que el ADN pudiera ser especialmente sensible durante la transcripción, la duplicación y en sitios con errores de apareamiento. Por lo que se podría considerar que las lesiones letales pueden ser rupturas en el ADN de cadena doble y enlaces cruzados intercadena. También el efecto radiosensibilizador de la BrdU se ha asociado con el mecanismo de reparación de errores de apareamiento. En cultivos celulares de células cancerosas deficientes en MMR, se ha observado aumento en el daño producido por la radiación en las células sensibilizadas con BrdU (Berry *et al.*, 1999).

No cabe duda que se ha evidenciado la radiosensibilización inducida en el ADN sustituido con BrdU (Franken *et al.*, 1997; Morales-Ramírez *et al.*, 1984b).

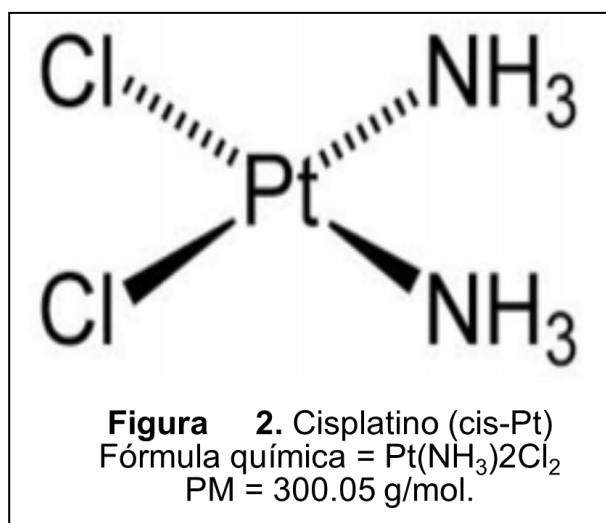
Sin embargo, los resultados de los estudios en fase clínica en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, glioma multiforme o pancreático (Epstein *et al.*, 1995; Robertson *et al.*, 1997; Prados *et al.*, 1998), no han proporcionado una respuesta concluyente en su utilidad como agente radiosensibilizador. Aunado a lo anterior, el único ensayo aleatorio completo que implicó pacientes con metástasis cerebral, no mostró diferencia entre los tratamientos de los pacientes que recibieron BrdU más radiación, con respecto a los que fueron tratados solamente con radiación (Phillips *et al.*, 1995). La BrdU es catalogada como una droga huérfana porque se usa en el tratamiento de una enfermedad que afecta a un pequeño número de pacientes (menos de 200,000 personas en U.S.A), como el caso de tumores cerebrales primarios en el cual se usa como radiosensibilizador (PubChem, 2019).

No obstante, a que los resultados como radiosensibilizador no han sido alentadores en la fase clínica, es importante considerar que usaron dosis altas de BrdU y de radiación. Por lo tanto, es importante hacer estudios sobre los posibles mecanismos involucrados en el efecto radiosensibilizador de la BrdU, utilizando dosis bajas de BrdU y radiación en condiciones *in vivo*. Lo cual podría tener utilidad para diseñar una mejor estrategia en los protocolos terapéuticos.

1.2.2 Cisplatino

El cis-Pt (Figura 2), también es llamado cis-diaminodicloroplatino(II), es un alquilante bifuncional utilizado como agente antineoplásico en el tratamiento de algunos tipos de cáncer como el de ovario, NSCLC y de cabeza y cuello (Kelland *et al.*, 2007; Dasari y Tchounwou 2014; McDowell *et al.*, 2017) y como agente

radiosensibilizador en el tratamiento de cáncer cérvico uterino (Candelaria *et al.*, 2006).



El cis-Pt es un complejo neutral de platino con estructura plana que contiene; dos átomos de cloro salientes en la posición *cis* alrededor del átomo de platino y dos ligandos amoniacos (Basu y Krishnamurthy, 2010). Una vez dentro de las células, el cis-Pt se convierte en un compuesto electrofílico potente; capaz de formar enlaces cruzados con el ADN o con las proteínas.

El cis-Pt ingresa a las células tanto por difusión pasiva como mediante proteínas transportadoras que se encuentran en la membrana celular, como las transportadoras de cobre 1 y 2, ATPasas ATP7A y ATP7B, la proteína transportadora de cationes orgánicos 2 y la transportadora de extrusión multidrogas 1 (Ciarimboli, 2012). Después de que ingresa dentro de las células, el cis-Pt se hidroliza perdiendo sus átomos de cloro y forma acuoespecies electrofílicas $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$ y $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ que reaccionan con el ADN. Estas acuoespecies forman uniones covalentes con el ADN, principalmente con las purinas, debido a que contienen un anillo imidazol altamente nucleofílico. El cis-Pt reacciona preferentemente con el N⁷ de la guanina y la adenina; lo que

puede producir aductos mono y bifuncionales, estos pueden formar enlaces cruzados intracadena o intercadena, así como ADN-proteína. Siendo en su mayoría, enlaces cruzados intracadena (aproximadamente el 90 %), que pueden ser *cis*-Pt(NH₃)₂-d(GpG) y *cis*-Pt(NH₃)₂-d(ApG), o *cis*-Pt(NH₃)₃-d(GpTpG). A pesar de que se forman en menor cantidad los enlaces cruzados intercadena *cis*-Pt(NH₃)d(GpC)d(GpC), hay estudios que indican que podrían ser los causantes del efecto citotóxico del *cis*-Pt (Woźniak y Blasiak, 2002).

La presencia de enlaces cruzados distorsiona la estructura de la doble hélice desestabilizándola, con lo que se afecta la transcripción y la replicación produciéndose rupturas de cadena sencilla y doble en el ADN y errores en la codificación. Estas lesiones pueden repararse, pero si esto no sucede entonces pueden ser mutagénicas o letales (Lenhert, 2015). Se ha reportado que el *cis*-Pt también produce ERO, las cuales pueden disparar la muerte celular (Brozovic *et al.*, 2010).

La quimioterapia con *cis*-Pt ha mostrado efectos tóxicos en los pacientes como: hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, cardiotoxicidad, neurotoxicidad y daño hematológico, así como resistencia adquirida en el curso de la terapia, estando relacionados algunos de estos efectos con las dosis altas de *cis*-Pt utilizadas (Dasari y Tchounwou, 2014). Existe evidencia del efecto radiosensibilizador del *cis*-Pt en sistemas *in vitro* e *in vivo* (Gorodetsky *et al.*, 1998; Yapp *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de su uso en la práctica clínica, hay incertidumbre sobre su capacidad radiosensibilizadora. Existen reportes en los que se observa efecto aditivo entre el *cis*-Pt y la radiación (Lambin *et al.*, 1993), en otros efecto sinérgico (Liu *et al.*, 2014) e inclusive no han encontrado efecto

(Mokaleng y Akudugu, 2009). Dolling y coautores (1998), encuentran una respuesta celular diferencial, dependiendo de la dosis de cis-Pt y del intervalo entre su administración y la radiación. La respuesta variable también se ha observado en protocolos de tratamiento clínico (Eapen *et al.*, 2004; Quon *et al.*, 2011). Un factor que puede ser fundamental en la respuesta, es la relación de las dosis de cis-Pt y radiación. En estudios *in vitro*, los tratamientos que han mostrado efecto sinérgico involucraron dosis de ambos agentes en las que *per se*, no producen citotoxicidad (Seiwert *et al.*, 2007).

Se ha determinado en plásmidos que contenían aductos de platino, que los electrones de baja energía producidos por la RI, aumentan de manera preferencial la formación de rupturas de doble cadena y enlaces cruzados intercadena (Rezaee *et al.*, 2013). Así también que los e_{aq}^- y los radicales $\bullet OH$ incrementan la formación de rupturas de cadena sencilla y de cadena doble en el ADN en una relación de 1.9 y 2.2 respectivamente, con respecto a los plásmidos no modificados e irradiados (Rezaee *et al.*, 2013). Se ha observado en cultivo de células NSCLC y en un modelo xenográfico, que la combinación de cis-Pt y radiación incrementa el efecto de la radiación; aumentando la muerte celular mediante apoptosis y autofagia (Liu *et al.*, 2014). También se ha propuesto, que el efecto sinérgico del cis-Pt puede deberse a que una vez que modifica al ADN, se puede incrementar el daño producido por la radiación o causar inhibición de la reparación (Seiwert *et al.*, 2007).

El mecanismo mediante el cual el cis-PT aumenta el efecto de la radiación no se ha establecido completamente y aún se encuentra en investigación (Shürmann *et al.*, 2018).

La importancia de hacer estudios sobre los posibles mecanismos involucrados en el efecto radiosensibilizador del cis-Pt, utilizando dosis bajas de ambos agentes, es la de proporcionar información que ayude en el diseño de mejores estrategias en los protocolos terapéuticos.

1.5 Modelos preclínicos utilizados en la evaluación de radiosensibilizadores

Los estudios preclínicos son herramientas esenciales en la investigación del cáncer, siendo utilizados también en el estudio de los radiosensibilizadores (Citrin y Mitchel, 2014). Entre éstos estudios se encuentran los ensayos *in vitro*, que son un modelo experimental ampliamente utilizado para determinar el efecto genotóxico y citotóxico de algunos agentes y también es utilizado para determinar el efecto radiosensibilizador. Principalmente se utilizan los ensayos clonogénicos de supervivencia, en donde se mide la capacidad proliferativa de células individuales. Una ventaja adicional de éste ensayo, es la manipulación molecular para establecer la relación entre un agente y el posible blanco que permita el efecto radiosensibilizador. Con este modelo se pueden hacer comparaciones entre líneas celulares tumorales y células normales (Kahn *et al.*, 2012). Sin embargo las dosis y los tiempos de exposición de los estudios *in vitro*, no son equivalentes a lo que sucede en un organismo íntegro.

La mayoría de los estudios *in vivo* se han realizado en xenotransplantes, en los cuales se implantan subcutáneamente células tumorales en la pierna del roedor; lo que permite la irradiación del tumor sin la exposición de órganos importantes. Después de la implantación se deja que el tumor crezca en un

volumen medible y entonces se inicia la terapia durante la cual se determina el volumen del tumor durante 2 o 3 semanas (Kahn *et al.*, 2012).

El conocimiento de la vía o vías de acción de un radiosensibilizador puede determinar su uso en la práctica clínica. En esta tesis se considera que el análisis de las consecuencias genotóxicas, esto es, la producción de micronúcleos (MN) en los reticulocitos (RET) en función del tiempo, y las consecuencias citotóxicas, como lo es la reducción en la frecuencia de RET en función del tiempo producidas por el tratamiento con BrdU o cis-Pt, podría proporcionar una aproximación *in vivo* para caracterizar su forma de acción. Por esto, es importante estudiar sus efectos, en el organismo vivo y en función del tiempo, mediante la cinética de inducción de RET-MN, lo que permitirá establecer si producen radiosensibilización, la magnitud, su probable vía o si sólo alteran, por ejemplo, el curso de la división celular.

2. ANTECEDENTES

2.1 Del ensayo de micronúcleos para determinar daño en el ADN a los estudios genotoxicocinéticos y citotoxicocinéticos

Los MN, son pequeños cuerpos de cromatina que pueden ser derivados de fragmentos cromosómicos o de cromosomas completos, que no se incorporan dentro del núcleo principal en alguna de las células hijas al terminar la división celular; también son conocidos como cuerpos de Howell-Jolly.

La inducción de MN es un índice probado del daño ADN; que ha permitido estimar el potencial genotóxico de agentes que alteran el proceso de la segregación de los cromosomas en la división celular (aneuploidógenos) o que inducen rupturas en el ADN (clastógenos).

Para discernir si los MN son causados por efecto clastogénico o aneugénico se puede utilizar un anticuerpo anticinetocoro; también se pueden detectar regiones centroméricas mediante fluorescencia de hibridización *in situ*; en ambos casos, la ausencia de fluorescencia indicaría que los MN son causados por rupturas en el ADN (Krishna *et al.*, 2000; Mateuca *et al.*, 2006). Los MN con fluorescencia negativa al anticuerpo contienen fragmentos de cromosomas, son acéntricos y pueden ser el resultado de rupturas de doble cadena en el ADN causadas de manera directa; o por la conversión de rupturas de cadena sencilla en rupturas de doble cadena que no son reparadas o que lo son de manera ineficiente (Mateuca *et al.*, 2006; Fenech *et al.*, 2011). Los MN con fluorescencia positiva al anticuerpo pueden formarse por la replicación tardía; y pueden incluir solamente una cromátida o el cromosoma completo; también pueden formarse por hipometilación de secuencias repetitivas en el ADN centromérico o pericentromérico; o por defectos que pueden ser tanto en las proteínas del cinetocoro, como del huso acromático o en los puntos de control durante la anafase (Mateuca *et al.*, 2006; Fenech *et al.*, 2011). Para que se formen los MN independientemente de su origen, su cromatina tiene que ser envuelta por una membrana (Fenech *et al.*, 2011).

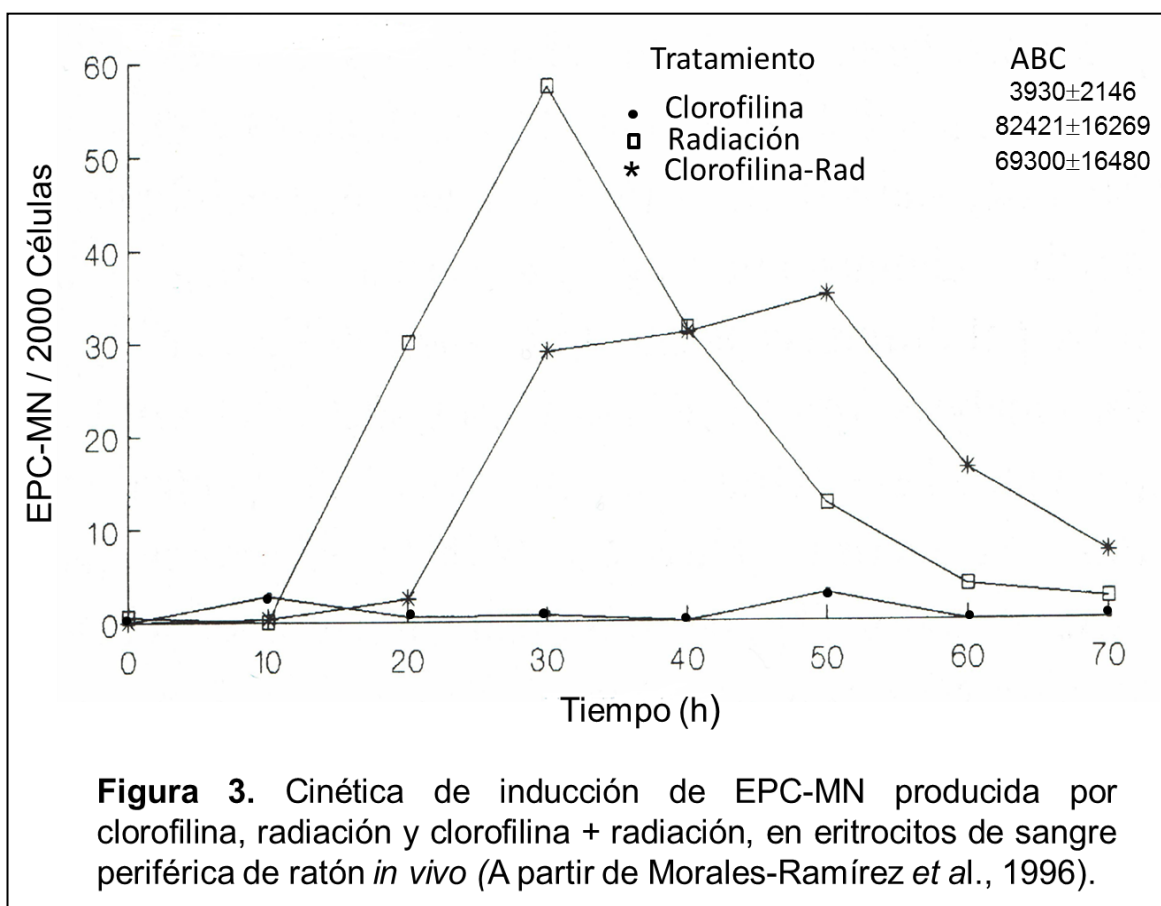
En sistemas *in vivo*, la determinación de MN generalmente se hace en eritrocitos de roedores. Debido a que se demostró que las células de la médula

ósea y las de sangre periférica de ratón son equivalentes en sensibilidad (MacGregor *et al.*, 1980), Morales-Ramírez y coautores (2014), han analizado sistemáticamente la inducción de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC-MN) en función del tiempo (genotoxicocinética), a partir de muestras pequeñas de sangre de la cola, sin sacrificar al animal. También en el mismo sistema, la reducción de la frecuencia de eritrocitos policromáticos (EPC) permite establecer la citotoxicidad en función del tiempo (citotoxicocinética). Cabe señalar que los MN detectados en los EPC también denominados RET en la circulación sanguínea, son producto de la acción de agentes aneuploidógenos o clastógenos sobre los normoblastos de la médula ósea. Los RET son eritrocitos jóvenes por lo que los MN que se encuentran en ellos pueden ser atribuidos al tratamiento reciente (Kuramochi *et al.*, 1992; Morales-Ramírez *et al.*, 1994; 1996; 1997).

2.2. La genotoxicocinética y la citotoxicocinética como estrategia para caracterizar el mecanismo de acción de agentes antineoplásicos y radiosensibilizadores *in vivo*

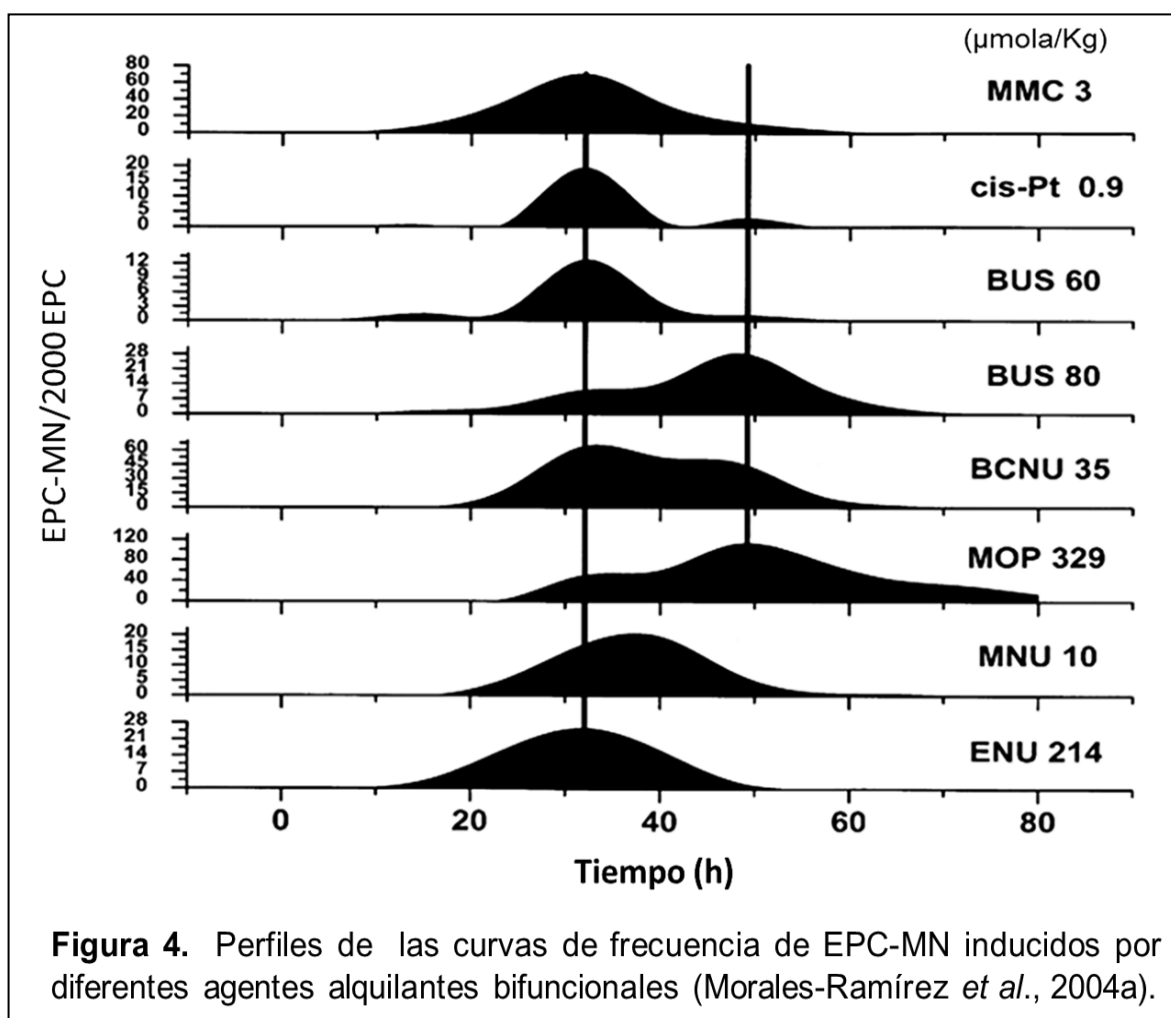
Las interacciones entre agentes y su acción en el organismo íntegro es un proceso dinámico, por lo que los estudios a tiempo fijo pueden conducir a obtener conclusiones diferentes. Un caso documentado fue el de la clorofilina, la cual se había reportado que tenía efecto radioprotector (Abraham *et al.*, 1994). Sin embargo, en un estudio en el que se determinó su efecto mediante el área bajo la curva (ABC) de inducción de EPC-MN en función del tiempo, como indicador de daño integral; se observó que no había diferencia significativa entre los grupos

irradiados pretratados o no con clorofilina; aunque la forma de la curva fue diferente (Figura 3). También en el mismo estudio se podían obtener diferentes conclusiones; comparando las curvas de los grupos irradiados pretratados o no con clorofilina, a las 20 y 30 h, se podía observar efecto radioprotector del 100 % y 50 %, respectivamente, a las 40 h, no había efecto, e incluso a las 50 h resultaba que la clorofilina podía tener efecto radiosensibilizador (Morales-Ramírez *et al.*, 1996). Esta observación dio la alerta sobre la importancia de hacer el análisis cinético en lugar de la determinación a tiempo fijo.



El análisis de la cinética de inducción de EPC-MN, abrió la posibilidad de obtener información sobre las formas de acción entre diferentes tipos de agentes (Morales-Ramírez *et al.*, 1998; 2004a; 2004b; 2008; 2017; Morales-Ramírez y Vallarino-Kelly, 1999; Vallarino-Kelly y Morales-Ramírez, 2001). Algunos de ellos

pueden inducir MN en diferentes ciclos de división, o tener dos o más mecanismos de inducción de EPC-MN, esto evidenciado por la presencia de más de un pico (Figura 4), como el caso de la bis-cloroetilnitrosourea (BCNU) y la azacitidina (aza-C); e incluso la dosis puede determinar que un agente produzca uno o más picos de inducción de MN, como es el caso del busulfán (BUS) (Morales-Ramírez *et al.*, 2004b).

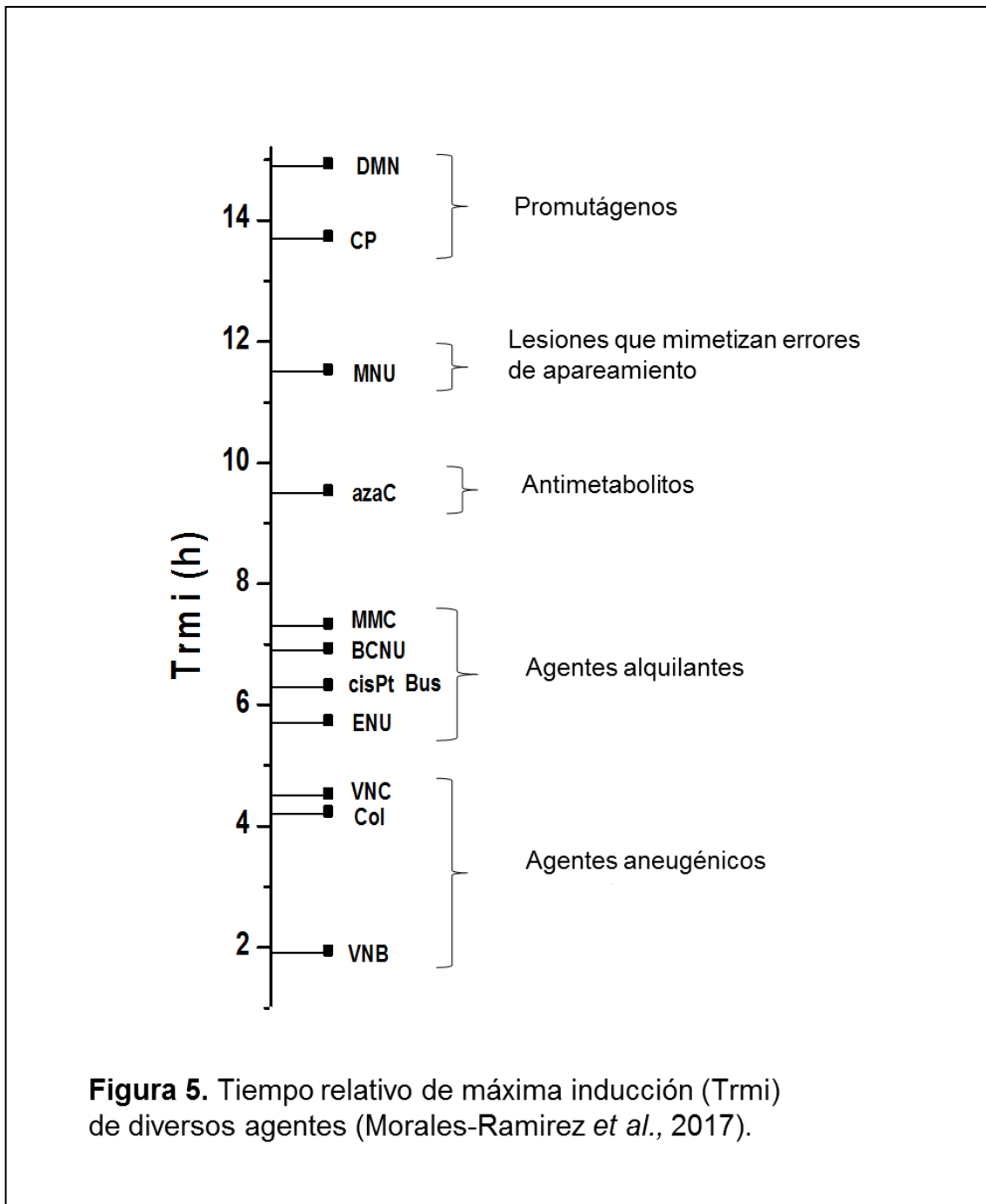


Además, la determinación del área bajo la curva de inducción de RET-MN con respecto al tiempo, nos permite tener un índice más robusto de la genotoxicidad de los agentes. Se pueden incorporar otros índices útiles como el tiempo de inducción máxima, que permite distinguir el o los tiempos a los que la

inducción de MN se está expresando, o tiempo relativo de máxima inducción (Trmi), definido como la diferencia en horas entre el tiempo de inducción máxima causado por la RI y el tiempo de inducción máxima de los diferentes agentes. Se tomó como referente la radiación gamma, porque su acción es muy directa y no hay influencia de la farmacocinética (Morales-Ramírez *et al.*, 2014). Los resultados con los agentes probados con este índice (Figura 5), muestran que los aneuploidógenos causan el menor retardo, posiblemente porque la vía de inducción ocurre en las células que se encuentran en la última mitosis; seguidos por los agentes alquilantes mono y bifuncionales que inducen rupturas en el ADN durante la reparación. Los agentes que tienen mecanismos complejos como la aza-C muestran un retardo mayor, ya que tienen que incorporarse al ADN en donde forma un mega-aducto con la ADN metil transferasa; o la MNU que genera rupturas en el ADN a través de la reparación de aductos que simulan errores de apareamiento. Finalmente los agentes que requieren activación metabólica en el hígado como la ciclofosfamida (CP) presentaron el mayor retraso (Morales-Ramírez *et al.*, 2014).

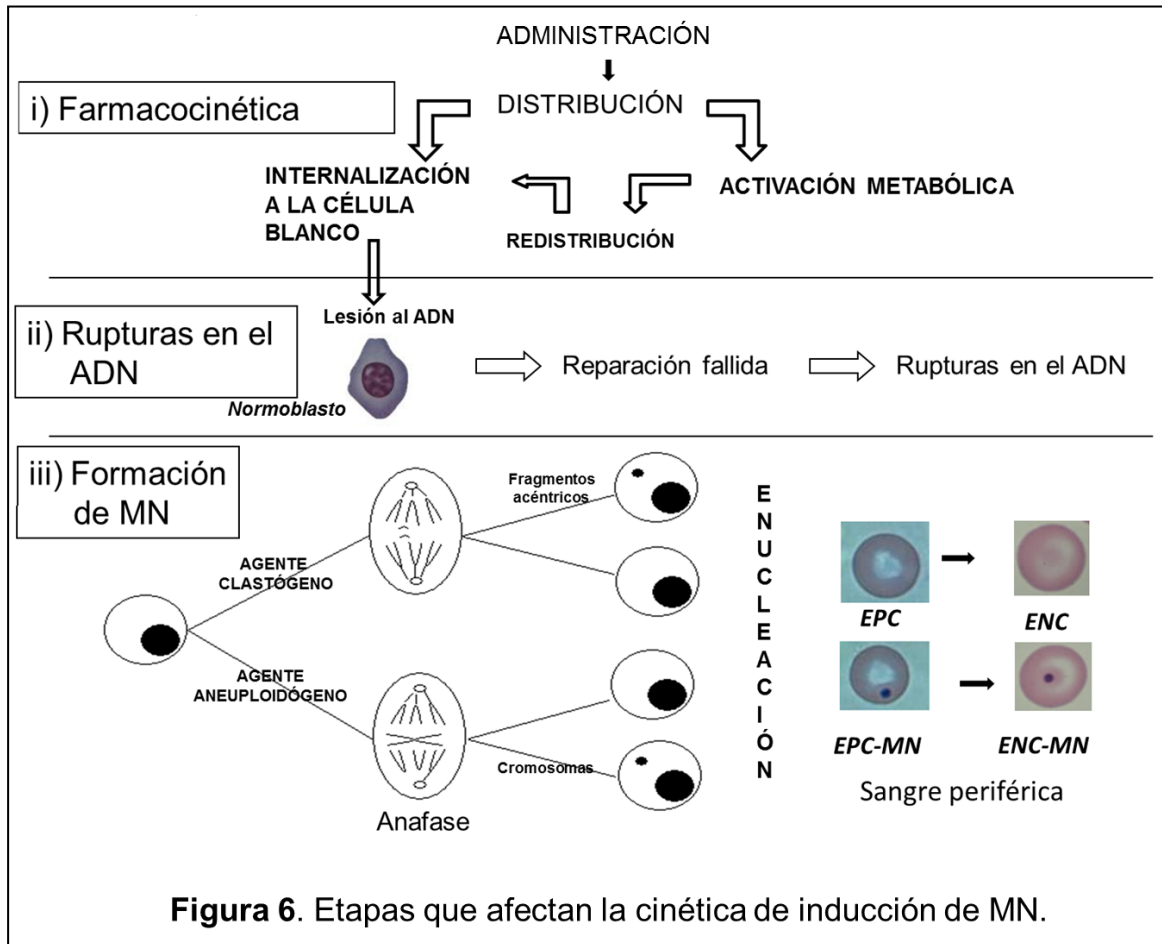
También se estableció que una lesión determinada, puede generar una cinética específica de formación de EPC-MN, como es el caso de la O⁶-cloroetilguanina, que es producida con el tratamiento simultáneo de la BCNU y la O⁶-benzilguanina. Se observó, que con el tratamiento simultáneo se produjo incremento en la inducción de EPC-MN, y retardó en el tiempo de inducción máxima de EPC-MN con respecto al inducido solamente por BCNU (Morales-Ramírez *et al.*, 2010). Con estos análisis, se ha podido establecer que la cinética

de inducción de MN es variable, ya que es dependiente de la naturaleza del agente y de su forma de acción.



La inducción de MN comprende varias etapas; las cuales van a afectar su cinética de inducción y son: i) la farmacocinética del agente inductor, desde que se administra al organismo, hasta que se internaliza a la célula blanco; ii) la vía de

producción de rupturas en el ADN, que pueden ocurrir por los diversos mecanismos de reparación celular y, iii) la formación de MN durante la anafase (Figura 6).



Otro índice muy importante que se puede obtener en las mismas muestras y que permiten evidenciar la acción de los agentes; es el índice de citotoxicidad, que es la reducción en la frecuencia de EPC. Éste índice al medirse en función del tiempo permite establecer la citotoxicocinética.

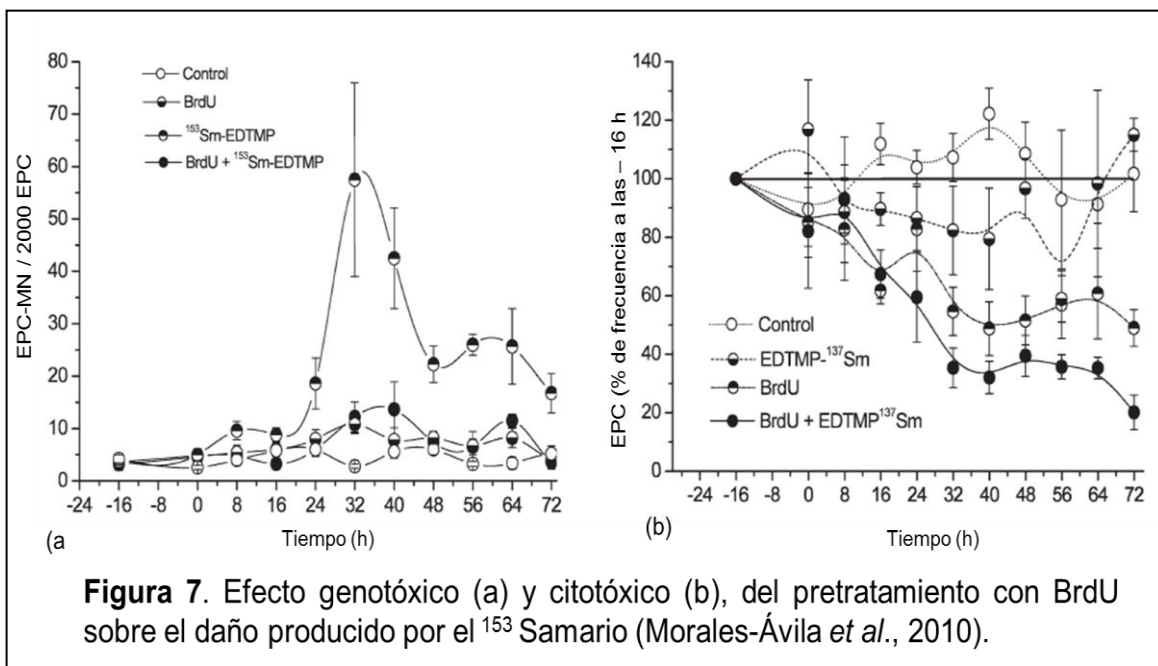
Utilizando como estrategia el análisis de la cinética de inducción de EPC-MN en función del tiempo, se pueden hacer inferencias para determinar la vía de formación de MN; el posible mecanismo de formación de rupturas en el ADN y, por ende, del MN; además, si esto es debido a uno o varios mecanismos e

inclusive si requiere de activación metabólica. Este tipo de análisis le da una fuerza analítica mayor al ensayo de MN, que la simple determinación de inducción de MN a tiempos fijos, propuesta en los protocolos estandarizados para este ensayo en eritrocitos de mamífero; con los que se puede obtener una subestimación de la respuesta (OECD 2014; Morales-Ramírez *et al.*, 2017).

Las ventajas analíticas de este sistema, permitieron considerar la conveniencia de ampliar el campo de estudio al efecto de agentes radiosensibilizadores, ya que sobre algunos de ellos se ha reportado una acción sensibilizadora a la radiación en diferente grado y consistencia.

En un estudio preliminar, sobre la posibilidad de usar para la ablación de la médula ósea, la acción conjunta de la BrdU como radiosensibilizador y el ^{153}Sm -etilendiaminotetrametilfosfonato (^{153}Sm) como radiofármaco que se ubica en hueso; se observó que la BrdU radiosensibiliza a las células de la médula ósea. Los autores reportaron que en el ADN sustituido con BrdU se formaba una lesión letal inducida por el ^{153}Sm , que no fue reparada fácilmente y no permitió la división celular y la formación de MN (Figura 7) (Morales-Ávila *et al.*, 2010).

Los estudios antes mencionados en los que se utiliza esta estrategia de análisis se hicieron mediante microscopía óptica. En el presente estudio se consideró la conveniencia de hacer el análisis con citometría de flujo, lo que representa un análisis más robusto de las frecuencias de RET y RET-MN. Debido a que se pueden analizar una cantidad mayor de RET, lo que le da mayor fuerza analítica y estadística (Dertinger *et al.*, 2007).



3. JUSTIFICACIÓN

La determinación de la genotoxicocinética y la citotoxicocinética *in vivo*, midiendo la frecuencia de RET-MN y RET respectivamente, es un análisis más robusto que da una visión más precisa de lo que está ocurriendo en el organismo íntegro. Ésta estrategia permitirá la estimación del efecto radiosensibilizador de la BrdU y del cis-Pt; así como hacer una aproximación al posible modo de interacción de estos agentes con la radiación. Esto en contraposición con los ensayos *in vivo* a pocos tiempos fijos, que sólo dan un bosquejo de un proceso complejo y dinámico, lo que puede dar una subestimación de la respuesta. También en los estudios *in vitro*, las concentraciones y los tiempos de exposición no son equiparables con lo que sucede en condiciones *in vivo* y que en el mejor de los casos, sólo dan una visión de lo que sucede a nivel celular.

La propuesta implícita en ésta tesis, es que a través de la determinación de la aparición de RET-MN en función del tiempo *in vivo*, se puede lograr establecer la forma de como la BrdU y el cis-Pt afectan la cinética de inducción de daño al ADN causado por la radiación, e implícitamente la respuesta que tienen las células.

Además, este sistema tiene ventajas metodológicas, como el poder tomar muestras antes del tratamiento para que cada organismo sea su propio testigo; realizar el muestreo secuencial sin sacrificar ratones a cada tiempo y el requerirse muestras pequeñas de sangre.

Los estudios de radiosensibilización se harán en las células de la médula ósea, las que tienen cierta similitud con las células cancerosas, al estar en proliferación celular continua. Esta condición se aprovecha para el diseño de las estrategias antineoplásicas, ya que las células en proliferación son más sensibles a los tratamientos que interfieren con la división celular. La respuesta sólo se medirá en la última división del normoblasto, monitoreando la frecuencia de MN en los RET resultado de su última división.

El conocimiento generado podría ser la base para el diseño de protocolos de RT.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Permitirá el análisis genotoxicocinético y citotoxicocinético determinar la actividad radiosensibilizadora y evidenciar la forma de acción de la BrdU y del cis-Pt?

5. HIPÓTESIS

El análisis genotoxicocinético y citotoxicocinético permitirá determinar la actividad radiosensibilizadora y evidenciar la forma de acción de la BrdU y del cis-Pt, en normoblastos de ratón *in vivo*.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad de dosis bajas de BrdU y cis-Pt sobre la radiosensibilización a dosis bajas de radiación, y caracterizar su forma de acción en células de la médula ósea en ratones *in vivo*.

6.1 Objetivos Particulares

1.- Determinar cuáles son la dosis y el tiempo adecuado de administración de BrdU o cis-Pt para establecer su posible efecto radiosensibilizador. Las dosis adecuadas definidas serán aquellas que *per se*, no producen demasiada geno- o cito-toxicidad, ya que en caso contrario podría enmascarse el efecto radiosensibilizador.

2. Determinar el efecto de la incorporación de BrdU sobre la inducción de daño al ADN por radiación en células de la médula ósea, mediante electroforesis unicelular en gel.

3.- Determinar el efecto del pretratamiento con BrdU o con cis-Pt sobre las cinéticas de inducción de MN y de citotoxicidad por radiación gamma, mediante el análisis geno- y cito-toxicocinético en normoblastos.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Protocolos

7.1.1 Electroforesis unicelular en gel

7.1.1.1 Bromodesoxiuridina

Una de las principales diferencias entre las células de la médula ósea y los leucocitos, es que en el primer tipo celular un porcentaje significativo de ellas se encuentran en la fase S; debido a que tienen que estar en proliferación celular. Lo anterior se hace evidente con la electroforesis unicelular en gel (EUG) también conocida como ensayo cometa. Con este ensayo se observa un porcentaje significativo de células con cauda; lo que muy probablemente representa los fragmentos de Okasaki en las células de la médula ósea. En tanto que en los leucocitos, que se encuentran en la fase G0, el porcentaje de células con cauda es substancialmente menor porque en ellos ya no ocurre la división celular.

En este experimento preliminar se comparó el tamaño de la migración de la cauda en células de la médula ósea y en leucocitos de sangre periférica de ratones que no recibieron tratamiento (testigo). El objetivo fue determinar el

impacto de la proliferación celular sobre el tamaño de la migración de la cauda, entre células en constante proliferación celular y células en G0. Adicionalmente se determinó el límite en la migración de la cauda para distinguir entre las células dañadas y las no dañadas por los tratamientos; así como comparar el grado del daño. Por consiguiente, la comparación del promedio de células no dañadas y dañadas permitiría determinar si se incrementa la sensibilidad con la incorporación de BrdU en el ADN.

Protocolo A

Comparación de grupos testigo de células de la médula ósea y leucocitos de sangre periférica de ratón.

Se formaron dos grupos de 5 ratones cada uno, sin tratamiento para que fueran grupos testigos.

Médula ósea: 5 ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se disectó un fémur y se obtuvieron las células de la médula ósea.

Leucocitos de sangre periférica: Se colectaron muestras de sangre de la cola de 5 ratones.

Protocolo B

Determinación del efecto de la radiación gamma en ratones pretratados con BrdU mediante EUG

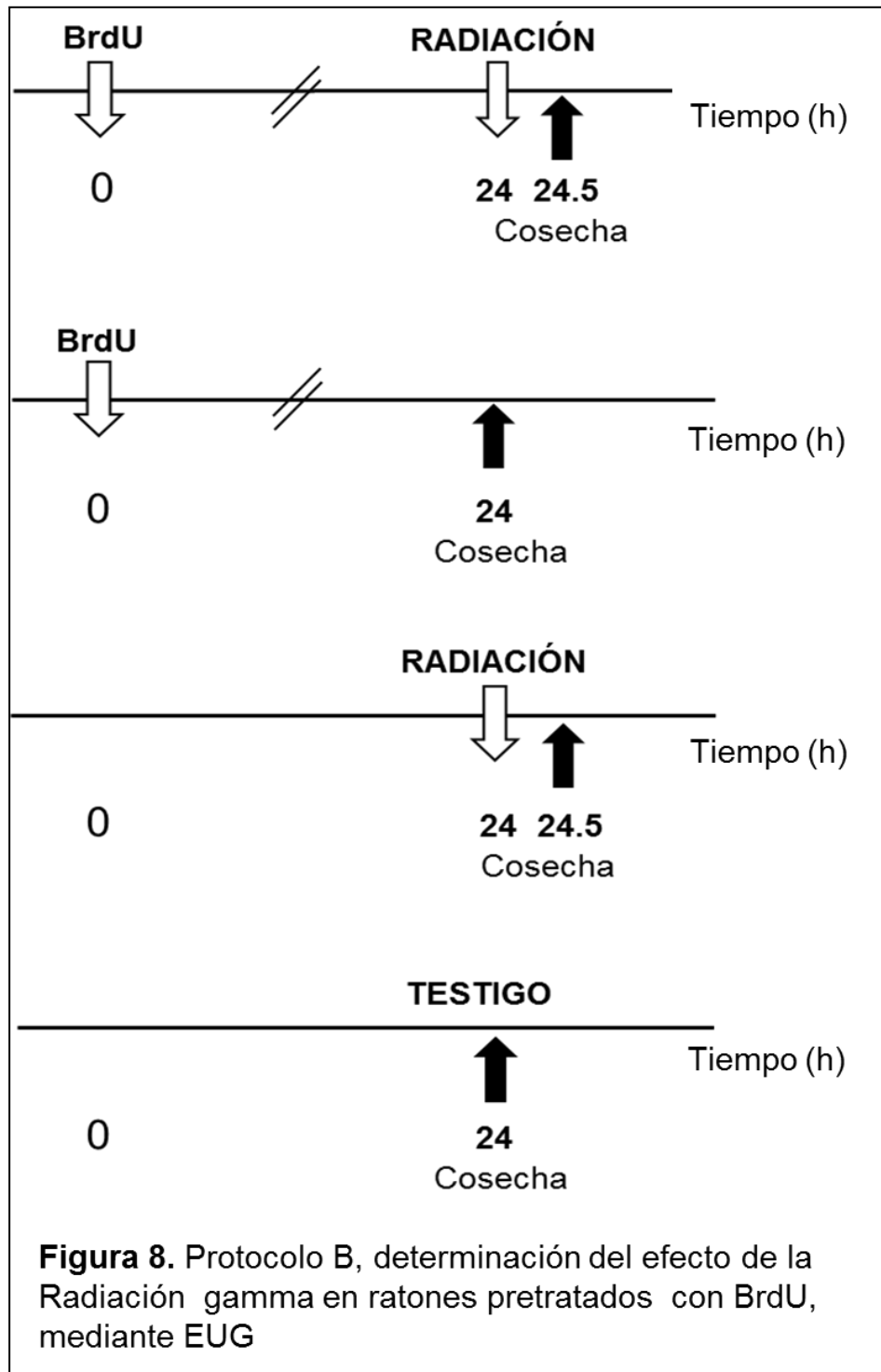
Se formaron cuatro grupos de 5 ratones cada uno, que recibieron los siguientes tratamientos: BrdU + Radiación; BrdU; Radiación; además de un grupo Testigo: En donde el tiempo cero es el tiempo de la administración de la BrdU (Figura 8):

Grupo experimental (BrdU + Radiación): Se administró mediante una inyección intraperitoneal (IP), una dosis 0.125 mg/g de peso corporal de BrdU previamente adsorbida a carbón activado 24 h antes de que los animales fueran expuestos a 0.5 Grays (Gy) de radiación gamma. Treinta minutos después de la irradiación se colectaron las células de la médula ósea.

Grupo BrdU: La BrdU fue administrada mediante una inyección IP de 0.125 mg/g de peso corporal previamente adsorbida a carbón activado al tiempo cero. 24 h después de la administración de BrdU; se colectaron las células de la médula ósea.

Grupo irradiado: Los animales fueron expuestos individualmente a 0.5 Gy de radiación gamma. Treinta minutos después de la irradiación se colectaron las células de la médula ósea.

Grupo testigo: Se colectó la médula ósea de ratones no tratados a las 24 h.



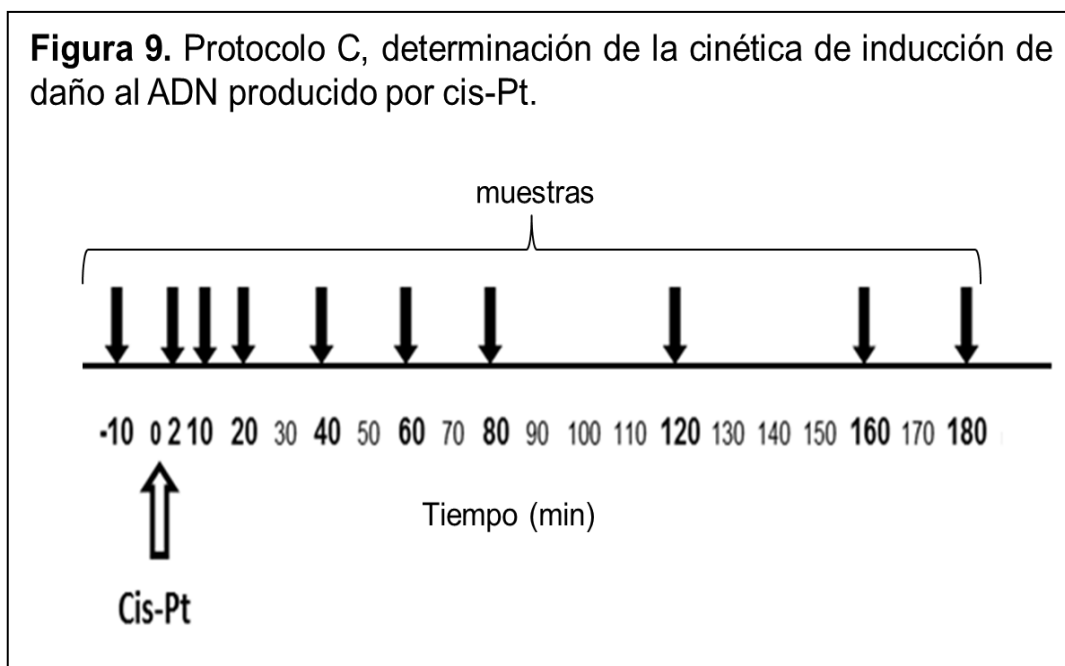
7.1.1.2 Cisplatino

Protocolo C

Cinética de inducción de daño al ADN producido por cis-Pt

Para determinar el tiempo entre los tratamientos (cis-Pt y radiación), se consideró que el tiempo adecuado sería cuando la administración del cis-Pt causara efecto genotóxico significativo ($p < 0.5$), como indicio de que había arribado a la célula. Lo que se hizo mediante el análisis de la cinética de inducción de daño producida por cis-Pt en leucocitos de ratón *in vivo*.

Se formó un grupo de 5 ratones y se les administró el cis-Pt (0.93 $\mu\text{moles/Kg}$) mediante una inyección IP. Se tomaron muestras de sangre de la cola antes del tratamiento para determinar la frecuencia basal y a los 2, 10, 20, 40, 60, 80, 120, 160, 180 min (Figura 9). Las muestras fueron analizadas mediante EUG.



7.1.2 Ensayo de Micronúcleos

7.1.2.1 Bromodesoxiuridina

Protocolo D

Determinación de la cinética de inducción de MN y de citotoxicidad por radiación gamma en RET de ratones pre-tratados con BrdU

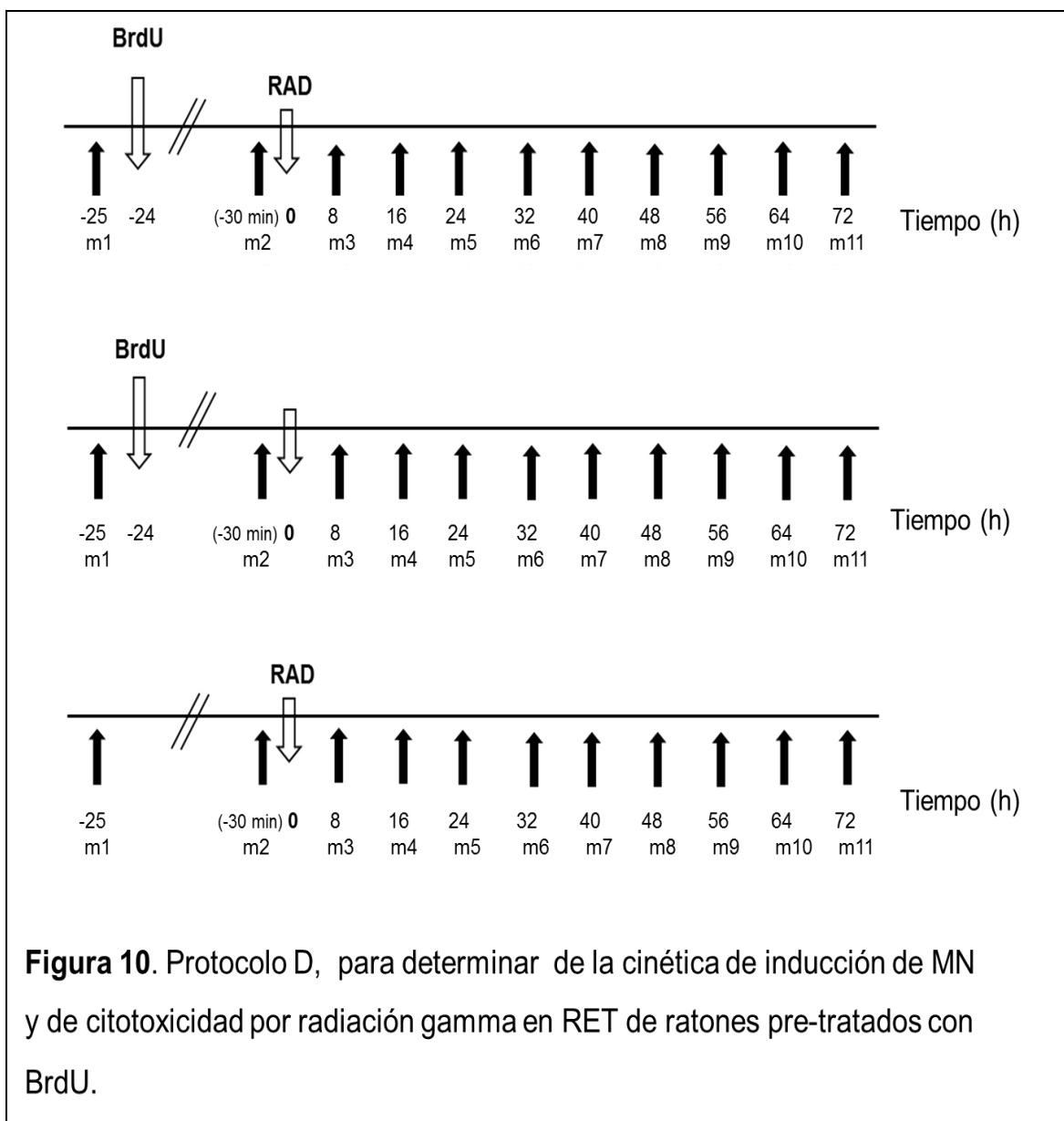
Se integraron tres grupos de 5 ratones cada uno con los siguientes tratamientos: BrdU + Radiación; BrdU; Radiación: Se tomó una muestra a los ratones antes de cada tratamiento para que fuera su testigo. Se consideró el tiempo cero inmediatamente antes de la exposición a la radiación (Figura 10).

Grupo experimental (BrdU + Radiación): Se administró mediante una inyección IP, una dosis de 0.125 mg/g de peso corporal de BrdU, previamente adsorbida a carbón activado 24 h antes de que los animales fueran expuestos a 0.5 Gy de radiación gamma.

Grupo BrdU: La BrdU fue administrada mediante una inyección IP de 0.125 mg/g de peso corporal previamente adsorbida a carbón activado, 24 h antes del tiempo cero.

Grupo irradiado: Los animales fueron expuestos individualmente a 0.5 Gy de radiación gamma.

Se tomaron muestras de 25 µl de sangre de la cola 25 h antes de los tratamientos para determinar la frecuencia basal y 30 min antes del tiempo cero y después cada 8 h hasta completar 72 h. Las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo.



7.1.2.2 Cisplatino

Protocolo E

Determinación de la cinética de inducción de MN y de citotoxicidad por radiación gamma en RET de ratones pre-tratados con cis-Pt.

Se integraron tres grupos de 5 ratones cada uno con los siguientes tratamientos: cis-Pt + Radiación; cis-Pt; Radiación. Se tomó una muestra a los ratones antes de cada tratamiento para que fuera su testigo. Se consideró el tiempo cero inmediatamente antes de la exposición a la radiación (Figura 11).

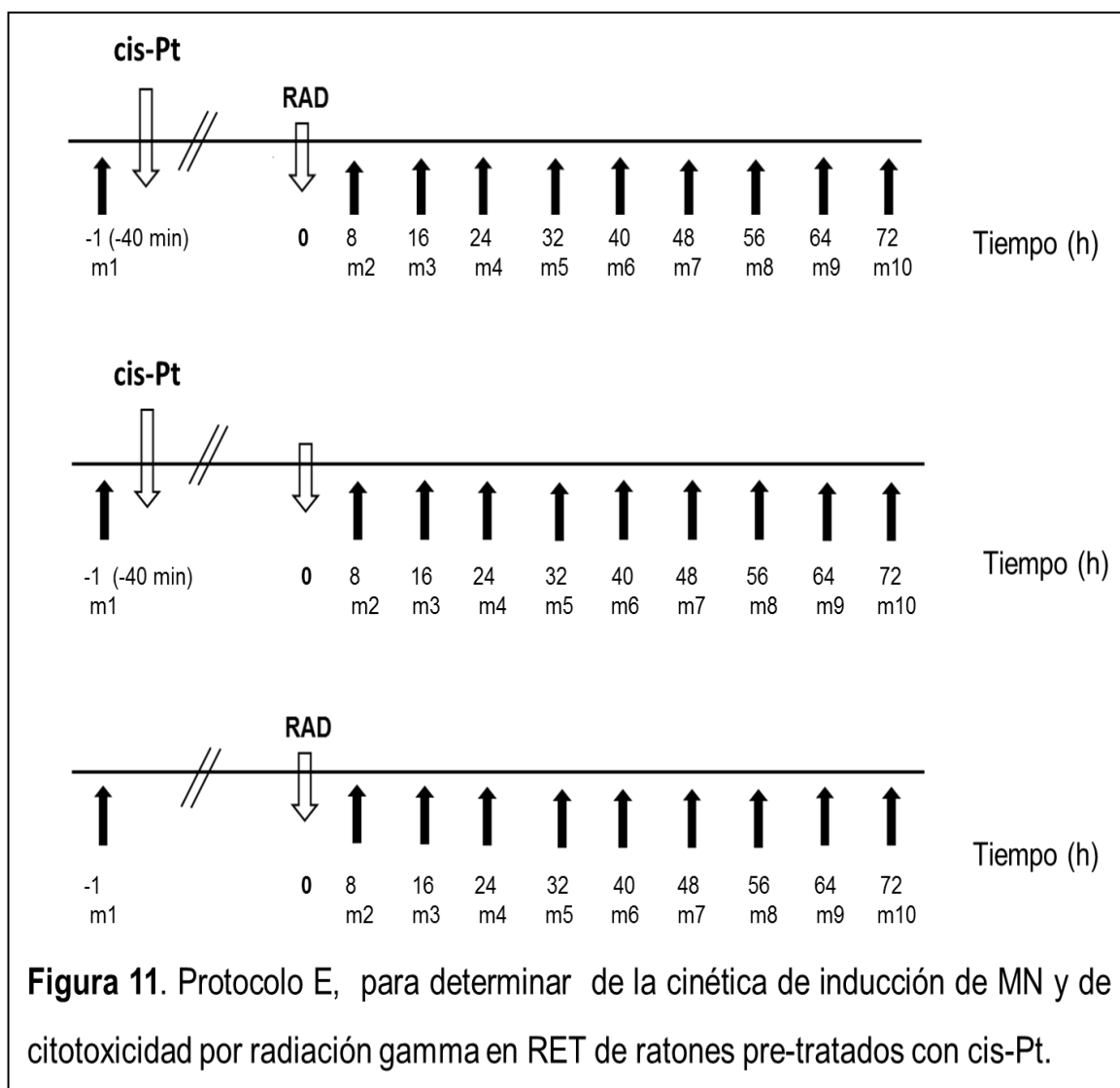
Grupo experimental (cis-Pt + Radiación): Se administró una dosis 1.0 $\mu\text{mol/Kg}$ de peso corporal cis-Pt 40 min antes de que los animales fueran expuestos a 0.5 Gy de radiación gamma.

Grupo cis-Pt: Se administró una dosis 1.0 $\mu\text{mol/Kg}$ de peso corporal cis-Pt 40 min antes del tiempo cero.

Grupo irradiado: Los animales fueron expuestos individualmente a 0.5 Gy de radiación gamma.

Antes de los tratamientos se tomó una muestra para determinar la frecuencia basal. Después de la irradiación se tomaron muestras de sangre de la

cola cada 8 horas durante 72 horas. Las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo.



7.2 Agentes químicos

Los agentes químicos utilizados en los experimentos fueron adquiridos de las siguientes marcas comerciales: Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA): agarosa y agarosa de punto de fusión bajo (APFB); Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA): BrdU, cis-Pt, Tris, cloruro de sodio, N-lauril sarcocinato de sodio,

dimetilsulfóxido, cloruro de potasio, EDTA, Triton X-100, hidróxido de sodio, bromuro de etidio (BrEt); MP Biomedicals (France): ribonucleasa A (RNasa), Ioduro de propidio; y BD Pharmingen: anticuerpo CD71 conjugado con isotocianato de fluoresceína FITC (anti-CD71-FITC).

7.3 Animales

Se emplearon ratones machos de 2 a 3 meses de edad, de la cepa ICR, con un peso promedio de 30 g, mantenidos bajo condiciones controladas de períodos de luz, temperatura (22°C), circulación de aire, alimentados con comprimidos de purina y agua *ad libitum* (Purina Lab. Chow).

Los protocolos fueron revisados y aprobados por el comité interno del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL), el cual supervisa la ética de la investigación en donde se involucra el uso de animales.

7.4 Administración de la bromodesoxiuridina y del cisplatino

7.4.1 Bromodesoxiuridina

La dosis se determinó en base a estudios previos (Morales-Ávila *et al.*, 2010). La BrdU previamente adsorbida a carbón activado (Morales-Ramírez, 1980), se administró mediante una inyección IP a la dosis indicada en los protocolos. Como referencia esta dosis representa 1/10 parte de la requerida para

obtener la tinción diferencial de las cromátidas hermanas en las células de la médula ósea, bajo las mismas condiciones de administración (Morales-Ramírez *et al.*, 1984a).

7.4.2 Cisplatino

La dosis se determinó en base a estudios previos (Morales-Ramírez *et al.*, 2004a). El cis-Pt se administró mediante una inyección IP de una suspensión acuosa a una dosis de 0.93 $\mu\text{moles/Kg}$ (EUG) o 1.0 $\mu\text{mol/Kg}$ de peso corporal (cinética de inducción de RET-MN).

7.5 Irradiación

Los ratones fueron irradiados en el Gamacell que es una fuente de cobalto 60 (^{60}Co). A una dosis aguda de 0.5 Gy. La dosis fue comprobada con dosímetros termoluminiscentes (DTL) de $\text{LiF: Mg,CuP + PTFE}$.

7.6 Procesamiento de las muestras

7.6.1 Preparación y análisis de las muestras para electroforesis unicelular en gel

7.6.1.1 Sangre periférica

Para obtener las muestras de sangre periférica, los ratones fueron puestos en tubos de plástico para inmovilizarlos con la cola extendida. Se cortó un pequeño fragmento del extremo de la cola y se tomaron dos muestras de 4 µl de sangre, que se pusieron en un tubo para microcentrífuga que contenía 1 ml de solución de Hank.

7.6.1.2 Médula ósea

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, un fémur fue disectado y se obtuvieron las células de la médula ósea por arrastre con una inyección de 0.5 ml de solución de Hank a 37°C. De ésta suspensión celular se tomaron 15 µl y se transfirieron a un tubo para microcentrífuga conteniendo 1 ml de solución de Hank fría. Las células fueron procesadas mediante la EUG previamente reportada con algunas modificaciones (Singh *et al.*, 1988; Eriksson y Nygren, 1995).

7.6.2 Electroforesis unicelular en gel

Una limitante que tenía la EUG para determinar el efecto radiosensibilizador de la BrdU en células de la médula ósea *in vivo*, lo constituía las rupturas que se generan durante la síntesis del ADN (fragmentos de Okasaki), y que aumentan la frecuencia basal de células con cauda (cometas). Estos fragmentos no pueden

distinguirse de las rupturas inducidas en el ADN por algún agente como podría ser la radiación.

Se propuso que el efecto sinérgico podía incrementar el número de células con cauda, así como la longitud de las mismas; lo que podría permitir distinguir los fragmentos producidos durante la síntesis del ADN *per se*, de los fragmentos causados por el tratamiento con radiación en las células en proliferación.

Se utilizó la EUG también conocida como ensayo cometa en su versión alcalina, descrita previamente (Singh *et al.*, 1988) con algunas modificaciones (Eriksson y Nygren, 1995). Brevemente: Las muestras de células de la médula ósea o de leucocitos de sangre periférica contenidas en solución de Hank, se centrifugaron por 10 min a 2500 rpm, después de lo cual se eliminó el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 75 μ l de APFB al 0.5% y se colocó sobre un portaobjetos cubierto con agarosa de alto punto de fusión. A las laminillas se les colocó un cubreobjetos y se metieron al refrigerador durante 5 min, ya solidificada la capa de agarosa con las células, se les quitó el cubreobjetos y se les aplicó la última capa de 75 μ l de APFB. Después se les puso un cubreobjetos encima y se refrigeraron durante 5 min. Transcurrido el tiempo se les quitó el cubreobjetos por deslizamiento y se sumergieron en solución de lisis a 4 °C por 1 h. Posteriormente, las laminillas se retiraron con cuidado del refrigerador y se colocaron en la cámara de electroforesis. La cámara se llenó hasta que el nivel cubrió completamente las laminillas con buffer alcalino para electroforesis a 4 °C preparado recientemente. Las laminillas se dejaron sumergidas en este buffer durante 40 min, para permitir el desenrollamiento del ADN y la expresión del daño sensible al álcali. Posteriormente se hizo el

corrimiento electroforético a 25 volts y 300 miliamperios durante 40 min. Al término del tiempo las laminillas se enjuagaron con buffer de neutralización y se escurrieron.

7.6.2.1 Análisis de las laminillas

Las laminillas se tiñeron con 70 µl de bromuro de etidio, y se analizaron con el objetivo de 25X, en un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Se utilizó el programa Comet IV (Perceptive Instruments).

7.6.2.1.1 Frecuencia basal de rupturas en el ADN de leucocitos de sangre periférica y en células de la médula ósea

En leucocitos de sangre periférica y en células de la médula ósea se determinó la frecuencia basal de células que tienen rupturas en el ADN, considerando la migración de la cauda en rangos. El análisis se hizo en 2 laminillas por cada muestra en 50 células de cada laminilla.

7.6.2.1.2 Índice de daño al ADN en leucocitos de sangre periférica y en células de la médula ósea

Leucocitos de sangre periférica: El daño al ADN se determinó considerando el porcentaje de células con cauda en 2 laminillas por cada muestra en 300 células por cada laminilla.

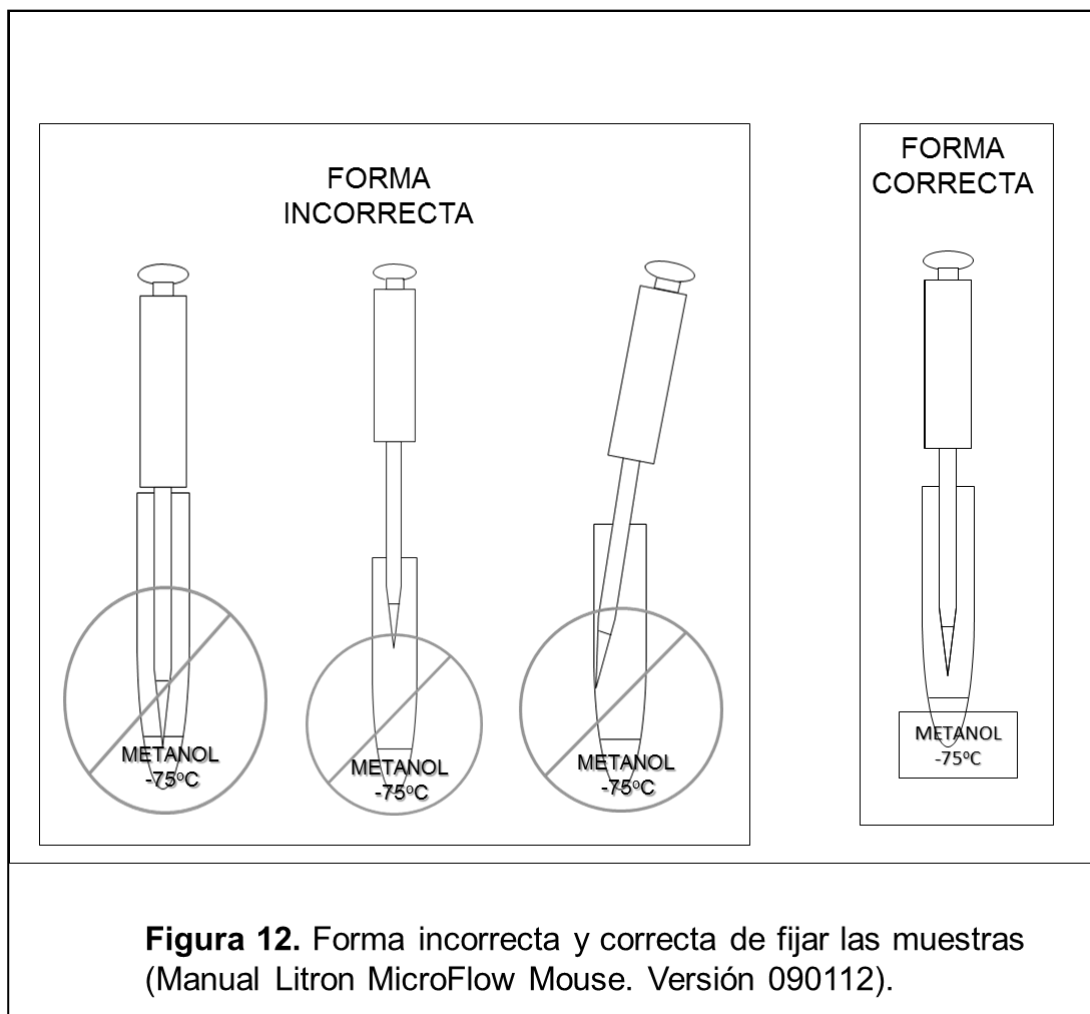
Células de la médula ósea: Para distinguir los fragmentos de ADN inducidos por los tratamientos (rupturas) de los fragmentos causados durante la síntesis del ADN (fragmentos de Okasaki), las células se agruparon considerando la migración de la cauda en rangos de 20 micras.

7.6.3 Análisis de los RET-MN mediante citometría de flujo

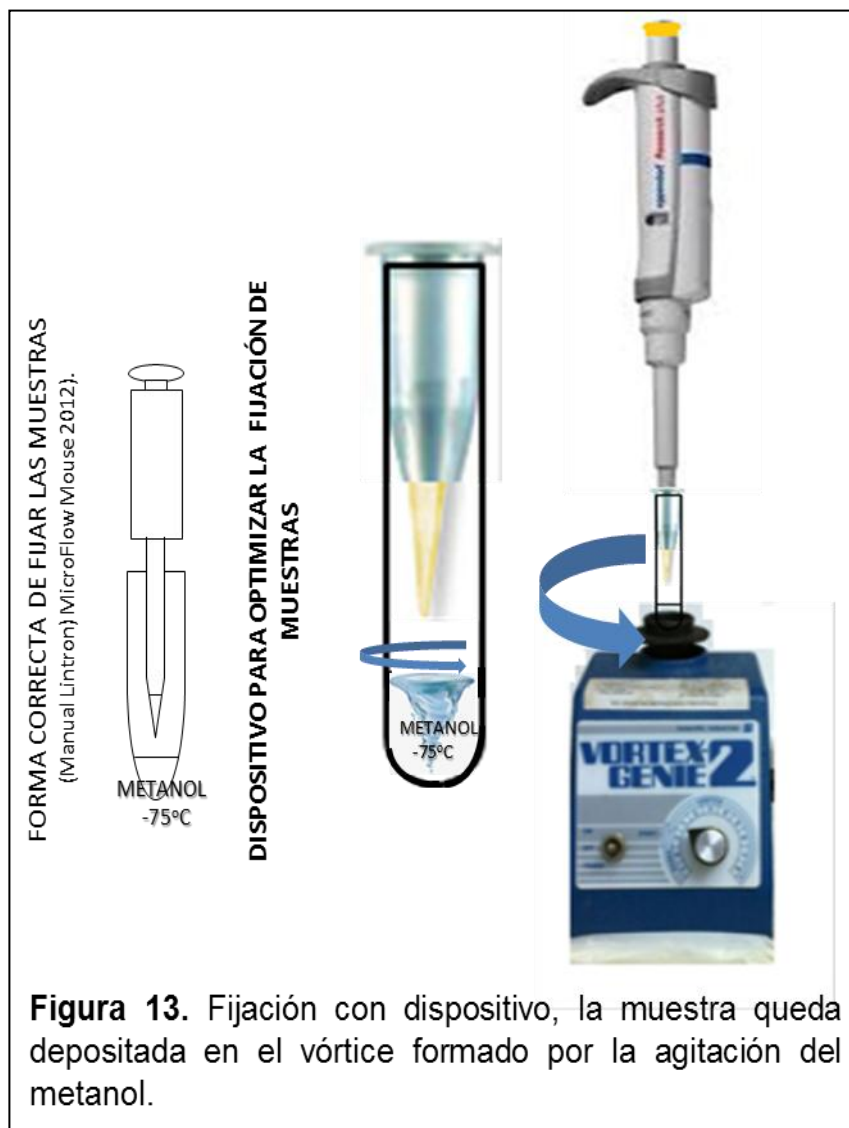
El citómetro de flujo (CF) es un instrumento analítico con el que se mide la emisión de fluorescencias y la dispersión de luz producida por células o partículas microscópicas suspendidas en líquido. La ventaja analítica de la citometría de flujo, es la posibilidad de hacer mediciones cuantitativas y multiparamétricas en un número grande de células. Lo que permite aumentar la fortaleza estadística para definir las propiedades de una población celular o de las subpoblaciones que la componen.

7.6.3.1 Obtención, fijación y marcaje de muestras para el análisis celular en el citómetro de flujo

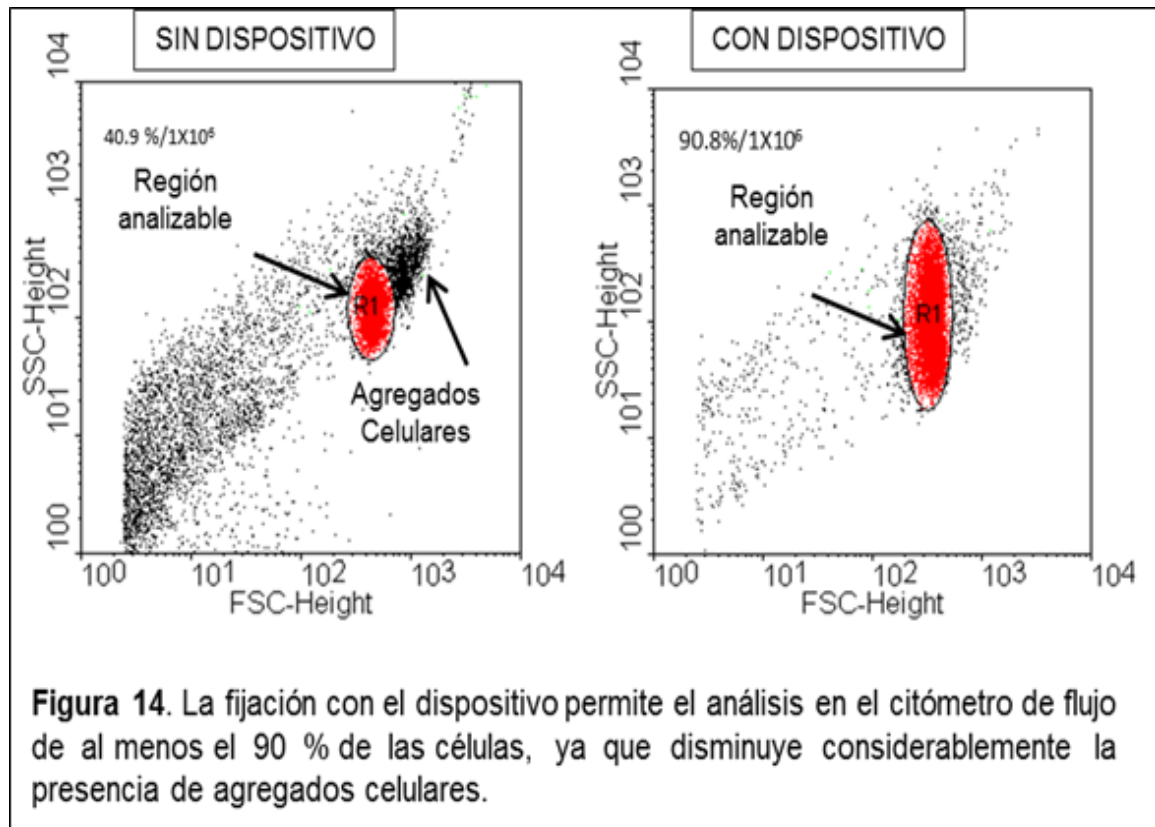
Se tomaron muestras de 25 µl de sangre de la cola de los ratones y se fijaron en 2 ml de metanol a -75° C. En el manual Litron MicroFlow Mouse (2012), indican la técnica de fijación correcta (Figura 12). La muestra no debe tocar el metanol ultrafrío; no se debe depositar la muestra muy alejada del metanol; la punta de la pipeta que contiene la muestra no debe tocar las paredes del tubo. El seguimiento de estas recomendaciones hará que la muestra no se congele antes de entrar en contacto con el fijador y que pueda fijarse correctamente. Además, el tubo que contiene el metanol ultrafrío, tiene que estar en agitación continua en un vortex, para que las células se fijen en el vórtice producido y no se formen agregados celulares. La muestra tiene que depositarse dentro del tubo a corta distancia del metanol considerando las indicaciones anteriores. La fijación también tiene que llevarse a cabo en el menor tiempo posible para que no varíe la temperatura del metanol.



Para lograr una buena fijación de las muestras hay que tener vasta experiencia y habilidad para hacerlo de forma reproducible. En el caso particular constituía un problema metodológico y para resolverlo, se utilizó dispositivo que consistió en un tubo eppendorf de 1.5 ml con el fondo recortado para que tuviera la función de un embudo (Figura 13). Esto permitió dirigir de manera lineal la punta de la pipeta para depositar la muestra en el centro del tubo de 4.5 ml, en donde se formaba el vórtice con la agitación del metanol, y permitió tener la distancia de aproximadamente 1 cm, como lo indica el manual Litron



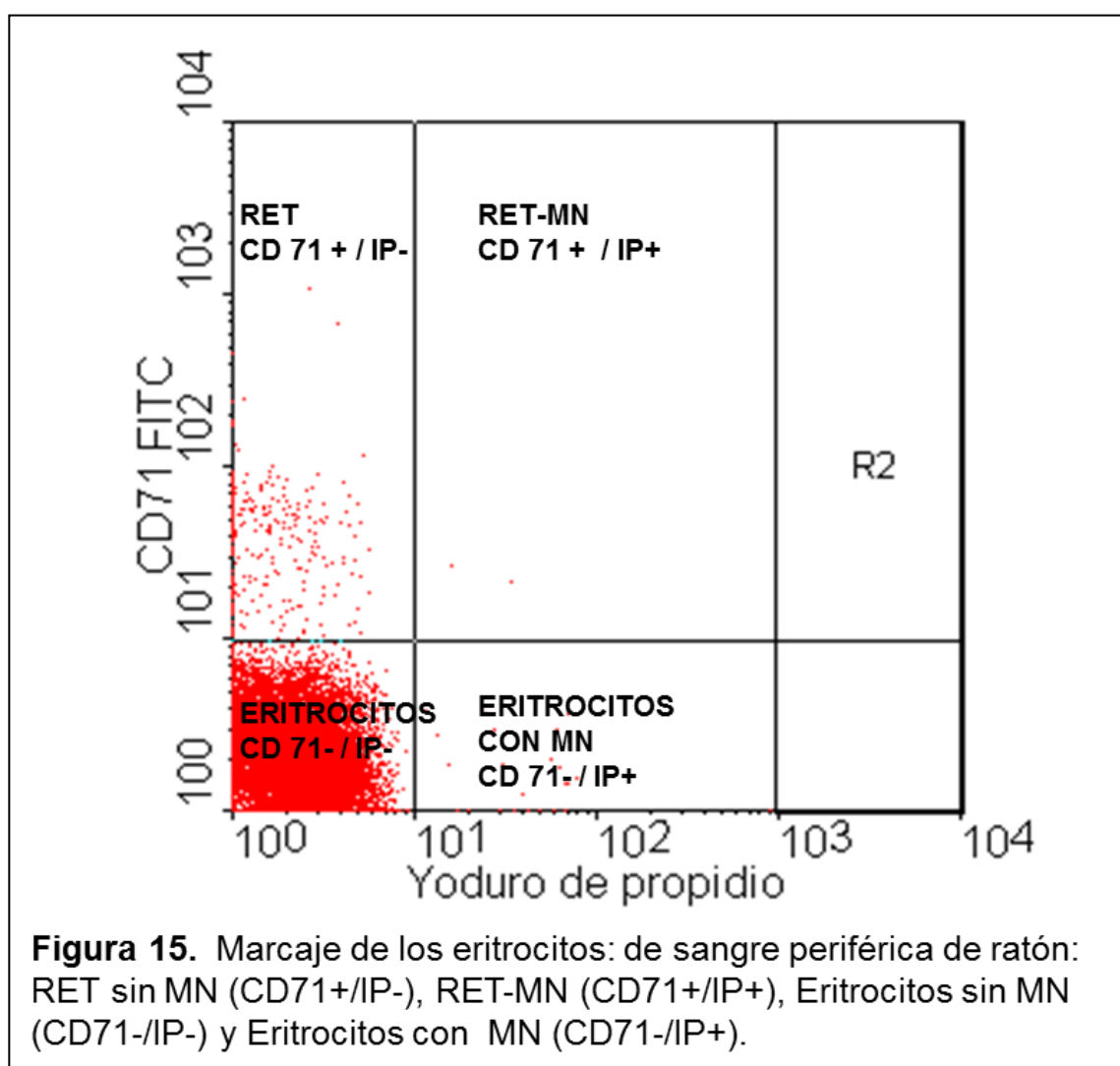
La utilización de este dispositivo aseguró la fijación correcta del material y el análisis en el CF de al menos el 90 % de las células, reduciéndose notablemente la presencia de agregados celulares que impedirían el análisis de la muestra (Figura 14).



Después de la fijación, las muestras se almacenaron a a -75° C, posteriormente fueron procesadas para su adquisición en el CF, mediante la metodología previamente reportada por Dertinger y coautores (1996), con algunas modificaciones. Se colocó 1 ml en un tubo eppendorf y se le adicionaron 7 ml de amortiguador de solución salina carbonatada (BBS). Se centrifugaron durante 5 minutos a 600 g, se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente 100 μ l. De esta dilución celular, se pusieron 25 μ l en cada uno de dos tubos Falcon para citometría, uno de los tubos contenía 80 μ l de RNasa A (1 mg de RNasa/ml) para evaluar la autofluorescencia y el otro tubo contenía también 80 μ l de RNasa A (1 mg de RNasa/ml) más 5 μ l de anti-CD71-FITC para marcar a los RET.

Las muestras se incubaron en dos periodos, el primero de 40 minutos a 4 $^{\circ}$ C y el segundo de 90 min a 22 $^{\circ}$ C. Posteriormente a todos los tubos se les

adicionaron 500 µl de BBS y se guardaron en la oscuridad a 4 °C. Las muestras que contenían el anticuerpo fueron teñidas 15 minutos previos a la adquisición de los datos con 2 µl de yoduro de propidio (820 µg/ml), para detectar el ADN de los MN. En la Figura 15, se muestra el marcaje de los eritrocitos, en el extremo superior izquierdo se encuentran los RET sin MN (CD71+/IP-), a la derecha los RET-MN (CD71+/IP+). En la parte inferior a la izquierda los eritrocitos maduros sin MN (CD71-/IP-) y a la derecha los eritrocitos maduros con MN (CD71-/IP+).



7.6.3.2 Análisis y cuantificación de los RET-MN

Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton & Dickinson, Immunocytometry Systems), el cual está equipado con un láser de argón de 488 nm. Se utilizó el programa de computadora Cell Quest para obtener los datos de 1,000,000 eventos y el análisis se realizó usando el programa WinMDI 2.9. El Anti-CD71-FICT y el ioduro de propidio fueron detectados en los canales FL1 y FL2, respectivamente. La regionalización se realizó de acuerdo a Hayashi y coautores (2007).

7.7 Análisis estadístico

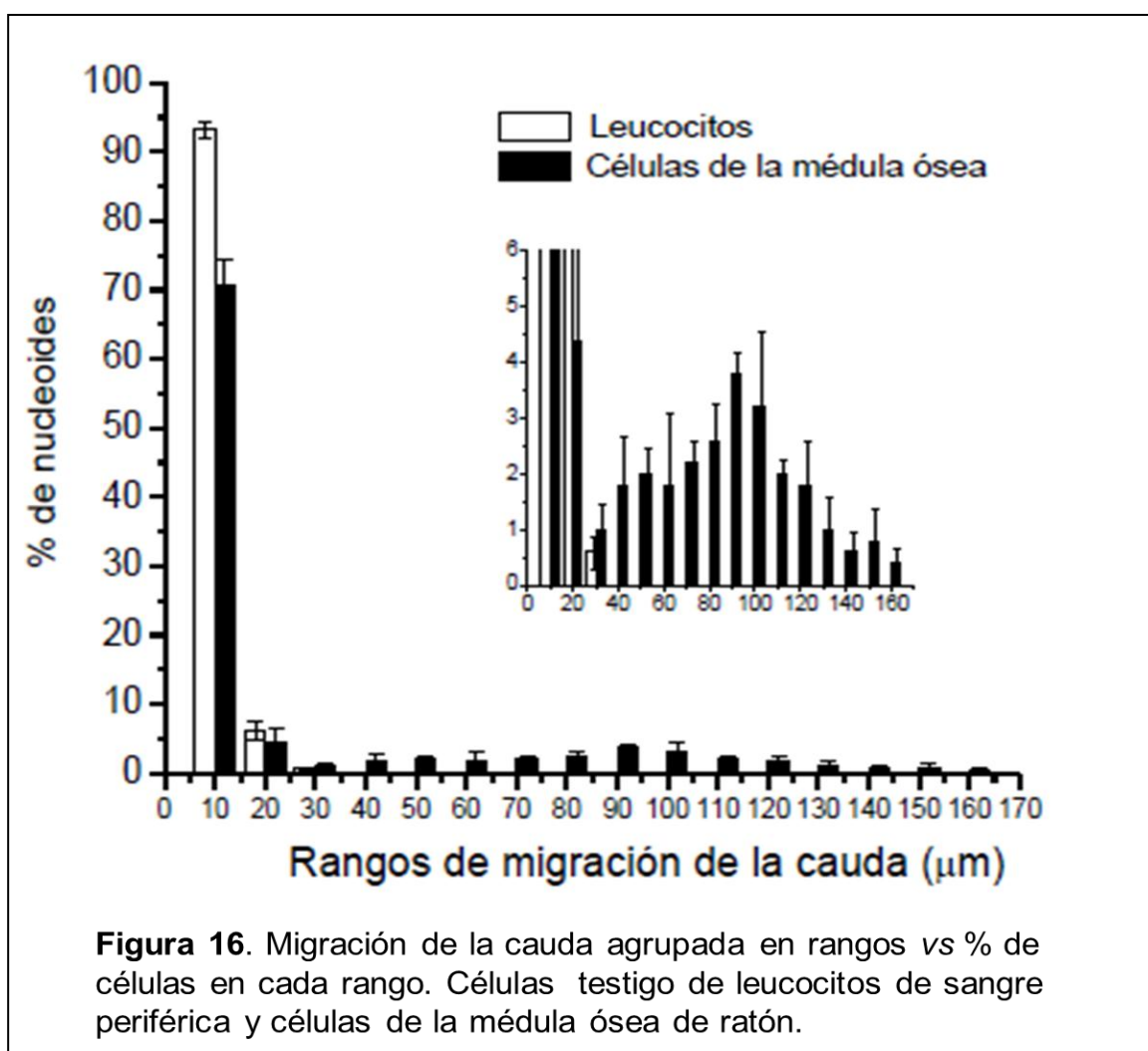
Se utilizó el programa InfoStat 2014. Se hizo la prueba de Shapiro-Wilks para determinar si los datos tenían una distribución normal. Si los datos eran paramétricos se utilizó la t de Student, si no eran paramétricos se utilizó Kruskal-Wallis. Para los resultados de RET-MN se hicieron comparaciones de las respuestas a los diferentes tiempos con respecto al valor inicial mediante la prueba t de Student para muestras pareadas. Se consideró como valor significativo $p < 0.5$.

8 RESULTADOS

8.1 Bromodesoxiuridina

8.1.2 Electroforesis unicelular en gel

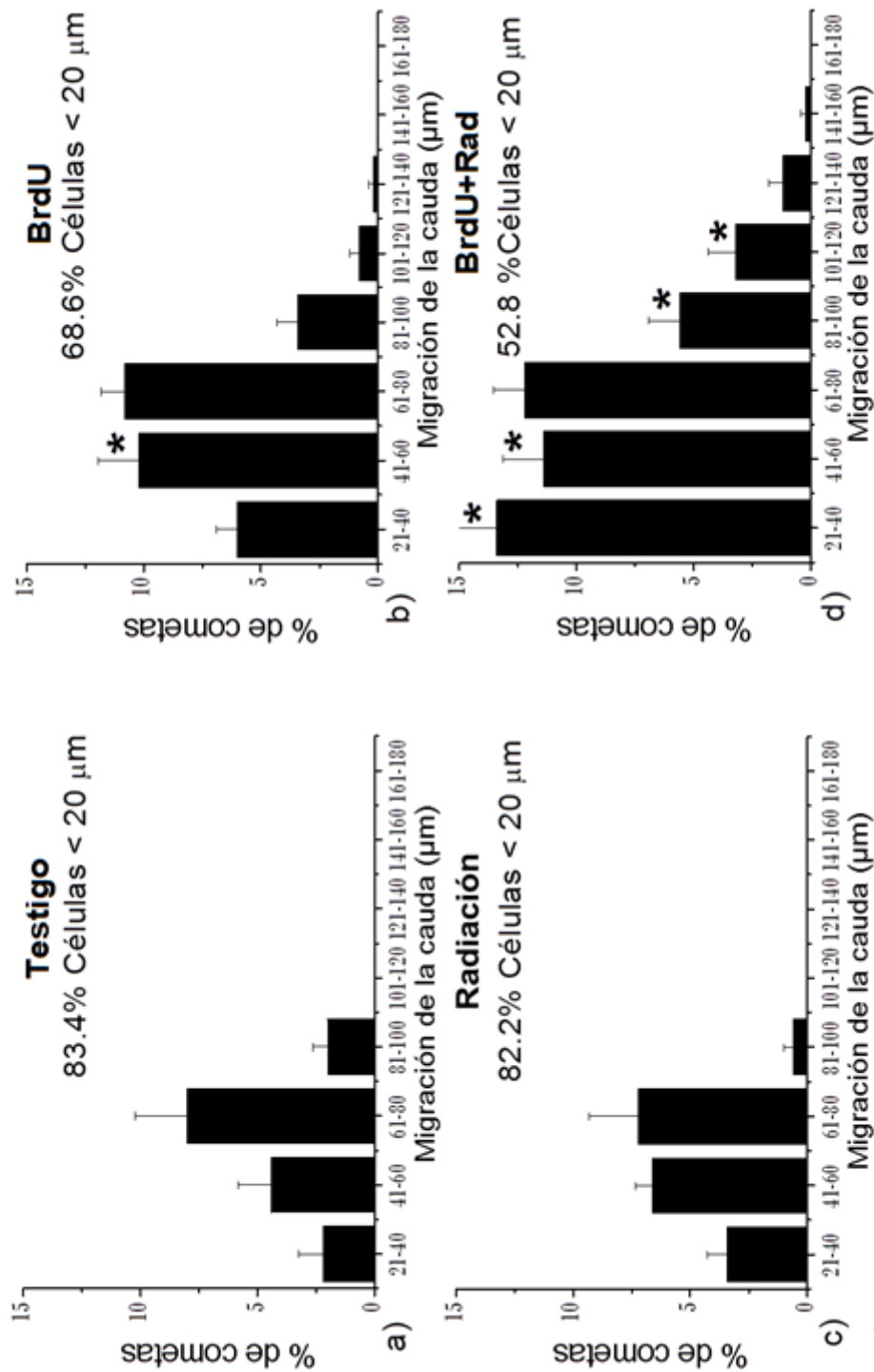
En la figura 16, se muestra la migración de la cauda agrupada en rangos y el porcentaje de células en cada uno de los rangos, de células testigo de leucocitos de sangre periférica y de células de la médula ósea de ratón (protocolo A).



Se observa que el 98 % de los leucocitos tienen migración de la cauda principalmente en el rango de 0 a 20 μm , lo que indica que las células que están en G0 como es el caso de los leucocitos, podrían presentar migración de la cauda en este rango. En tanto que las células de la médula ósea mostraron mayor dispersión en rangos de 0 a 160 μm . En donde el 75 % las células tienen pocos fragmentos y se encuentran en el rango de migración de 0 a 20 μm , como en el caso de los leucocitos, pero el 25 % de las células tienen rangos de migración de la cauda distribuidas desde 40 hasta 160 micras. Por lo que los fragmentos evidenciados en estos rangos podrían ser debidos a los fragmentos de Okasaki que se forman durante la síntesis del ADN. Con base en estos estudios, se estableció que la migración de la cauda parece ser un índice que nos permite distinguir los rangos en los que se encuentran los fragmentos inducidas por daño al ADN (rupturas), de los rangos en donde se encuentran los fragmentos causados en el ADN por la síntesis; en las células de la médula ósea que están o no en división celular.

En la Figura 17, se muestran las gráficas de distribución de frecuencias de las células agrupadas en rangos de migración de la cauda mayores a 20 μm , de ratones testigo (a), tratados con BrdU (b), con radiación (c) o ambos agentes (d), de acuerdo con el protocolo B. La evaluación del daño se realizó 30 minutos después de la irradiación. En el grupo testigo las células tuvieron migraciones de la cauda desde 21 y hasta 100 micras, en donde la frecuencia fue mayor en el rango de 61 a 80 micras. Las células con fragmentos en el ADN en este rango en el grupo testigo probablemente representan a las células que se encuentran en síntesis. En el grupo tratado con BrdU tuvieron migraciones de la cauda desde 21

y hasta 120 micras en donde la frecuencia fue mayor en los rangos que abarcan de 41 a 80 micras, habiendo diferencia significativa con valor de $p < 0.5$, con respecto al grupo testigo en el rango de 41 a 60 micras. El grupo tratado con 0.5 Gy de radiación gamma tuvo migraciones de la cauda principalmente desde 21 a 80 micras, no habiendo diferencia significativa en ningún rango con respecto a los del grupo testigo. En la Figura 17 (d), se muestra que en el grupo irradiado pretratado con BrdU, el 47.2 % de la población celular tuvo daño con migraciones de la cauda desde 21 hasta 140 μm . Se observa diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.5$) en casi todos los rangos con respecto al testigo, a excepción del rango de 61 a 80 micras.



* p < 0.05 Kruskal-Wallis con respecto al testigo

Figura 17. Distribución de frecuencias de las células de la médula ósea agrupadas en rangos de migración de la cauda mayores a 20 μm.

En la Tabla 1, se muestra el efecto de la incorporación de la BrdU en el ADN, sobre el daño producido por la radiación gamma. Los resultados fueron obtenidos con el protocolo experimental B. Se determinó la frecuencia de células con migraciones de la cauda mayores a 20 micras (MC >20 μm), 30 minutos después de la irradiación. En el grupo testigo el 16.6 % de las células tienen MC >20 μm ; se observa que tanto el grupo tratado solamente con BrdU como el tratado con ambos agentes tuvieron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.5$) con respecto al grupo testigo.

El índice de radiosensibilización (IR) se definió como el daño causado por la radiación en el ADN substituido con BrdU, con respecto al daño producido en el ADN no substituido, considerando los incrementos. Para conocer el incremento en células con MC >20 μm producido solamente por la radiación en células con su ADN substituido con BrdU (BrdU+Rad), a este grupo (MC >20 μm , 30.6) se le restó el incremento (Δ) de células con MC >20 μm producidas por el tratamiento solamente con BrdU (14.8), dando por resultado 15.8.

Para calcular el IR se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{IR} = (\Delta \text{ BrdU+Rad}) - (\Delta \text{ BrdU}) / (\Delta \text{ Rad})$$

El IR fue de 13.2, lo que indica efecto sinérgico entre ambos agentes, ya que la inducción daño en el ADN substituido con BrdU fue 13.2 veces mayor que en el no substituido.

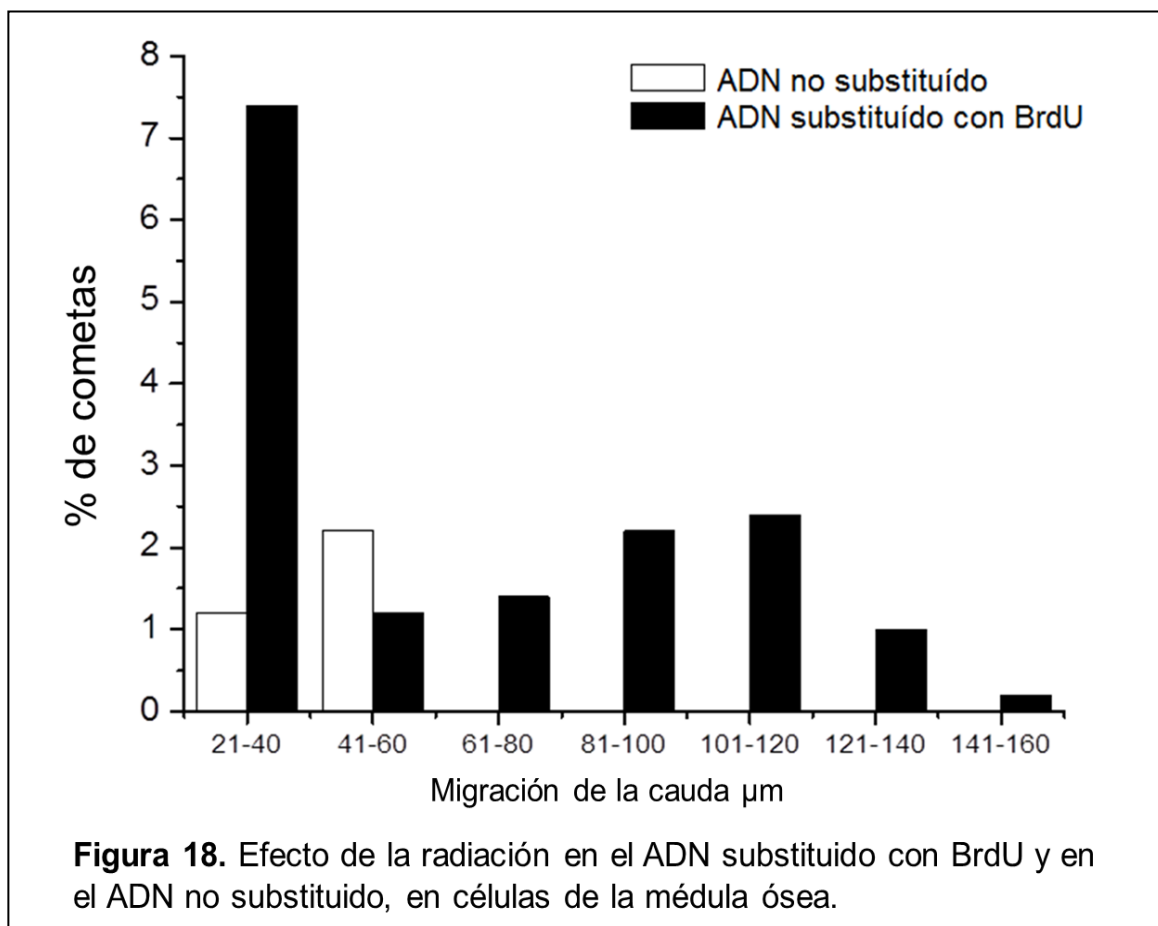
Tabla 1. Efecto de la incorporación de 0.125 mg/g de BrdU en el ADN sobre el daño inducido por 0.5 Gy de radiación gamma

	% Células con MC > 20 μm $\bar{x} \pm \text{DE}$	Incremento (Δ) (- testigo)	- Δ BrdU tratamiento	IR
Testigo	16.6 \pm 8.1			
BrdU	31.4 \pm 7.7*	14.8		
Rad	17.8 \pm 6.8	1.2		
BrdU+Rad	47.2 \pm 2.7*	30.6	15.8	13.2

MC= Migración de la cauda. Índice de Radiosensibilización (IR) = (Δ BrdU+Rad - Δ BrdU) / Δ Rad;
* Diferencia significativa vs grupo testigo. Prueba t de Student $p < 0.05$

Con las gráficas mostradas en la Figura 17, no se puede comparar el daño inducido por radiación en células con el ADN substituido con BrdU, con el daño producido en células con su ADN no substituido con BrdU. Para eliminar la frecuencia basal de fragmentos de ADN (fragmentos de Okasaki) y el efecto *per se* de la BrdU, en cada rango de migración de la cauda, se restó el valor testigo en el grupo irradiado, y en el grupo con el tratamiento combinado se restaron las frecuencias tanto del testigo como las frecuencias obtenidas en el grupo tratado solamente con BrdU.

En la Figura 18, se muestra que los ratones que fueron irradiados después de la incorporación de BrdU, tuvieron frecuencias altas de cometas en comparación con los ratones irradiados sin tratamiento con BrdU.



La irradiación de ratones pretratados con BrdU causó que se incrementara el porcentaje de células con rangos de migración de la cauda con poco daño de 21 a 40 μm , así como el de células con alto daño con migraciones de la cauda mayores a 141 micras, lo que probablemente corresponda a las células que no se encuentran en división y a las células en las que su ADN se encuentra en síntesis, respectivamente.

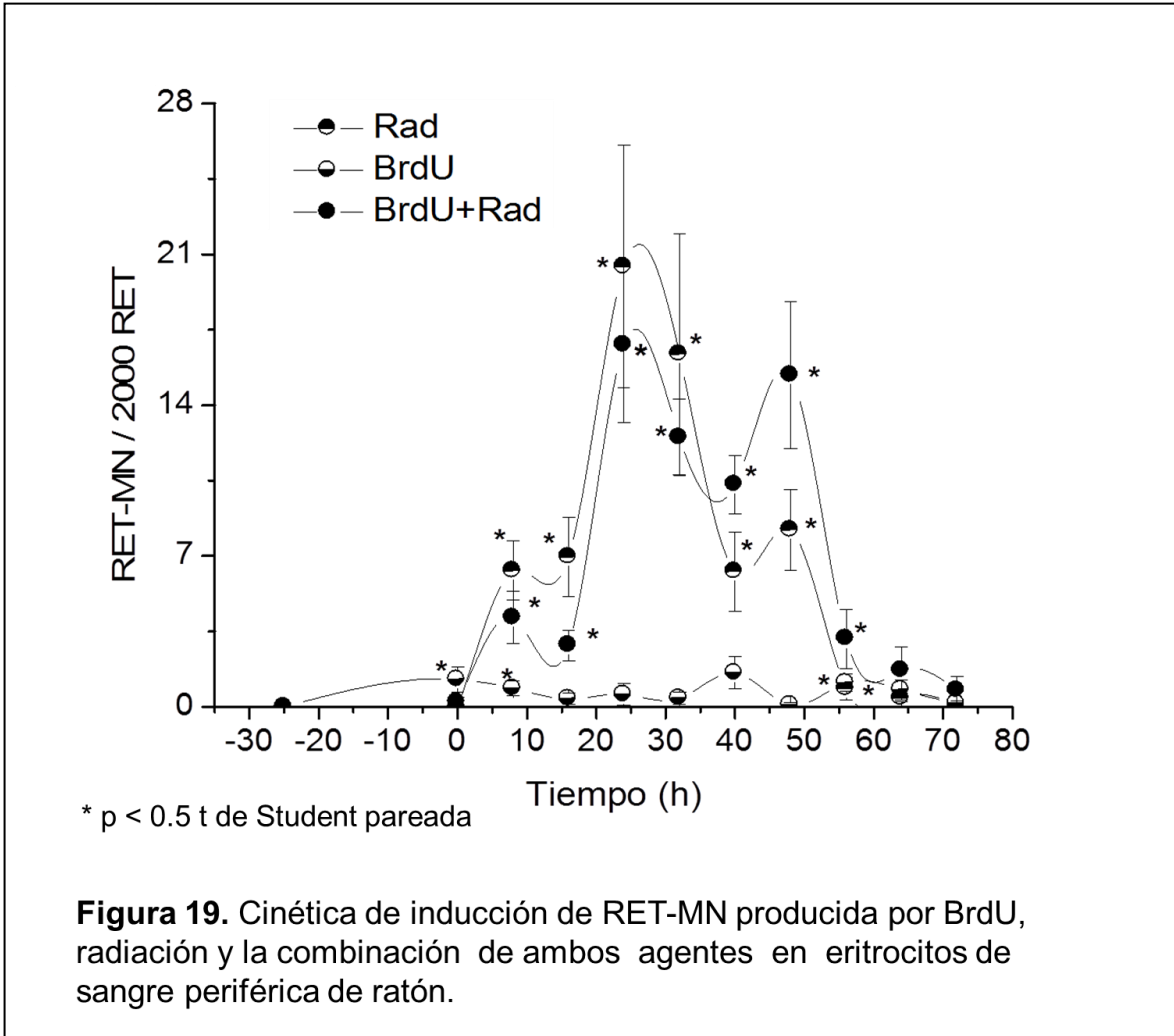
El IR calculado en la Tabla 1, en el que se consideró el porcentaje de células con MC > 20 μm , es una sobreestimación del daño, porque la migración

de la cauda representa un alto número de lesiones, y los resultados indican que las células que tuvieron más daño en los ratones irradiados con su ADN substituido con BrdU, tuvieron migraciones de la cauda en los rangos que van de 61 hasta 140 μm y que las células de los ratones que solamente fueron irradiados, tuvieron migraciones en el rango de 41 a 60 μm .

8.1.3 Cinética de inducción de reticulocitos micronucleados producida por bromodesoxiuridina, radiación gamma y la combinación de ambos agentes

La Figura 19, muestra la cinética de inducción de RET-MN producida por BrdU, radiación gamma y la combinación de ambos agentes (protocolo D), analizada con citometría de flujo. Con el programa Origin 8.0 de Microsoft se determinó el tiempo en el que se presentan los picos de inducción de RET-MN.

Se observa que la BrdU causa una leve inducción de RET-MN a las 0, 8 y 56 h, la que mostró ser significativa ($p < 0.5$) con respecto al testigo. La radiación gamma (0.5 Gy) induce una cinética que muestra una curva con tres picos, en donde el más pequeño es temprano a las 8.3 h, el pico mayor a las 29.9 h y un pico tardío a las 47.7 h. Con diferencia significativa en casi todos los tiempos con respecto al testigo.



La cinética de RET-MN producida en los ratones con el tratamiento combinado también mostró tres picos. Sin embargo, al comparar las cinéticas de inducción de RET-MN obtenidas de los ratones irradiados pretratados o no con BrdU se observó, que la presencia de la BrdU en el ADN causó un cambio importante en la cinética de inducción de RET-MN. En donde el pico principal obtenido con la radiación (segundo) fue reducido levemente y el último pico (tercero) se incrementó. Este grupo presentó diferencia significativa ($p < 0.5$) con respecto al testigo en casi todos los tiempos excepto a las 64 y 72 h. El incremento en la inducción de RET-MN se cuantificó mediante el área bajo la

curva total, así como también el ABC en el tercer pico que corresponde al intervalo de las 40 a las 72 h.

En la Tabla 2 se muestra que los grupos de ratones que fueron irradiados y pretratados o no con BrdU tienen un ABC total sin diferencia significativa entre ellos. En tanto que el ABC calculada en el tercer pico del grupo que recibió tratamiento combinado, fue de casi dos veces el valor del ABC mostrado por el grupo solamente irradiado; habiendo diferencia significativa ($p < 0.5$).

Tabla 2. Área bajo la curva total de la inducción de RET-MN y en el intervalo de 40-72 h por el tratamiento con BrdU, radiación y ambos agentes				
Tratamiento	ABC total	ABC 40-72 h	Incremento (-BrdU tratamiento)	IR
	$\bar{x} \pm DE$	$\bar{x} \pm DE$		
BrdU	68.3 \pm 35.0	23.1 \pm 16.4		
Rad	534.1 \pm 130.9	125.2\pm14.5		
BrdU+Rad	574.1 \pm 185.0 ^{ns}	242.4 \pm 94.6 [*]	219.3	1.75
* Diferencia significativa ABC Rad vs BrdU+Rad; de 40-72 h $p < 0.05$, t de Student. Índice de Radiosensibilización (IR) = (ABC BrdU+Rad) – (ABC BrdU) / (ABC Rad)				

El IR se calculó en el intervalo de las 40 a las 72 h, con la siguiente fórmula:

$$IR = (ABC \text{ combinado}) - (ABC \text{ BrdU}) / (ABC \text{ Rad})$$

El IR fue de 1.75, lo que muestra efecto sinérgico entre ambos agentes.

En la Figura 20 se muestran las curvas de las frecuencias de RET en porcentaje vs tiempo de los tres grupos. El grupo tratado solamente con BrdU mostró leve reducción a las 8, 32 y 40 h, con diferencia significativa ($p < 0.5$) con respecto al tiempo cero. A las 48 horas sobrepasó el 100 % y continuó su incremento. El grupo tratado con radiación mostró la reducción máxima de RET de aproximadamente el 50 % entre las 40 y las 48 h, posteriormente se observó incremento que sobrepasó el 100 % después de las 60 h. La frecuencia de RET del grupo que recibió el tratamiento combinado mostró reducción desde las 8 h después de la irradiación, la reducción máxima fue de las 32 a las 56 h, y luego se observó recuperación llegando al 100 % a las 72 h.

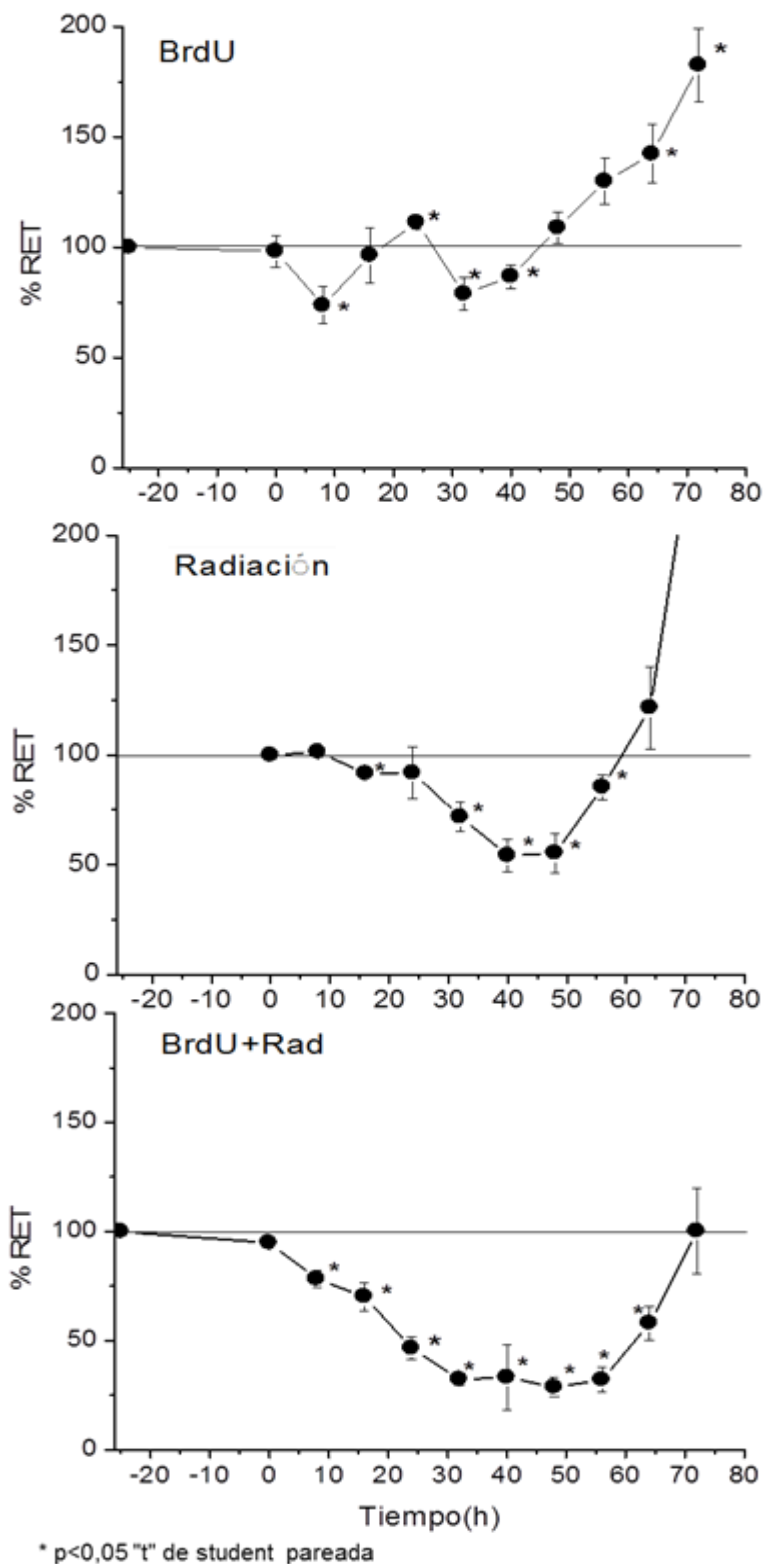
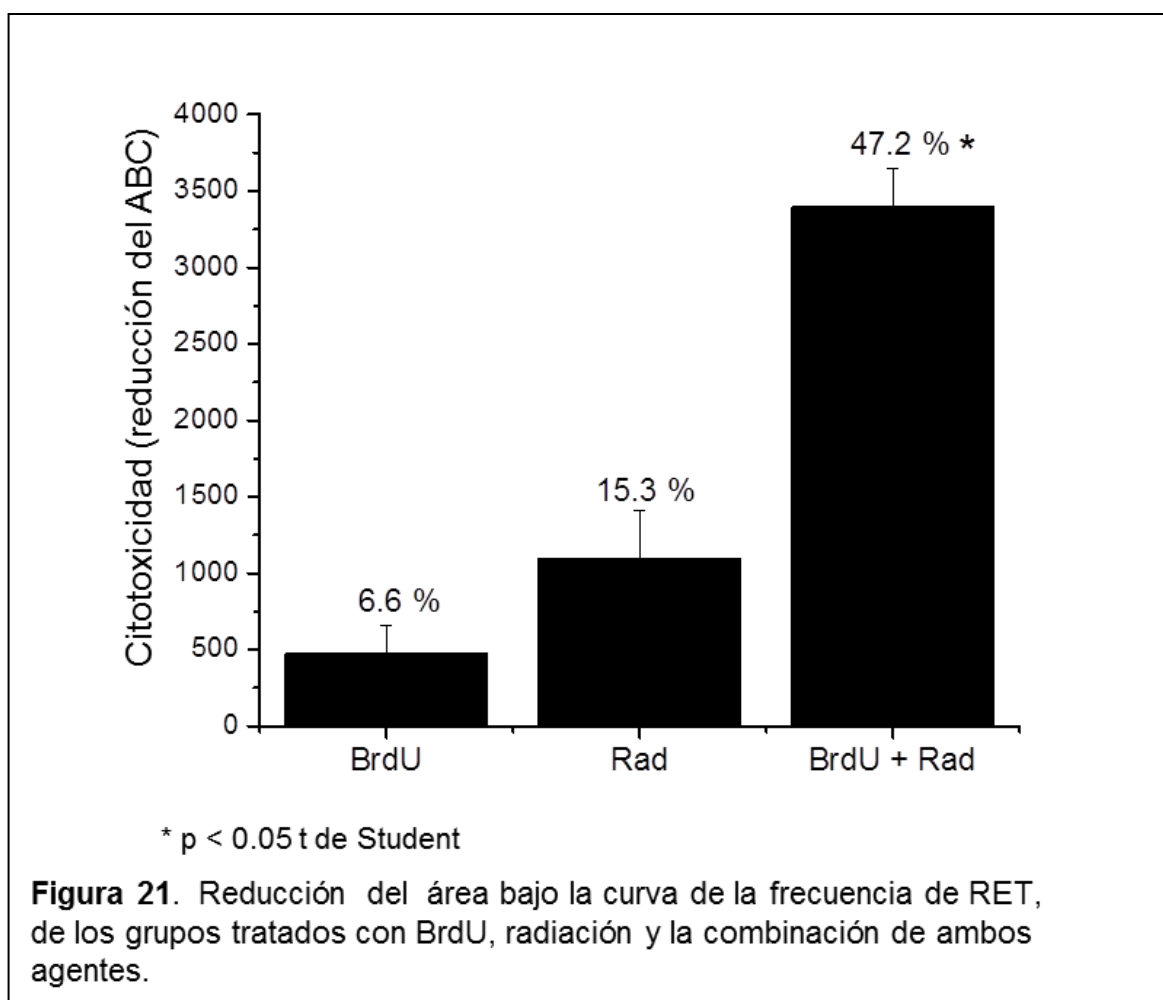


Figura 20. Frecuencias de RET en porcentaje vs tiempo, obtenido con el tratamiento con BrdU, radiación y ambos agentes.

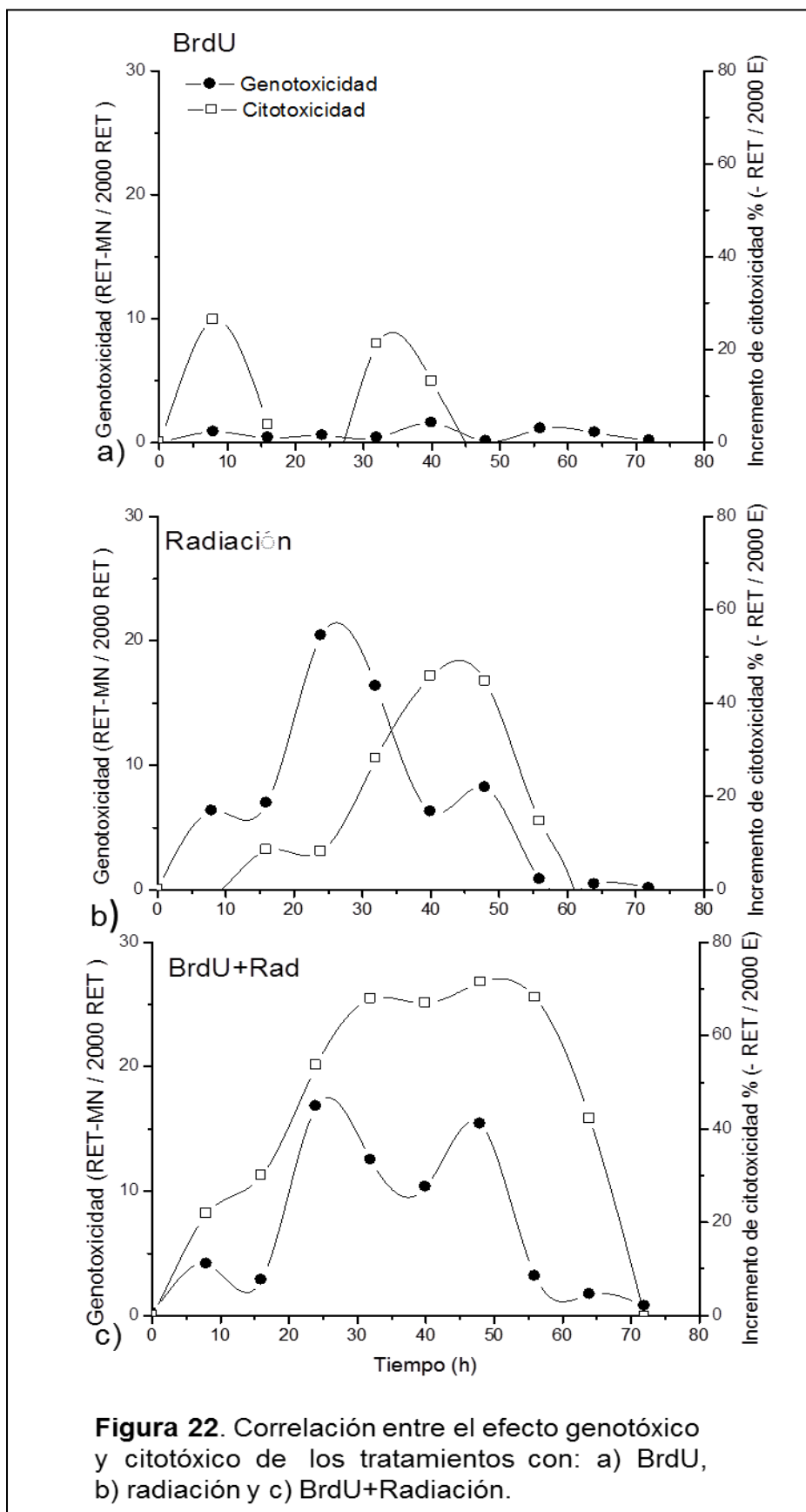
En la Figura 21 se muestra la comparación de las diferencias en citotoxicidad; para lo cual se calculó la reducción del ABCde la frecuencia de RET, asumiendo una frecuencia del 100 % a lo largo del experimento. El tratamiento con BrdU mostró reducción en la frecuencia de RET del 6.6 %, el tratamiento con radiación de 15.3 % y en el tratamiento combinado del 47.2 %, mismo que tuvo diferencia significativa ($p < 0.5$), con respecto a los tratamientos con BrdU y radiación.



Se calculó el IR del efecto citotóxico con los valores del porcentaje de reducción de la frecuencia de RET, el cual nos dio un valor de 2.6. Éstos resultados indican que bajo nuestras condiciones experimentales la dosis baja de

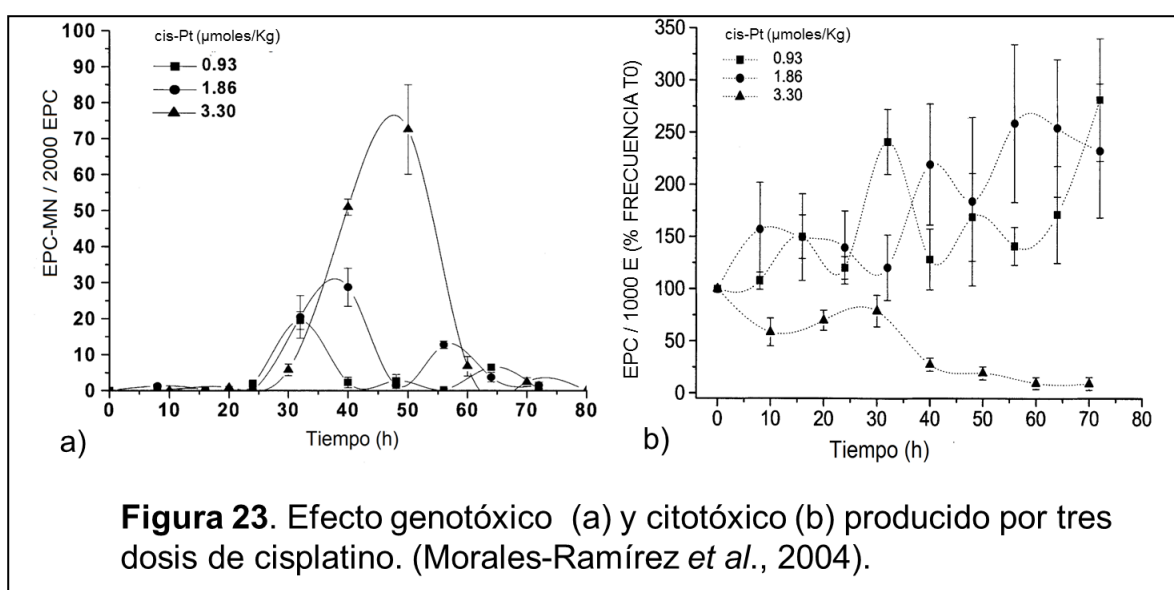
BrdU utilizada, fue suficiente para producir sensibilización a la radiación mostrando efecto sinérgico en sus consecuencias citotóxicas.

La correlación entre el efecto genotóxico y citotóxico de los tratamientos con BrdU, radiación y combinado se muestra con las curvas superpuestas en la Figura 22; a, b y c, respectivamente. Se observa que la BrdU casi no induce efecto genotóxico pero sí un leve efecto citotóxico y que ambos efectos son independientes. En el grupo solamente irradiado los picos máximos de genotoxicidad y citotoxicidad no ocurren al mismo tiempo. Primero ocurre el efecto genotóxico y después el efecto citotóxico, lo que indica que ambos efectos son independientes. En el grupo pretratado con BrdU e irradiado, se muestra que en el segundo pico de genotoxicidad las rupturas inducidas por la radiación fueron reducidas, pero se observa incremento en la citotoxicidad. El incremento en el tercer pico de genotoxicidad con respecto al observado con radiación se correlaciona con alto incremento en la citotoxicidad.



8.2 Cisplatino

La dosis de cis-Pt (1.0 $\mu\text{mol/Kg}$) se eligió basándonos en estudios previos, siendo aquella que *per se* no produjera demasiada geno- o cito-toxicidad, y que por lo tanto enmascarara el efecto radiosensibilizador. En la Figura 23 (a y b) se muestra el efecto genotóxico y citotóxico respectivamente de tres dosis de cis-Pt (Morales-Ramírez *et al.*, 2004b).

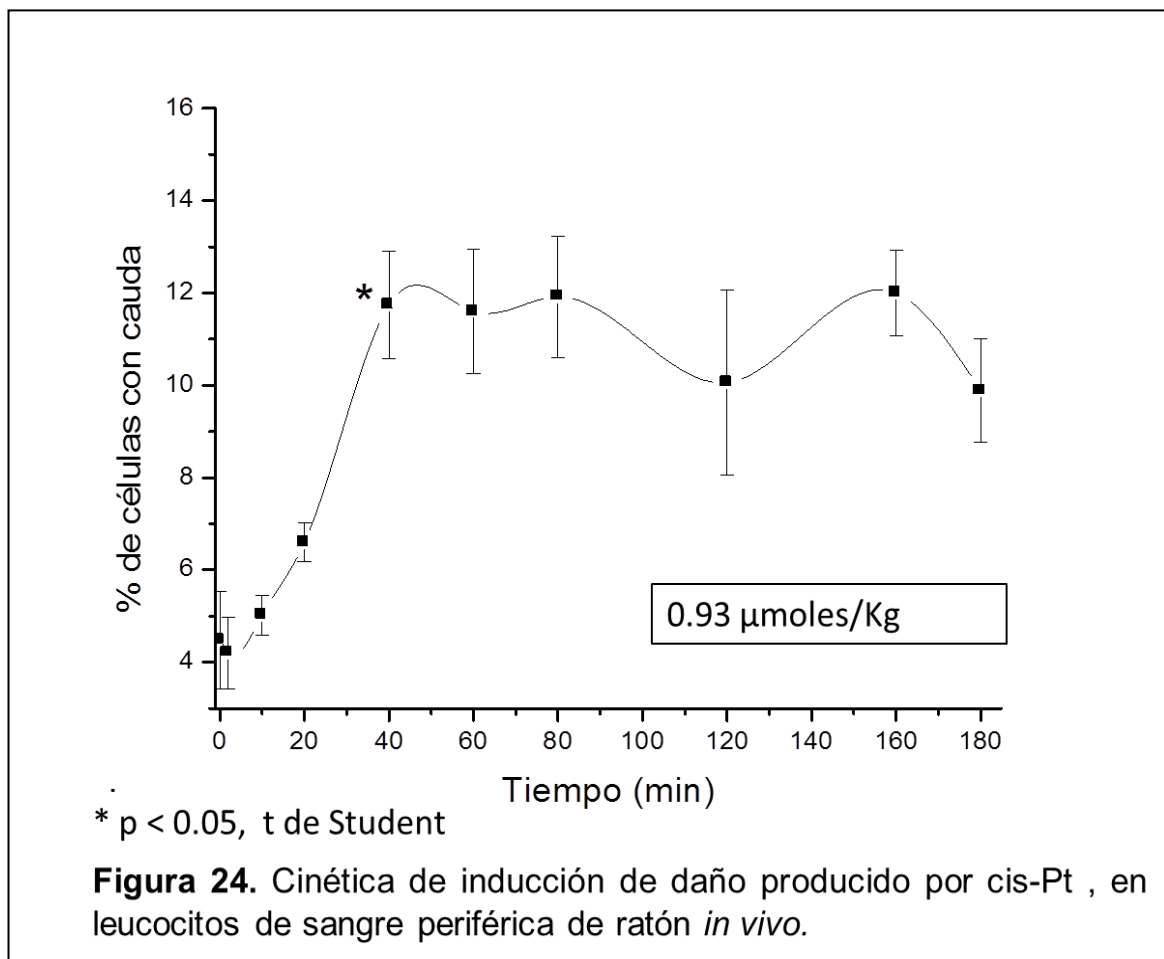


En este estudio se reportó que la eficiencia genotóxica calculada como ABC/dosis fue de 287, 298 y 422 con las dosis de 0.93 $\mu\text{moles/kg}$, 1.86 $\mu\text{moles/kg}$ y de 3.3 $\mu\text{moles/Kg}$ de cis-Pt respectivamente. Sin embargo la dosis alta fue citotóxica a las 32 h. Las dosis baja e intermedia tuvieron eficiencia similar, y considerando que se ha reportado efecto radiosensibilizador *in vitro* utilizando dosis bajas de cis-Pt y radiación (Gorodetsky *et al.*, 1998; Myint *et al.*, 2002), la dosis que se utilizó en la presente tesis para el estudio de la cinética de inducción de RET-MN, fue la de 1.0 $\mu\text{mol/Kg}$ de cis-Pt, haciendo el redondeo a la dosis baja

que permitió evidenciar su efecto, además es 22 veces menor que la LD₅₀ (Gibson *et al.*, 1991).

8.2.1 Electroforesis unicelular en gel

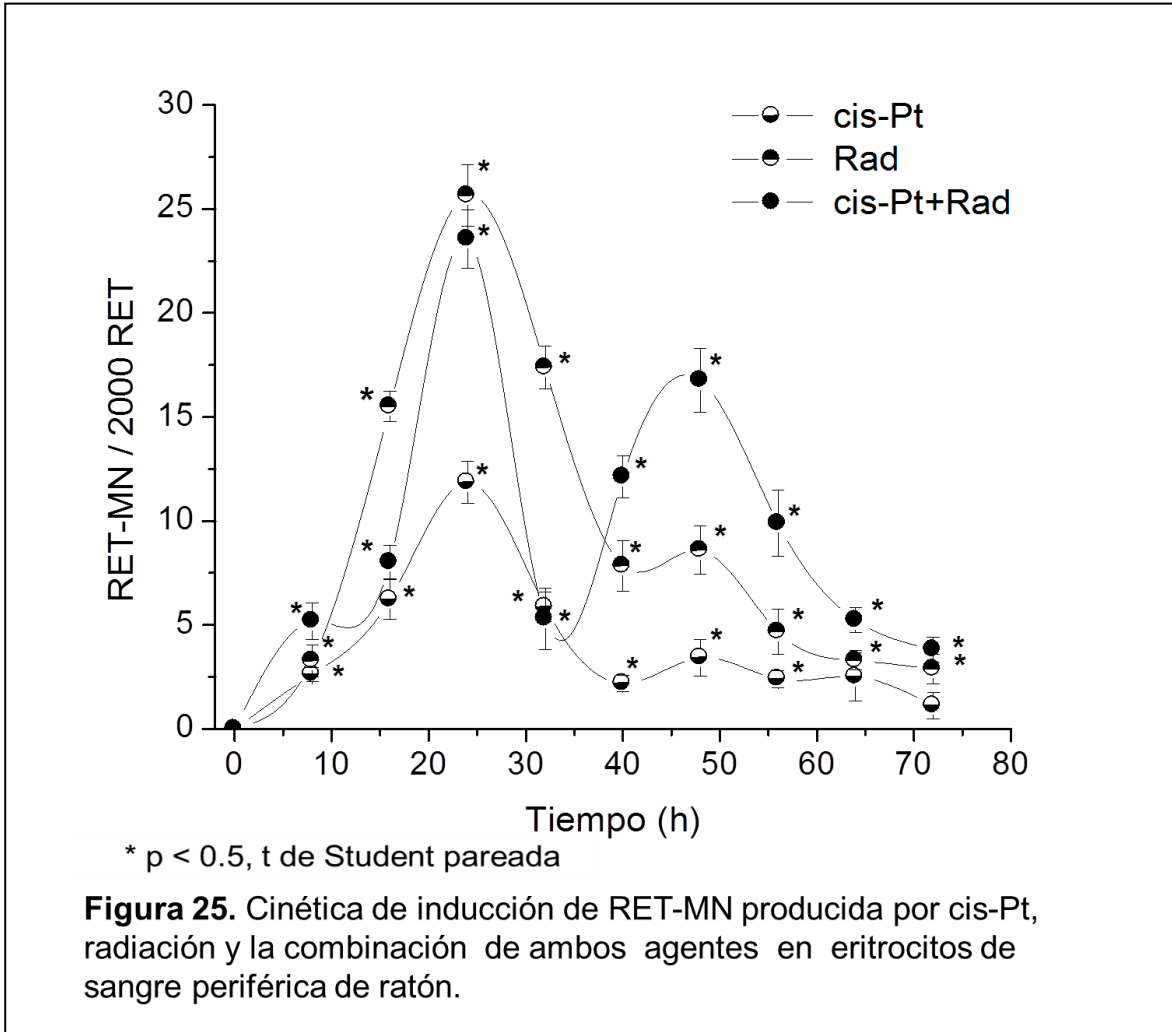
La determinación del tiempo entre la administración de cis-Pt y la radiación se hizo considerando los resultados obtenidos con la cinética de inducción de daño en leucocitos de sangre periférica de ratón *in vivo*, mediante EUG (Figura 24). En este estudio se determinó la cinética de inducción de células con cauda producidas con 0.93 μ moles/Kg de cis-Pt (Morales-Ramírez *et al.*, 2004b) (protocolo C).



Se observó que a los 40 minutos de la administración del cis-Pt el porcentaje de células con cauda aumentó 2.6 veces el valor basal, lo que indica que a este tiempo el cis-Pt ya había modificado al ADN y que como producto de estas modificaciones se producía la máxima inducción de rupturas en el ADN, lo que se hizo evidente con la EUG.

8.2.2 Cinética de inducción de reticulocitos micronucleados producida por cis-Pt, radiación gamma y la combinación de ambos agentes

En la Figura 25 se muestra la cinética de inducción de RET-MN obtenida con cis-Pt, radiación y el tratamiento combinado (protocolo E). La cinética que induce el cis-Pt presenta un pico principal y solo se sugiere un pico secundario, lo que indica que los MN se formaron principalmente por un mecanismo que ocurrió en el intervalo de las 0 a las 40 h y presentó una inducción máxima de 11.8 RET-MN a las 24 h. La radiación induce una curva con dos picos en forma de campana, en donde el primer pico que también es el principal, se encuentra en el intervalo de las 0 a las 40 h y presentó una inducción máxima de 25.8 RET-MN a las 24.3 h, siendo esta inducción de más del doble que la del cis-Pt. El pico secundario, formado en el intervalo de las 40 a las 72 h, indujo una frecuencia máxima de 8.6 RET-MN a las 47.8 h, casi tres veces la inducción observada a este tiempo para el cis-Pt. En todos los tiempos se observa diferencia significativa con respecto al tiempo cero ($p < 0.5$).



El grupo irradiado y pretratado con cis-Pt muestra un cambio importante en la cinética con respecto al grupo irradiado. Tiene tres picos de inducción de MN, el primero es temprano en el intervalo de las 0 a las 12.4 h, con inducción máxima de 5.2 RET-MN a las 8 h, el segundo y principal se encuentra en el intervalo de las 12.4 a las 34 h con frecuencia máxima de 23.4 RET-MN alrededor de las 24 h. El tercer pico se encuentra en el intervalo de 34 a las 72 h, con 17 RET-MN de inducción máxima, y se observa 1.5 h, antes que el segundo pico producido por la radiación (46.5 h), con una inducción máxima de RET-MN de casi dos veces la inducción máxima producida solamente por radiación. Las frecuencias máximas de RET-MN del pico que se forma a las 24 h con el tratamiento de radiación y el

combinado no tuvieron diferencias significativas. Sin embargo, las frecuencias máximas de RET-MN del pico que se forma a las 48 entre los grupos antes mencionados si tuvieron diferencia significativa con valor de $p < 0.05$.

En la Tabla 3, se muestran los resultados del ABC de inducción de RET-MN con respecto al tiempo. El área total obtenida en los grupos de ratones que recibieron radiación, ya sean pretratados o no con cis-Pt, no presentaron diferencia significativa. También se calculó el ABC en los picos de las 24 y 48 h, en todos los tratamientos. El ABC calculada en el pico de las 24 h, en el grupo con el tratamiento combinado fue menor con respecto al ABC del grupo tratado solamente con radiación, habiendo diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.5$). En tanto que el ABC obtenida en el pico de las 48 h, con el tratamiento combinado aumentó significativamente ($p < 0.5$) con respecto al grupo solamente irradiado.

Se calculó el IR con el ABC obtenido en cada uno de los intervalos que contenían el pico a las 48 h, para lo cual se usó la siguiente fórmula:

$$IR = (ABC \text{ combinado}) - (ABC \text{ cis-Pt}) / (ABC \text{ Rad})$$

El IR fue de 1.6, lo que muestra que el efecto sinérgico entre ambos agentes ocurre después de las 34 h.

Tabla 3. Área bajo la curva total del incremento de RET-MN y en el pico a las 24 h y en el pico a las 48 h para el tratamiento con cis-Pt, radiación y ambos agentes					
Tratamiento	ABC total	ABC del pico a las 24 h	ABC del pico a las 48 h	Incremento (pico 48h) (- tratamiento con cis—Pt)	IR
	$\bar{x} \pm DE$	$\bar{x} \pm DE$	$\bar{x} \pm DE$		
cis-Pt	301.3 ± 79.1	221.4 ± 46.6	79.9 ± 42.4		
Rad	701.3 ± 66.4 *	525.8 ± 40.2 *	175.5 ± 29.7 *		
cis-Pt + Radiación	691.4 ± 94.7 *	280.0 ± 24.6 *, **	369.1 ± 70.6 *, **	289.2	1.6
*Diferencia significativa con respecto al cis-Pt; ** Diferencia significativa con respecto a Rad, p < 0.05, t de Student. Índice de radiosensibilización: (IR)= (ABC cis-Pt+Rad)- (ABC cis-Pt)/ (ABC Rad)					

En la Figura 26 se muestra la reducción de la frecuencia de RET en función del tiempo de los tres grupos experimentales. El cis-Pt mostró leve efecto citotóxico, con aproximadamente 20 % de citotoxicidad máxima a las 45 h, con recuperación posterior. El grupo tratado con radiación mostró reducción en la frecuencia de RET en el período de las 16 a las 40 h, en donde la reducción máxima de RET fue del 37%, y recuperación que excedió el 100% después de las 54 h. El grupo con el tratamiento combinado también mostró reducción en la frecuencia de RET en el mismo período que el grupo tratado solamente con radiación, con reducción máxima del 63%, también con recuperación posterior.

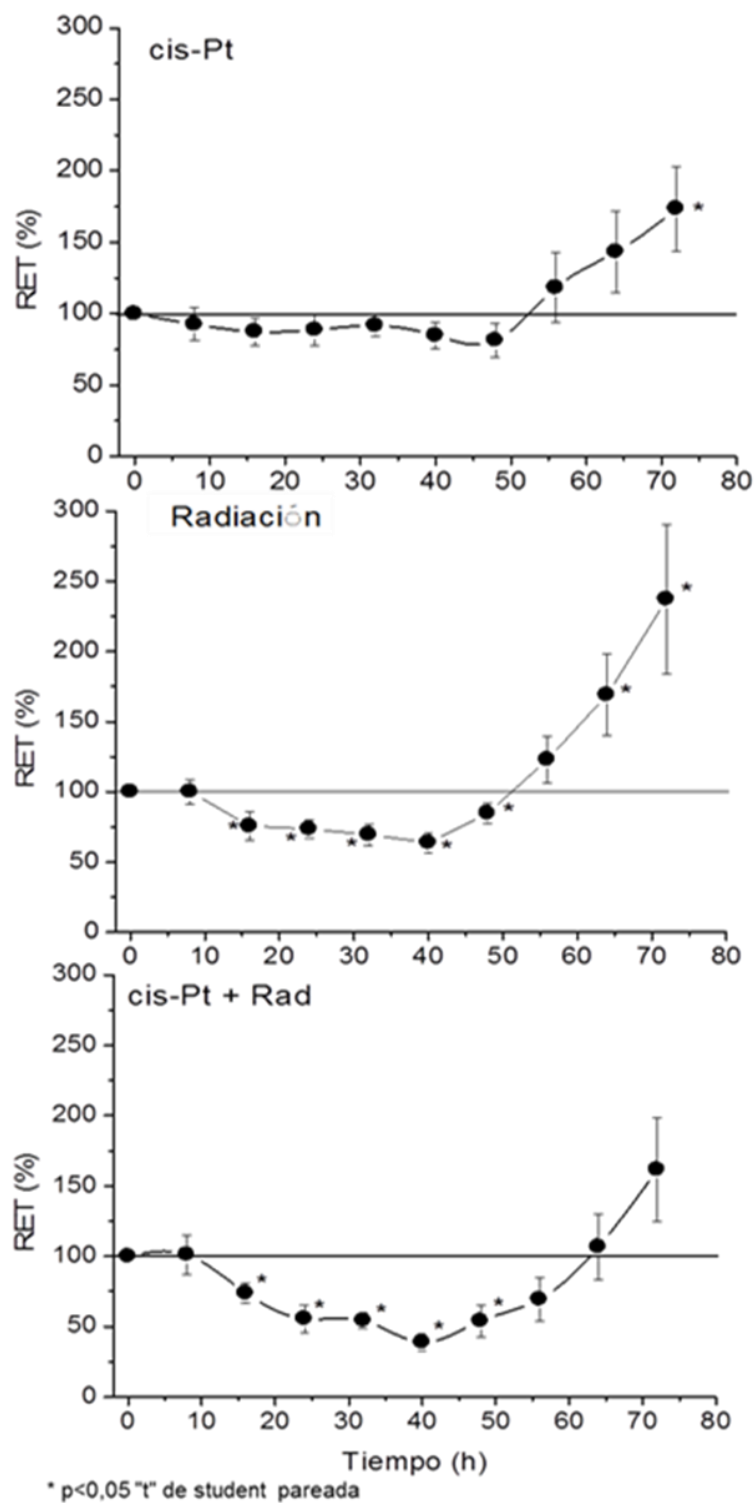
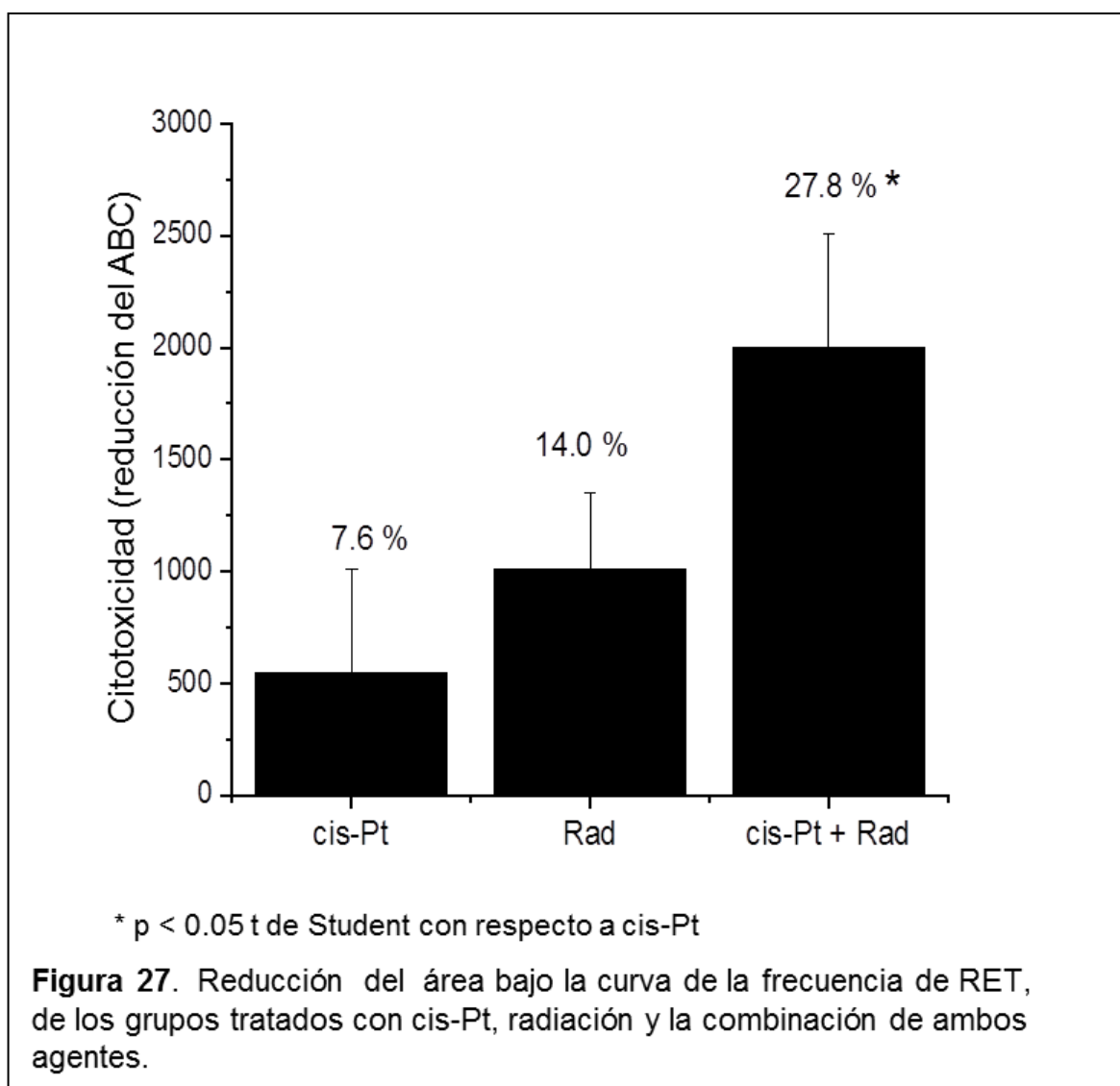
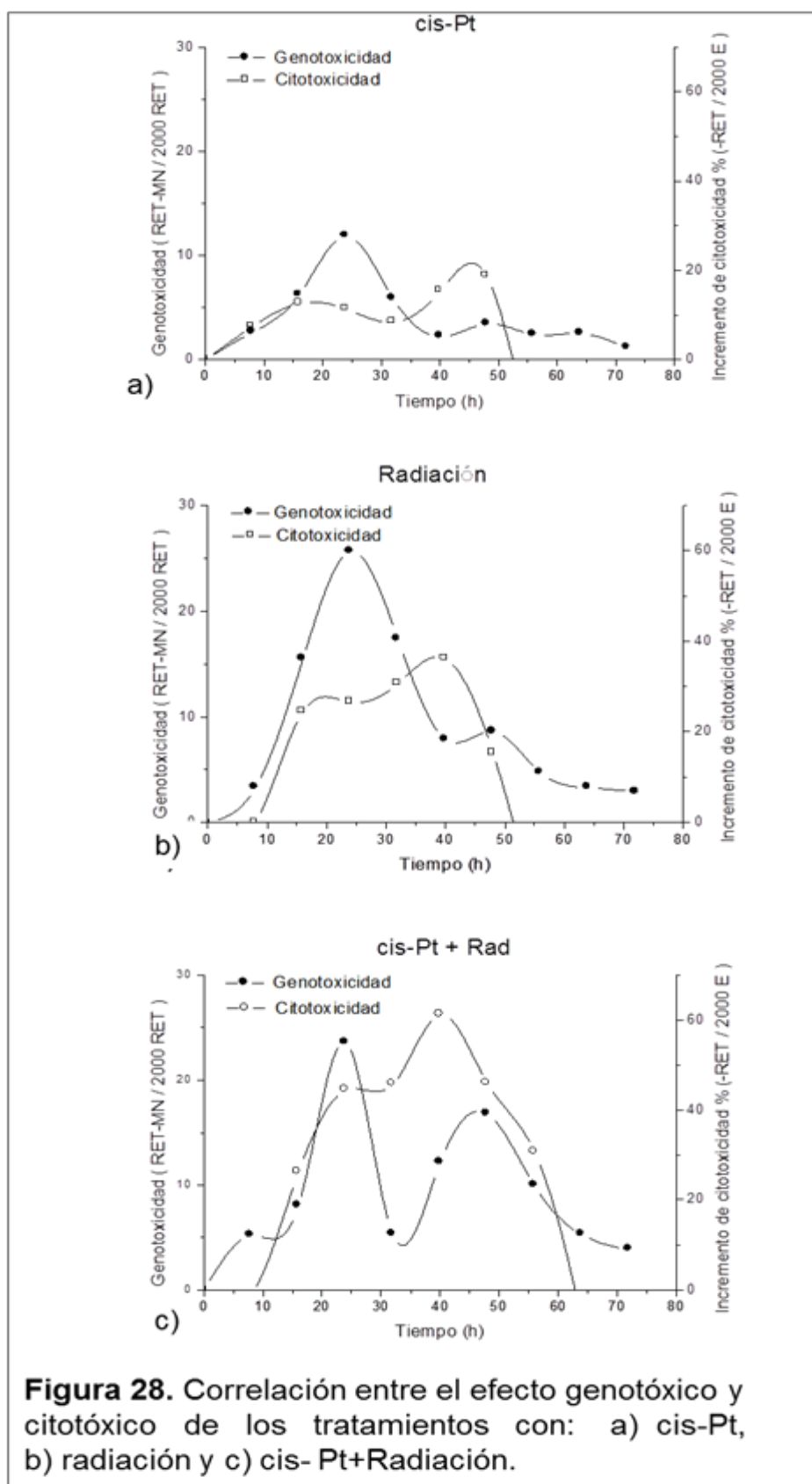


Figura 26. Frecuencias de RET en porcentaje vs tiempo, obtenido con el tratamiento con cis-Pt, radiación y ambos agentes.

En la Figura 27 se muestra la comparación de las diferencias en citotoxicidad, para lo cual se calculó la reducción del ABC de la frecuencia de RET, asumiendo una frecuencia del 100 % a lo largo del experimento. El tratamiento con cis-Pt mostró reducción en la frecuencia de RET del 7.6 %, el tratamiento con radiación tuvo una reducción de 14.0 % y en el tratamiento combinado se observó reducción del 27.8 %. Se calculó el IR del efecto citotóxico con los valores del porcentaje de reducción en la frecuencia de RET, el cual dio un valor de IR de 1.4.



La correlación entre el efecto genotóxico y citotóxico de los tratamientos con cis-Pt, radiación y combinado, se muestra con las curvas superpuestas en las Figuras 28 a, b y c, respectivamente. Se observa que el cis-Pt tuvo leve efecto genotóxico y citotóxico y que ambos efectos fueron independientes. En el grupo solamente irradiado los picos máximos de genotoxicidad y citotoxicidad no ocurren al mismo tiempo, primero ocurre el efecto genotóxico y después el efecto citotóxico, lo que indica que ambos efectos son independientes. En la Figura 28 c, se observa que en el grupo pretratado con cis-Pt e irradiado, el segundo pico de genotoxicidad coincide con el primer pico de citotoxicidad, lo que indica que podrían estar correlacionados, posteriormente la citotoxicidad continúa en aumento y se produce el tercer pico de genotoxicidad, aunque no son tiempo dependientes.



9. DISCUSIÓN

9.1 Bromodesoxiuridina

El efecto radiosensibilizador de la BrdU se ha reportado previamente en estudios *in vitro* e *in vivo* (Morales-Ramírez *et al.*, 1984b; Ling y Ward, 1990; Morales-Ávila, 2010), sin embargo la vía de radiosensibilización no ha sido completamente establecida. La interacción de la RI con las células produce ERO como el radical $\bullet\text{OH}$; también se generan \acute{e}_{aq} . Los radicales $\bullet\text{OH}$ y los \acute{e}_{aq} , se producen en proporción similar (Gantchev *et al.*, 2011), siendo el primero el que produce la mayoría del daño en el ADN, en tanto que los \acute{e}_{aq} no le causan daño (Nabben *et al.*, 1984). Se ha reportado que los \acute{e}_{aq} tienen una participación importante en el daño producido en el ADN sustituido con BrdU (Greenstock y Whitehouse, 1992), existen estudios que se han enfocado en analizar la participación del átomo de bromo en el efecto radiosensibilizador. Cecchini y coautores (2004) utilizaron oligonucleótidos artificiales con diferentes secuencias de ADN, en las que en algunas se incluyó bromouracil. En el mismo estudio, relacionaron la sustitución de la BrdU, con la formación de enlaces cruzados intercadena; los cuales se formaron en regiones con apareamientos erróneos (Cecchini *et al.*, 2004). Considerando lo anterior se ha propuesto que la radiosensibilización producida por la BrdU *in vivo* podría limitarse a regiones de cadena sencilla como los que se encuentran en los sitios de transcripción, la horquilla de replicación del ADN y posiblemente en las regiones de los bucles de los telómeros (Cecchini *et al.*, 2004). Dextraze y coautores (2009) observaron

también en oligonucleótidos, que los sitios en donde hay substitución con BrdU eran lábiles al álcali, además de la formación de enlaces cruzados intercadena solamente en la cadena semicomplementaria (llamada así por contener secuencias no complementarias que forman apareamientos erróneos) cuando el ADN estaba en conformación B.

Los estudios antes mencionados se hicieron en sistemas *in vitro* libres de células y la extrapolación de las condiciones *in vivo* o *in vitro* o a la inversa, representa problemas debido a la diferencia en las dosis y la duración del tiempo de exposición a los agentes (Morales-Ramírez *et al.*, 2017; Hentosh y Peffley, 2010). En el presente estudio con BrdU, se utilizaron dos modelos biológicos para caracterizar el efecto radiosensibilizador de dosis bajas de BrdU a dosis bajas de radiación: El primero midiendo la migración de la cauda utilizando electroforesis unicelular en gel y el segundo basado en la cinética de inducción de RET-MN. La dosis de BrdU utilizada en este estudio, fue administrada mediante la adsorción a carbón activado (Morales-Ramírez, 1980) y es equivalente a una décima parte de la dosis de BrdU que se requiere para la tinción diferencial de las cromátidas hermanas, en células de la médula ósea (Morales-Ramírez *et al.*, 1984a). Por analogía en cultivos celulares la dosis de BrdU que permite la tinción diferencial *in vitro* es 1×10^{-5} M, la cual substituye aproximadamente del 20 al 30 % de la timidina con BrdU (Perry y Evans, 1975; Lawrence *et al.*, 1990). Asumiendo que la incorporación de BrdU fue proporcional; entonces en el presente estudio la substitución de la timidina por BrdU fue aproximadamente del 2 al 3 %.

9.1.1 Electroforesis unicelular en gel

La electroforesis unicelular en gel, permitió determinar el efecto de la BrdU sobre la inducción de daño producido por radiación gamma; midiendo la respuesta de manera casi inmediata. Se conoce que la EUG es un método bien establecido que permite determinar daño (rupturas) y reparación en el ADN, esta metodología también se utiliza en estudios genotóxicológicos (Olive *et al.*, 1990; Mendiola-Cruz y Morales-Ramírez, 1999; Araldi *et al.*, 2015). Con este ensayo se pudo determinar el efecto casi inmediato de la radiación para inducir lesiones en el ADN substituido con BrdU.

En las células de la médula ósea hay la limitante para distinguir el daño causado por el tratamiento; debido a que el promedio de las células con cauda era diluido con las células sin cauda. También la presencia de células en división causa una alta frecuencia basal de células con cauda, debido a los fragmentos de Okasaki, producidos durante la síntesis del ADN. El análisis de la migración de la cauda en rangos de 20 micras permitió medir el efecto del tratamiento. Considerando que las células no dañadas por el tratamiento estaban en el rango de menos de 20 micras y que las células dañadas se encontraban en los rangos superiores a 21 μm , se incrementó la sensibilidad y fue posible determinar el porcentaje de células que fueron dañadas en la fase S del ciclo celular.

Kruszewski y coautores (2012), determinaron *in vitro* el efecto de 8 Gy de rayos X en las diferentes fases del ciclo celular; tomaron como parámetro el momento de la cauda de Olive. Los autores no encontraron diferencias en el contenido del % ADN en la cauda entre las células en diferente etapa del ciclo

celular. Debido a que el momento de la cauda de Olive es definido como el producto de la longitud de la cauda y la fracción del ADN total en la cauda, implica que la diferencia significativa observada en el momento de la cauda de Olive en el estudio mencionado, fue dependiente de la longitud de la cauda. Por lo que se estimó que la longitud de la cauda sería el parámetro más conveniente. Aunque se consideró que tanto la longitud, como la migración de la cauda, eran parámetros análogos es de tomar en cuenta de que en la longitud de la cauda, la evaluación del daño se mide desde el centro del núcleo y en la migración de la cauda la extensión del daño se mide desde el borde del núcleo. En el presente estudio se utilizó la migración de la cauda, como el parámetro más conveniente, porque la cauda en sí, inicia en el borde del nucleoide. Fue así que midiendo el tamaño de la migración de la cauda, fue posible distinguir en las células de la médula ósea, las células que estaban en la fase de síntesis de las que no lo estaban.

En las células de la médula ósea fue posible detectar las rupturas producidas por los fragmentos de Okasaki generados durante la síntesis del ADN, lo que se permitió distinguirlas de los leucocitos de sangre periférica que se encuentran en la fase G0. El análisis de la frecuencia basal de migración de la cauda en células de la médula ósea y en leucocitos, mostró que la frecuencia máxima de migración de la cauda se encontraba en ambos tipos celulares menor a 20 micras. Y las células que presentaran migración de la cauda mayor a 21 micras, serían las que tuvieron rupturas en el ADN producido por daño. Por lo que se consideró que el efecto sinérgico de la BrdU y la radiación podrían incrementar

el número de células dañadas y causar incremento en la migración de la cauda en las células que se encontraran en síntesis.

El daño producido por la dosis de radiación utilizada, no fue detectado ya que el porcentaje de células con migración de la cauda fue casi el mismo que en el grupo testigo. Sin embargo, la incorporación baja de BrdU en el ADN sensibilizó al ADN a las rupturas inducidas por la radiación. Adicionalmente, se podría distinguir entre dos niveles de daño después de la exposición a la radiación en células substituidas con BrdU en su ADN. El primero incluye migraciones de la cauda en el rango de 21 a 60 micras que fueron incrementadas, comparadas con el ADN irradiado no substituido con BrdU y el segundo incluye migraciones de la cauda en los rangos de 61 a 160 micras, que se mostraron solamente en las células con su ADN substituido con BrdU. Estos dos niveles de daño corresponden al producido en células que se encuentran o no en síntesis, respectivamente.

Los resultados obtenidos con la electroforesis unicelular en gel y la estrategia de agrupar la migración de la cauda en rangos, indicaron que las células en las que su ADN está substituido con BrdU, son más sensibles durante la síntesis del ADN, lo que concuerda parcialmente con los resultados de Cecchini y coautores (2004), además de que la substitución con BrdU las hace álcali lábiles (Dextraze *et al.*, 2009).

9.1.2 Cinética de inducción de reticulocitos micronucleados

Como se mencionó, el análisis de la cinética de inducción de MN permite determinar la participación de diferentes procesos que ocurren en la inducción de los mismos. Considerando diversos estudios *in vivo* se han podido hacer inferencias de los posibles mecanismos de acción de diferentes agentes (Morales-Ramírez *et al.*, 2014). Basados en estudios previos con radiación y agentes químicos, los picos que se presentan en la cinética de inducción de MN podrían representar diferentes mecanismos de inducción de rupturas en el ADN que son susceptibles de formar MN. En el presente estudio se hizo el análisis de la cinética de inducción de RET-MN y de la reducción en la frecuencia de RET en función del tiempo mediante citometría de flujo.

La cinética de inducción de MN obtenida con radiación gamma en el presente estudio, resultó diferente de la obtenida previamente mediante análisis al microscopio. Morales-Ramírez y coautores (1996), reportaron la presencia de un pico entre las 25 y las 30 h, dependiendo de la dosis y la presencia de un pico secundario que no se encontraba bien definido, solamente se mostraba un hombro. En el presente estudio se observaron tres picos de inducción de RET-MN, el primero es pequeño a las 8 h, el segundo pico es el principal a las 30 h y un pico mediano a las 48 h. La diferencia en las cinéticas se puede atribuir a la diferente sensibilidad a la radiación que presentan las cepas de ratones (Hamasaki *et al.*, 2007), y/o a que el método de análisis mediante citometría de flujo es más sensible (Dertinger *et al.*, 2007), y a las 8 h, cuando el efecto citotóxico es bajo se pueden evaluar 20,000 células, lo cual es un orden de

magnitud mayor a lo que se puede determinar con microscopía, y se puede detectar un leve incremento. Este pico temprano también podría explicarse por el efecto aneuploidógeno de la radiación, el cual ha sido observado en células de bazo (Hande *et al.*, 1996). En la cinética de inducción de MN reportada para agentes aneuploidógenos se ha observado, inducción temprana de MN la cual se produjo en la última división celular previo a la enucleación de los eritrocitos (Morales-Ramírez *et al.*, 2004a). Considerando que la radiación actúa de manera directa sobre las células que se encuentran en la última mitosis y por la naturaleza de la radiación que no requiere del proceso farmacocinético para producir efecto, lo que podríamos estar observando es la inducción temprana de MN causada por efecto aneuploidógeno de la radiación.

El segundo pico y principal, podría representar las rupturas generadas tanto por la acción los radicales $\bullet\text{OH}$ como por los electrones prehidratados (Nguyen *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2017). El tercer pico de inducción de RET-MN podría indicar las rupturas inducidas durante la reparación tardía de algunas lesiones causadas por la radiación gamma. El incremento tardío en la frecuencia de MN producido por radiación también ha sido observado por Dertinger y coautores en 2007. Es posible que la reparación de errores de apareamiento podría estar involucrada, ya que entre las lesiones que puede producir la radiación por la acción del estrés oxidativo que produce RL, se encuentra la 8-oxoguanina, que puede aparearse con igual eficiencia con la citosina o con la adenina (Slupphaug *et al.*, 2003), formando apareamientos erróneos que se incorporan al ADN en la primera división celular y tratan de ser reparados en la segunda división celular (Macpherson *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2010), generando

rupturas cromosómicas en la tercera división celular (Armstrong y Galloway, 1997). O fallas en la reparación de lesiones por recombinación, ya que este tipo de reparación está involucrada en la reparación de enlaces cruzados ADN-proteína (Nakano *et al.*, 2009) y ésta es una de las lesiones que puede producir la RI (Lenhert, 2015).

El grupo de ratones que recibió el tratamiento combinado, cuyo ADN estaba substituido con BrdU al momento de la irradiación, también mostró tres picos de inducción re RET-MN. El primero de ellos fue el más pequeño y como se discutió anteriormente podría ser debido al efecto aneuploidogénico de la radiación (Hande *et al.*, 1996). El segundo pico fue menor en términos de área bajo la curva; comparado con el segundo pico producido por la radiación en un ADN no substituido con BrdU, sin embargo no fue estadísticamente significativo, lo que probablemente representa las rupturas inducidas por la debrominación de la BrdU incorporada (Cecchini *et al.*, 2004). El tercer pico presentó incremento en su ABC, con respecto al grupo tratado solamente con radiación, lo que podría sugerir que representa la consecuencia de la formación de enlaces cruzados (Cecchini *et al.*, 2005) o de apareamientos erróneos (Cecchini *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2004). Hay evidencia de que la substitución de BrdU en el ADN puede inducir formas tautoméricas, con lo que se podrían producir los errores de apareamiento (He *et al.*, 2004) y se ha determinado que la radiación en los sitios con apareamientos erróneos, tienen propensión a la inducción de enlaces cruzados intercadena (Cecchini *et al.*, 2005). Por lo que sería posible que esta sean las lesiones involucradas en la producción de rupturas en el ADN.

Como ya se mencionó el ABC en el tercer pico de inducción de RET-MN en células irradiadas con su ADN substituido con BrdU, fue mayor con respecto al ABC de las células irradiadas no substituidas con BrdU. El Trmi observado en el tercer pico en células irradiadas con su ADN substituido con BrdU fue de 18 h. Considerando estudios previos con altas dosis de agentes inductores de enlaces cruzados como el cis-PT, el BUS y la BCNU (Morales-Ramírez *et al.*, 2004b), que mostraron que el último pico de inducción de MN ocurría entre las 46 a las 48 h, tendrían un Trmi de entre 21.3 a 22.3, lo que sería cercano al Trmi del tercer pico observado en el presente estudio; e indicativo de que los enlaces cruzados pueden ser las lesiones que participan en la inducción de MN en este tercer pico. El tercer pico de inducción de RET-MN observado en el grupo del tratamiento combinado, también mostró mayor efecto citotóxico que en el grupo tratados solamente con radiación. Lo que es congruente con que la abundancia de enlaces cruzados causa picos tardíos de inducción de MN, lo que probablemente, dé por resultado alta citotoxicidad.

La citotoxicidad celular se determinó midiendo la reducción en la frecuencia de RET, la BrdU *per se* solo causó leve citotoxicidad, la radiación gamma mostró citotoxicidad máxima entre las 40 y 48 h. La incorporación de BrdU anterior a la irradiación produjo incremento adicional de citotoxicidad que inició 8 h después de la radiación y persistió hasta las 64 h. Estos resultados indican que el incremento en la citotoxicidad causada por la incorporación de la BrdU al ADN, ocurrió poco tiempo después de la irradiación y que se mantuvo. Lo que sugiere que la radiosensibilización se encuentra relacionada principalmente con el mecanismo tardío de rupturas en el ADN.

Para comparar la citotoxicidad entre los grupos se calculó el ABC de RET contra tiempo, en donde el 100% representaría que no hubo cambios en la frecuencia obtenida desde el tiempo cero hasta las 72 h. Los porcentajes de citotoxicidad indicaron que la BrdU produce efecto radiosensibilizador importante, con un IR de 2.6.

En lo que respecta a la relación entre genotoxicidad y citotoxicidad, en el grupo irradiado se observa en las curvas sobrepuestas con estos dos parámetros, que el segundo pico de frecuencia de inducción de RET-MN fue más alto y que no se asocia con la citotoxicidad de manera tiempo dependiente. Sin embargo, en el grupo irradiado pretratado con BrdU las rupturas fueron levemente reducidas y hubo incremento en la citotoxicidad. Lo anterior puede sugerir que las lesiones inducidas por la radiación en el ADN substituido con BrdU fueron diferentes y más citotóxicas que las inducidas en un ADN no substituido. De manera alternativa, estas lesiones podrían estar relacionadas a rupturas simples causadas por la debrominación, las cuales son cinco veces más abundantes que las rupturas simples inducidas en el ADN no substituido (Cecchini *et al.*, 2005). Por lo que el número de lesiones podrían saturar el proceso de reparación y producir muerte celular.

Al parecer la BrdU es un excelente agente radiosensibilizador, el cual podría tener aplicaciones terapéuticas. Sin embargo, solamente se ha usado en tumores cerebrales (Kinsella *et al.*, 1984; Phillips *et al.*, 1991), en donde se utilizan dosis altas tanto de BrdU como de radiación (Matsutani *et al.*, 1988; Hegarty *et al.*, 1990; Robertson *et al.*, 1997). En este trabajo, en el que se utilizaron dosis bajas de ambos agentes, se observó un claro efecto

radiosensibilizador. Posiblemente identificando las dosis de BrdU y de radiación se podrían obtener mejores resultados terapéuticos que disminuyan los efectos secundarios; los cuales han restringido el uso terapéutico de la BrdU (Prados *et al.*, 1998). Una estrategia para mejorar los protocolos terapéuticos, podría ser la incorporación continua de dosis bajas de BrdU, que pudieran substituir determinado porcentaje del ADN en las células cancerosas, pero sin los efectos deletéreos en el paciente; seguido del tratamiento con dosis bajas de radiación como las utilizadas en el presente estudio. Se requieren más estudios para proponer un protocolo teórico.

9.2 Cisplatino

En la práctica clínica se ha utilizado el cis-Pt como un agente antineoplásico y también como agente radiosensibilizador; sin embargo y a pesar de su uso, hay incertidumbre sobre su capacidad radiosensibilizadora (Lambin *et al.*, 1993; Dolling *et al.*, 1998; Eapen *et al.*, 2004; Mokaleng y Akudugu, 2009; Quon *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014).

En estudios *in vitro*, se ha observado efecto radiosensibilizador cuando se administraron dosis bajas de cis-Pt y radiación (Gorodetsky *et al.*, 1998; Myint *et al.*, 2002). En el presente estudio para determinar la cinética de inducción de RET-MN se utilizó una dosis de cis-Pt, 22 veces menor que la LD 50 IP, en ratón y la dosis de radiación fue 0.5 Gy, siendo esta una dosis baja en comparación con los 45 Gy que pueden recibir los pacientes en dosis fraccionadas de 1.8 Gy (Glicksman *et al.*, 1994).

Se ha propuesto que el efecto sinérgico del cis-Pt puede deberse a que una vez integrado en el ADN puede incrementar el daño producido por la radiación o causar inhibición de la reparación, no siendo excluyentes estas propuestas (Seiwert *et al.*, 2007).

En plásmidos con el ADN modificado con cis-Pt, se ha que determinado que la RI puede aumentar las rupturas en el ADN de cadena simple, rupturas de cadena doble y producir enlaces cruzados intercadena (Lu *et al.*, 2007; Rezaee *et al.*, 2013; Bao *et al.*, 2014). Lo anterior debido a la acción de electrones secundarios de baja energía y la acción de los e_{aq}^- . Tanto los enlaces cruzados intercadena como las rupturas de doble cadena son difíciles de reparar y pueden ser letales (Dronkert y Kanaar, 2001; Rothkamm *et al.*, 2003), por lo que este tipo de lesiones pueden ser la vía para la radiosensibilización. Sin embargo, la vía mediante la cual el cis-Pt aumenta el efecto de la radiación no se ha establecido completamente y aún se encuentra en investigación (Schürmann *et al.*, 2018).

9.2.1 Electroforesis unicelular en gel

La electroforesis unicelular en gel, permitió establecer el tiempo entre la administración de cis-Pt y la radiación para determinar su efecto radiosensibilizador. En el presente estudio se observó que a los 40 minutos de la administración del cis-Pt, el porcentaje de células con cauda aumentó de manera significativa con respecto al valor basal. El cis-Pt *per se* no induce rupturas en el ADN, sin embargo se sabe que una vez que ingresa a las células, los átomos de cloro que contiene son desplazados por moléculas de agua y que este producto

hidrolizado es muy electrofílico, por lo que forma aductos con el ADN. La reparación de algunos de estos aductos puede formar sitiosapurínicos o apirimidínicos (AP) los cuales son lábiles al álcali y se ha reportado la presencia de sitios lábiles al álcali en células de ovario de criceto chino, tratadas con cis-Pt (Plooy y Lohnman, 1980). Por lo que los sitios AP podrían detectarse como rupturas en el ADN con la EUG. Otra alternativa para explicar las rupturas en el ADN evidenciadas mediante EUG, es el daño generado por las ERO. Se ha reportado que el cis-Pt puede generar ERO (Masuda *et al.*, 2001; Brozovic *et al.*, 2010) y se conoce que éstas, también generan daño oxidativo que puede conducir inmediatamente a rupturas en el ADN de una manera similar a como lo hace la RI mediante el mecanismo indirecto (Mendiola-Cruz y Morales-Ramírez, 1999).

El tiempo entre la administración de cis-Pt y radiación es un factor importante para determinar su efecto radiosensibilizador (Dolling *et al.*, 1998). En ratones con carcinoma mamario se observó el mayor efecto radiosensibilizador con un factor de 1.7, si el tiempo de administración entre el cis-Pt y la radiación era de 30 min (Overgaard y Khan, 1981). Johnsson y coautores (1995), observaron que el cis-Pt administrado intraperitonealmente en ratones, alcanza el pico de distribución en la mayoría de los tejidos a los 15 min, y que la formación de aductos con el ADN ocurre entre los 30 min y 4 h. Con base en lo anterior se consideró que a los 40 min, el cis-Pt ya había interactuado con el ADN y que en nuestro estudio podía ser el tiempo adecuado para exponer a la radiación a los ratones.

9.2.2 Cinética de inducción de reticulocitos micronucleados

Como se mencionó el análisis *in vivo* de la cinética de inducción de MN, permite determinar la participación de diferentes procesos que ocurren en la inducción de MN, y se han podido hacer inferencias de los posibles mecanismos de acción de algunos agente antineoplásicos (Morales-Ramírez *et al.*, 2004b). En esta parte del estudio, se determinó la cinética de inducción de RET-MN y la reducción en la frecuencia de RET en función del tiempo, causada por radiación gamma, en normoblastos de ratones pre-tratados o no con cis-Pt. El análisis también se realizó con citometría de flujo.

Basados en estudios previos con radiación y agentes químicos, se ha determinado que los picos que se presentan en la cinética de inducción de MN, representan diferentes mecanismos de inducción de rupturas en el ADN que son susceptibles de formar MN. Por lo tanto la presencia de un pico y la sugerencia de un pico secundario de inducción de RET-MN, producidos por el cis-Pt, es indicativa de la participación de un mecanismo principal de inducción de MN. Esta cinética es parecida a la observada mediante análisis al microscopio con una dosis similar (Morales-Ramírez *et al.*, 2004b), sin embargo, el pico principal ocurre 8 h después que el observado en nuestro experimento, lo que podría explicarse debido a la diferencia entre las cepas de los ratones (Hamasaki *et al.*, 2007; Mukherjee *et al.*, 2014).

El cis-Pt no induce rupturas en el ADN de manera directa, lo que implica que las rupturas que dan origen a los MN pueden ser el resultado del procesamiento de lesiones causadas por los mecanismos de reparación del ADN,

siendo predominante la reparación por escisión de nucleótidos (Galluzzi *et al.*, 2012). También hay evidencia de que el cis-Pt puede producir ERO las cuales pueden causar daño al ADN (Brozovic *et al.*, 2010) y durante el procesamiento de las lesiones se producen MN.

Se ha propuesto que el cis-Pt puede formar lesiones como el aducto cis-Pt-d(GpG), considerado como un apareamiento erróneo anormal que puede ser “tolerado” por síntesis translesión y reconocido por proteínas implicadas en la reparación de errores de apareamiento (Duckett *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1997). Sin embargo si la reparación no se lleva a cabo la lesión permanece atravesando ciclos de replicación y reparación produciéndose gaps o rupturas en las cadenas (Vaisman *et al.*, 1998), lo que podría explicar la presencia del pico sugerido a las 48 h. También podría explicarse a errores en la reparación de lesiones como los enlaces cruzados intercadena que causa en menor proporción el cis-Pt y que son más difíciles de reparar, en donde participa la reparación por recombinación (Dronkert y Kanaar, 2001).

La radiación gamma, en esta parte del estudio mostró dos picos de inducción de MN, lo que indica que éstos se formaron por dos mecanismos y no por tres como fue el caso del control positivo de radiación en el experimento en el que se determinó el efecto radiosensibilizador de la BrdU, lo que indicaría en este caso, la escasa o nula participación de la acción aneuploidogénica de la radiación

El tratamiento combinado indicó tres picos de inducción de RET-MN, el temprano ocurre a las 8 h, lo que se podría explicar considerando un leve efecto aneugénico de la radiación (Hande *et al.*, 1996; Tusell *et al.*, 1996). El segundo pico es levemente reducido en altura y más angosto con respecto al de la

radiación, en términos de ABC es 1.87 veces menor, lo que indica que la radiación indujo menor cantidad de MN en un ADN modificado con cis-Pt con respecto a las inducidas por radiación en un ADN no modificado. El ABC mostrado en el pico de las 24 h, por el tratamiento combinado es 1.26 veces mayor que con el observado por el tratamiento únicamente con cis-Pt. Lo que indicaría que se produjeron más lesiones que dieron origen a MN cuando se administró el tratamiento combinado que cuando se dio tratamiento solamente con cis-Pt. Lo anterior podría deberse a que cuando el cis-Pt ingresa a las células, pierde sus átomos de cloro por hidrólisis lo que lo convierte en un compuesto electrofílico, capaz de reaccionar con el ADN y proteínas; la contribución adicional de lesiones capaces de generar MN sería atribuida al efecto que tiene la radiación en un ADN modificado con cis-Pt. Se ha reportado que la radiación puede producir rupturas por ionización en los átomos de cloro que contiene el cis-Pt, lo que le podría aumentar su eficiencia como compuesto electrofílico para reaccionar con el material genético (Kopyra *et al.*, 2009). Esto es que el cis-Pt que no hubiera perdido sus átomos de cloro por hidrólisis, podría perderlos por ionización, implicando que al administrar el tratamiento combinado había dos vías para convertir al cis-Pt en nucleofílico, aumentando su eficiencia para reaccionar con el material genético y por lo tanto lo que se observa en el pico a las 24 h es el aumento de la cantidad de lesiones capaces de convertirse en MN con el tratamiento combinado con respecto al tratamiento solamente por cis-Pt.

El tercer pico de inducción de RET-MN observado a las 48 h con el tratamiento combinado es más alto y 2.1 veces mayor en términos del ABC que el pico mostrado solamente por la radiación a este tiempo. Esto indica que con el

tratamiento combinado, la radiosensibilización se evidenció en el pico de las 48 h, porque se produjo mayor cantidad de rupturas que dieron origen a MN. En estudios previos comparando la inducción de RET-MN con diferentes dosis de cis-Pt, se observó que dosis altas evidenciaban el pico de máxima inducción a las 48 h, lo que es sugestivo de que se formaron mayor cantidad de enlaces cruzados y que el procesamiento de estas lesiones dio origen a MN (Morales-Ramírez *et al.*, 2004b). En el presente estudio, el pico observado a las 48 h con el tratamiento combinado, indicaría que se formaron mayor cantidad de enlaces cruzados. En estudios con plásmidos modificados con cis-Pt, se ha determinado que la radiación aumenta la cantidad de enlaces cruzados intercadena (Lu *et al.*, 2007; Bao *et al.*, 2014).

En cuanto a la diferencia en citotoxicidad el tratamiento con cis-Pt mostró reducción en la frecuencia de RET del 7.6 %, el tratamiento con radiación de 14.0% y en el tratamiento combinado de 27.8 %, obteniendo Un IR del efecto citotóxico de 1.4. Estos resultados indican que el cis-Pt produce efecto radiosensibilizador genotóxico así como efecto radiosensibilizador en términos de citotoxicidad.

En lo que respecta a la relación entre genotoxicidad y citotoxicidad en el grupo irradiado, se observa en las curvas sobrepuestas con estos dos parámetros que el primer pico de frecuencia de inducción de RET-MN fue más alto y que no se asocia con la citotoxicidad de manera tiempo dependiente. Sin embargo, en el grupo irradiado pretratado con cis-Pt, se observa que el pico de inducción de RET-MN mostrado a las 24 h, se asocia con la citotoxicidad. Lo anterior puede sugerir que las lesiones inducidas por la radiación en el ADN modificado con cis-

Pt fueron diferentes y más citotóxicas que las inducidas en un ADN no modificado. Los resultados del presente estudio indican que la radiación gamma aumenta las lesiones difíciles de reparar y aumenta la muerte celular en células con su ADN modificado con cis-Pt.

El cis-Pt se está utilizando como agente radiosensibilizador en tratamientos como el cáncer cérvico uterino o el cáncer de cabeza y cuello (Cetina *et al.*, 2006; Szturz *et al.*, 2017), sin embargo utilizan dosis altas tanto de cis-Pt como de radiación, lo que conlleva a que los pacientes tengan reacciones secundarias como mielosupresión y nefrotoxicidad entre otras. En el presente estudio se observó, que bajo estas condiciones experimentales las dosis bajas de cis-Pt y radiación pueden causar efecto radiosensibilizador, similar al de la BrdU en sus consecuencias genotóxicas, no obstante produce menor efecto radiosensibilizador en sus consecuencias citotóxicas. Posiblemente identificando las dosis de cis-Pt y de radiación, así como el tiempo que transcurre entre la administración de ambos agentes se podrían obtener mejores resultados, los cuales podrían disminuir los efectos secundarios en los pacientes. Se requieren más estudios para proponer un protocolo teórico.

9.3 Bromodesoxiuridina vs. Cisplatino

La cinética de inducción de RET-MN indica que la radiación aumenta su efecto tanto en el ADN que tienen incorporado BrdU como en el ADN que se encuentra modificado con cis-Pt. Y que este efecto se observó a las 48 h en ambos casos. En el grupo pretratado con BrdU o con cis-Pt previo a la irradiación el IR dio en el primer caso un valor de 1.75 y en el segundo de 1.6, siendo

similares lo que indicaría que ambos agentes pueden tener efecto radiosensibilizador similar en sus consecuencias genotóxicas.

Es importante notar la participación de los \acute{e}_{aq} producidos por la acción indirecta de la radiación, cuando actúan en un ADN con BrdU incorporado o en un ADN modificado con cis-Pt, ya que en ambos casos se ha reportado que ocurre la formación de enlaces cruzados (Cecchini *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2007; Bao *et al.*, 2014). En estudios previos con altas dosis de agentes inductores de enlaces cruzados como el cis-Pt, busulfán y bis-cloroetil nitrosourea (Morales-Ramírez *et al.*, 2004b), mostraron que el último pico de inducción de MN ocurría de las 46 a las 48 h. Siendo a este tiempo en el que se observó el efecto radiosensibilizador producido por la radiación gamma en células que tienen su ADN sustituido con BrdU y en células con su ADN modificado con cis-Pt. Los enlaces cruzados podrían ser las lesiones que están produciendo el efecto sinérgico en ambos casos.

En términos de citotoxicidad, la BrdU mostró un evidente efecto radiosensibilizador en comparación con el cis-Pt, por lo que se podría considerar a la BrdU como un mejor agente inductor de radiosensibilización debido a que radiosensibiliza a las células tanto en sus consecuencias genotóxicas como en sus consecuencias citotóxicas.

10. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos con ambos modelos experimentales *in vivo* permitieron obtener las siguientes conclusiones:

10.1 Bromodesoxiuridina

10.1.1 Se reveló una dramática radiosensibilización *in vivo* de las células cuando tienen su ADN sustituido con BrdU, comparadas con las células no sustituidas, tanto en células en proliferación como en las que no lo están.

10.1.2 Se obtuvo la primera evidencia *in vivo*, de que las células en proliferación que tienen su ADN sustituido con BrdU, son particularmente sensibles a la acción de la radiación.

10.1.3 La radiación puede causar un leve efecto aneugénico tanto en células con su ADN sustituido con BrdU como en las no sustituidas, evidenciado mediante el análisis genotoxicocinético.

10.1.4 Las rupturas en el ADN sustituido y no sustituido con BrdU que causan MN, parecen ser producidas por la radiación gamma a través de dos mecanismos principales, probablemente debidos a fallas en la reparación por escisión y recombinación.

10.1.5 El daño inducido durante el último pico de inducción de RET-MN, se incrementó debido a la incorporación de BrdU, y probablemente está asociado a la formación de enlaces cruzados, de acuerdo con estudios previamente publicados.

10.1.6 Todos los mecanismos de inducción de rupturas por la radiación en el ADN sustituido con BrdU parecen estar correlacionados con citotoxicidad.

10.1.7 La citotoxicidad del primer pico principal de radioinducción de RET-MN es BrdU dependiente, indicando que una lesión radioinducida en el ADN sustituido con BrdU es más citotóxica o que se incrementa el número de lesiones difíciles de reparar.

10.2 Cisplatino

10.2.1 Se determinó que el cis-Pt causa a los 40 minutos la máxima inducción rupturas en el ADN, las que muy probablemente sean causadas por la presencia de sitios AP, lábiles al álcali que fueron generados durante la reparación de los aductos y/o al producto de rupturas producidas por estrés oxidante.

10.2.2 En el ADN modificado con cis-Pt aumenta el número de lesiones producidas por la radiación *in vivo*, cuantificados en las cinéticas de genotoxicidad.

10.1.3 La irradiación de células pretratadas o no con cis-Pt *in vivo* indujeron dos picos mayores en la curva de RET-MN contra tiempo, evidenciando dos mecanismos principales de inducción de MN. Probablemente correspondientes a fallas en la reparación por escisión y recombinación.

10.2.4 El pretratamiento con dosis bajas de cis-Pt incrementó la sensibilidad a la inducción tardía de MN *in vivo* a dosis bajas de radiación, probablemente a la inducción de enlaces cruzados intercadena, previamente reportados.

10.2.5 En ratones irradiados pretratados con cis-Pt, el segundo mecanismo de inducción de MN se asocia con el incremento en la citotoxicidad.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, S.K., Sarma L. & Kesavan P.C. (1994). Role of chlorophyllin as an in vivo anticlastogen: protection against gamma-radiation and chemical clastogens. *Mutation Research*. 322:209-212.

Armstrong, M.J. & Galloway S.M. (1997). Mismatch repair provokes chromosome aberrations in hamster cells treated with methylating agents or 6-thioguanine, but not with ethylating agents. *Mutation Research*. 373:167–178.

Alizadeh, E. & Sanche, L. (2012). Precursors of Solvated Electrons in Radiobiological Physics and Chemistry. *Chemical Reviews*. 112: 5578–5602. doi: 10.1021/cr300063r.

Altman, K., Gerber, G. & Okada, S. (1970). *Radiation Biochemistry*. Vol I: Cells by Shigefumi Okada. New York. Academic Press Inc.

Araldi, R.P., de Melo, T.C., Mendes, T.B., de Sá Júnior, P.L., Nozima, B.H, Ito, E.T., de Carvalho, R.F., de Souza, E.B. & de Cassia, Stocco R. (2015). Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 72:74-82. doi: 10.1016/j.biopha.2015.04.004.

Bao, Q., Chen, Y., Zheng, Y. & Sanche L. (2014). Cisplatin Radiosensitization of DNA Irradiated with 2-20 eV Electrons: Role of Transient Anions. *Journal of Physical Chemistry C Nanomaterials Interfaces*.118:15516-15524.

Baserga, R., Hongo, A., Rubini, M., Prisco, M. & Valentinis B. (1997). The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1332: F105-F126.

Basu, A. & Krishnamurthy S. (2010). Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *Journal of Nucleic Acids*. (2010) pii: 201367. doi:10.4061/2010/201367.

Berry, S.E., Garces, C., Hwang, H-S., Kunugi, K., Meyers, M., Davis, T.W., Boothman, D.A. & Kinsella T.J. (1999). The Mismatch Repair Protein, hMLH1, Mediates 5-Substituted Halogenated Thymidine Analogue Cytotoxicity, DNA Incorporation, and Radiosensitization in Human Colon Cancer Cells. *Cancer Research*. 59:1840–1845.

Bickl, M.D. & Davidson R.L. (1974). Total substitution of bromodeoxyuridine for thymidine in the DNA of a bromodeoxyuridine-dependent cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 71:2082-2086.

Bouffler, S. (2015). Evidence for variation in human radiosensitivity and its potential impact on radiological protection. *Annals of the The International Commission on Radiological Protection*. 1-10.

Bouras, A., Kaluzova M. & Hadjipanayis C. (2015). Radiosensitivity enhancement of radioresistant glioblastoma by epidermal growth factor receptor antibody-conjugated iron-oxide nanoparticles. *Journal of Neuro-Oncology*. 24:13-22. doi: 10.1007/s11060-015-1807-0.

Brozovic, A., Ambriović-Ristov, A. & Osmak M. (2010). The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Critical Reviews in Toxicology*. 40:347-359. doi: 10.3109/10408441003601836.

Brunner, T., Cengel, K., Hahn, S., Wu, J., Fraker, D., McKenna, W. & Bernhard E. (2005). Pancreatic Cancer Cell Radiation Survival and Prenyltransferase Inhibition: The Role of K-Ras. *Cancer Research*. 65:8433-8441.

Butterworth, K.T., McMahon, S.J., Currell, F.J. & Prise K.M. (2012). Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle Radiosensitization. *Nanoscale*. 4:4830-4838. doi: 10.1039/c2nr31227a.

Candelaria, M., García-Arias, A., Cetina, L., Dueñas, A. (2006). Radiosensitizers in cervical cáncer. Cisplatin and beyond. *Radiation Oncology*. 1:15. doi:10.1186/1748-717X-1-15.

Cassaret A. (1968). *Radiation Biology*. U.S.A Prentice-Hall Inc.

Cecchini, S., Girouard, S., Huels, M.A., Sanche, L. & Hunting, D.J. (2004). Single-strand-specific radiosensitization of DNA by bromodeoxyuridine. *Radiation Research*. 162:604-615.

Cecchini, S., Girouard, S., Huels, M.A., Sanche, L. & Hunting, D.J. (2005). Interstrand cross-links: a new type of gamma-ray damage in bromodeoxyuridine-substituted DNA. *Biochemistry* 44:1932-1940.

Cetina, L., Wegman, T., García-Arias, A., Candelaria, M. & Dueñas-González, A. (2006). Radiosensibilizantes en cáncer cérvicouterino. *Cancerología*. 1:4-29.

Chakravarti, A., Erkinen, M., Nestler, U., Stupp, R., Mehta, M., Aldape, K., Gilbert, M., Black, P. & Loeffler J. (2006). Temozolomide-mediated radiation enhancement in glioblastoma: a report on underlying mechanisms. *Clinical Cancer Research*. 12: 4738-4746.

Ciarimboli, G. (2012). Membrane Transporters as Mediators of Cisplatin Effects and Side Effects. *Hindawi Publishing Corporation Scientifica* ID 473829 doi: 10.6064/2012/473829.

Citrin, D. & Mitchell J. (2014). Altering the Response to Radiation: Sensitizers and Protectors. *Seminars in Oncology*. 41:848-859. doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.09.013.

Dasari, S. & Tchounwou, P.B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*. 740:364-378. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.

Davis, M.A., Tang, H.Y., Maybaum, J. & Lawrence T.S. (1995). Dependence of fluorodeoxyuridine-mediated radiosensitization on S phase progression. *International Journal of Radiation Biology*. 67:509-517.

Deans, A. & West S. (2011). DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nature reviews*. 11:467-480. doi: 10.1038/nrc3088.

Dertinger, S.D., Torous, D.K. & Tometsko, K.R. (1996). Simple and reliable enumeration of micronucleated reticulocytes with a single-laser flow cytometer. *Mutation Research*. 371:283-392.

Dertinger, S.D., Miller, R.K., Brewer, K., Smudzin, T., Torous, D.K., Roberts, D.J., Avlasevich, S.L., Bryce, S.M., Sugunan, S. & Chen Y. (2007). Automated human blood micronucleated reticulocyte measurements for rapid assessment of chromosomal damage. *Mutation Research* 626:111-119.

Dextraze, M.E., Cecchini, S., Bergeron, F., Girouard, S., Turcotte, K., Wagner, J.R. & Hunting D.J. (2009). Reaching for the other side: generating

sequence-dependent interstrand cross-links with 5-bromodeoxyuridine and γ -rays. *Biochemistry* 48:2005–2011. doi: 10.1021/bi801684t.

Dextraze M., Gantchev T., Girouard S., Hunting D. (2010). DNA interstrand cross-links induced by ionizing radiation: An unsung lesion. *Mutation Research*. 704:101–107. doi: 10.1016/j.mrrev.2009.12.007.

Dittmann, K., Mayer, C., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Raju, U., Milas, L., Chen, D., Kehlbach, R. & Rodemann H. (2005). Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 280:31182-31189.

Dolling, J.A., Boreham, D.R., Brown, D.L., Mitchel, R.E. & Raaphorst G.P. (1998). Modulation of radiation-induced strand break repair by cisplatin in mammalian cells. *International Journal of Radiation Biology*. 74:61-69.

Doyle, T., Mornex, F. & McKenna W. (2001). The Clinical Implications of Gemcitabine Radiosensitization. *Clinical Cancer Research*. 7:226-228.

Dronkert, M.L. & Kanaar R. (2001). Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutation Research*. 486:217–247.

Duckett, D.R., Drummond, J.T., Murchie, A.I., Reardon, J.T., Sancar, A., Lilley, D.M. & Modrich P (1996). Human MutS α recognizes damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U S A*. 93:6443-6447.

Eapen. L., Stewart. D., Collins. J. & Peterson R. (2004). Effective bladder sparing therapy with intra-arterial cisplatin and radiotherapy for localized bladder cancer. *Journal Urology*. 172:1276-1280.

Epstein, A.H., Lebovics, R.S., Goffman, T., Teague, D., Fuetsch, E.S., Glatstein, E., Okunieff, P. & Cook J.A. (1994). Treatment of locally advanced cancer of the head and neck with 5'-iododeoxyuridine and hyperfractionated radiation therapy: measurement of cell labeling and thymidine replacement. *Journal of the National Cancer Institute*. 86:1775-80.

Eriksson S. & Nygren J. (1995). In Comet Workshop. Prague, Aug 19-20.

Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surralles, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D. & Thomas P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. 26:125-32.

Fernet, M., Mégnin-Chanet, F., Hall, J. & Favaudon V. (2010). Control of the G2/M checkpoints after exposure to low doses of ionising radiation: Implications for hyper-radiosensitivity. *DNA Repair*. 9:48–57. doi: 10.1016/j.dnarep.2009.10.006.

Fertil, B. & Malaise E. (1981). Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 7:621–629.

Flanagan, S., Robinson, B., Krokosky, C. & Shewach D. (2007). Mismatched nucleotides as the lesions responsible for radiosensitization with gemcitabine: a new paradigm for antimetabolite radiosensitizers. *Molecular Cancer Therapeutics*. 6:1858-1868.

Foray, N., Colin, C. & Bourguignon M. (2012). 100 Years of Individual Radiosensitivity: How We Have Forgotten the Evidence. *Radiology*. 264:627-631. doi: 10.1148/radiol.12112560.

Fowler, J.F., Adams, G.E. & Denekamp J. (1976). Radiosensitizers of hypoxic cells in solid tumours. *Cancer Treatment Reviews*. 3:227-256.

Franken, N.A., Van, Bree C.V., Kipp, J.B. & Barendsen, G.W. (1997). Modification of potentially lethal damage in irradiated Chinese hamster V79 cells after incorporation of halogenated pyrimidines. *International Journal Radiation Biology*. 72:101-109.

Fukuoka, K., Arioka, H., Iwamoto, Y., Fukumoto, H., Kurokawa, H., Ishida, T., Tomonari, A., Suzuki, T., Usuda, J., Kanzawa, F., Kimura, H., Saijo, N. & Nishio K. (2002). Mechanism of vinorelbine-induced radiosensitization of human small cell lung cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 49:385-390.

Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martin, S. I., Kepp, O., Castedo, M. & Kroemer G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 31:1869–1883. doi: 10.1038/onc.2011.384.

Gantchev, T.V., Dextraze, M-E. & Hunting D.J. (2011). DNA Radiosensitization: the search for repair refractive lesions including double strand breaks and interstrand crosslinks. En Clark Chen *Selected Topics in DNA Repair*, Tech Europe. pp 417-436. ISBN: 978-953-307-606-5.

Gibson, D., Gean, K-F., Ben-Shoshan, R., Ramu, A., Ringel, I. & Katzhendle, J. (1991). Preparation, Characterization, and Anticancer Activity of a Series of cis-PtCl₂ Complexes Linked to Anthraquinone Intercalators. *Journal of Medicinal Chemistry*. 34:414-420.

Glicksman, A.S., Slotman, G., Doolittle C3rd., Clark, J., Koness, J., Coachman, N., Posner, M., DeRosa, E. & Wanebo H. (1994). Concurrent cis-

platinum and radiation with or without surgery for advanced head and neck cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 30:1043-50.

González-Beltrán, F. & Morales-Ramírez, P. (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. *Mutation Research*. 425:239-47.

Goodsell, D.S. (2003). The molecular perspective: Protein farnesyltransferase. *The Oncologist*. 8:597-598.

Gorodetsky, R., Levy-Agababa, F., Mou, X. & Vexler A.M. (1998). Combination of cisplatin and radiation in cell culture: effect of duration of exposure to drug and timing of irradiation. *International Journal of Cancer*. 75:635-42.

Granados, G.M., Arrieta, R.G. & Meneses G.A. (2016). Cáncer. Cap.1 *Tratamiento del cáncer, oncología médica quirúrgica y radioterapia* (pp 1-5). México. Manual Moderno.

Grégoire, V., Hunter, N., Milas, L., Brock, W., Plunkett, W. & Hittelman W. (1994). Potentiation of radiation-induced regrowth delay in murine tumors by fludarabine. *Cancer Research*. 54:468-474.

Greenstock C.L. & Whitehouse R.P. (1992). Radiation chemical studies of sensitization by 5-bromouridine-5'-monophosphate (5-BrUMP). *Radiation and Environmental Biophysics*. 31:1-9.

Hainfeld, J., Slatkin, D. & Smilowitz H. (2004). The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Physics in Medicine and Biology*. 49:N309-N315.

Hall, E. (1994). *Radiobiology for the radiologist*. Editorial J.B. Lippincott, Philadelphia. pp. 17-20, 107-131.

Hamasaki, K., Imai, K., Hayashi, T., Nakachi, K. & Kusunoki Y. (2007). Radiation sensitivity and genomic instability in the hematopoietic system: Frequencies of micronucleated reticulocytes in whole-body X-irradiated BALB/c and C57BL/6 mice. *Cancer Science*. 98:1840-1844.

Han, W. & Yu K. (2010). Ionizing Radiation, DNA Double Strand Break and Mutation. In: *Advances in Genetics Research*. Volume 4. Editor: Kevin V. Urbano. Nova Science Publishers, Inc. pp. 1-13.

Hande, M.P., Boei, J.J. & Natarajan .AT. (1996). Induction and persistence of cytogenetic damage in mouse splenocytes following whole-body X-irradiation analysed by fluorescence in situ hybridization. II. Micronuclei. *International Journal of Radiation Biology*. 70:375-383.

Hashemy, S., Ungerstedt, J., Zahedi, F. & Holmgren A. (2006). Motexafin gadolinium, a tumor-selective drug targeting thioredoxin reductase and ribonucleotide reductase. *Journal of Biological Chemistry*. 281:10691-10697.

Hayashi, M., MacGregor, J.T., Gatehouse, D.G., Blakey, D.H., Dertinger, S.D., Abramsson-Zetterberg, L., Krishna, G., Morita, T., Russo, A., Asano, N., Suzuki, H., Ohyama, W. & Gibson D. (2007). In Vivo Micronucleus Assay Working Group, IWGT In vivo erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. *Mutation Research*. 627:10-30.

Hegarty, T.J., Thornton, A.F., Diaz, R.F., Chandler, W.F., Ensminger, W.D., Junck, L., Page, M.A., Gebarski, S.S., Hood, T.W., Stetson P.L., et al.(1990). Intra-arterial bromodeoxyuridine radiosensitization of malignant gliomas. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 19:421-428.

Hentosh P. & Peffley D.M. (2010). The cladribine conundrum: deciphering the drug's mechanism of action. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 6:75-81. doi: 10.1517/17425250903393745.

Hickson, I., Zhao, Y., Richardson, C.J., Green, S.J., Martin, N.M.B., Orr, A.I., Hong, B-J., Kim, J., Jeong, H., Bok, S., Kim, Y-E. & Ahn G-O. (2016). Tumor hypoxia and reoxygenation: the yin and yang for radiotherapy. *Radiation Oncology Journal* 34:239-249. doi: 10.3857/roj.2016.02012.

Hsu T.C. & Somers C.E. (1961). Effect of 5-Bromodeoxyuridine on mammalian chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 47:396-403.

Hu, X., Li, H., Ding, J. & Han S. (2004). Mutagenic mechanism of the A-T to G-C transition induced by 5-bromouracil: an ab Initio Study. *Biochemistry*. 43:6361-6269.

Iliakis, J., Kurtzman, S., Pantelias, G. & Okayasu R. (1989). Mechanism of Radiosensitization by Halogenated Pyrimidines: Effect of BrdU on Radiation Induction of DNA and Chromosome Damage and Its Correlation with Cell Killing. *Radiation Research*. 119:286-304.

Johansen, I. & Howard-Flanders P (1965). Macromolecular Repair and Free Radical Scavenging in the Protection of Bacteria against X-Rays. *Radiation Research*. 24:184-200.

Johnsson, A., Olsson, C., Nygren, O., Nilsson, M., Seiving, B. & Cavallin-Stahl, E. (1995). Pharmacokinetics and tissue distribution of cisplatin in nude mice: platinum levels and cisplatin-DNA adducts. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 37:23-31.

Kahn, J., Tofilon, P. J. & Camphausen, K. (2012). Preclinical models in radiation oncology. *Radiation Oncology* 7:223. doi: 10.1186/1748-717X-7-223.

Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 7:573-84.

Kinsella, T.J., Mitchell, J.B., Russo, A., Morstyn, G. & Glatstein E. (1984). The use of halogenated thymidine analogs as clinical radiosensitizers: rationale, current status, and future prospects: non-hypoxic cell sensitizers. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 10:1399-1406.

Krishna, G., Urda, G. & Paulissen J. (2000). Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats. *Mutation Research*. 453:45–50.

Kim, J., Alfieri, A., Kim, S. & Fuks Z. (1986). The potentiation of radiation response on murine tumor by fludarabine phosphate. *Cancer Letters*. 31:69-76.

Kjellström, J., Kjellén, E. & Johnsson A. (2005). In vitro radiosensitization by oxaliplatin and 5-fluorouracil in a human colon cancer cell line. *Acta Oncologica*. 44:687-693.

Konigsberg F. (2008). *Radicales libres y estress oxidativo*. México. Manual Moderno.

Kopyra, J., Koenig-Lehmann, C., Bald, I. & Illenberger E. (2009). A single slow electron triggers the loss of both chlorine atoms from the anticancer drug

cisplatin: implications for chemoradiation therapy. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 48:7904-7907. doi: 10.1002/anie.200903874.

Kruszewski, M., Iwaneńko, T., Machaj, E.K., Ołdak, T., Wojewódzka, M., Kapka,-Skrzypczak, .L & Pojda Z. (2012). Direct use of the comet assay to study cell cycle distribution and its application to study cell cycle-dependent DNA damage formation. *Mutagenesis* 27:551-558. doi: 10.1093/mutage/ges018.

Kühne, M., Riballo, E., Rief, N., Rothkamm, K., Jeggo, P. & Löbrich M. (2004). A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Research*. 64:500-508.

Kumar, L. & Gupta S. (2016). Integrating Chemotherapy in the Management of Cervical Cancer: A Critical Appraisal. *Oncology*. 91:8-17. doi: 10.1159/000447576.

Kuramochi, M., Seki, H., Tazawa, T., Sakai, S. & Sakai Y. (1992). The micronucleus test with mouse peripheral blood on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and mitomycin C. *Mutation Research*. 278:121-125.

Kvols, L.K. (2005). Radiation Sensitizers: A Selective Review of Molecules Targeting DNA and non-DNA Targets. *The Journal of Nuclear Medicine* 46:187S-190S.

Lambin, P., Scalliet, P., Coster, B., M'Vondo, J.C., Vynckier, S., Gueulette, J. & Wambersie A. (1993). Influence of cisplatin on intestinal tolerance to photon and neutron irradiation in mice. *Radiotherapy and Oncology*. 26:73-5.

Lawrence, T.S., Davis, M.A., Maybaum, J, Stetson, P.L. & Ensminger W.D. (1990) The Effect of Single versus Double-Strand Substitution on Halogenated

Pyrimidine-Induced Radiosensitization and DNA Strand Breakage in Human Tumor Cells. *Radiation Research*. 123:192-198.

Lawrence, T.S., Davis, M.A. & Loney T.L. (1996) Fluoropyrimidine-mediated Radiosensitization Depends on cyclin E-Dependent Kinase Activation. *Cancer Research*. 56:3203-3206.

Lehnert S. (2008). *Biomolecular Action of Ionizing Radiation*. Boca Ratón, USA . Taylor & Francis Group.

Lehnert S. (2015). *Radiosensitizers and Radiochemotherapy in the Treatment of Cancer*. Boca Raton, USA. CRC Press Taylor & Francis Group.

Lett, J., Stacey, K. & Alexander P. (1961). Crosslinking of dry deoxyribonucleic acids by electrons. *Radiation Research*. 14: 349-362.

Lewin B. (2000). *Genes VII*. U.S.A. Oxford University Press.

Li, X., Sevilla, M.D. & Sanche L. (2003). DFT investigation of dehalogenation of adenine-halouracil base pairs upon low-energy electron attachment. *Journal of the American Chemical Society*. 125:8916-8920.

Ling, L.L. & Ward J.F. (1990). Radiosensitization of Chinese hamster V79 cells by bromodeoxyuridine substitution of thymidine: enhancement of radiation-induced toxicity and DNA strand break production by monofilar and bifilar substitution. *Radiation Research*. 121:76-83.

Litron MicroFlow Mouse. Micronucleus Analysis Kit. *Instruction Manual*. *MicroFlowPLUS* Kit (Mouse Peripheral Blood). Litron Laboratories Version 090112.

Lippitz, B., Halperin, E., Griffith, O., Colvin, O., Honore, G., Ostertag, C., Bigner, D. & Friedman H. (1990). L-buthionine-sulfoximine-mediated

radiosensitization in experimental interstitial radiotherapy of intracerebral D-54 MG glioma xenografts in athymic mice. *Neurosurgery*. 26:255-260.

Liu, M., Ma, S., Liu, M., Hou, Y., Liang, B., Su, X. & Liu X. (2014). Synergistic killing of lung cancer cells by cisplatin and radiation via autophagy and apoptosis. *Oncology letters*. 7:1903-1910.

Liu, Ch., Lina, Q. & Yuna Z. (2015). Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Oxygen-Dependent Radiosensitivity. *Radiation Research*. 183:487-496. doi: 10.1667/RR13959.1.

Lu, Q.B., Kalantari, S. & Wang C.R. (2007). Electron transfer reaction mechanism of cisplatin with DNA at the molecular level. *Molecular Pharmaceutics*. 4:624-628.

Lu, Q.B. (2010). Effects and applications of ultrashort-lived prehydrated electrons in radiation biology and radiotherapy of cancer. *Mutation Research*. 704:190-9. doi: 10.1016/j.mrrev.2010.01.012.

Ma, J., Wang, F., Denisov, S. A., Adhikary, A. & Mostafavi M. (2017). Reactivity of prehydrated electrons toward nucleobases and nucleotides in aqueous solution. *Science. Advances*. 3: e1701669. doi: 10.1126/sciadv.1701669.

MacGregor, J.T., Wehr, C.M. & Gould D.H. (1980) Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. *Environmental Mutagenesis*. 2:509-514.

Macpherson, P., Barone, F., Maga, G., Mazzei, F., Karran, P. & Bignami M. (2005). 8-oxoguanine incorporation into DNA repeats *in vitro* and mismatch recognition by MutS α . *Nucleic Acids Research*. 33:5094-5105.

Magda, D. & Miller R. (2006). Motexafin gadolinium: a novel redox active drug for cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*. 16:466-476.

Mahmoud-Ahmed, A., Atkinson, S. & Shun C. (2006). Early Gene Expression Profile in Mouse Brain after Exposure to Ionizing Radiation. *Radiation Research*. 165:142–154.

Maier, P., Hartmann, L., Wenz, F. & Hersikind C. (2016). Cellular pathways in response to ionizing radiation and their targetability for tumor radiosensitization. *International Journal of Molecular Sciences*. 17:pii:E102. doi: 10.3390/ijms17010102.

Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., & Kirsch-Volders M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 88:1515–1531.

Matsutani, M., Kohno, T., Nagashima, T., Nagayama, I., Matsuda, T., Hoshino, T. & Sano K. (1988). Clinical trial of intravenous infusion of bromodeoxyuridine (BUdR) for radiosensitization of malignant brain tumors. *Radiation Medicine*. 6:33-39.

Martin, L.M., Marples, B., Coffey, M., Lawler, M., Lynch, T. H., Hollywood, D. & Marignol L. (2010). DNA mismatch repair and the DNA damage response to ionizing radiation: Making sense of apparently conflicts data. *Cancer Treatment Reviews*. 36:518-527. doi: 10.1016/j.ctrv.2010.03.008.

Masuda, H., Tanaka, T., Tateishi, M., Naito, M. & Tamai H. (2001). Detection and cytotoxicity of cisplatin-induced superoxide anion in monolayer cultures of a human ovarian cancer cell line. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 47:155-60.

McDowell, L.J., Huang, S.H., Xu, W., Che, J., Wong, R.K.S., Brierley, J., Kim, J., Cummings, B., Waldron, J., Bayley, A., Hansen, A., Witterick, I., & Ringash J. (2017). Effect of Intensity Modulated Radiation Therapy With Concurrent Chemotherapy on Survival for Patients With Cervical Esophageal Carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 98:186-195. doi: 10.1016/j.ijrobp.2017.01.003.

Meidanchi, A., Akhavan, O., Khoei, S., Shokri, A., Hajikarimi, Z. & Khansari, N. (2015). ZnFe₂O₄ nanoparticles as radiosensitizers in radiotherapy of human prostate cancer cells. *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*. 46:394-399. doi: 10.1016/j.msec.2014.10.062.

Mendiola-Cruz, M.T. & Morales-Ramírez P. (1999). Repair kinetics of gamma-ray induced DNA damage determined by the single cell gel electrophoresis assay in murine leukocytes in vivo. *Mutation Research*. 433:45-52.

Meuth, M. & Green H. (1974). Induction of a deoxycytidineless state in cultured mammalian cells by bromodeoxyuridine. *Cell*. 2:109-112.

Mokaleng, B.B. & Akudugu, J.M. (2009). Modulation of the sensitivity in Chinese hamster cells to photons and fast neutrons by cisplatin, vinblastine, and bleomycin. *Cancer Journal Physiology Pharmacology*. 87:347-52. doi: 10.1139/y09-017.

Morales-Ávila, E., Ferro-Flores, G., Vallarino-Kelly, T. & Morales-Ramírez P. (2010). Effect of BrdU incorporation into DNA on genotoxic and cytotoxic action of bone seeker radiopharmaceutical (153Sm-EDTMP) in murine bone marrow cells in vivo. *Radiation Research* 173:386-391. doi: 10.1667/RR1920.1.

Morales-Ramírez, P. (1980). Analysis in vivo of sister chromatid exchange in mouse bone-marrow and salivary gland cells. *Mutation Research*. 74:61-69.

Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T. & Rodríguez-Reyes R. (1984a). The detection of SCE in rodent tissues using the activated charcoal-bromodeoxyuridine system. *Basic Life Sciences*. 29B:599-611.

Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T. & Rodríguez-Reyes R. (1984b) In vivo persistence of sister chromatid exchanges (SCE) induced by gamma rays in mouse bone marrow cells. *Environmental Mutagenesis*. 6:529-37.

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

Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T., Mercader-Martínez, J. & Rodríguez-Reyes R. (1994). Induction of micronuclei by acute and chronic exposure in vivo to gamma rays in murine polychromatic erythrocytes. *Mutation Research*. 341:47-55.

Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T. & Rodríguez-Reyes R. (1996). Effect of chlorophyllin on gamma ray induced micronuclei polychromatic erythrocytes of murine peripheral blood determined by the ABC strategy. *Mutation Research*. 367:51-56.

Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T., Anguiana-Orozco, R. & Rodríguez-Reyes R. (1997). Pharmacokinetic parameters of genotoxic activity inferred from the comparison of the kinetics of MN-PCE induced by chemical agents and ionizing radiation. *Mutation Research*. 391:127-134.

Morales-Ramírez, P. & Vallarino-Kelly, T. (1998), Pharmacokinetic parameters determined from the clastogenic activity of ethylnitrosourea and dimethylnitrosamine in mice in vivo. *Mutation Research*. 412:315-322.

Morales-Ramírez, P. & Vallarino-Kelly T. (1999). Relationship between of micronuclei induction and the mechanism of chromosome break formation by methylnitrosourea in mice in vivo. *Mutation Research*. 427:31-38.

Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T. & Cruz-Vallejo V. (2004a) Kinetics of micronucleated polychromatic erythrocyte (MN-PCE) induction in vivo by aneuploidogens. *Mutation Research*. 565:79-87.

Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T., Cruz-Vallejo, V.L., López-Iturbe, R. & Alvaro-Delgadillo H. (2004b) In vivo kinetics of micronuclei induction by bifunctional alkylating antineoplastics. *Mutagenesis* 19:207-213.

Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T. & Cruz-Vallejo, V.L. (2008). Mechanisms of DNA breaks induction in vivo by 5-azacytidine: paths of micronucleus induction by aza C. *Journal of Applied Toxicology*. 28:254-259.

Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T. & Cruz-Vallejo V.L. (2010). Effect of O6-chloroethylguanine DNA lesions on the kinetics and mechanism of micronucleus induction in vivo. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 51:236-242. doi: 10.1002/em.20538.

Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T. & Cruz-Vallejo V. (2014). Kinetics of micronucleus induction and cytotoxicity caused by distinct antineoplastics and alkylating agents in vivo. *Toxicology Letters*. 224:319–325. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.11.012.

Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T. & Cruz-Vallejo V. (2017).

Genotoxicity kinetics in murine normoblasts as an approach for the in vivo action of difluorodeoxycytidine. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 79:843–853. doi: 10.1007/s00280-017-3290-0.

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

Mukherjee, S., Sainis, K.B. & Deobagkar, D.D. (2014). F1 hybrids of BALB/c and C57BL/6 mouse strains respond differently to low-dose ionizing radiation exposure. *Journal of Genetics*. 93:667-82.

Myint, W., Ng, C. & Raaphorst G. (2002) .Examining the non-homologous repair process following cisplatin and radiation treatments. *International Journal of Radiation Biology*. 78:417-424.

Nabben, F.J., Lafleur, M.V., Sikkers, J.C., Loman, A.C., Retèl, J. & Loman, H. (1984). Repair of damage in double-stranded phi X174 (RF) DNA due to radiation-induced water radicals. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine*. 45:379-88.

Nakano, T., Katafuchi, A., Matsubara, M., Terato, H., Tsuboi, T., Masuda, T., Tatsumoto, T., Pack, S.P., Makino, K., Croteau, D.L., Van Houten, B., Iijima, K., Tauchi, H. and Ide, H. (2009). Homologous recombination but not nucleotide excision repair plays a pivotal role in tolerance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*. 284:27065-27076. doi: 10.1074/jbc.M109.019174.

Neta, P. (1972). Electron Spin Resonance Study of Radicals Produced in Irradiated Aqueous Solutions of 5-Halouracils. *The Journal of Physical Chemistry*. 76:2399-2402.

Nguyen, J., Ma, Y., Luo, T., Bristow, R.G., Jaffray, D.A. & Lu Q.B. (2011). Direct observation of ultrafast-electron-transfer reactions unravels high effectiveness of reductive DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:11778-11783. doi: 10.1073/pnas.1104367108.

Noble, S. & Goa K. (1997). Gemcitabine. A review of its pharmacology and clinical potential in non-small cell lung cancer and pancreatic cancer. *Drugs*. 54: 447–472.

OECD Guideline for the testing of chemicals. *Mammalian erythrocyte micronucleus test*. Overview of currently available test guidelines. Organization for Economic Cooperation and development. 2016 *Series TG 474*. OECD Publishing, Paris. Recuperado el 08 de marzo de 2019 de <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264264762-en.pdf?expires=1557334065&id=id&accname=guest&checksum=A49F02CD68C659AD712D1A3FFA5FDC26>

Ojima, E., Inoue, Y., Watanabe, H., Hiro, J., Toiyama, Y., Miki, C. & Kusunoki, M. (2006). The optimal schedule for 5-fluorouracil radiosensitization in colon cancer cell lines. *Oncology Reports*. 16:1085-1091.

Olive, P.L., Banáth, J.P. & Durand R.E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiation Research*. 122:86-94.

Overgaard, J. & Khan, A.R. (1981). Selective enhancement of radiation response in a C3H mammary carcinoma by cisplatin. *Cancer Treatment Reports*. 65:501-503.

Pauwels, B., Korst, A., Pattyn, G., Lambrechts, H., Van Bockstaele, D., Vermeulen, K., Lenjou, M., de Pooter, C., Vermorken, J. & Lardon F. (2003). Cell cycle effect of gemcitabine and its role in the radiosensitizing mechanism in vitro. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 57:1075-1083.

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

Phillips, T.L., Levin, V.A., Ahn, D.K., Gutin, P.H., Davis, R.L., Wilson, C.B., Prados, M.D., Wara, W.M. & Flam M.S. (1991). Evaluation of bromodeoxyuridine in glioblastoma multiforme: a Northern California Cancer Center Phase II study. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 21:709-714.

Phillips, T.L., Scott, C.B., Liebel, S.A., Rotman, M. & Weigensberg I.J. (1995). Results of a randomized comparison of radiotherapy and bromodeoxyuridine with radiotherapy alone for brain metastases: report of RTOG trial 89-05. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 33:339-348.

Plotnik, D.A., Asher, C., Chu, S.K., Miyaoka, R.S., Garwin, G.G., Johnson, B.W., Li, T., Krohn, K.A. & Schwartz J.L. (2012). Levels of Human Equilibrative Nucleoside Transporter-1 are Higher in Proliferating Regions of A549 Tumor Cells Grown as Tumor Xenografts *In Vivo*. *Nuclear Medicine and Biology*. 39(8):1161–1166. doi:10.1016/j.nucmedbio.2012.07.007.

Plooy A.C. & Lohman P.H. (1980). Platinum compounds with anti-tumour activity. *Toxicology*. 17(2):169-176.

Poot, M., Rüdiger, H.W. & Hoehn H. (1990). Detection of free radical-induced DNA damage with bromodeoxyuridine/Hoechst flow cytometry: implications for Bloom's syndrome. *Mutation Research*. 238:203-207.

Pozarowski, P. & Darzynkiewicz Z. (2004). Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods in Molecular Biology* 281:301-311.

Prados, M.D, Scott, C.B., Rotman, M., Rubin, P., Murray, K., Sause, W., Asbell, S, Comis, R., Curran, W., Nelson, J., Davis, R.L., Levin, V.A., Lamborn, K. & Phillips, T.L. (1998). Influence of bromodeoxyuridine radiosensitization on malignant glioma patient survival: a retrospective comparison of survival data from the Northern California Oncology Group (NCOG) and Radiation Therapy Oncology Group trials (RTOG) for glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 40:653-659.

PubChem. U.S. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. Recuperado el 08 de marzo de 2019 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-bromo-2-deoxyuridine>

Puck, T.T. & Marcus P.I. (1956). Action of X rays on mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine*. 103:653–666.

Quon, H., Leong, T., Haselow, R., Leipzig, B., Cooper, J &, Forastiere A. (2011). Phase III study of radiation therapy with or without Cis-Platinum in patients with unresectable squamous or differentiated carcinoma of the head and neck: An intergroup trial of the eastern cooperative oncology group (E2382). *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 81:719–725. doi: 10.1016/j.ijrobp.2010.06.038.

Rainey, M., Charlton, M., Stanton, R. & Kastan M. (2008). Transient inhibition of ATM kinase is sufficient to enhance cellular sensitivity to ionizing radiation. *Cancer Research*. 68:7466-7474. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0763.

Rehman, M., Jawaid, P. & Kondo T. (2016). Dual effects of nanoparticles on radiation therapy: as radiosensitizers and radioprotectors. *Radiation Environment and Medicine*. 5:40-45.

Rezaee, M., Hunting, D.J. & Sanche L. (2013). New insights into mechanisms underlying the synergistic action of ionizing radiation with platinum Chemotherapeutic drugs: The role of low-energy electrons. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 87:847-853. doi: 10.1016/j.ijrobp.2013.06.2037.

Riesterer, O., Matsomoto, F., Wang, L., Pickett, J., Molkentine, D., Giri, U., Milas, L. & Raju U. (2011). A novel Chk inhibitor, XL-844, increases human cancer cell radiosensitivity through promotion of mitotic catastrophe. *Investigational New Drugs* 29:514–522. doi: 10.1007/s10637-009-9361-2.

Robertson, J.M., Ensminger, W.D., Walker, S. & Lawrence, T.S. (1997) A phase I trial of intravenous bromodeoxyuridine and radiation therapy for pancreatic cancer. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 37:331-335.

Robinson, B., Im, M., Ljungman, M., Praz, F. & Shewach D. (2003). Enhanced radiosensitization with gemcitabine in mismatch repair-deficient HCT116 cells. *Cancer Research*. 63:6935-6941.

Rockwel, S., Dobrucki, I.T., Kin, E.Y., Marrison, S.T. & Vu V.T. (2009). Hypoxia and radiation therapy: Past history, ongoing research, and future promise. *Current Molecular Medicine*. 9:442–458.

Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L.H. & Löbrich, M. (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Molecular and Cellular Biology*. 16:5706-5715.

Sangar, V., Cowan, R., Margison, G., Hendry, J. & Clarke N. (2004). An evaluation of gemcitabines differential radiosensitising effect in related bladder cancer cell lines. *British Journal of Cancer*. 90:542–548.

Sasatani, M., Xu, Y., Kawai, H., Cao, L., Tateishi, S., Shimura, T., Li, J., Iizuka, D., Noda, A., Hamasaki, K., Kusunoki, Y. & Kamiya K. (2015). RAD18 Activates the G2/M Checkpoint through DNA Damage Signaling to Maintain Genome Integrity after Ionizing Radiation Exposure. *PLOS ONE*. 10 (2):e0117845. doi:10.1371/journal.pone.0117845.

Schürmann, R., Vogel, S., Ebel, K. & Bald I. (2018). The physic-chemical basis of DNA radiosensitization: Implications for cancer radiation therapy. *Chemistry-A European Journal* 24:10271-10279. doi: 10.1002/chem.201800804.

Seiwert, T., Salama, J. & Vokes E. (2007). The concurrent chemoradiation paradigm- General principles. *Nature Clinical Practice Oncology*. 4:86-100.

Selenius, M., Hedman, M., Brodin, D., Gandin, V., Rigobello, M.Pia., Flygare, J., Marzano, C., Bindoli, A., Brodin, O., Björnsted, M. & Fernandes A. (2012). Effects of redox modulation by inhibition of thioredoxin reductase on radiosensitivity and gene expression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 16:1593-1605. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01469.x.

Selman J. (1983). *Elements of Radiobiology*. U.S.A. Charles Thomas Publisher.

Shewach, D.S. & Lawrence T.S. (2007). Antimetabolite Radiosensitizers. *Journal of Clinical Oncology*. 25:4043-4050.

Sinclair, W. & Morton R. (2012). X-Ray Sensitivity during the Cell Generation Cycle of Cultured Chinese Hamster Cells. *Radiation Research*. 178, AV88–AV101.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. & Schneider E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175:184-191.

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

Smart, D., Ortiz, K., Mattson, D., Bradbury, C., Bisht, K., Sieck, L., Brechbie, Martin, W. & Gius D. (2004). Thioredoxin Reductase as a Potential Molecular Target for Anticancer Agents That Induce Oxidative Stress. *Cancer Research*. 64:6716–6724.

Spalding, A.C. & Lawrence T.S. (2006). New and emerging radiosensitizers and radioprotectors. *Cancer Investigation*. 24:444-456.

Steenken, S. (1992). Electron-transfer-induced acidity/basicity and reactivity changes of purine and pyrimidine bases. Consequences of redox processes for DNA base pairs. *Free Radical Research Communications*. 16:349-379.

Su, X., Liu, P., Wu, H. & Gu N. (2014). Enhancement of radiosensitization by metal-based nanoparticles in cancer radiation therapy. *Cancer Biology and Medicine*. 11:86-91. doi: 10.7497/j.issn.2095-3941.2014.02.003.

Szturz, P., Wouters, K., Kiyota, N., Tahara, M., Prabhash, K., Noronha, V., Castro, A., Licitra, L., Adelstein, D. & Vermorken J.B. (2017). Weekly Low-Dose Versus Three-Weekly High-Dose Cisplatin for Concurrent Chemoradiation in Locoregionally Advanced Non-Nasopharyngeal Head and Neck Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Aggregate Data. *Oncologist*. 9:1056-1066. doi: 10.1634/theoncologist.2017-0015.

Taupin, F., Flaender, M., Delorme, R., Brochard, T., Mayol, J., Arnaud, J., Perriat, P., Sancey, L., Lux, F. & Barth R. (2015). Gadolinium nanoparticles and contrast agent as radiation sensitizers. *Physics in Medicine and Biology*. 60: 4449–4464. doi: 10.1088/0031-9155/60/11/4449.

Thomas, R., Recht, L. & Nagpal S. (2013). Advances in the management of glioblastoma: the role of temozolomide and MGMT testing. *Clinical Pharmacology*. 5:1-9. doi: 10.2147/CPAA.S26586.

Tofilon, P.J. & Camphausen K. (2009). Molecular Targets for Tumor Radiosensitization. *Chemical Reviews*. 109:2974–2988. doi: 10.1021/cr800504x.

Tubiara, M., Dutrix, J. & Wambersie A. (1990). *Introduction to Radiobiology*. Ed Taylor and Francis. 480 pp.

Tusell, L., Alvarez, R., Genescà, A., Caballín, M.R., Miró, R. & Egozcue J. (1996). Analysis of radiation-induced micronuclei in two-cell human-hamster embryos using telomeric and centromeric FISH probes. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 74:102-106.

Vaisman, A., Varchenko, M., Umar, A., Kunkel, T.A., Risinger, J.I., Barrett, J.C., Hamilton, T.C. & Chancy S.G. (1998). The Role of hMLH1, HMSH3, and

HMSH6 Defects in Cisplatin and Oxaliplatin Resistance: Correlation with Replicative Bypass of Platinum-DNA Adducts. *Cancer Research*. 58:3579-3585.

Vallarino-Kelly, T. & Morales-Ramírez P. (2001). Kinetics of micronucleus induction and cytotoxic activity of colchicine in murine erythroblast in vivo. *Mutation Research*. 495:51-59.

van Wietmarschen, N. & Lansdorp, P.M. (2016). Bromodeoxyuridine does not contribute to sister chromatid exchange events in normal or Bloom syndrome cells. *Nucleic Acids Research*. 44:6787–6793 doi:10.1093/nar/gkw422.

Wardman, P. (2007). Chemical Radiosensitizers for Use in Radiotherapy. *Clinical Oncology*. 9:397-417.

Webb, C.F., Jones, G.D., Ward, J.F., Moyer, D.J., Aguilera, J.A. & Ling L.L. (1993). Mechanisms of radiosensitization in bromodeoxyuridine-substituted cells. *International Journal of Radiation Biology*. 64:695-705.

Wedge, S., Porteous, J., Glaser, M., Marcus, K. & Newlands, E. (1997). In vitro evaluation of temozolomide combined with X-irradiation. *Anticancer Drugs*. 8:92-97.

Wen, B., Deutsch, E., Marangoni, E., Frasca, V., Maggiorella, L., Abdulkarim, B., Chavaudra, N. & Bourhis J. (2001). Tyrphostin AG 1024 modulates radiosensitivity in human breast cancer cells. *British Journal of Cancer*. 85:2017-2021.

Wilson, G. (2004). Radiation and the cycle, revisited. *Cancer and Metastasis Review*. 23:209-225.

Woźniak, K. & Blasiak J. (2002). Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts. *Acta Biochimica Polonica* 49:583–596.

Yamada, M., O'Regan, E., Brown, R. & Karran P. (1997). Selective recognition of a cisplatin-DNA adduct by human mismatch repair proteins. *Nucleic Acids Research*. 25:491-6.

Yapp, D.T., Lloyd, D.K., Zhu, J. & Lehnert S.M. (1998). The potentiation of the effect of radiation treatment by intratumoral delivery of cisplatin. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 42:413-20.

Yi, X., Ding, L., Jin, Y., Ni, C. & Wang W. (1994). The toxic effects, GSH depletion and radiosensitivity by BSO on retinoblastoma. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 29:393-396.

Zaidi, S., Huddart, R. & Harrington K. (2009). Novel targeted radiosensitisers in cancer treatment. *Current Drug Discovery Technologies*. 6: 103-134.

Zhang, M., Boyer, M., Rivory, L., Hong, A., Clarke, S., Stevens, G. & Fife, K. (2004). Radiosensitization of vinorelbine and gemcitabine in NCI-H460 non-small-cell lung cancer cells. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 58:353-360.

Zhang, Y., Wang, J., Liu, F., You, Z., Yang, R. & Zhao Y. (2010). EGFR inhibitor C225 increases the radiosensitivity of human lung squamous cancer cells. *Cancer Cell International*. 10:2-7. doi: 10.1186/1475-2867-10-39.

Zhang, X., Yang, H., Gu, K., Chen, J., Rui, M. & Jiang, G.L. (2011). In vitro and in vivo study of a nanoliposomal cisplatin as a radiosensitizer. *International Journal of Nanomedicine*. 6:437-444. doi: 10.2147/IJN.S15997.

Zhu, L., Wu, K., Ma, S. & Zhang, S. (2015). HDAC inhibitors: a new radiosensitizer for non-small-cell lung cancer. *Tumori*. 101:257-262. doi: 10.5301/tj.5000347.

ANEXO 1 (PUBLICACIÓN)

In vivo Characterization of the Radiosensitizing Effect of a Very Low Dose of BrdU in Murine Cells Exposed to Low-Dose Radiation.

Environmental and Molecular Mutagenesis 60:534:545 (2019).

Virginia Cruz-Vallejo,^{1,2} Rocío Ortiz Muñiz,³ Teresita Vallarino-Kelly,¹ Elsa Cervantes-Ríos,³ Pedro Morales-Ramírez^{1*}.

1 Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Carretera México-Toluca s/n, La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México C. P., 52750, México.

2 Doctorado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana, Avenida San Rafael Atlixco 186 CP, 09340, Ciudad de México, México.

3 Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Avenida San Rafael Atlixco 186 CP, 09340, Ciudad de México, México.

Research Article

In vivo Characterization of the Radiosensitizing Effect of a Very Low Dose of BrdU in Murine Cells Exposed to Low-Dose RadiationVirginia Cruz-Vallejo,^{1,2} Rocío Ortíz-Muiz,³ Teresita Vallarino-Kelly,¹ Elsa Cervantes-Ríos,³ and Pedro Morales-Ramírez^{1*}¹Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Carretera México-Toluca s/n, La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México C. P., 52750, Mexico²Doctorado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana, Avenida San Rafael Atlixco 186 CP, 09340, Ciudad de México, Mexico³Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Avenida San Rafael Atlixco 186 CP, 09340, Ciudad de México, Mexico

The aim of the present study was to characterize the *in vivo* radiosensitizing effect of a very low dose of bromodeoxyuridine (BrdU) in mice exposed to low-dose radiation by establishing the following: (1) the radiosensitizing effect during DNA synthesis using single-cell gel electrophoresis (SCGE) in murine bone marrow cells, and (2) the number and timing of the mechanisms of genotoxicity and cytotoxicity, as well as the correlation of both end points, using flow cytometry analysis of the kinetics of micronucleus induction in reticulocytes. Groups of mice received intraperitoneal injections of 0.125 mg/g of BrdU 24 h prior to irradiation with 0.5 Gy of ⁶⁰Co gamma rays. DNA breaks measured using SCGE were determined at 30 min after exposure to radiation. The kinetics of micronucleated reticulocyte (MN-RET)

induction was determined every 8 h after irradiation up to 72 h. The results from both experimental models indicated that low-level BrdU incorporation into DNA increased the sensitivity to 0.5 Gy of radiation, particularly in the S phase. The formation of micronuclei by gamma rays was produced at three different times using two main mechanisms. In the BrdU-substituted cells, the second mechanism was associated with a high cytotoxic effect that was absent in the irradiated BrdU-unsubstituted cells. The third mechanism, in which micronucleus formation was increased in irradiated substituted cells compared with the irradiated nonsubstituted control cells, was also related to an increase in cytotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.* 60:534–545, 2019. © 2019 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: Radiosensitization; BrdU; gamma rays; micronuclei; comet assay

INTRODUCTION

Early evidence that BrdU sensitizes DNA to the induction of damage by ionizing radiation was obtained in *Escherichia coli*, in which BrdU causes an increase in double-strand breaks and lethality [Kaplan 1966]; in *Drosophila*, in which BrdU causes an increase of dominant lethality and sex-linked recessive lethality in the premeiotic stage [Rajaraman and Kamra 1973, 1974]; and also in mammalian cells, in which BrdU causes an increase in chromosomal damage [Dewey and Humphrey 1965]. Using sister chromatid exchange (SCE) analysis in murine bone marrow cells *in vivo*, we demonstrated that BrdU sensitizes cells to SCE induction by gamma radiation, causing persistent lesions [Morales-Ramírez et al. 1984a]. This result suggests that lesions caused by ionizing radiation in BrdU-substituted DNA are very toxic and not easily repaired [Morales-Ramírez et al. 1984a; Fujii et al. 2013], thereby causing cell death or at least blocking cell division [Morales-Ávila et al. 2010].

Previous results have allowed us to approach a possible strategy for bone marrow ablation or cancer therapy by determining the action of BrdU incorporation into DNA of bone marrow cells on the genotoxic and cytotoxic effects of samarium-153 ethylene-diamino-tetramethylene phosphonate [Morales-Ávila et al. 2010]. We observed that ¹⁵³Sm-EDTMP caused lesions in the BrdU-substituted DNA that could not easily be repaired, killing normoblasts

Grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; Grant number: Project 240116-CB, 2015-I.

*Correspondence to: Pedro Morales-Ramírez, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Carretera México-Toluca s/n, La Marquesa, Ocoyoacac, Edo. de México, C. P. 52750, México. E-mail: pedro.morales@inin.gob.mx

Received 2 January 2019; provisionally accepted 24 February 2019; and in final form 2 March 2019

DOI: 10.1002/em.22284

Published online 9 March 2019 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

by blocking cell division and eliminating the possibility of micronucleus formation. This finding suggests that high doses of BrdU and radiation do not allow discernment of a correlation between DNA damage and cell viability.

Because information on radiation sensitization could be applied in radiotherapy, it is important to use *in vivo* approaches to determine the effects of real doses and durations of exposure [Morales-Ramírez et al. 2017; Hentosh and Peffley 2010]. The unsuccessful therapeutic use of BrdU may have resulted from the use of high BrdU and radiation doses. BrdU is considered a potent radiosensitizing agent, and conventional fractionated accumulated irradiation doses between 45 and 66 Gy were used [Robertson et al. 1997; Hegarty et al. 1990; Matsutani et al. 1988] that could be very toxic for the organism. No experimental studies *in vivo* have addressed radiosensitization using low BrdU and radiation doses below 1.0 Gy [Miller et al. 1992].

In addition to considering that biological processes are very dynamic, it is important to establish strategies that allow us to observe responses over time to approach the complexity of the post-treatment process. We proposed to use the kinetics of micronucleus induction in normoblasts *in vivo* as a strategy to establish the genotoxic profiles by measuring the increment of micronuclei in polychromatic erythrocytes or reticulocytes as a function of time after treatment [Morales-Ramírez et al. 2014]. This procedure can be accomplished by collecting small samples of blood from the tails of mice. Several parameters of genotoxic action can be followed, such as the presence of one or several peaks of MN induction, suggesting that the induction of DNA breaks occurs *via* one or many mechanisms. The time required for the maximal induction(s) could be related to the possible mechanisms involved. Additionally, in the same blood samples, it is possible to quantify the cytotoxicity and correlate this with the genotoxic findings. These parameters permit the establishment of a profile of the response [Morales-Ramírez et al. 2017] and even determine the interactions of various agents [Morales-Ramírez et al. 2010].

However, the DNA breaks induced in proliferating cells are not easily determined because DNA breaks produced during DNA synthesis (Okazaki fragments) cannot be distinguished from those produced by radiation. Here, we propose a strategy that allows measurement of the increase in DNA break induction due to combined treatment with BrdU and gamma rays in proliferating murine bone marrow cells *in vivo* using single-cell gel electrophoresis, an assay that permits the determination of DNA damage production shortly before treatment.

The aim of the present *in vivo* study was to characterize the radiosensitizing effect of a very low dose of BrdU in mice exposed to low-dose radiation by determining the radiosensitizing effect during DNA synthesis in BrdU-substituted cells using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assays of murine bone marrow cells and by establishing the number and timing of mechanisms involved in DNA break induction and

cytotoxicity and the correlation of both end points, using the cytometric analysis of the kinetics of micronucleated reticulocyte (MN-RET) induction.

MATERIALS AND METHODS

SCGE Assay Protocols

Protocol A

An experiment comparing bone marrow cell and leukocyte basal tail migration was performed with the aims of determining (1) the impact of cell proliferation on tail migration, (2) the tail migration limit to distinguish damaged from undamaged cells, and (3) the degree of damage in damaged cells rather than the average of damaged and undamaged cells, thereby increasing sensitivity. This is based on bone marrow cells and leukocytes are similar in DNA size but differ in that leukocytes are in G₀ phase, whereas in bone marrow, there are a percentage of cells in S phase shown by Okazaki DNA fragments. This measurement was performed by collecting samples of peripheral blood and bone marrow from untreated groups of five mice. This assay allowed us to determine whether the damage was induced mainly in nondividing cells or cells in S phase.

Protocol B

Four groups of ICR male mice weighing approximately 30 g were subjected to the following treatments, where zero is the time of BrdU administration.

Experimental group: BrdU adsorbed onto activated charcoal was administered intraperitoneally at time zero. The dose of BrdU was 0.125 mg/g of body weight. At 24 h after BrdU administration, the animals were exposed to 0.5 Gy of ⁶⁰Co gamma rays, and bone marrow cells were collected 30 min after irradiation.

BrdU group: BrdU adsorbed onto activated charcoal was administered intraperitoneally at time zero. The BrdU dose was 0.125 mg/g of body weight, and the bone marrow cells were obtained at 24 h after BrdU administration.

Radiation group: The animals were individually exposed to 0.5 Gy of ⁶⁰Co gamma rays at 24 h, and the bone marrow cells were collected 30 min later.

Control group: Untreated control bone marrow cells were collected at 24 h.

Micronucleus Assay Protocol

Three groups of male ICR mice weighing approximately 30 g were subjected to the following treatments, where zero was the time of radiation exposure.

Experimental group: BrdU adsorbed onto activated charcoal was administered intraperitoneally 24 h before radiation. The dose of BrdU was 0.125 mg/g of body weight. The animals were exposed to 0.5 Gy of ⁶⁰Co gamma rays. A 25- μ l blood sample was collected from the tail before irradiation and every 8 h until 72 h after irradiation.

BrdU group: BrdU adsorbed onto activated charcoal was administered intraperitoneally 24 h before time zero. The dose of BrdU was 0.125 mg/g of body weight, and a 25- μ L blood sample was collected from the tail vein 24 h before BrdU administration and every 8 h after until 72 h after BrdU administration.

Radiation group: The animals were individually exposed to 0.5 Gy of ^{60}Co gamma rays at time zero, and a 25- μ L blood sample was collected from the tail vein before irradiation and every 8 h after for 72 h.

The blood samples collected from each mouse before treatment were used as control samples.

Chemicals

The chemicals used in these experiments were purchased from the following suppliers: agarose and low-melting point agarose (LMP Gibco BRL, Gaithersburg, MD); BrdU, Tris, sodium chloride, N-lauryl-sarcosine, dimethyl sulfoxide, potassium chloride EDTA, Triton X-100, sodium hydroxide and ethidium bromide (EtBr) Sigma Chemicals (St. Louis, MO); ribonuclease A (RNase), propidium iodide MP (Biomedicals France); and FITC mouse anti-Rat CD71 (anti-CD71-FITC) (BD Pharmingen).

Animals

Three-month-old ICR albino male mice (Harlan) weighing approximately 30 g and maintained in our laboratory were used. The animals were maintained in plastic cages with sawdust bedding under controlled temperature (23–25°C) and light–dark cycle (12-h periods) conditions. The animals were fed Purina Chow and tap water *ad libitum*. The protocols were reviewed and approved by the Internal Committee of Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL), which oversees the ethics of research involving the use of animals and the welfare of animals.

BrdU Administration

BrdU that had previously been adsorbed onto activated charcoal [Morales-Ramírez 1980] was intraperitoneally administered at a dose of 0.125 mg/g body weight. For reference, this BrdU dose represents approximately one tenth of that required for sister chromatid differential staining of bone marrow cells under the same administration conditions [Morales-Ramírez et al. 1984b]. As an analogy, the dose of BrdU in culture permitting sister chromatid differential staining *in vitro* is 1×10^{-5} M [Perry and Evans 1975]; at this dose, 20–30% of thymidine is substituted with BrdU [Lawrence et al. 1990; Ling and Ward 1990]. Assuming proportional BrdU incorporation in the present study, approximately 2–3% of the thymidine was substituted with BrdU.

Irradiation Conditions

The dose rate was 0.22 Gy/min, and the total administered dose was 0.5 Gy. The exposure rate was confirmed by thermoluminescent dosimetry.

Single-Cell Gel Assay

Peripheral Blood

To acquire peripheral blood samples, the mice were confined in plastic containers through which their tails were extended. A small fragment was cut from the end of the tail, and two blood samples of 4 μ L each were obtained and suspended in a micro-centrifuge tube with 1 mL of Hank's solution.

Bone Marrow

The animals were sacrificed by cervical dislocation, a femur was dissected, and the bone marrow was obtained by injecting 1.0 mL of cold Hank's solution into one end of the bone. A total of 15 μ L of the cell suspension was diluted in 1.0 mL of Hanks solution and kept on ice.

Processing Samples

A slightly modified basic alkaline technique [Singh et al. 1988] was used [Eriksson and Nygren 1995]. Briefly, 4 μ L of blood or diluted bone marrow sample was centrifuged at 2500 rpm for 10 min at 5°C. The pellet was resuspended in 100 μ L of low-melting-point agarose and added to a slide with a dry layer of agarose. Finally, a low-melting-point agarose layer was added. The slide was then immersed in a lysis solution for 1 h at 4°C in the dark. Then, the slides were exposed to the alkaline buffer for 40 min to allow for unwinding of the DNA chains and transformation of the alkali-labile sites into DNA breaks. Next, an electric current was applied at 25 V and 300 mA for 40 min *via* a power supply (PS250-1, Techware Sigma Milliamper, USA). All steps were conducted under low-light conditions to prevent additional DNA damage. The slides were removed, Tris buffer (0.4 M, pH 7.5) was carefully added dropwise to neutralize the excess alkali, and the slides were then rinsed three times for 5 min each. Finally, the slides were dehydrated by immersion in cold pure methanol, placed on a flat surface to dry, and maintained in a closed box at room temperature. Prior to staining, the slides were rehydrated with Tris buffer. Each slide was stained with 70 μ L of ethidium bromide (2.0 μ g/mL) and covered with a clean coverslip. The slides were kept in a humidifier and scored within 24 h of staining.

Damage Index

The samples were analyzed with the Comet IV program (Perceptive Instruments). DNA damage was measured in terms of tail migration. Fifty randomly selected cells were scored along the exposed zone on each of two slides, and 100 cells per mouse were imaged using a fluorescence microscope with an excitation filter of 546 nm, a barrier filter of 590 nm and a 25 \times objective. The frequency of cells with tail migration ranges of 10 or 20 μ m was determined in each sample.

Cytometric Analysis of MN-RET

Sample Preparation [Cervantes-Ros et al. 2012]

Blood samples of 25 μL were collected from tail veins into tubes with 25 μL of sodium heparin as an anticoagulant and then diluted 1:2 in bicarbonate-buffered saline solution (BBS; 0.9 g NaCl +0.0444 g NaHCO_3 in 100 mL of distilled water). A 100- μL aliquot from the diluted sample was fixed by vortexing in cryogenic tubes containing 2 mL of ultra-cold methanol (-70°C). The samples were kept at the same temperature in an ultracold freezer.

Staining and Marking the Cells

The samples were resuspended, and 1 mL of the fixed cells was diluted 1:7 with BBS at 4°C and centrifuged at 600 g for 5 min at 4°C . The supernatant was discarded, and the precipitate was resuspended in 100 μL of the supernatant; 25- μL aliquots were placed in two Falcon tubes for cytometry. One tube containing only 80 μL of RNase A (1 mg RNase/mL) was used to evaluate autofluorescence. The other tube contained 80 μL of RNase plus 5 μL of antibody (anti-CD71-FITC) to mark reticulocytes. The samples were incubated twice, first for 40 min at 4°C and then for 90 min at 22°C . Next, 500 μL of BBS was added to each tube, and the tubes were kept in the dark at 4°C overnight. The samples containing antibody were stained for 15 min before flow cytometry with 2 μL of propidium iodide to detect DNA in reticulocytes.

MN-RET Quantification

RET with or without MNs was scored using a FACSCalibur (Becton & Dickinson, cytometry Systems) equipped with an argon laser at 488 nm. The Cell Quest program was used to obtain 1×10^6 events (total cells). Then, WinMDI 2.9 was used to analyze the data. Anti-CD71-FITC and propidium iodide were detected in channels FL1 and FL2, respectively. Gating was performed according to Hamasaki et al. [2007] to allow us to distinguish RET and erythrocytes. The number of RET analyzed for the presence of MN ranged from 7400 to 30,000 per sample time [Hamasaki et al., 2007].

ABC Index

The area beneath the curve MN-RET vs. time was determined as an index of the total MN-RET induction using the Origin Pro8 program. This was also used to measure the total induction MN-RET in a time period.

The ABC of cytotoxicity was determined assuming that the basal frequency of RET was maintained along the experiment, and this area represents a 100% of viability, and the cytotoxicity was calculated as a reduction of this area by the treatments along the time. This was calculated by using the Origin Pro8 program.

Statistics

We determined if the data were parametric using the Shapiro–Wilks test. For the MN-RET results, the paired Students' t-test was used to establish significant differences between different times for each mouse. Students' t-tests and $P < 0.05$ were used to identify significant differences between groups. The significant difference of cell frequencies for tail migration ranges by different treatments was determined by Kruskal–Wallis test, $P < 0.05$.

RESULTS

Comet Assay Response

Figure 1 shows the distribution of cell frequencies as percentages with respect to tail migration in μm for untreated leukocytes and bone marrow cells (protocol A). Leukocytes in the peripheral blood had tail migrations ranging from 0 to 20 μm , with a minimal induction of 30- μm tail migrations. By contrast, bone marrow cells exhibited greater dispersion ranging from 0 to 160 μm . The undamaged cells appeared to have migrations from 0 to 20 μm ; these cells represented 75% of the total population in bone marrow and 98% in leukocytes. In the small graph, the same curve is shown but with a smaller range of frequencies to focus on the distribution of larger tail migrations in bone marrow cells. This curve indicates that the range of tail migration in the bone marrow was from 40 to 160 μm with a maximal induction at 90 μm , due to the DNA fragments generated during DNA synthesis. Therefore, tail migration

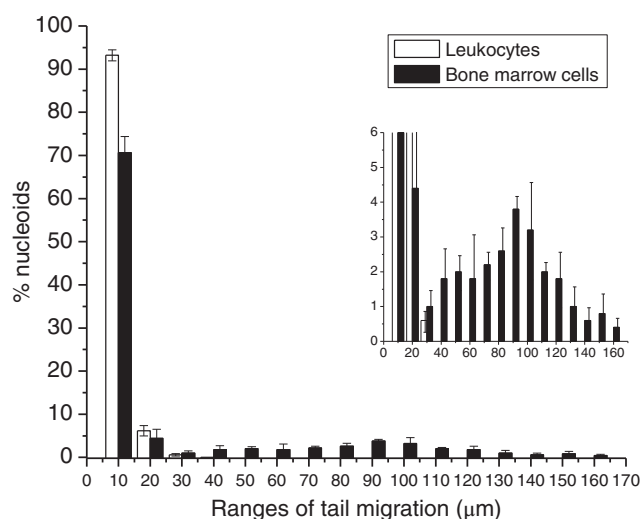


Fig. 1. Frequency of nucleoids with different tail-migration ranges (μm) from *in vivo* untreated leukocytes (nondividing cells) and bone marrow cells. Most leukocytes had tail migrations of less than 20 μm , whereas the tail migrations of bone marrow cells ranged from 30 to 160 μm , with a maximum of 90–100 μm . This result is more clearly observed in the small panel.

TABLE I. Effect of BrdU incorporation into DNA on damage induced by gamma radiation

	% Cells with TM > 20 $\mu\text{m} \times \pm \text{SD}$	Increase (- control)	- BrdU treated	RI
Untreated Control	16.6 ± 8.1			
BrdU (0.125 mg/kg)	31.4 ± 7.7 ^a	14.8		
Rad (0.5 Gy)	17.8 ± 6.8	1.2		
BrdU + Rad	47.2 ± 2.7 ^a	30.6	15.8	13.2

TM: Tail migration; RI: Radiosensitization Index = (BrdU+Rad - BrdU) /Rad.

^aStatistics significant vs. control group. Students' t-test $P < 0.05$.

appeared to be a convenient index to distinguish DNA breaks due to damage induced in both dividing and nondividing cells from those caused by DNA synthesis.

Table I shows the percentage of cells with DNA damage obtained from experimental protocol B by measuring the frequency of cells with tail migration higher than 20- μm damage 30 min after irradiation. The data indicate a synergic effect of BrdU incorporation and irradiation. Only the

groups treated with BrdU alone (31.4 ± 7.7) and irradiated after BrdU incorporation (47.2 ± 2.7) were significantly different from the control (16.6 ± 8.1). The radiosensitizing index (RI) was defined as the damage rate caused by radiation in the BrdU-substituted DNA with respect to the unsubstituted DNA. The increment in the percentage of damaged cells caused by radiation in the BrdU-substituted DNA was calculated by subtracting the percentage of comets caused by pretreatment with BrdU alone from the percentage of comets in the group pretreated with BrdU and irradiated. The damage in the unsubstituted DNA caused by radiation was calculated as the increment of damaged cells in the group treated only with radiation. The index was approximately 13.2, indicating a very high radiosensitizing effect of BrdU.

Figure 2 shows histograms of the bone marrow cell frequency distribution by tail migration higher than 20 μm (cells with DNA breaks) from untreated mice and mice treated with radiation, BrdU, or both according to protocol B by assessing damage 30 min after irradiation. In the untreated control group, cells exhibited tail migrations greater than 20 μm and less than 100 μm ; most of the cells

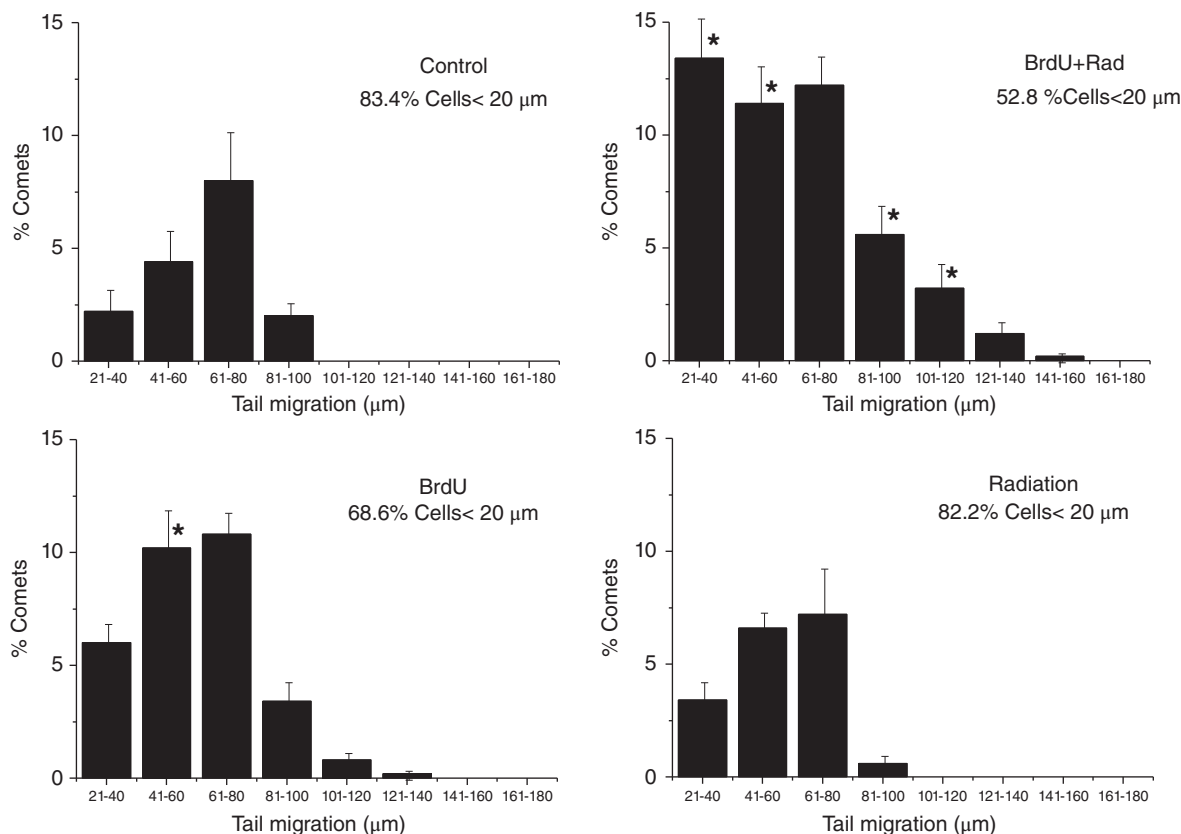


Fig. 2. Frequency of cells with DNA breaks, as indicated by tail migrations greater than 20 μm for cells from untreated mice, mice with BrdU-substituted DNA, and cells scored 30 min after irradiation of untreated or BrdU-pretreated mice. There are increases in the number and range of damaged cells in the group of mice irradiated after BrdU incorporation. The asterisks represent statistical significance with respect to the control. Kruskal-Wallis test, $P < 0.05$.

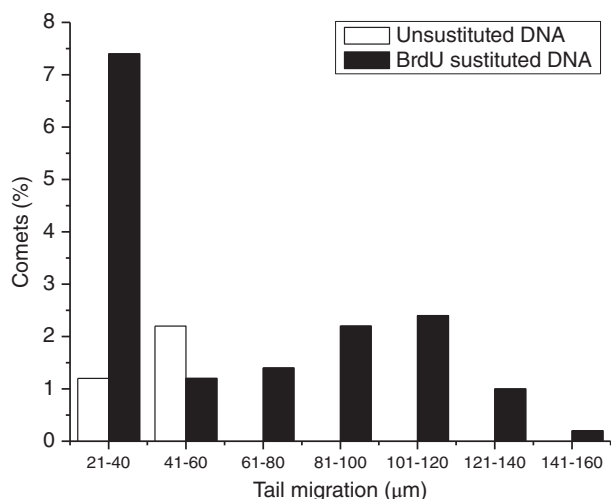


Fig. 3. Increase in damaged bone marrow cells from mice pretreated or not with BrdU. The average increase in damaged cells in the group irradiated after BrdU incorporation was higher than that in cells that were only irradiated. The data represent the results shown in Figure 2 after subtracting the respective controls. From the radiation-only group, the frequency of the untreated control was subtracted; from the combined group, the control value and increment observed in the BrdU-treated group were subtracted.

were within the subrange of 61 to 80 μm . These cells with DNA breaks likely represented cells undergoing DNA synthesis. In the group treated with BrdU, most tail migrations were greater than 20 and up to 100 μm ; only the range from 41 to 60 μm showed a significant difference compared with that of the control bars. The group treated with 0.5 Gy of radiation exhibited tail migrations mainly between 20 and 80 μm , but any range was significantly different from that of the control. The graph of cells from the mice treated with BrdU and subsequently exposed to radiation indicated that nearly 47.2% of the cells were damaged, and their tail migrations were mostly greater than 21 μm , reaching up to 140 μm . The values of the bars were significantly different compared with all the comparable ranges of the control except for the 61–80 μm range.

The histograms of cells with different tail migrations were difficult to compare in terms of damage induced by gamma rays in unsubstituted and substituted DNA due to the frequency of cells with DNA breaks in the controls and with damage caused by BrdU substitution. Figure 3 shows the results of subtracting the control values from those of the irradiated group and subtracting both the control group and BrdU group frequencies from those of the group treated with both BrdU and radiation. These operations eliminate the basal frequency of breaks (Okazaki fragments) and the effect of BrdU *per se*. These curves more clearly indicate that the mice irradiated after BrdU incorporation had higher frequencies of comets than the irradiated mice without BrdU pretreatment. The combined treatment caused an increase in comets both in

cells with low damage (20–40 μm) and in cells with high damage (up to 140 μm), likely corresponding to nondividing cells and cells in DNA synthesis, respectively. Considering that long tails represent more damage, this finding implies that cells in DNA synthesis are much more sensitive.

The RI calculated by considering the percentage of damaged cells (Table I), was an underestimation because long tail migration represents a higher number of lesions, and the results indicated that irradiated BrdU-substituted cells showed tail migrations from 61–80 to 121–140 μm and that irradiated cells with unsubstituted DNA showed a maximal tail migration of 41–60 μm .

MN-RET Assay

Figure 4 shows the kinetics of MN-RET induction by 0.125 μmoles of BrdU per kg body weight, by 0.5 Gy of gamma radiation, and by the combined treatment. The flow cytometry results showed a radiation curve with three peaks: one small early peak at 8.3 h, a higher peak at 29.9 h, and a late peak at 47.7 h. Comparison of the curves from mice irradiated with or without pretreatment with BrdU indicated that BrdU induced an important change in the kinetics of MN-RET induction. The principal peak (second) obtained by radiation was slightly reduced, and the last peak (third) was increased. To quantify the increase in MN-RET induction, the total area beneath the curve (ABC) was measured, as well as the ABC in the range from 40 to 72 h, corresponding to the third peak. The results shown in

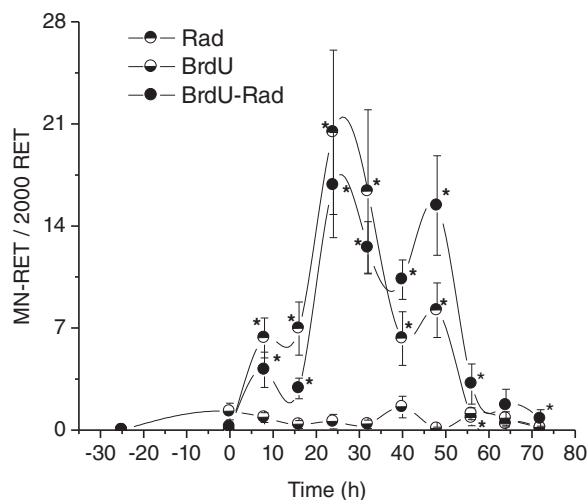


Fig. 4. Kinetics of MN-RET induction vs. time in mice treated with BrdU, radiation or radiation after BrdU substitution. A total of 1×10^6 events was counted by cytometry, and between 7000 and 20,000 RET were scored for MN. The frequency was reported as MN-RET/2000 RET to compare with our previous studies using microscopy. Asterisks represent statistical significance adjusted at $P < 0.05$ according to paired Students' *t*-test: radiation from 8 to 48 h; BrdU-Rad from 8 to 64 h. The points represent the average and standard error. Asterisks represent statistical significance. Paired *t* test, $P < 0.05$.

TABLE II. Total area beneath the curve of MN-RET induction and in the range of 40–72 h for treatment with BrdU, radiation, and both agents

Treatment	ABC total		ABC 40–72 h		Increase (-BrdU treated)	RI
	x	SD	x	SD		
BrdU	68.3	35	23.1	16.4		
Rad	534.1	130.9	125.2	14.5		
BrdU+Rad	574.1 ^{ns}	185	242.4*	94.6	219.3	1.75

ABC Rad vs. BrdU+Rad: total area ns; from 40 to 72 h * $P < 0.05$, Students' t-test. Radiosensitization Index. RI = (BrdU+Rad) – BrdU/Rad.

Table II indicate that the total ABC for the group pretreated with BrdU and irradiated did not differ significantly from that of the irradiated group, whereas the ABC of the third peak was twofold greater than that observed for irradiation alone and showed a significant difference.

The frequency curves in % of RET vs. time for the three groups are shown in Figure 5. The curve for the group treated only with BrdU exhibited slight reduction with some fluctuations and an increase at the end. The curve obtained by irradiation showed a reduction from 24 to 60 h, with a maximal reduction of 50% at 40 and 48 h; the frequency increased and even exceeded 100% (zero time) after 64 h. The curve of RET frequency for the group pretreated with BrdU and irradiated showed an important reduction that was initiated 8 h after irradiation and continued with the end of the experiment at 72 h; the maximal reduction occurred from 32 to 56 h. To compare differences in cytotoxicity, the reduction of the ABC of RET frequency vs. time was calculated, assuming a 100% frequency throughout the experiment (Fig. 6). Treatment with BrdU caused a 6.6% reduction in RET, whereas irradiation caused a reduction of 15% and irradiation in mice pretreated with BrdU caused a reduction of 47%, which is significantly different from that of the controls of BrdU and radiation. These results indicate that the BrdU dose used was not cytotoxic *per se* but was sufficient to cause significant sensitization to radiation.

Comparison of the timing of the genotoxic and cytotoxic effects indicated that they were similar but not equivalent. To precisely correlate the geno- and cyto-toxicity, Figure 7 shows superposed curves of the increases in these endpoints. This figure indicates that the second peak is higher in the BrdU-unsubstituted cells and is not related to time in terms of cytotoxicity; however, after BrdU incorporation, the breaks were slightly reduced, concomitant with a dramatic increase in cytotoxicity. The increase in the third peak correlates with a very high increase in cytotoxicity, which persisted long after MN-RET induction diminished.

DISCUSSION

Early *in vitro* and *in vivo* studies in mammalian cells have reported BrdU-induced cell radiosensitization [Morales-Ramírez et al. 1984a; Ling and Ward 1990; Morales-Ávila et al. 2010]. Although the mechanism of radiosensitization by

BrdU has not been completely established, previous studies of BrdU-induced DNA radiosensitization reported that hydrated electrons do not cause damage in natural DNA [Nabben et al. 1984]; however, these radicals appear to have a primordial role in the damaged BrdU-substituted DNA [Greenstock and Whitehouse 1992; Webb et al. 1993]. The $\cdot\text{OH}$ radical from hydrogen peroxide does not appear to cause sensitization in BrdU-substituted DNA [Webb et al. 1993], and evidence indicates that hydrated electrons are produced at similar rates to those of $\cdot\text{OH}$ radicals [Gantchev et al. 2011]. Studies examining radiosensitization have clearly focused on the role of the bromine atom in this effect [Cecchini et al. 2004].

SCGE

The SCGE assay permits the study of the synergic effect of BrdU on the capacity of radiation to induce more lesions by measuring these lesions immediately. In a previous *in vitro* study, the authors detect a significant increase in damage after treatment with X rays using the Olive tail moment but not the percent of DNA in the tail [Kruszewski et al. 2012]. The *Olive tail moment* is defined as the product of the tail length and fraction of total DNA in the tail [Olive et al. 1990]. These results imply that the significant difference in the tail moment depends on the tail length, indicating that tail length and the analogous tail migration are more convenient parameters.

The tail migration is an index with clear biological meaning: The production of fragments of DNA whose migration is dependent on the fragment size because smaller fragments migrate farther. The analysis of basal tail migrations in bone marrow and leukocytes showed that the maximal frequency was less than 20 μm , thereby permitting damaged cells to be distinguished by tail migrations greater than this length. Our hypothesis was that the synergic effect of BrdU and radiation could increase the number of damaged cells and lead to an increase in tail migration in cells in DNA synthesis; the results indicate that BrdU increases both damaged cells (Table I) and tail migrations in damaged cells (Fig. 3).

Additionally, we could discern an increase in two levels of damage after radiation exposure of BrdU-substituted cells: (1) small tail migrations in the range of 20–60 μm that were only slightly increased in irradiated BrdU-unsubstituted DNA and (2) large tail migrations in the range of 60–160 μm only

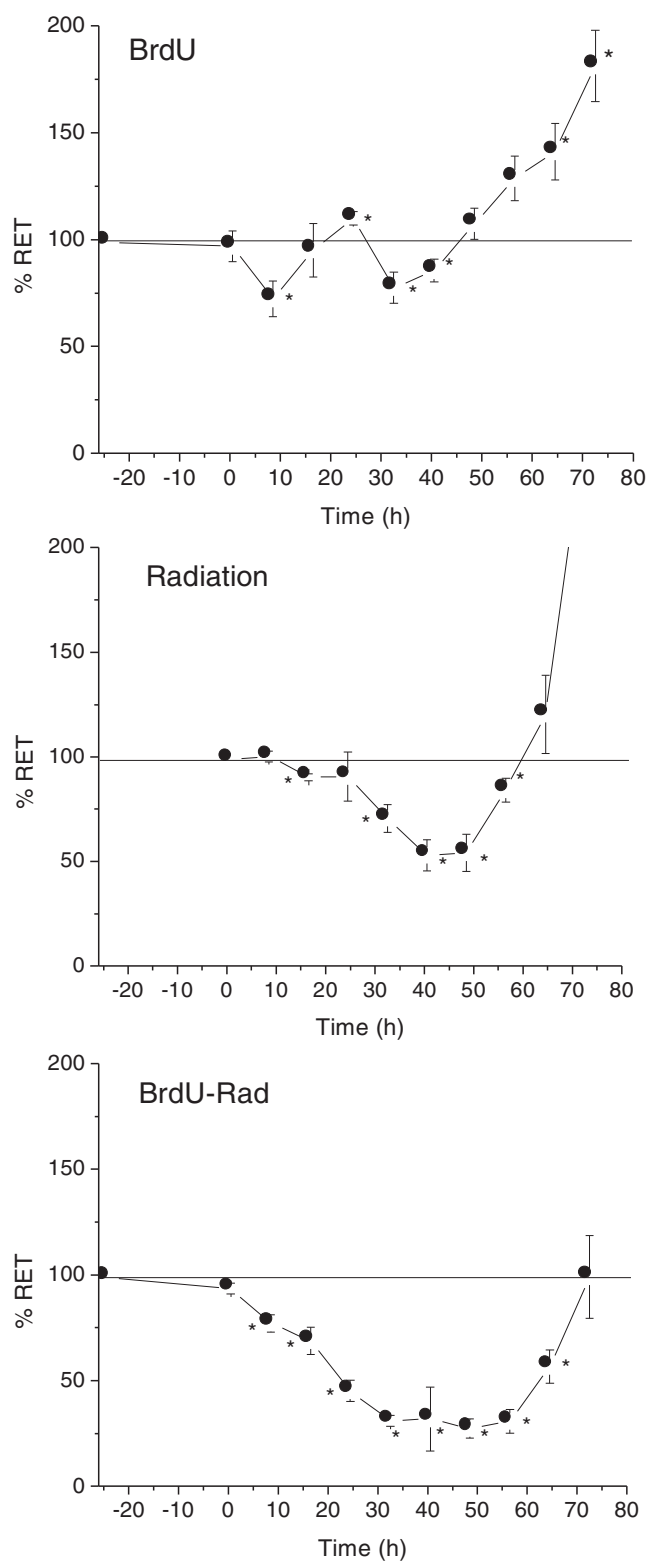


Fig. 5. Kinetics of cytotoxicity resulting from BrdU alone, irradiation alone, or irradiation after BrdU incorporation. The analysis was performed for 1×10^6 events, and RET reduction was the index of cytotoxicity. The frequency at time zero was considered 100% viability. The asterisks represent statistical significance, at $P < 0.05$, paired Students' t-test.

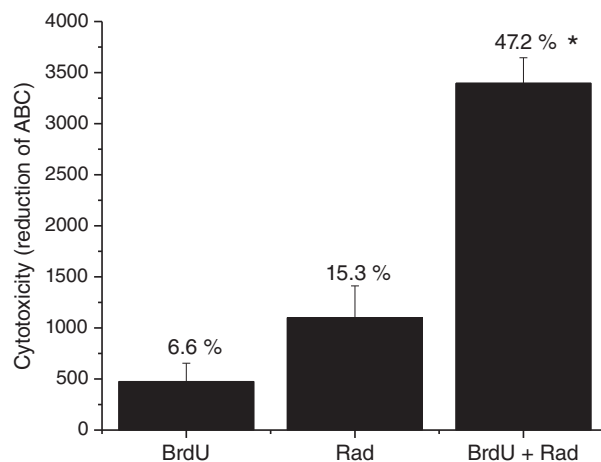


Fig. 6. Decrease in the ABC of frequency of RET vs. time during the experimental period before recovery, as calculated from the curves shown in Figure 3. Synergy was observed in cells that were irradiated after BrdU substitution. The asterisks represent statistical significance with respect to the BrdU and radiation groups, Students' t-test $P < 0.05$.

increased in irradiated BrdU-substituted cells. These two levels of damage probably represent damage in nondividing cells and cells undergoing a DNA synthesis step, respectively; the percentages of these types of cells were similar, although the level of damage is higher in dividing cells considering that the large tail migrations represent many breaks. Thus, these results imply that BrdU-substituted DNA was more sensitive during DNA duplication, which was consistent with previously reported findings in a cell-free system [Cecchini et al. 2004]. The authors of that study proposed that *in vivo* radiosensitization by BrdU would almost certainly be limited to single-strand regions, such as those found in replication forks, transcription bubbles, mismatched DNA, and possibly the loop regions of telomeres [Cecchini et al. 2004]. Our *in vivo* results demonstrated that BrdU sensitizes DNA to break induction by 0.5 Gy of radiation during DNA synthesis as well as in cells that are not in synthesis and agree partially with the results obtained in the abovementioned study in a cell-free system [Cecchini et al. 2004].

Micronucleus Assay

The micronucleus assay allowed the determination of the long-term consequences of DNA break production. The kinetic analysis of MN induction allowed us to establish whether different processes participated in MN induction based on the hypothesis that different mechanisms of DNA breaks occur at different times [Morales-Ramírez et al. 2014].

The curves of the kinetics of MN-RET induction by gamma rays obtained in the present study differ from the kinetics previously obtained using microscopic analysis. The previously obtained curves usually showed a single peak at approximately 25 to 30 h, depending on the dose,

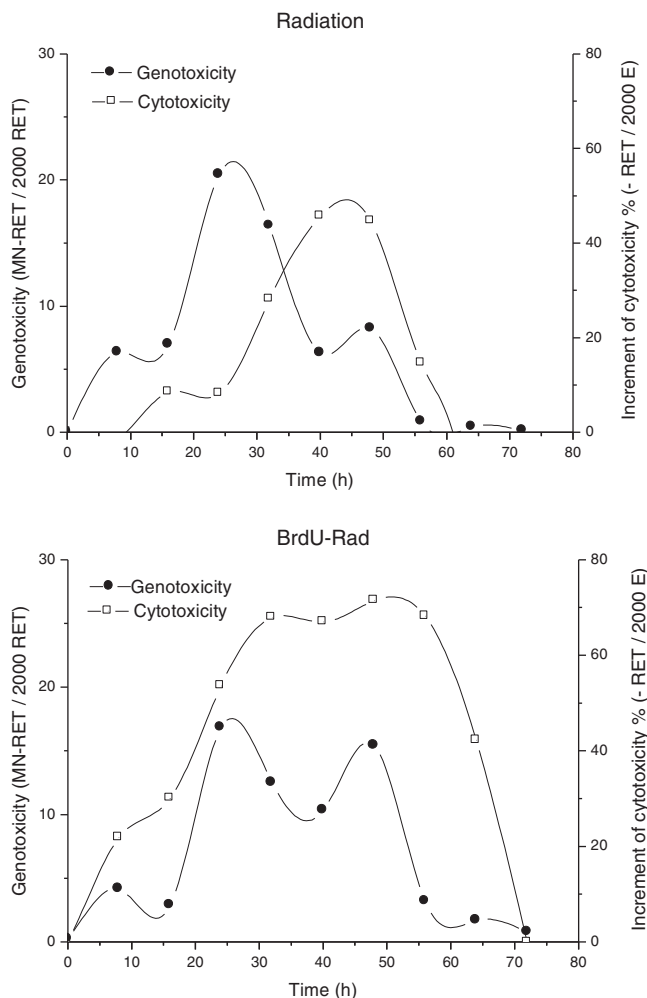


Fig. 7. Comparison of genotoxic and cytotoxic induction curves with respect to time in the radiation and BrdU-radiation groups. The data of these curves were obtained from data of Figures 4 and 5.

and a low shoulder. In the present study, three peaks were observed: a small one at 8 h, a large one at 30 h, and a medium-sized peak at 48 h. This finding may be due to differences in the sensitivities of the methods used. The sensitivity of cytometry is very high; when the cytotoxicity is low, it is possible to score 20,000 cells, which is one order of magnitude greater than scoring by microscopy and allows the measurement of slight increases. An alternative but not mutually exclusive explanation is that our previous studies of unsubstituted DNA were performed in BALB/c mice, which is a radiosensitive strain; thus, the additional peaks observed in the present study could represent the expression of some process present in the ICR strain that is not present in BALB/c mice [Mukherjee et al. 2014].

In the cells with BrdU-substituted DNA, three peaks were observed after irradiation. The first peak was small and could be explained by the previously reported aneuploidogenic effect of

radiation [Hande et al. 1996], in agreement with our previous studies in which the micronuclei induced by aneuploidogens appear early [Morales-Ramírez et al. 2004a]. The second peak was lower in terms of the area beneath the curve than that induced in BrdU unsubstituted DNA, but the results were not statistically significant and probably represent the breaks induced by debromination of the incorporated BrdU [Cecchini et al. 2004]. The third peak showed a significant increase with respect to unsubstituted DNA and could represent the consequence of the formation of crosslinks [Cecchini et al. 2005] or nucleotide mismatches [Cecchini et al. 2005; Hu et al. 2004].

There is evidence that BrdU substitution can generate tautomeric forms, which, in turn, can produce mismatches [Hu et al. 2004], and mismatch sites are prone to subsequent interstrand crosslink induction by radiation [Cecchini et al. 2005]. These data indicate that, in addition to BrdU substitution, the conformational state determines the sensitivity and lesion type. Under these circumstances, the crosslinks that are induced in mismatched sites of single-strand BrdU-substituted regions could be the lesions involved in DNA break production; the unresolved mismatches may also produce DNA breaks, such as in the case of pseudomismatches induced by MNU [Armstrong and Galloway 1997], resulting in the production of micronuclei in the subsequent division [Morales-Ramírez and Vallarino-Kelly 1999]. Evidence from a cell-free system indicates that radiation-induced crosslinking in BrdU-substituted DNA occurs preferentially in mismatches with specific nucleotide sequences [Dextraze et al. 2009].

Regarding the possibility of crosslinks induced by radiation in BrdU-substituted DNA, in the present study, radiation significantly increased the third peak of MN induction in BrdU-substituted cells with respect to unsubstituted cells. To discern the timing of micronucleus induction, we proposed using the time of relative maximal induction (Trmi) [Morales-Ramírez et al. 2014], which represents the difference in the time of maximal induction by some agents with respect to the maximal induction by ionizing radiation because radiation acts directly without requiring pharmacokinetic processes, in contrast to chemical agents. In the present study, the third peak showed a Trmi of 18 h. In a previous study, higher doses of cisplatin, busulfan, and bis-chloroethyl nitrosourea showed a later peak of MN induction between 46 and 48 h [Morales-Ramírez et al. 2004b]. These results represent a Trmi for these crosslinking agents of 21.3–22.3 h, near the Trmi of the third peak of MN induction by radiation in BrdU-substituted DNA. This third peak with the BrdU-substituted DNA is accompanied by greater cytotoxicity than with the unsubstituted DNA. This result is consistent with the abundant crosslinks likely resulting in high cytotoxicity.

To compare the effect of BrdU incorporation into DNA with the cytotoxicity caused by radiation, we calculated the reduction of the ABC of RET vs. time, where 100% represented no change from the frequency obtained at time zero over the 72 h. The percentages of cytotoxicity were 6.6, 15.3, and 47.2% for BrdU, radiation, and BrdU plus radiation, respectively. This

result indicates that BrdU causes important radiosensitization that is statistically significant.

Regarding the relationship between genotoxicity and cytotoxicity, the superposed curves of the increases in these endpoints revealed that the peaks of cytotoxicity are slightly delayed. The second peak of MN-RET was higher in BrdU-unsubstituted cells and was not associated with cytotoxicity in a time-dependent manner. However, after BrdU incorporation, the breaks in this peak were slightly reduced, and there was a dramatic increase in cytotoxicity. This difference indicates that the lesions induced by radiation in BrdU-substituted DNA were different and much more cytotoxic. Alternatively, these lesions could be related to simple breaks caused by debromination of the incorporated BrdU, that are five times more abundant than those induced in unsubstituted DNA [Cecchini et al. 2005]. The number of lesions could saturate the repair process and cause cell death. Concerning the increase of the MN-RET in the third peak, there is a concomitant increase in cytotoxicity that could be the result of a DNA crosslinking production; cross-links represent one of the most toxic types of DNA damage for proliferating cells [Cecchini et al. 2005].

Overall, BrdU appeared to be an excellent radiosensitizing agent and should have additional therapeutic applications. However, to date, it has been used only in brain tumors [Kinsella et al. 1984; Phillips et al. 1991] using high doses and radiation with conventional fractionated accumulated irradiation doses between 45 and 66 Gy [Matsutani et al. 1988; Hegarty et al. 1990; Robertson et al. 1997], a combination that is very toxic to the organism. Identifying optimal doses of both BrdU and radiation might provide better therapeutic outcomes that minimize side effects. These and other limitations have restricted the therapeutic use of BrdU [Prados et al. 1998]. A strategy to improve therapeutic protocols could be long-term continuous BrdU incorporation with low doses sufficient to substitute a certain low percentage of DNA in all cancer cells but without deleterious effects in the patient, followed by treatment with a lower dose of radiation than that used in the previous studies. Additionally, this strategy could improve the action of directed radiopharmaceuticals [Morales-Ávila et al. 2010]. More studies are required to propose a theoretical protocol.

CONCLUSIONS

The results obtained in both experimental models *in vivo* led to the following conclusions: (1) low BrdU incorporation into DNA increases the sensitivity to low doses of radiation *in vivo*; (2) SCGE, in particular, revealed the dramatic radiosensitization of cells with BrdU-substituted DNA *in vivo* compared with unsubstituted cells for both proliferating and nonproliferating cells and demonstrated increases in the frequencies of damaged cells and breaks (tail migration ranges); (3) this study is the first to provide *in vivo* evidence that

proliferating cells with BrdU-substituted DNA are particularly sensitive to radiation, which is consistent with evidence obtained in cell-free systems that single-stranded BrdU-substituted DNA is more radiosensitive; (4) radiation of both unsubstituted and BrdU-substituted DNA seems to cause slight induction of MN through an aneugenic mechanism; (5) persistent DNA breaks that caused micronuclei appear to be produced by gamma rays through two main mechanisms; (6) only damage induced during the late mechanism appears to be increased by BrdU incorporation, and this mechanism, according to previously reported studies, could be related to crosslinks; (7) all mechanisms of DNA break induction in BrdU-substituted DNA appear to correlate with cell cytotoxicity caused by BrdU incorporation; and (8) irradiation after BrdU incorporation increases the cytotoxicity of the first main mechanism of MN induction, indicating that radioinduced lesions in BrdU-substituted DNA are more cytotoxic or that the increased number of lesions is difficult to repair.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

VCV and PMR conceived of the study, analyzed the data, and interpreted the results. ROM, ECR, and TVK analyzed the data and interpreted the results. All authors wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Angel Reyes Pozos for excellent technical assistance and Dr. Pedro González for support with TLD dosimetry.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

- Armstrong MJ, Galloway SM. 1997. Mismatch repair provokes chromosome aberrations in hamster cells treated with methylating agents or 6-thioguanine, but not with ethylating agents. *Mutat Res* 373: 167–178.
- Cecchini S, Girouard S, Huels MA, Sanche L, Hunting DJ. 2004. Single-strand-specific radiosensitization of DNA by bromodeoxyuridine. *Radiat Res* 162:604–615.
- Cecchini S, Girouard S, Huels MA, Sanche L, Hunting DJ. 2005. Interstrand cross-links: a new type of gamma-ray damage in bromodeoxyuridine-substituted DNA. *Biochemistry* 44:1932–1940.
- Cervantes-Ríos E, Ortiz-Muñiz R, Martínez-Hernández AL, Cabrera-Rojo L, Graniel-Guerrero J, Rodríguez-Cruz L. 2012. Malnutrition and infection influence the peripheral blood reticulocyte micronuclei frequency in children. *Mutat Res* 731:68–74.
- Dewey WC, Humphrey RM. 1965. Increase in radiosensitivity to ionizing radiation related to replacement of thymidine in mammalian cells with 5-bromodeoxyuridine. *Radiat Res* 26:538–553.

- Dextraze ME, Cecchini S, Bergeron F, Girouard S, Turcotte K, Wagner JR, et al. 2009. Reaching for the other side: Generating sequence-dependent interstrand cross-links with 5-bromodeoxyuridine and γ -rays. *Biochemistry* 48:2005–2011.
- Eriksson S, Nygren J. 1995. In Comet Workshop. Prague, Aug 19–20.
- Fujii Y, Genet MD, Roybal EJ, Kubota N, Okayasu R, Miyagawa K, Fujimori A, Kato TA. 2013. Comparison of the bromodeoxyuridine-mediated sensitization effects between low-LET and high-LET ionizing radiation on DNA double-strand breaks. *Oncol Rep* 29: 2133–2139.
- Gantchev TV, Dextraze M-E, Hunting DJ. 2011. DNA Radiosensitization: the search for repair refractive lesions including double strand breaks and interstrand crosslinks. *Clark Chen Selected Topics in DNA Repair. InTech Europe Croatia*. pp. 417–436 ISBN: 978–953-307-606-5.
- Greenstock CL, Whitehouse RP. 1992. Radiation chemical studies of sensitization by 5-bromouridine-5'-monophosphate (5-BrUMP). *Radiat Environ Biophys* 31:1–9.
- Hamasaki K, Imai K, Hayashi T, Nakachi K, Kusunoki Y. 2007. Radiation sensitivity and genomic instability in the hematopoietic system: Frequencies of micronucleated reticulocytes in whole-body X-irradiated BALB/c and C57BL/6 mice. *Cancer Sci* 98:1840–1844.
- Hande MP, Boei JJ, Natarajan AT. 1996. Induction and persistence of cytogenetic damage in mouse splenocytes following whole-body X-irradiation analysed by fluorescence in situ hybridization. II. Micronuclei. *Int J Radiat Biol* 70:375–383.
- Hegarty TJ, Thornton AF, Diaz RF, Chandler WF, Ensminger WD, Junck L, Page MA, Gebarski SS, Hood TW, Stetson PL, et al. 1990. Intra-arterial bromodeoxyuridine radiosensitization of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19:421–428.
- Hentosh P, Peffley DM. 2010. The cladriline conundrum: deciphering the drug's mechanism of action. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 6: 75–81. <https://doi.org/10.1517/17425250903393745>.
- Hu X, Li H, Ding J, Han S. 2004. Mutagenic mechanism of the A-T to G-C transition induced by 5-bromouracil: an ab initio study. *Biochemistry* 43:6361–6369.
- Humphrey RM, Dewey WC. 1965. Radiosensitivity of normal and 5-bromodeoxyuridine treated mammalian cells during different phases of the cell cycle. *Exp Cell Res*. 39:483–495.
- Kaplan HS. 1966. DNA-strand scission and loss of viability after X irradiation of normal and sensitized bacterial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 55:1442–1446.
- Kinsella TJ, Mitchell JB, Russo A, Morstyn G, Glatstein E. 1984. The use of halogenated thymidine analogs as clinical radiosensitizers: rationale, current status, and future prospects: non-hypoxic cell sensitizers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 10:1399–1406.
- Kruszewski M, Iwaneńko T, Machaj EK, Oldak T, Wojewódzka M, Kapka-Skrzypczak L, Pojda Z. 2012. Direct use of the comet assay to study cell cycle distribution and its application to study cell cycle-dependent DNA damage formation. *Mutagenesis* 27: 551–558. <https://doi.org/10.1093/mutage/ges018>.
- Lawrence TS, Davis MA, Maybaum J, Stetson PL, Ensminger WD. 1990. The effect of single versus double-strand substitution on halogenated pyrimidine-induced Radiosensitization and DNA Strand breakage in human tumor cells. *Radiat Res* 123:192–198.
- Ling LL, Ward JF. 1990. Radiosensitization of Chinese hamster V79 cells by bromodeoxyuridine substitution of thymidine: enhancement of radiation-induced toxicity and DNA strand break production by monofilar and bifilar substitution. *Radiat Res* 121:76–83.
- Matsutani M, Kohno T, Nagashima T, Nagayama I, Matsuda T, Hoshino T, Sano K. 1988. Clinical trial of intravenous infusion of bromodeoxyuridine (BUdR) for radiosensitization of malignant brain tumors. *Radiat Med* 6:33–39.
- Miller EM, Fowler JF, Kinsella TJ. 1992. Linear-quadratic analysis of radiosensitization by halogenated pyrimidines. *Radiat Res* 131: 90–97.
- Morales-Ávila E, Ferro-Flores G, Vallarino-Kelly T, Morales-Ramírez P. 2010. Radiosensitization of murine normoblasts in vivo by Bromodeoxyuridine to the genotoxicity and cytotoxicity of the bone-seeking radiopharmaceutical Sm-153-EDTMP. *Radiat Res* 173:386–391.
- Morales-Ramírez P. 1980. Analysis in vivo of sister chromatid exchange in mouse bone-marrow and salivary gland cells. *Mutat Res* 74: 61–69.
- Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T. 1999. Relationship between the kinetics of micronuclei induction and the mechanism of chromosome break formation by methylnitrosourea in mice in vivo. *Mutat Res* 427:31–38.
- Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Cruz-Vallejo V. 2014. Kinetics of micronucleus induction and cytotoxicity caused by distinct antineoplastics and alkylating agents in vivo. *Toxicology Lett* 224: 319–325.
- Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Cruz-Vallejo V. 2017. Genotoxicity kinetics in murine normoblasts as an approach for the in vivo action of difluorodeoxycytidine. *Cancer Chemother Pharmacol* 79:843–853. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3290-0>.
- Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Cruz-Vallejo VL. 2004a. Kinetics of micronucleated polychromatic erythrocytes (MN-PCE) induction in vivo by aneuploidogens. *Mutation Res* 565:79–87.
- Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Cruz-Vallejo VL. 2010. Effect of O6-chloroethylguanine DNA lesions on the kinetics and mechanism of micronucleus induction in vivo. *Environ Mol Mutagen* 51:236–242.
- Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Cruz-Vallejo VL, López-Iturbe R, Alvaro-Delgadillo H. 2004b. In vivo kinetics of micronuclei induction by bifunctional alkylating antineoplastics. *Mutagenesis* 19: 207–213.
- Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Rodríguez-Reyes R. 1984a. In vivo persistence of sister chromatid exchanges (SCE) induced by gamma rays in mouse bone marrow cells. *Environ Mutagen* 6: 529–537.
- Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Rodríguez-Reyes R. 1984b. The detection of SCE in rodent tissues using the activated charcoal-bromodeoxyuridine system. *Basic Life Sci* 29B:599–611.
- Mukherjee S, Sainis KB, Deobagkar DD. 2014. F1 hybrids of BALB/c and C57BL/6 mouse strains respond differently to low-dose ionizing radiation exposure. *J. Genet* 93:667–682.
- Nabben FJ, Laffeur MV, Sikkers JC, Loman AC, Retèl J, Loman H. 1984. Repair of damage in double-stranded phi X174 (RF) DNA due to radiation-induced water radicals. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 45:379–388.
- Olive PL, Banáth JP, Durand RE. 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res* 122:86–94.
- Perry P, Evans HJ. 1975. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 258:121–125.
- Phillips TL, Levin VA, Ahn DK, Gutin PH, Davis RL, Wilson CB, Prados MD, Wara WM, Flam MS. 1991. Evaluation of bromodeoxyuridine in glioblastoma multiforme: a northern California cancer center phase II study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 21:709–714.
- Prados MD, Scott CB, Rotman M, Rubin P, Murray K, Sause W. 1998. Influence of bromodeoxyuridine radiosensitization on malignant glioma patient survival: a retrospective comparison of survival data from the northern California oncology group (NCOG) and radiation therapy oncology group trials (RTOG) for glioblastoma

- multiforme and anaplastic astrocytoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 40:653–659.
- Rajaraman R, Kamra OP. 1973. Modification of radiation-induced genetic damage in the male *germ* cells of *Drosophila melanogaster* with pyrimidine nucleosides and their halogenated analogues: effects on the F1 generation. *Mutation Res* 17:395–401.
- Rajaraman R, Kamra OP. 1974. Modification of radiation-induced genetic damage in *Drosophila melanogaster* male germ cells with nucleic acid precursors. III. Effects on the premeiotic cells. *Mutation Res* 22:47–53.
- Robertson JM, McGinn CJ, Walker S, Marx MV, Kessler ML, Ensminger WD, et al. 1997. A phase I trial of hepatic arterial bromodeoxyuridine and conformal radiation therapy for patients with primary hepatobiliary cancers or colorectal liver metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 39: 1087–1092.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184–191.
- Webb CF, Jones GD, Ward JF, Moyer DJ, Aguilera JA, Ling LL. 1993. Mechanisms of radiosensitization in bromodeoxyuridine-substituted cells. *Int J Radiat Biol* 64:695–705.

Accepted by—
R. Preston



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00116

Matrícula: 2161801101

El uso de la genotoxicocinética y la citotoxicocinética para caracterizar la acción de radiosensibilizadores.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 10 del mes de diciembre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE
DRA. EDITH CORTES BARBERENA
DRA. MARIA DEL CARMEN GARCIA RODRIGUEZ
DRA. ELSA CERVANTES RIOS



Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública, cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL
DE: VIRGINIA LETICIA CRUZ VALLEJO

VIRGINIA LETICIA CRUZ VALLEJO
ALUMNA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE

VOCAL

DRA. EDITH CORTES BARBERENA

VOCAL

DRA. MARIA DEL CARMEN GARCIA RODRIGUEZ

SECRETARIA

DRA. ELSA CERVANTES RIOS