

II. ARTÍCULOS

Analysis of bleomycin-and cytosine arabinoside-induced chromosome aberrations involving chromosomes 1 and 4 by painting FISH

Mutat. Res., 439: 3-11, 1999

Equal induction and persistence of chromosome aberrations involving
chromosomes with heterogeneous lengths and gene densities

Cytogenet. Cell Genet., 87: 62-68, 1999

Equal induction and persistence of chromosome aberrations involving chromosomes 1, 4 and 10 in thyroid cancer patients treated with radioactive iodine

Mutat. Res., 469: 147-158, 2000

ARTÍCULO 4

Induction, processing and persistence of radiation-induced chromosomal aberrations involving hamster euchromatin and heterochromatin

Mutat. Res., 469: 169-179, 2000

Radiation-induced chromosome aberrations in a human euchromatin
(17cen-p53) and heterochromatic (1cen-1q12) region

Mutagenesis (enviado)

Radiation-induced chromosome aberrations in a human euchromatin
(17cen-p53) and heterochromatic (1cen-1q12) region

Mutagenesis (aceptado)

III. DISCUSIÓN

III. DISCUSIÓN

La asociación entre desórdenes genéticos y presencia de ACs justifica el interés en entender los mecanismos implicados en la formación de las ACs. En este sentido, hemos visto como se acepta de forma generalizada que las ACs se forman a partir de DSBs no reparadas o mal reparadas. Sin embargo, no se conocen totalmente los mecanismos involucrados en la formación de las ACs. Diferentes investigaciones enfatizan el posible efecto modulador de la estructura de la cromatina en la formación y procesamiento de las ACs. Hay evidencias que indican que la estructura de la cromatina o la actividad transcripcional pueden afectar el procesamiento de distintas lesiones en el DNA, tales como las inducidas por la luz ultravioleta, los aductos químicos o las SSBs y enlaces cruzados inducidos por la radiación ionizante. No obstante, existe poca información sobre el efecto de la estructura de la cromatina y la heterogeneidad intragenómica en la formación de las DSBs, su procesamiento y persistencia.

Con la incorporación de las técnicas de hibridación *in situ* en la detección de las ACs se volvió a cuestionar la distribución de los puntos de rotura en el genoma a partir de los cuales se generan las ACs, ya sea de forma espontánea o inducida. La distribución de las ACs es el resultado de la inducción inicial y de la reparación de las lesiones en el DNA. Por lo tanto, factores como la estructura de la cromatina y la arquitectura nuclear, que podrían modular la inducción inicial y/o la reparación de las lesiones, podrían afectar la distribución de las ACs. En este sentido, el análisis de la distribución de las ACs entre cromosomas que difieran en densidad génica puede proporcionarnos una información útil, teniendo en cuenta que la densidad génica refleja la heterogeneidad de los cromosomas con respecto a la actividad génica y a la estructura de la cromatina.

La distribución de las ACs se ha analizado mayoritariamente después de la exposición a radiación ionizante; sin embargo, es en el caso de la acción de los agentes químicos cuando la compactación de la cromatina y, por lo tanto, la diferente accesibilidad al DNA, puede afectar más a la distribución de las ACs. En este sentido, en el primer estudio planteado en esta tesis doctoral se ha comparado la distribución de las ACs después de la exposición a un agente químico, la bleomicina, entre los cromosomas 1 y 4, dos cromosomas que difieren en densidad génica, mediante la técnica de pintado cromosómico por FISH. En este estudio se realizó una FISH bicolor hibridando simultáneamente los cromosomas 1 y 4 con sondas

DISCUSIÓN

marcadas con biotina y digoxigenina, de forma que el cromosoma 1 se visualizó en verde y el cromosoma 4 en rojo después del proceso de detección. El estudio se realizó en linfocitos humanos de sangre periférica cultivados durante 48 horas y tratados durante las primeras 18 horas con diferentes concentraciones de bleomicina. Adicionalmente, se analizó el efecto del arabinósido de citosina (ara-C) sobre la reparación de las lesiones inducidas por la bleomicina. Para ello se establecieron cultivos paralelos tratados conjuntamente con bleomicina y ara-C.

El efecto clastogénico de la bleomicina se detectó en todas las concentraciones ensayadas, independientemente del cromosoma analizado, observándose una relación lineal entre la frecuencia de ACs y la concentración de bleomicina. Este resultado concuerda con los descritos previamente por otros autores (Dresp *et al.*, 1978; Sognier *et al.*, 1982; Kligerman *et al.*, 1992; Ellard *et al.*, 1995). Ambos cromosomas presentan la misma sensibilidad al efecto clastogénico de la bleomicina. Así, el número mínimo de roturas detectado en los cromosomas 1 y 4, a partir de las ACs observadas en ambos cromosomas, corresponde a lo esperado en función de su contenido de DNA.

La bleomicina se considera como un agente radiomimético debido a su capacidad de inducir daño en el DNA por liberación de radicales libres. No obstante, los mecanismos de acción de las radiaciones ionizantes y la bleomicina muestran diferencias substanciales (ver López-Larraza *et al.*, 1990). Varios estudios sugieren que la sensibilidad del DNA a la bleomicina está influenciada por la composición de bases del DNA (Takeshita *et al.*, 1978) y la estructura de la fibra de cromatina (Vig y Lewis, 1978). En este sentido, se ha descrito que las regiones internucleosomales y los genes en transcripción son más sensibles a la acción de la bleomicina que el DNA nucleosomal o los genes inactivos (Kuo y Hsu, 1979; Kuo, 1981; Beckman *et al.*, 1987). Por otra parte, López-Larraza y Bianchi obtienen que la sensibilidad del DNA a la bleomicina y la eficiencia de reparación están inversamente correlacionadas con el grado de compactación de la cromatina (López-Larraza y Bianchi, 1993). Así pues, a medida que aumenta la compactación de la cromatina, decrece la sensibilidad del DNA a la bleomicina y la capacidad de reparación, siendo el balance final una mayor incidencia de DSBs en el DNA de las células con mayor condensación de la cromatina. Sin embargo, nosotros no hemos detectado el efecto de la estructura de la cromatina al analizar, en metafase, las ACs que afectan a dos cromosomas con diferente densidad génica. El efecto de la bleomicina había sido previamente analizado en linfocitos humanos, utilizando la técnica

DISCUSIÓN

del pintado cromosómico multicolor, hibridando simultáneamente los cromosomas 1, 2 y 3 (Ellard *et al.*, 1995). En este estudio, se obtuvo una mayor implicación del cromosoma 1 respecto a los cromosomas 2 y 3.

El efecto potenciador del ara-C ha sido difícil de determinar, debido al retraso del ciclo celular que se produce después del tratamiento conjunto con bleomicina y ara-C, con respecto al tratamiento sólo con bleomicina. Sin embargo, sí que se ha podido observar claramente un diferente comportamiento de los dos cromosomas después del tratamiento conjunto. En este caso, el cromosoma 1 presentó una frecuencia de ACs mayor a la esperada y el cromosoma 4 una frecuencia menor, en función de su contenido de DNA. En cambio, no se observaron diferencias entre los dos cromosomas al tratar únicamente con ara-C. Este resultado puede explicarse teniendo en cuenta la implicación de un proceso dependiente y otro independiente de la reparación por escisión en la inducción de ACs por parte del ara-C (Kishi y Sekizawa, 1993). Así pues, al tratar únicamente con ara-C, detectamos principalmente su efecto clastogénico, independiente de la reparación por escisión, mientras que, al tratar conjuntamente con bleomicina y ara-C, detectamos tanto el efecto clastogénico como el efecto inhibidor. Por lo tanto, el hecho de que al tratar sólo con ara-C no detectemos diferencias, que sí detectamos al tratar conjuntamente con bleomicina y ara-C, está indicando que las diferencias se deben al efecto inhibidor del ara-C.

En el cromosoma 1, el efecto inhibidor del ara-C fue mayor que en el cromosoma 4, resultado que sugiere un nivel de reparación por escisión superior en el cromosoma con mayor densidad génica, ya que para que se manifieste el efecto inhibidor del ara-C es necesario que se inicie el proceso de reparación por escisión. Esta observación coincide con la descrita previamente por Surrallés y colaboradores con el EMS (Surrallés *et al.*, 1997). El mayor efecto inhibidor del ara-C en los cromosomas con mayor densidad génica, podría ser consecuencia de la reparación preferencial de las regiones activas transcripcionalmente. En este sentido, y como ya se ha indicado anteriormente, existen evidencias de que la estructura de la cromatina o la actividad transcripcional puede afectar el procesamiento de las lesiones inducidas por la radiación ultravioleta (Bohr *et al.*, 1985; Mullenders *et al.*, 1987), de los aductos químicos (Hanawalt, 1991), o de los enlaces cruzados y SSBs inducidos por la radiación ionizante (Chiu *et al.*, 1982).

DISCUSIÓN

La reparación preferencial de las regiones transcripcionalmente activas se ha determinado principalmente en el caso de la NER, describiéndose varios niveles, incluyendo la reparación acoplada a la transcripción. Por otra parte, son las lesiones reparadas por NER las principalmente afectadas por el ara-C, lo que se debe a la inhibición por parte del ara-C de las DNAs polimerasas dependientes de hueco grande. En cuanto a las lesiones inducidas por la bleomicina, aunque se reparan principalmente por vía de hueco pequeño, también se pueden reparar por vía de hueco grande y, por lo tanto, su reparación puede inhibirse durante el tratamiento con ara-C (DiGiuseppe y Dresler, 1989). Además, el efecto potenciador del ara-C se ha relacionado con diferentes tipos de lesiones inducidas por la bleomicina, tales como bases dañadas o SSBs (Preston, 1980; Holmerg y Gumauskas, 1986; Natarajan *et al.*, 1986). Por lo tanto, el efecto del ara-C asociado a la densidad génica de los cromosomas podría indicarnos la existencia de reparación preferencial, al menos de las lesiones cuya reparación es inhibida por el ara-C, mientras que por otra parte, podría significar la participación de otras lesiones, además de las DSBs, en la formación de las ACs.

Este resultado podría llevar a pensar que hubiéramos tenido que detectar también una mayor frecuencia de ACs en el cromosoma 1 al tratar sólo con bleomicina, si consideramos que las lesiones cuya reparación es inhibida por el ara-C contribuyen a la formación de las ACs. Sin embargo, como ya se ha indicado anteriormente, no hemos detectado diferencias entre ambos cromosomas. Por lo tanto, en condiciones normales sin saturación de la reparación, estas lesiones contribuirán poco a la formación de las ACs. Por otra parte, la reparación preferencial en el cromosoma 1 no quiere decir que las lesiones no se reparen en el cromosoma 4, sino que su reparación es más lenta, de forma que en caso de actuar el ara-C y generarse una DSBs, la probabilidad de interaccionar con otra DSBs en el tiempo y en el espacio es menor, lo que explicaría el menor efecto del ara-C en este cromosoma.

La densidad génica también podría afectar la persistencia de las ACs y, por lo tanto, la distribución cromosómica. Así, se ha sugerido que los cromosomas con mayor densidad génica pueden presentar una menor frecuencia de ACs como consecuencia de la letalidad causada por el truncamiento de genes (Natarajan *et al.*, 1996a). Las translocaciones son consideradas aberraciones estables y, por lo tanto, se han propuesto como biomarcadores en los estudios retrospectivos. Sin embargo, algunos estudios sugieren que las translocaciones pueden no ser tan estables como en un principio se pensaba, ya que las roturas involucradas podrían causar letalidad celular debido al truncamiento de genes (Spruill *et al.*, 1996; Tucker

DISCUSIÓN

et al., 1997). Teniendo en cuenta este planteamiento, la densidad génica de los cromosomas involucrados podría modular no sólo la inducción sino también la persistencia de las translocaciones. Con el fin de contrastar esta hipótesis, en un segundo estudio se comparó la persistencia de las ACs inducidas por la radiación ionizante en cromosomas con alta y baja densidad génica, mediante la técnica del pintado cromosómico. El estudio se realizó *in vitro* en la línea linfoblastoide TK6 después de ser irradiada con 3 Gy de rayos γ . En el estudio se analizaron las ACs que implicaban a los cromosomas 1, 4, 18 y 19, los dos cromosomas más grandes (1, 4) y los dos más pequeños (18, 19) que más difieren en densidad génica, con el fin de analizar simultáneamente el efecto del tamaño y de la densidad génica. El seguimiento de las ACs se realizó a los 1, 3, 7, 14, 28, 42 y 56 días después de la irradiación, en el caso de los cromosomas 1 y 4, y en el caso de los cromosomas 18 y 19, a los 1, 3, 7, 14 y 56 días después de la irradiación. Al igual que en el estudio anterior, se utilizaron sondas marcadas indirectamente, realizándose la hibridación por parejas.

En este estudio al comparar la inducción de ACs un día después de la irradiación tampoco se detectaron diferencias entre los cuatro cromosomas analizados. La frecuencia de ACs inducidas fue proporcional al tamaño de los cromosomas. En cuanto su persistencia, los intercambios complejos, dicéntricos y fragmentos fueron muy inestables, desapareciendo durante la primera semana después del tratamiento. Este rápido descenso en la frecuencia de dicéntricos y fragmentos era esperado teniendo en cuenta el comportamiento citogenético inestable de las aberraciones asimétricas. La frecuencia de translocaciones también decreció con el tiempo, siguiendo un declive exponencial. Sin embargo, en torno a un 30% de las translocaciones iniciales se mantuvo estable durante el periodo analizado, independientemente de la longitud o tamaño de los cromosomas. La estabilidad de las translocaciones se alcanzó al perderse las aberraciones inestables, de forma que el descenso de las translocaciones puede deberse a la presencia de otras aberraciones inestables en las mismas células. Por lo tanto, es difícil extrapolar los resultados a dosis bajas de exposición en las cuales la presencia de aberraciones múltiples y complejas debería reducirse y, por lo tanto, la persistencia de las translocaciones debería ser mayor en términos porcentuales. Por otra parte, el rápido descenso de las translocaciones durante la primera semana después de la irradiación limita la valoración del papel de la densidad génica en la estabilidad de las translocaciones a largo término. Sin embargo, se puede concluir que la densidad génica no afecta la persistencia del 30% de las translocaciones que perduran.

DISCUSIÓN

Las translocaciones simples, tanto las recíprocas como las no recíprocas, fueron más persistentes que las translocaciones que forman parte de intercambios complejos, las cuales presentaron un declive similar al obtenido con las aberraciones asimétricas. Por lo tanto, la presencia de translocaciones complejas contribuye al declive inicial detectado. En este sentido, hay que tener en cuenta que una parte de las translocaciones clasificadas como simples pueden formar parte, en realidad, de intercambios complejos (Simpson y Savage, 1995). Las translocaciones recíprocas y no recíprocas presentaron una cinética similar. Sin embargo, se ha de considerar que una parte de las translocaciones recíprocas pueden ser clasificadas como translocaciones no recíprocas, debido al límite de detección inherente a las técnicas de FISH (Boei y Natarajan, 1998; Boei *et al.*, 1998).

A priori, teóricamente la densidad génica podría ser un factor limitante de la persistencia de las translocaciones. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis no confirman esta hipótesis. En este sentido, se podría pensar que sólo entre un 5-10 % del genoma corresponde a DNA codificante, de forma que detectar el efecto de la densidad génica, aunque existiera, sería difícil bajo las condiciones experimentales seguidas. No obstante, la interrupción de un gen puede producirse tanto a nivel de intrón como de exón, siendo el resultado final un gen no funcional en ambos casos. Por lo tanto, si estimamos en 60.000 el número de genes humanos y un tamaño medio del gen de 15-20 Kb (Fields *et al.*, 1994), obtendremos que entre un 35-40 % DNA corresponde a genes. Este porcentaje se ha de considerar a nivel global del genoma, ya que se tiene que tener en cuenta la heterogeneidad detectada en la distribución de los genes, de forma que lo que es cierto para el genoma no tiene porque serlo al considerar cromosomas individuales. De hecho, a partir de los datos publicados con la mitad de los genes estimados localizados (Deloukas *et al.*, 1998), podemos considerar que entre un 56-74% del cromosoma 19 está ocupado por genes. Estos valores son extrapolaciones que pueden ser cuestionados; no obstante, lo único que se pretende es reflejar que la inducción de roturas en un porcentaje importante del genoma puede afectar algún gen y que este porcentaje de DNA varía entre los cromosomas, obteniéndose diferencias de más del doble si comparamos los cromosomas 18 y 19, de forma que, teóricamente, sería posible detectar el efecto de la densidad génica en la distribución de las ACs. En cuanto al número de genes que constituye el genoma humano, actualmente se cuestionan las primeras estimas que daban valores comprendidos entre 60.000 y 100.000 (Fields *et al.*, 1994). Sin embargo, los resultados obtenidos son opuestos. Así, en determinados estudios se obtiene que el número de genes es inferior al considerado inicialmente, estimándose entre 28.000-35.000 genes (Crollius *et al.*,

DISCUSIÓN

2000), mientras que en otros estudios se obtiene que el genoma humano contiene aproximadamente 120.000 genes (Liang *et al.*, 2000). Con relación a nuestro estudio, también hay que considerar que no todos los genes son esenciales para la supervivencia celular. Por otra parte, el efecto deletéreo de las ACs podría no limitarse al truncamiento físico de los genes. En este sentido, deberían considerarse efectos de posición debidos a la disrupción de los dominios de la cromatina o de los puntos de unión a la matriz nuclear, de forma que podría verse afectada la expresión génica. Además se ha descrito que, durante el proceso de reparación de las roturas, se pueden producir deleciones de unas 8 Kb, de forma que una rotura próxima a una región codificante puede implicar también la disrupción de genes y la pérdida de material importante para la supervivencia celular (Lutze *et al.*, 1993).

En todo caso, el efecto final es que la densidad génica, al menos a dosis altas de radiación, no afecta la persistencia de las translocaciones y, por lo tanto, bajo estas condiciones parece que la densidad génica no es un factor a tener en cuenta en los estudios retrospectivos a la hora de seleccionar los cromosomas a partir de los cuales estimar la frecuencia genómica de translocaciones.

Los resultados obtenidos en el experimento anterior fueron contrastados con los obtenidos en un estudio realizado *in vivo* después de bajas dosis de exposición. En este caso, el estudio se llevó a cabo con pacientes de cáncer de tiroides. Estos pacientes proporcionan una posibilidad de estudiar *in vivo* la inducción y persistencia de las ACs después de la exposición a dosis relativamente bajas de yodo radiactivo (I^{131}), permitiéndonos contrastar la distribución de las ACs entre los cromosomas analizados aplicando la técnica del pintado cromosómico. Con este objetivo se realizó el seguimiento citogenético en un grupo de 10 mujeres con cáncer de tiroides, de edades comprendidas entre 12 y 49 años, que habían recibido una actividad media de $3,96 \pm 0,30$ GBq (rango 3,70-4,44 GBq) de I^{131} después de la tiroidectomía, con el fin de eliminar los restos tiroideos. De cada paciente se obtuvieron muestras de sangre antes del tratamiento y 1 semana, 1 año y 3,5 años (41-47 meses) después de la administración del I^{131} . En este estudio se analizó la frecuencia de ACs que involucran a los cromosomas 1, 4 y 10. Para ello se realizó una FISH multicolor hibridando simultáneamente los tres cromosomas, de forma que el cromosoma 1 se detectó en verde, el cromosoma 4 en rojo y el cromosoma 10 en naranja (figura 10). En este caso, se incorporó al estudio el análisis del cromosoma 10 por la implicación preferencial que se le atribuye a este cromosoma, a dosis bajas de radiación ionizante, en un estudio realizado en un grupo de niños de Gomel 10 años después del

DISCUSIÓN

accidente de Chernobyl (Scarpato *et al.*, 1997). Además, se sabe que el cromosoma 10 contiene varios genes involucrados en la iniciación y progresión de los tumores tiroideos (Bongarzone *et al.*, 1994; Zedenius *et al.*, 1996).

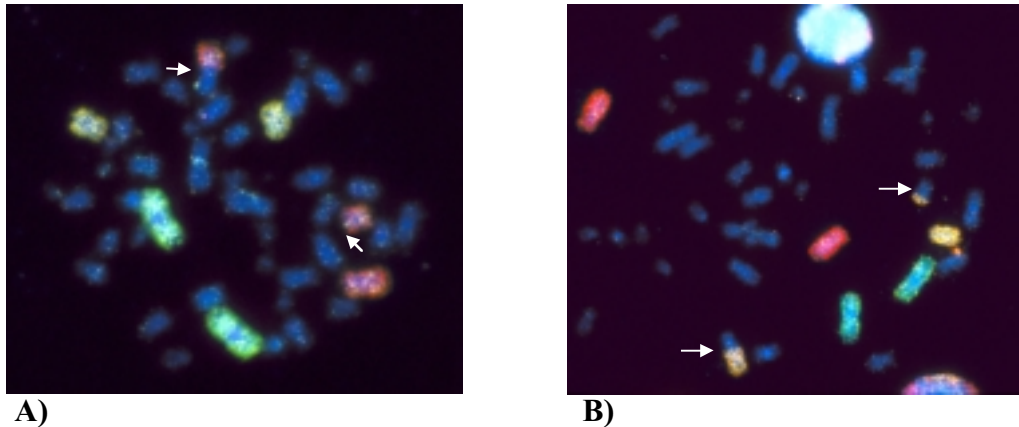


Figura 10. Visión al microscopio de fluorescencia de dos metafases después de realizar la FISH multicolor hibridando simultáneamente los cromosomas 1, 4, y 10. Con el filtro de triple banda, el cromosoma 1 se visualiza en verde, el cromosoma 4 en rojo, el cromosoma 10 en naranja y el resto de cromosomas contrateñidos con DAPI en azul. A) Metafase con translocación no recíproca entre el cromosoma 4 y uno de los cromosomas no hibridados; B) Metafase con un cromosoma dicéntrico y el correspondiente fragmento acéntrico bicolor que afecta al cromosoma 10 y uno de los cromosomas no hibridados.

Al analizar los resultados obtuvimos que el tratamiento con I^{131} incrementa la frecuencia de ACs en linfocitos de sangre periférica de los pacientes tratados, como era de esperar a partir de los resultados obtenidos en estudios previos, incluidos los realizados por nuestro grupo (Livingston *et al.*, 1993; Bagnat-Mahieu *et al.*, 1994; Catena *et al.*, 1994; Gundy *et al.*, 1996; Wuttke *et al.*, 1996; M'Kacher *et al.*, 1996; 1997; 1998; Gutiérrez *et al.*, 1997; 1999; Ramírez *et al.*, 1997). Así, una semana después del tratamiento, el número mínimo de roturas aumentó unas 3,4 veces respecto al nivel control, incremento al que contribuyeron tanto las translocaciones, como los dicéntricos y los fragmentos acéntricos. En cuanto a la persistencia de las ACs, se observó un diferente comportamiento entre translocaciones y dicéntricos. La frecuencia de translocaciones se mantuvo estable durante el periodo de tiempo analizado, mientras que la frecuencia de dicéntricos sufrió un descenso durante el primer año después del tratamiento para mantenerse estable en el último periodo analizado. En el caso de los fragmentos acéntricos, se observó una gran variabilidad interindividual que no permite extraer conclusiones al respecto.

DISCUSIÓN

Comparando estos resultados con los obtenidos *in vitro* en el estudio anterior, se sigue observando la mayor estabilidad de las translocaciones en comparación con los dicéntricos, como era de esperar teniendo en cuenta la naturaleza de estos dos tipos de ACs. En este caso la persistencia de los dicéntricos viene condicionada por el tiempo de vida de los linfocitos en sangre periférica. Los resultados obtenidos son consistentes con la existencia de dos subpoblaciones de linfocitos T, una de vida corta y otra de vida larga. Por otra parte, la baja dosis de exposición a la que son sometidos los pacientes contribuye a la mayor estabilidad de las translocaciones en términos porcentuales en comparación a la estabilidad obtenida en el estudio *in vitro*. En este estudio se ha estimado una dosis de 0.5 Gy una semana después del tratamiento, utilizando la relación dosis-efecto obtenida *in vitro* para el I¹³¹ por M'Kacher y colaboradores (M'Kacher *et al.*, 1996)

Cuando se analizaron los resultados para cada uno de los tres cromosomas estudiados, en general los tres cromosomas mostraron el mismo comportamiento en términos de inducción y persistencia. En todos los tiempos analizados, los valores observados de translocaciones, dicéntricos, exceso de fragmentos o número mínimo de roturas, para cada uno de los tres cromosomas estudiados, corresponden a los esperados en función de su contenido de DNA. Por lo tanto, este estudio corrobora *in vivo* los resultados obtenidos previamente *in vitro* para el cromosoma 1 y 4, pero no confirma la mayor radiosensibilidad atribuida al cromosoma 10 *in vivo* por Scarpato y colaboradores (Scarpato *et al.*, 1997). Sin embargo, ambos estudios no son del todo comparables, ya que los resultados observados con los niños de Gomel se basan en la frecuencia de translocaciones obtenidas a partir de los cromosomas 1, 3 y 10 después de 10 años del accidente de Chernobyl. Además, en este estudio las diferencias debidas al cromosoma 10 se detectaron después de comparar la frecuencia de translocaciones que implican a los cromosomas 1, 3 y 10 en el grupo de niños de Gomel respecto a la frecuencia de translocaciones que afectan a estos tres cromosomas en un grupo de niños de Italia. En consecuencia, los resultados obtenidos pueden estar afectados por factores medioambientales relacionados con el estilo de vida o la dieta. Las condiciones de exposición también son diferentes, tratándose en el caso de los niños de Gomel de una exposición crónica a una fuente de radiación altamente heterogénea.

La frecuencia de ACs en el cromosoma 10 también ha sido analizada en algunos estudios *in vitro*. De hecho, Scarpato y colaboradores han analizado recientemente la frecuencia de intercambios que implican a los cromosomas 1, 3 y 10 en linfocitos humanos expuestos *in*

DISCUSIÓN

in vitro a dosis bajas de rayos X (Scarpato *et al.*, 2000). En estas condiciones, también han encontrado una mayor implicación del cromosoma 10, por lo que respecta a la frecuencia de intercambios, en comparación con los cromosomas 1 y 3. A una dosis mayor, Knerh y colaboradores también detectaron una mayor implicación de este cromosoma pero, en este caso, sólo a nivel de dicéntricos (Knerh *et al.*, 1994, 1996). Sin embargo, en este cromosoma no se detectaron diferencias significativas al aumentar el número de cromosomas analizados (Barquinero *et al.*, 1998; Cigarrán *et al.*, 1999). Además, al considerar en conjunto los resultados obtenidos en diferentes estudios, realizados tanto por técnicas de bandas como por *chromosome painting*, no se observan diferencias respecto a los valores esperados para el cromosoma 10 (Johnson *et al.*, 1999)

Hasta ahora, en los estudios anteriores se ha evaluado el papel de la estructura de la cromatina indirectamente, analizando la distribución de las ACs en cromosomas con diferente longitud y densidad génica. Para ello, se han realizado estudios *in vitro* después de un tratamiento químico, como el tratamiento con bleomicina, o después de la exposición a radiación ionizante *in vivo* e *in vitro*. En ninguno de los tres estudios se ha detectado el efecto de la estructura de la cromatina al analizar la distribución de las ACs en metafase en los diferentes cromosomas analizados. Sin embargo, respecto a los cromosomas 1 y 4, los resultados descritos en la bibliografía, sobre la distribución de las ACs, son contradictorios. Así, en determinados estudios se ha encontrado mayor frecuencia de ACs implicando al cromosoma 4 con respecto al cromosoma 1 (Granath *et al.*, 1996; Boei *et al.*, 1997; Hoffmann *et al.*, 1999), principalmente debido a una mayor frecuencia de translocaciones; mientras que, en otros estudios no se detectan diferencias entre ambos cromosomas (Tucker *et al.*, 1993; Kovacs *et al.*, 1994; Matsuoka *et al.*, 1994; Luomahaara *et al.*, 1999). Las causas de las diferencias entre los resultados de los estudios no se conocen. Sin embargo, aparte de las diferentes condiciones de exposición, inevitables entre estudios, hay que tener en cuenta las posibles diferencias en la susceptibilidad de los donantes, determinadas por factores genéticos o medioambientales. Además, otros factores como el número de metafases analizadas o la presencia de aberraciones clonales también podrían contribuir a las discrepancias obtenidas entre estudios.

La mayoría de los estudios citogenéticos se realizan en metafase; sin embargo, en este caso se pierde toda la información referente a la inducción inicial y al procesamiento de las lesiones hasta formar las ACs visibles en metafase. Además, el retraso del ciclo celular de las

DISCUSIÓN

células más dañadas hace que llegue a metafase la fracción de células menos dañadas (Hittelman y Rao, 1974). Estas limitaciones se pueden resolver parcialmente con la técnica PCC, al permitir visualizar los cromosomas en interfase. Así, utilizando esta técnica es posible, por lo tanto, obtener información sobre la inducción inicial y el procesamiento de las lesiones, sin la perturbación del proceso asociado a la progresión del ciclo celular y la muerte celular en interfase. Por otra parte, la mayor diferencia en cuanto a la estructura de la cromatina interfásica la podemos encontrar entre la eucromatina y heterocromatina. En este sentido, el cariotipo del hámster chino presenta regiones eucromáticas y heterocromáticas grandes bien definidas (Schmid y Leppert, 1969). En concreto, en los cromosomas sexuales se diferencian fácilmente los distintos tipos de cromatina. Así, los brazos largos de ambos cromosomas X (Xq) y el cromosoma Y son regiones de heterocromatina constitutiva, mientras que el brazo corto (Xp) del cromosoma X activo representa una región eucromática y el brazo corto del cromosoma X inactivo una región de heterocromatina facultativa. Por lo tanto, los cromosomas sexuales de hámster chino nos ofrecen otra posibilidad de estudiar el papel de la estructura de la cromatina en la formación de las ACs. Teniendo en cuenta estas consideraciones, en el siguiente estudio se planteó el análisis de la inducción, procesamiento y persistencia del daño inducido por la radiación ionizante en los cromosomas sexuales de hámster chino, en este caso, realizando el estudio tanto en interfase como en metafase.

En primer lugar se analizaron las roturas inducidas por 4 Gy de rayos X inmediatamente y 4 horas después de la irradiación. El análisis se centró en la región eucromática (Xp) y heterocromática (Xq) aplicando la técnica PCC en combinación con FISH, utilizando sondas específicas de brazo (figura 11) o a nivel del todo el genoma mediante la tinción con Giemsa. El estudio, realizado en células de bazo de hembras de hámster chino, se extendió a 34 horas después de la irradiación, realizando la correspondiente evaluación en metafase mediante FISH específico de brazo (figura 12). Al analizar la inducción inicial se detectó una distribución no proporcional de las roturas entre los dos brazos del cromosoma X, con una frecuencia de número mínimo de roturas significativamente superior en el brazo heterocromático (Xq). En cuanto el exceso de elementos cromosomales estimados para el genoma, a partir de los obtenidos para el cromosoma X por PCC-FISH, fue superior al obtenido por PCC-Giemsa para todo el genoma, indicando una distribución no aleatoria de los puntos de rotura entre los cromosomas de hámster chino. Por lo tanto, los resultados sugirieron una mayor implicación del cromosoma X y, aunque ambos brazos contribuyen a esta mayor implicación, las mayores diferencias se obtuvieron a nivel del brazo

DISCUSIÓN

constitutivamente heterocromático. Por otra parte, la mayor contribución del brazo corto respecto al resto del genoma puede deberse al brazo corto del cromosoma X inactivo, constituido por heterocromatina facultativa.

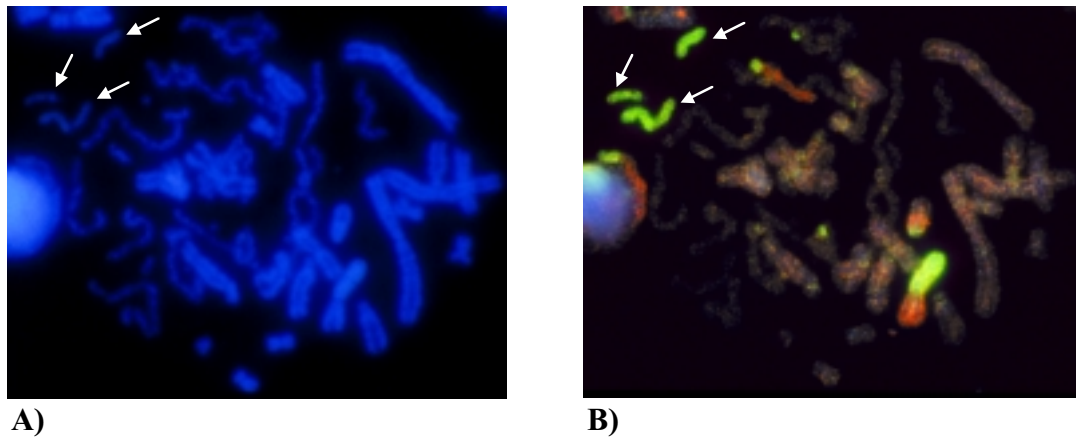


Figura 11. Visión al microscopio de fluorescencia de la PCC realizada después de irradiar células de bazo de hembras de hámster chino con 4 Gy de rayos X. A) Visión con el filtro de DAPI. Las PCCs se observan como cromosomas elongados constituidos por una única cromátida entremezclados con los cromosomas metafásicos de las células inductoras. B) Visión de las PCCs en combinación con FISH específica de brazo, observándose los brazos cortos de ambos cromosomas X en rojo y los brazos largos en verde. Se observan 3 fragmentos correspondientes al brazo heterocromático del cromosoma X que representan 3 roturas en este brazo.

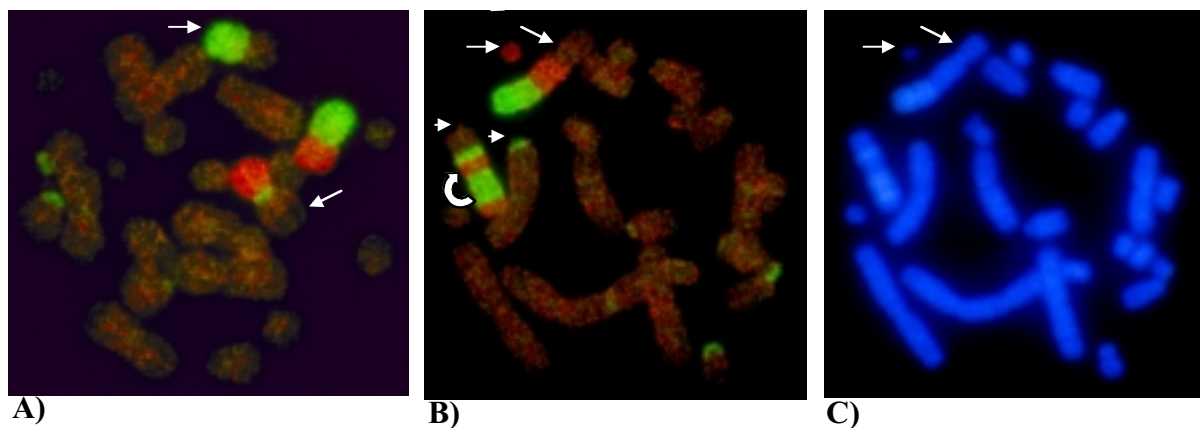


Figura 12. Visión al microscopio de fluorescencia de metafases de células de bazo de hembras de hámster chino 34 horas después de ser irradiadas con 4 Gy de rayos X y realizar la FISH específica de brazo. La FISH específica de brazo permite detectar las ACs que implican a cada brazo del cromosoma X por separado, así como las reorganizaciones interbrazo. A) Metafase en la que podemos distinguir una translocación recíproca que implica al brazo heterocromático del cromosoma X. B) y C) Metafase en la que podemos observar una inversión pericentromérica, una translocación y un dicéntrico, visión con el filtro de triple banda y el filtro de DAPI respectivamente. La sonda del brazo heterocromático produce hibridación cruzada con el cromosoma 6, de forma que la hibridación con este cromosoma no se ha de tener en cuenta al contabilizar las ACs.

DISCUSIÓN

La frecuencia de roturas en Xq fue mayor a la esperada en los tres tiempos analizados, además no se observaron diferencias respecto al procesamiento de las roturas inducidas inicialmente en el DNA entre ambos brazos. Sólo el 32,5 % de las roturas observadas inicialmente se detectaron en metafase; sin embargo, durante las primeras cuatro horas, sólo una pequeña fracción de las roturas en el cromosoma X fue restituida. El declive en la frecuencia de elementos cromosómicos ha sido interpretado en términos de dinámica de reparación. En este sentido, los resultados sugieren una reparación relativamente ineficiente de las DSBs en el cromosoma X. Sin embargo, la misma tendencia se observó en ambos brazos del cromosoma X, por lo tanto, bajo nuestras condiciones experimentales, la estructura de la cromatina no parece jugar un papel importante en el procesamiento de las roturas inducidas por la radiación.

Cuando se distinguió entre fragmentos e intercambios se obtuvo que las diferencias entre ambos brazos del cromosoma X, en los tres tiempos analizados, se debían a los fragmentos y no a los intercambios. Así, mientras que no se observaron diferencias estadísticamente significativas a nivel de intercambios, sí que se observaron a nivel de fragmentos; diferencias que se presentaron desde el primer tiempo analizado y se mantuvieron a las 34 horas después de la exposición, en metafase. Adicionalmente, la dinámica de reparación de las roturas cromosómicas y el procesamiento en ACs implica la disminución de la proporción de fragmentos respecto a la de intercambios con el tiempo después de la exposición. El procesamiento de las roturas puede estar modulado por el llamado efecto de proximidad (revisión en Sachs *et al.*, 1997). Se ha de tener en cuenta que para que se pueda formar un intercambio no sólo se han de inducir las roturas en el DNA, sino que éstas han de coincidir en el tiempo y en el espacio. La probabilidad de intercambio decrece a medida que aumenta la distancia entre las DSBs en el momento de su formación. En este sentido, la proporción de intracambios respecto de intercambios debería verse favorecida. Los intercambios intracromosómicos interbrazo fueron 3,8 veces más frecuentes que los intercambios intercromosómicos en el cromosoma X de hámster chino, lo que demuestra el papel de los territorios cromosómicos y el efecto de proximidad en el procesamiento de las roturas cromosómicas. Utilizando FISH específica de brazo esta relación se ha determinado a partir del cromosoma 1 en linfocitos humanos expuestos en G₀ a 2,5 Gy de rayos X; en estas condiciones, se obtuvo una relación 8,6 veces superior a la esperada, teniendo en cuenta la frecuencia de intercambios observados (Natarajan *et al.*, 1996c).

DISCUSIÓN

En nuestro estudio hemos detectado una mayor implicación del brazo heterocromático debido, principalmente, a la presencia de fragmentos, resultado que coincide con lo descrito previamente en otros estudios llevados a cabo en metafase (Grigorova *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1999). De hecho, la mayor frecuencia de roturas en la región heterocromática, a consecuencia de la mayor frecuencia de fragmentos, se manifiesta inmediatamente después del proceso de PCC. Durante la fusión y condensación prematura de los cromosomas, se produce inevitablemente la reparación de parte de las lesiones; sin embargo, la mayor frecuencia de roturas en la región heterocromática no puede atribuirse a una menor reparación durante el proceso de formación de las PCCs, ya que las diferencias se dan a nivel de fragmentos pero no de intercambios y, además, durante el resto del periodo analizado no se observan diferencias en el procesamiento de las DSBs. Así pues, los resultados sugieren que la mayor implicación de la región heterocromática en las ACs inducidas por la radiación puede ser causada por una mayor radiosensibilidad de la heterocromatina, más que por reparación diferencial de las DSBs entre las regiones eucromáticas y heterocromáticas. Por otra parte, la mayor radiosensibilidad que hemos detectado podría explicarse por la presencia en el brazo heterocromático de la constricción secundaria Xq21, sitio frágil, que además es rico en islas CpG e histona H4 acetilada, lo que sugiere la presencia de un grupo de genes activos en esta banda (Surrallés *et al.*, 1998). Sin embargo, en los machos de hámster chino también detectamos una mayor implicación de las regiones heterocromáticas a nivel del cromosoma Y, de forma que la presencia de esta banda no parece cuestionar la mayor implicación de las regiones heterocromáticas en la formación de las ACs inducidas por la radiación ionizante.

Los resultados obtenidos en este y otros estudios con la técnica del pintado cromosómico no se corresponden con los obtenidos utilizando las técnicas de bandas. Así, al utilizar la técnica de bandas G en la detección de los puntos de rotura a lo largo de los cromosomas, se obtiene que las roturas se localizan preferentemente en las bandas G claras, correspondientes a las regiones eucromáticas transcripcionalmente activas. En estos estudios, la mayor implicación de las regiones eucromáticas se considera que se debe a que las regiones heterocromáticas se rompen y se reparan menos que las eucromáticas, debido a la menor accesibilidad tanto de los agentes clastogénicos como de las enzimas de reparación (Folle *et al.*, 1998; Slijepcevic y Natarajan, 1994a,b). Sin embargo, la asignación de los puntos de roturas en las bandas G claras en el caso de los intercambios de tipo cromosómico puede ser producto de un artefacto óptico (Savage, 1977). De hecho, cuando se compara la asignación obtenida con la técnica de bandas G con la obtenida con la técnica de bandas R, se obtiene

DISCUSIÓN

también mayor asignación en las bandas claras, a pesar de presentar el patrón de bandas inverso, de forma que la técnica de tinción influye en la asignación de la rotura. Además, no hay que olvidar la dificultad añadida en la detección de los intercambios al utilizar las técnicas de bandas. Por otra parte, al utilizar otras técnicas se han obtenido resultados diferentes por lo que respecta a la distribución de las roturas y la eficiencia de reparación. Así, utilizando la técnica de desnaturalización alcalina y *Southern blotting* se ha detectado una mayor sensibilidad a la radiación ionizante en las regiones codificantes, tanto transcripcionalmente activas (oncogen *myc*) como inactivas (gen de la beta-globina), en comparación con la región centromérica α -satélite del cromosoma 17 o el *bulk* DNA en la línea celular MCF-7 (derivadas de cáncer de mama). Sin embargo, la cinética de reparación de las roturas de cadena fue aproximadamente la misma en las diferentes regiones estudiadas (Bunch *et al.*, 1995). Tampoco se ha detectado reparación preferencial de las roturas de cadena inducidas por la radiación ionizante en células CHO, al comparar la reparación en un gen activo, como el gen dihidrofolato reductasa, en relación con el resto del genoma (Ljungman, 1999). En cuanto a la distribución de las roturas, en estudios mediante geles de electroforesis de campo pulsado se ha detectado una distribución no al azar de las roturas inducidas por la radiación ionizante a lo largo de la longitud del DNA; sin embargo, las diferencias se observaron principalmente en el caso de las radiaciones de alta LET (Löbrich *et al.*, 1996; Newman *et al.*, 1997). También se ha descrito que la descondensación de la cromatina no modifica ni la inducción ni la reparación del DNA dañado por la radiación ionizante en células CHO (Yasui *et al.*, 1987).

En contrapartida a los resultados descritos anteriormente, en general, las regiones heterocromáticas presentan mayor frecuencia de ACs (Rupa *et al.*, 1997a, b; Johson *et al.*, 1999). Las razones de la posible mayor sensibilidad de las regiones heterocromáticas no se conocen, aunque se han sugerido diferentes posibilidades (Rupa *et al.*, 1997a). De hecho, en un principio se sugirió que la heterocromatina podría tener un papel de protección de cara a los clastógenos químicos, al localizarse en la periferia nuclear (Hsu, 1975). Mas recientemente, en relación con la carcinogénesis de los compuestos de níquel, se ha sugerido que las lesiones inducidas en el DNA por los radicales libres pueden ser incrementadas por la presencia de la histona H₁, proteína que se localiza en mayor concentración en las regiones heterocromáticas (Huang *et al.*, 1995). Por lo tanto, diferencias en la estructura proteica entre la heterocromatina y la eucromatina podrían ser las responsables de la mayor sensibilidad de las regiones heterocromáticas.

DISCUSIÓN

En esta tesis doctoral también se ha analizado el efecto de la estructura de la cromatina (heterocromatina / eucromatina) sobre la persistencia de las ACs inducidas por la radiación ionizante. Este estudio se efectuó con células de bazo de machos de hámster chino, en las que se realizó el seguimiento de las ACs a las 30, 56 y 96 horas después de la irradiación con 4 Gy de rayos X (figura 13). En este estudio, también se analizaron los cromosomas sexuales. En el primer tiempo analizado, se volvió a detectar una mayor frecuencia de ACs en las regiones heterocromáticas (Xq e Y) confirmando, por consiguiente, los resultados obtenidos en hembras. En cuanto a la persistencia, la frecuencia de intercambios que implican a regiones heterocromáticas declinó ligeramente más rápido que la frecuencia de intercambios que implican a la región eucromática. Este aparente mayor declive de las regiones heterocromáticas podría ser atribuible a la distribución de las ACs por célula y/o a la fracción de aberraciones potencialmente estables. De hecho, el porcentaje de aberraciones potencialmente estables (translocaciones, inversiones e inserciones) fue mayor en la región eucromática (Xp) que en las regiones heterocromáticas (Xq y Y). Sin embargo, al analizar la distribución de las ACs no se observaron diferencias, aunque sólo se consideraron las ACs en las regiones analizadas.

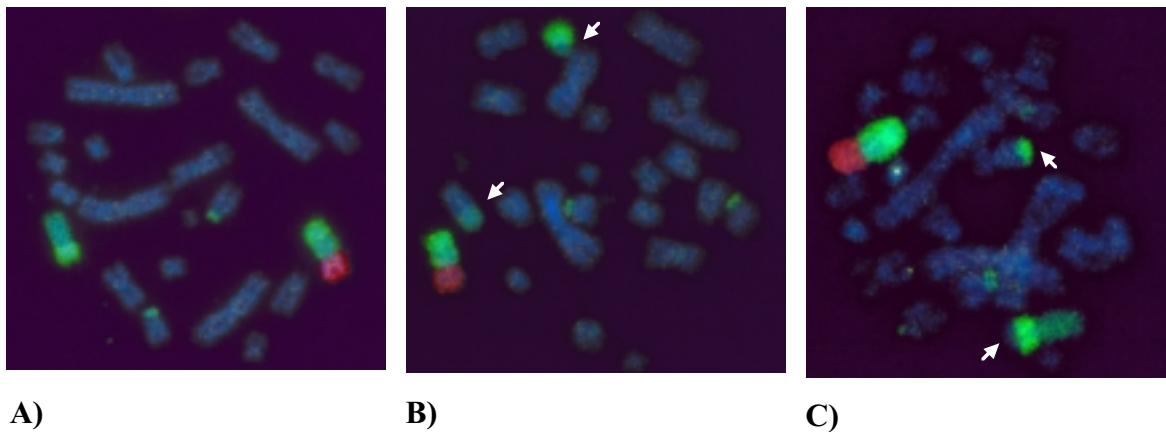


Figura 13. Visión al microscopio de fluorescencia de metafases de machos de hámster chino después de la irradiación con 4 Gy de rayos X y realizar la FISH específica de brazo. A) Metafase normal por lo que respecta a los cromosomas sexuales. La sonda del brazo largo del cromosoma X hibrida con el cromosoma Y. El brazo corto del cromosoma Y se detecta en verde y el brazo largo en una tonalidad más clara. B) Metafase en la que se distingue una translocación no recíproca que implica al brazo largo del cromosoma Y. C) Metafase con una translocación recíproca que afecta al brazo corto del cromosoma Y.

DISCUSIÓN

El efecto de la estructura de la cromatina sobre la persistencia de las ACs no fue detectado en la línea linfoblastoide TK6, al analizar la persistencia de las translocaciones entre cromosomas con diferente densidad génica. Sin embargo, si detectamos cierto efecto de la estructura de la cromatina al comparar la persistencia de las ACs directamente entre una región heterocromática y otra eucromática. Por otra parte, la inestabilidad de las ACs que afectan a las regiones heterocromáticas explicaría los resultados negativos obtenidos al utilizar como biomarcador las roturas en la región 1q12 para analizar el efecto del I¹³¹ en las células de descamación de la mucosa bucal de pacientes con cáncer de tiroides e hipertiroidismo (Ramírez *et al.*, 1999). La baja persistencia de las ACs inducidas en la región 1q12 podría ser la responsable de los resultados negativos, teniendo en cuenta que el efecto del I¹³¹ se detectó en muestras replicadas al utilizar como biomarcador las anomalías en la región 17cen-p53 (Ramírez *et al.*, 2000). Ambas regiones comprenden aproximadamente el mismo porcentaje del genoma, diferenciándose en la estructura de la cromatina, por lo tanto, estas regiones permiten comparar en humanos una región de heterocromatina constitutiva con una región principalmente eucromática de tamaño similar.

Para complementar el estudio, se decidió analizar el papel de la estructura de la cromatina en la inducción y persistencia de las ACs en células humanas, comparando la implicación de la banda heterocromática 1q12 y la región 17cen-p53. El seguimiento de las ACs se realizó en la línea linfoblastoide TK6, al cabo de 1, 3, 7, 14 y 56 días después de la exposición. La detección de las ACs en cada una de las dos regiones se realizó por separado en muestras replicadas. El estudio de las roturas en la región 1q12 se realizó mediante el marcado en tándem de la región centromérica del cromosoma 1 y de la región 1q12, utilizando la técnica conocida con el nombre de *tandem labeling* (Eastmond *et al.*, 1994); mientras que las alteraciones que implican a la región 17cen-p53 se detectaron hibridando simultáneamente con dos sondas, una que hibridaba con la región centromérica del cromosoma 17, detectada en verde, y otra que hibridaba con el *locus* del gen de la p53, detectada en rojo (figura 14). Los resultados en ambas regiones se compararon con los obtenidos previamente en el cromosoma 1, como representante de los otros tres cromosomas analizados.

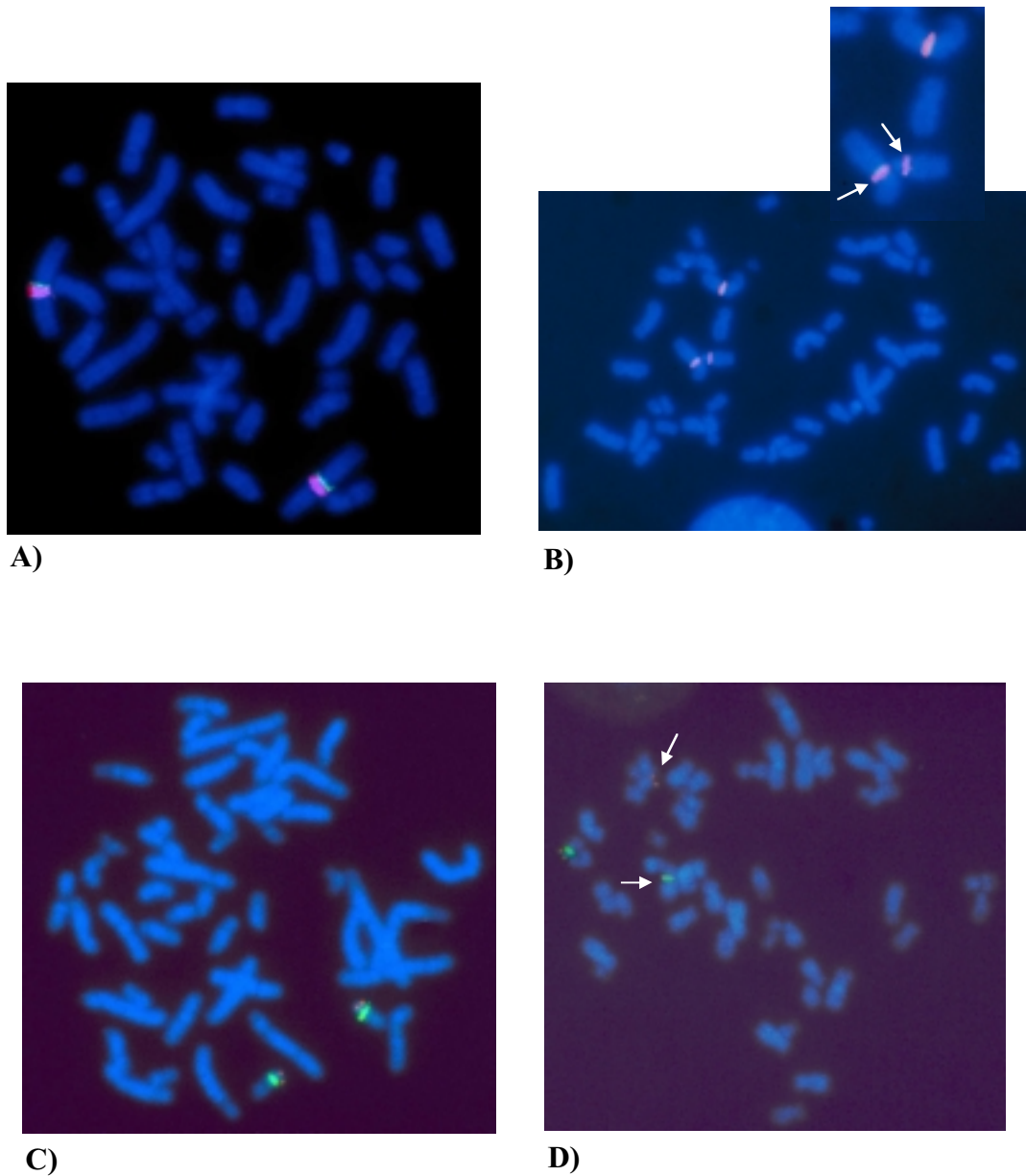


Figura 14. Visión al microscopio de fluorescencia de metafases de la línea linfoblástoide TK6 después de ser irradiada con 3 Gy de rayos γ . A) y B) Visión después de realizar la FISH con el marcado en tándem de la región centromérica del cromosoma 1 (verde) y la región heterocromática 1q12 (rojo): A) Visión de una metafase normal para esta región; B) Metafase con translocación recíproca que implica a la región heterocromática 1q12. C) y D) Visión después de realizar la FISH marcando simultáneamente el centrómero del cromosoma 17 (verde) y el *locus* del gen de la proteína p53 (rojo): C) Visión de una metafase normal para esta región; D) Metafase en la que se puede distinguir una translocación con punto de rotura en la región 17cen-p53.

DISCUSIÓN

En este estudio, sin embargo, en contra de lo que se podía esperar a partir de los resultados obtenidos en las células de bazo de hámster chino, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas respecto al número mínimo de roturas entre la banda 1q12 y la región 17cen-p53. Tampoco se observaron diferencias al comparar las roturas detectadas en estas regiones con las roturas obtenidas a nivel del cromosoma 1. Por lo tanto, al menos en las condiciones experimentales de este estudio, la radiación ionizante tuvo similar efecto sobre las tres regiones estudiadas y, en consecuencia, no parece que la estructura de la cromatina tenga efecto sobre la distribución de las ACs. En este caso, el estudio se llevó a cabo en metafase, de forma que no podemos determinar si esta igualdad se debe a la inducción inicial de DSBs y/o a su procesamiento. Este resultado está aparentemente en desacuerdo con estudios previos realizados utilizando técnicas de bandas y de FISH, en los que se ha detectado una mayor presencia de ACs en las regiones heterocromáticas y/o en los telómeros (Johnson *et al.*, 1999). En particular, la heterocromatina pericentromérica se ha considerado especialmente sensible a la acción de agentes clastogénicos tanto físicos como químicos (Brøgger, 1977; Sabatier *et al.*, 1989; Eastmond y Pinkel, 1990; Aurias, 1993; Eastmond *et al.*, 1994; Rupa *et al.*, 1995, 1997). Por otra parte, hay que tener en cuenta que el presente estudio se ha realizado en una línea celular en continuo crecimiento de forma que, en el momento de la irradiación, las células se pueden encontrar en cualquiera de las fases del ciclo celular. Considerando las posibles diferencias en la estructura de la cromatina y en la actividad transcripcional entre las diferentes fases del ciclo celular, se podría explicar las diferencias observadas en la distribución de las ACs entre los distintos estudios. Así pues, éste podría ser el motivo de las discrepancias si se tiene en cuenta que la mayoría de estudios efectuados en linfocitos humanos se realizan en la fase G₀ del ciclo celular. Sin embargo, se tendría que comprobar experimentalmente si la fase del ciclo celular afecta a la inducción y/o al procesamiento de las lesiones en la región heterocromática y/o en las regiones eucromáticas.

Por lo que respecta a la persistencia de las translocaciones, tanto las que implican a la región heterocromática (1q12) como las que afectan a la región eucromática (17cen-p53), alcanzan un nivel basal entre los 7-14 días después de la irradiación. Sin embargo, durante el primer periodo sí que se observa una cierta diferencia entre ambas regiones; así, mientras que en el caso de la heterocromatina el declive es pronunciado desde el primer momento, en el caso de la región eucromática el declive inicial es similar al obtenido para el cromosoma 1. En el caso de la región heterocromática, un ciclo después de la irradiación se ha perdido el 60,8

DISCUSIÓN

% de las translocaciones que afectan a esta región frente al 28,6 % en el caso de la región eucromática 17cen-p53. Durante este primer periodo se produce un gran descenso en la frecuencia de las ACs en general y, por lo tanto, parte de las translocaciones se pueden perder como consecuencia de la presencia de otras aberraciones inestables presentes en la célula. Sin embargo, el rápido declive inicial, en el caso de la región heterocromática, puede estar indicando que, en este caso, no sólo se pierden por la presencia de otras aberraciones inestables sino también por la inestabilidad intrínseca de la propia translocación.

El rápido descenso en la frecuencia de translocaciones en la región 1q12, un ciclo después de la exposición, confirmaría la falta de efecto del I¹³¹ al utilizar este biomarcador en el análisis de las células de mucosa bucal en los pacientes con cáncer de tiroides e hipertiroidismo (Ramírez *et al.*, 1999). Las muestras de mucosa bucal se toman unos 27 días después de la exposición, tiempo necesario para que las células afectadas emigren de la capa basal del epitelio a la superficie. Las células de descamación de la mucosa bucal proceden de células basales que han sufrido entre 1 y 2 divisiones. La elevada inestabilidad de las translocaciones que afectan a la banda 1q12 podría tener implicaciones al utilizar esta banda como biomarcador de daño cromosómico en estudios de biomonitorización.

En cuanto a la persistencia a largo plazo, su análisis, como ya ocurrió anteriormente al analizar el comportamiento de los diferentes cromosomas, se ve dificultado por el descenso inicial de las translocaciones; sin embargo, en este caso, la dificultad es mayor debido al tamaño pequeño de la región que se analiza. A pesar de ello, en general, tanto en este estudio como en el anterior, en células de bazo de machos de hámster chino, se puede apreciar una tendencia de las ACs que afectan a las regiones heterocromáticas a ser más inestables, aunque, se necesitan más estudios para poder confirmar esta tendencia. De hecho, no hay estudios realizados que permitan contrastar nuestros resultados. Sólo se ha analizado la persistencia de las ACs que implican a la región 1q12 en la línea celular AZH-1, después de la exposición a diepoxibutano y mitomicina C, durante un periodo de 20 días (Murg *et al.*, 1999). En este estudio, al final del periodo analizado tan sólo persiste el 6% del daño inicial.

Respecto a la inestabilidad de las ACs que afectan a las regiones heterocromáticas se podría esperar el efecto contrario, teniendo en cuenta que las regiones heterocromáticas representan, en principio, DNA inactivo. En este sentido, podría esperarse que las roturas en estas regiones no fueran seleccionadas en contra al no afectar la supervivencia celular. Sin

DISCUSIÓN

embargo, nosotros observamos la tendencia contraria. Esta tendencia podría relacionarse con el efecto de posición descrito en *Drosophila* y otras especies, incluso en mamíferos, el cual se caracteriza por el silenciamiento de genes próximos a las regiones de heterocromatina. Por lo tanto, la extensión de la heterocromatina a partir de la yuxtaposición heterocromatina/eucromatina en las regiones translocadas podría implicar el silenciamiento de genes fundamentales para la célula y, como resultado, provocar la muerte celular. Este efecto, sin embargo, no se ha detectado en segmentos de heterocromatina que se han translocado en las proximidades del cromosoma X inactivo en células somáticas humanas (Surrallés y Natarajan, 1998). En cambio, el efecto de silenciamiento se ha detectado por proximidad a las secuencias teloméricas en células eucariotas (Gottschling *et al.*, 1990). Por otra parte, también se ha descrito inestabilidad cromosómica provocada por la presencia de roturas en las regiones heterocromáticas (Smith *et al.*, 1998). Este fenómeno podría afectar la distribución de las ACs en las células, de forma que las células con roturas en la región heterocromática tuvieran mayor tendencia a presentar otras alteraciones que las células con ACs en otras regiones, de forma que el declive en la frecuencia de translocaciones en la región heterocromática se deba a la presencia simultánea de otras aberraciones inestables en la misma célula.

Por último, en este estudio nos ha llamado la atención la alta frecuencia de translocaciones recíprocas, junto con la prácticamente ausencia de fragmentos acéntricos en la región 1q12, respecto a las otras regiones estudiadas. Pensando en posibles diferencias a nivel fusigénico de los extremos de las DSBs inducidas por la radiación ionizante, se determinaron los extremos pegados y no pegados a partir del patrón observado para cada ACs detectada. Se consideraron las roturas en las regiones analizadas de forma que cada rotura genera dos extremos. Al determinar los extremos pegados y no pegados se obtuvo que sólo el 15 % de los extremos en la región 1q12 se encuentran no pegados, mientras que, en el caso del cromosoma 1 y la región 17cen-p53 el porcentaje aumenta hasta aproximadamente el 46 %. En el caso de las ACs que implican a la región 17cen-p53 al marcar sólo la región centromérica y la del *locus* p53, en determinados patrones observados no es posible determinar si se trata de una translocación recíproca o no recíproca, en cuyo caso, estas translocaciones no se consideran para determinar el porcentaje de extremos pegados. En este caso concreto, de 19 translocaciones aparentemente simples, en 5 de ellas no fue posible determinar si se trataba de una translocación recíproca o no recíproca. Sin embargo, las diferencias parecen claras, observándose aparentemente un mayor potencial fusigénico de los extremos que implican a la región heterocromática.

DISCUSIÓN

Considerando que la banda 1q12 está formada por secuencias de DNA satélite altamente repetitivo, el mayor potencial fusigénico de esta banda podría deberse a una mayor capacidad de reparación de las DSBs en estas regiones. Sin embargo, en el caso de la NEHJ no se precisan grandes regiones de homología y, además, en el estudio anterior en células de bazo de hámster chino no hemos detectado diferencias en la cinética de reparación de las DSBs entre el brazo heterocromático y el brazo eucromático. Estas consideraciones cuestionan la mayor capacidad fusigénica de las regiones heterocromáticas, en general. Entre la banda heterocromática 1q12 y los brazos heterocromáticos de los cromosomas sexuales de hámster chino podemos observar diferencias aparte del tamaño. De hecho, muchas regiones heterocromáticas en hámster chino se caracterizan por la falta de DNA altamente repetitivo (ver Sumner, 1998). Por lo tanto, podría presentarse diferente comportamiento entre ambos tipos de regiones heterocromáticas. También podría pensarse que el diferente potencial fusigénico detectado pueda deberse a la incorrecta discriminación de los patrones incompletos, de forma que los intercambios terminales se clasifiquen como intercambios incompletos (Wu *et al.*, 1998; Deng y Lucas, 1999; Boei *et al.*, 2000). Los intercambios terminales se producen cuando una de las roturas implicadas está muy próxima al telómero del cromosoma, de manera que la parte distal no puede ser detectada. Sin embargo, este problema debería manifestarse tanto al analizar las roturas que implican a la banda 1q12 como al analizar las roturas en todo el cromosoma 1.

Analizando en conjunto los resultados, podemos determinar que la estructura de la cromatina puede afectar la inducción, la reparación y/o la persistencia de las ACs. Así, el efecto de la estructura de la cromatina sobre la inducción la detectamos al comparar el daño entre regiones de heterocromatina constitutiva y regiones eucromáticas después de irradiar con rayos X células de bazo de hámster chino. Sin embargo, este efecto no lo detectamos entre la banda 1q12 y la región 17cen-p53 en la línea linfoblastoide TK6. Por otra parte, en ambos estudios se observa una mayor inestabilidad de las ACs que implican a las regiones de heterocromatina constitutiva. En cuanto a la reparación, la estructura de la cromatina no parece afectar la reparación de las DSBs. Sin embargo, la densidad génica sí puede afectar la reparación de determinado tipo de lesiones. La formación de las ACs puede estar afectada por la arquitectura nuclear y la estructura de la cromatina, si bien en este último caso, la relación entre densidad génica y estructura de la cromatina no refleja diferencias en la distribución de las ACs entre cromosomas que difieren en densidad génica.

IV. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

IV. CONCLUSIONES

A partir de los experimentos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral, habiendo empleado las técnicas de citogenética molecular descritas y bajo las condiciones experimentales seguidas, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La densidad génica y la longitud de los cromosomas no afectan la distribución de las ACs en metafase ni la persistencia de las translocaciones a largo término. Por lo tanto, la densidad génica y la longitud cromosómica no son factores a tener en cuenta a la hora de seleccionar los cromosomas a partir de los cuales estimar la frecuencia de ACs en estudios retrospectivos.
2. Existen diferencias intercromosómicas en la capacidad de reparación por escisión.
3. En la formación de las ACs pueden participar otras lesiones, además de las DSBs.
4. El efecto de proximidad en el procesamiento de las DSBs demuestra el papel de los territorios cromosómicos en la formación de las ACs.
5. La estructura de la cromatina (heterocromatina/eucromatina) afecta la inducción pero no el procesamiento de las DBSs en células de bazo de hámster chino irradiadas en G_0 . En cuanto a la persistencia de las ACs se observa una tendencia a una menor persistencia de las ACs que implican a regiones heterocromáticas.
6. La elevada inestabilidad de las translocaciones que afectan a la banda 1q12 puede tener implicaciones al utilizar las roturas en esta banda como un biomarcador de daño cromosómico en los estudios de biomonitorización.
7. La banda 1q12 presenta mayor capacidad fusigénica que otras regiones del genoma.

V. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

V. BIBLIOGRAFÍA

- Alsbeih G. y Raaphorst G.P. Differential induction of premature chromosome condensation by calyculin A in human fibroblast and tumor cell lines. *Anticancer Res.*, 19: 903-908, 1999.
- Alvarez L., Evans J.W., Wilks R., Lucas J.N., Brown J.M. y Giaccia A.J. Chromosomal radiosensitivity at intrachromosomal telomeric sites. *Genes Chrom. Cancer*, 8: 8-14, 1993.
- Andrulis E.D., Neiman A.M., Zappulla D.C. y Sternglanz R. Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature*, 394: 592-595, 1998.
- Aurias A. Acquired chromosomal aberrations in normal individuals. En: Kirsch I.R. (eds). *Causes and consequences of chromosomal aberrations*, Boca Raton: CRC Press, pp. 125-139, 1993.
- Awa A.A. Chromosome damage in atomic bomb survivors and their offspring Hiroshima and Nagasaki. En: Ishihara T. y Sasaki M.S. (eds). *Radiation-Induced Cytogenetic Damage in Man*. Alan R. Liss, New York, pp. 433-453, 1983.
- Awa A., Sofuni T., Honda T., Iton N., Herishi S. y Otake M. Relationship between the radiation dose and chromosome aberrations in atomic bomb survivors of Hiroshima and Nagasaki. *Radiat. Res.*, 19: 126-140, 1992.
- Babu K.A. y Verma R.S. Chromosome structure: euchromatin and heterochromatin. *Int. Rev. Cytol.*, 108: 1-60, 1987.
- Balajee A.S., Oh H.J. y Natarajan A.T. Analysis of restriction enzyme-induced chromosome aberrations in the interstitial telomeric sequences of CHO and CHE cells by FISH. *Mutat. Res.*, 307: 307-313, 1994.
- Barquinero J.F., Knehr S., Braselmann H., Figeló M. y Bauchinger M. DNA-proportional distribution of radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence *in situ* hybridization painting of all chromosomes of human female karyotype. *Int. J. Radiat. Biol.*, 74: 315-323, 1998.
- Barquinero J.F., Cigarrán S., Caballín M.R., Braselmann H., Ribas M., Egozcue J. y Barrios L. Comparison of X-ray dose-response curves obtained by chromosome painting using conventional and PAINT nomenclatures. *Int. J. Radiat. Biol.*, 75: 1557-1566, 1999.

BIBLIOGRAFÍA

- Barrios L., Miró R., Caballín M.R., Fuster C., Guedea F., Subias A. y Egozcue J. Cytogenetic effects of radiotherapy: breakpoint distribution in induced chromosome aberrations. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 41: 61-70, 1989.
- Bauchinger M. Retrospective dose reconstruction of human radiation exposure by FISH/chromosome painting. *Mutat. Res.*, 404: 89-96, 1998.
- Bauchinger M. y Götz G. Distribution of radiation induced lesions in human chromosomes and dose-effect relation analysed with G-banding. *Radiat. Environm. Biophys.*, 16: 355-366, 1979.
- Bauchinger M. y Schmid E. LET dependence of yield ratios of radiation-induced intra- and interchromosomal aberrations in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 74: 17-25, 1998.
- Bauchinger M., Schmid E. y Braselmann H. Cell survival and radiation induced chromosome aberrations. II. Experimental findings in human lymphocytes analysed in first and second post-irradiation metaphases. *Radiat. Environ. Biophys.*, 25: 253-260, 1986.
- Bauchinger M., Schmid E., Braselmann H., Willich N. y Clemm Ch. Time-effect relationship of chromosome aberrations in peripheral lymphocytes after radiation therapy for seminoma. *Mutat. Res.*, 211: 265-272, 1989.
- Bauchinger M., Schmid E., Zitzelsberger H., Braselmann H. y Nahrstedt U. Radiation-induced chromosome aberrations analysed by whole chromosome-specific DNA probes and pancentromeric DNA probe. *Int. J. Radiat. Biol.*, 64:179-184, 1993.
- Baugnet-Mahieu L., Lemaire M., Léonard E.D., Léonard A. y Gerber G.B. Chromosome aberrations after treatment with radioactive iodine for thyroid cancer. *Radiat Res.*, 140: 429-431, 1994.
- Beckmann R.P., Agostino M.J., McHugh M.M., Sigmund R.D. y Beerman T.A. Assessment of preferential cleavage of an actively transcribed retroviral hybrid gene in murine cells by deoxyribonuclease I, bleomycin, neocarzinostatin, or ionizing radiation. *Biochemistry*, 26: 5409-5415, 1987.
- Bender M.A. y Gooch P.C. Somatic chromosome aberrations induced by human whole-body irradiation: the 'recuplex' criticality accident. *Radiat Res.*, 29: 568-582, 1966.
- Bender M.A. y Preston R.J. Role of base damage in aberration formation: interaction of aphidicolin and X-rays. En: Natarajan A., Obe G. y Altmann H. (eds). *Progress in Mutation Research*. Elsevier Biomedical Press, pp. 37-46, 1982.
- Bender M.A., Griggs H.G. y Walker P.L. Mechanisms of chromosomal aberration production. I. Aberration induction by ultraviolet light. *Mutat. Res.*, 20: 387-402, 1973a.

BIBLIOGRAFÍA

- Bender M.A., Bedford J.S. y Mitchell J.B. Mechanisms of chromosomal aberration production. II. Aberrations induced by 5-bromodeoxyuridine and visible light. *Mutat Res.*, 20: 403-416, 1973b.
- Bender M.A., Griggs H.G. y Bedford J.S. Mechanisms of chromosomal aberration production. III. Chemicals and ionizing radiation. *Mutat. Res.*, 23: 197-212, 1974.
- Bender M.A., Awa A.A., Brooks A.L., Evans H.J., Groer P.G., Littlefield G., Pereira C., Preston J. y Wachholz B.W. Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation. *Mutat. Res.*, 196: 103-159, 1988.
- Bertoni L., Altolini C., Tessera L., Mucciolo E. y Giulotto E. Telomeric and non-telomeric (TTAGGG)_n sequences in gene amplification and chromosome stability. *Genomics*, 24: 53-62, 1994.
- Bickmore W.A. y Sumner A.T. Mammalian chromosome banding-an expression of genome organization. *Trends Genet.*, 5: 144-148, 1989.
- Bird A.P. CpG-rich islands as gene markers in the vertebrate nucleus, *Trends Genet.*, 3: 342-347, 1987.
- Blasco M.A., Lee H-W, Hande M.P., Samper E., Lansdorp P.M., DePinho R.A. y Greider C.W. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*, 91: 25-34, 1997.
- Blount B.C., Mack M.M., Wehr C.M., MacGregor J.T., Hiatt R.A., Hiatt R.A., Wang G., Wickramasinghe S.N., Everson R.B. y Ames B.N. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 3290-3295, 1997.
- Boei J.J.W.A. y Natarajan A.T. Combined use of chromosome painting and telomere detection to analyse radiation-induced chromosomal aberrations in mouse splenocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 73: 125-133, 1998.
- Boei J.J.W.A., Vermeulen S. y Natarajan A.T. Detection of chromosomal aberrations by fluorescence *in situ* hybridization in the first three postirradiation divisions of human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 349: 127-135, 1996.
- Boei J.J.W.A., Vermeulen S. y Natarajan A.T. Differential involvement of chromosome 1 and 4 in the formation of chromosomal aberrations in human lymphocytes after X-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 72: 139-145, 1997.
- Boei J.J.W.A., Vermeulen S., Fomina J. y Natarajan A.T. Detection of incomplete exchanges and interstitial fragments in X-irradiated human lymphocytes using a telomeric PNA probe. *Int. J. Radiat. Biol.*, 73: 599-603, 1998.

BIBLIOGRAFÍA

- Boei J.J.W.A., Vermeulen S. y Natarajan A.T. Analysis of radiation-induced chromosomal aberrations using telomeric and centromeric PNA probes. *Int. J. Radiat Biol.*, 76: 163-167, 2000.
- Boffa L.C., Mariani M.R. y Carpaneto E.M. Effects of N-methyl-N-nitrosourea on transcriptionally active and inactive nucleosomes: macromolecular damage and DNA repair. *Mol. Carcinog.*, 5: 174-177, 1992.
- Bohr V.A., Smith C.A., Okumoto D.S. y Hanawalt P.C. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell*, 40: 359-369, 1985.
- Bonassi S., Abbondandolo A., Camurri L., Dal Par L., De Ferrari M., Degrassi F., Forni A., *et al.*, Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of a future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 79: 133-135, 1995.
- Bonassi S., Hagmar L., Stromberg U., Montagud A.H., Tinnerberg H., Forni A. Heikkila P., Wanders S., Wilhardt P., Hansteen I.L., Knudsen L.E y Norppa H. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European study group on cytogenetic biomarkers and health. *Cancer Res.*, 60: 1619-1625, 2000.
- Bongarzonel I., Butti M.G., Coronelli S., Santoro M.G., Pilotti P., Fusco A., Della Porta G. y Pierotti M.A. Frequent activation of RET protooncogene by fusion with a new activating gene in papillary thyroid carcinomas, *Cancer Res.*, 54: 2979-2985, 1994.
- Boue J. y Boue A. Genetic causes of fetal wastage. In: Cortés-Prieto, Campos da Paz J.A. y Neves-e-Castro M. (eds). *Research on fertility and sterility*. University Park Press, Baltimore, MD, pp. 393-405, 1981.
- Bouffler S., Silver A., Papworth D., Coates J. y Cox R. Murine radiation myeloid leukaemogenesis: relationship between interstitial telomere like sequences and chromosome 2 fragile sites. *Genes Chrom. Cancer*, 6: 98-106, 1993.
- Bouffler S.D., Morgan W.F., Pandita T.K. y Slijepcevic P. The involvement of telomeric sequences in chromosomal aberrations. *Mutat Res.*, 366: 129-135, 1996.
- Boulton S.J. y Jackson S.P. *Saccharomyces cerevisiae* Ku 70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways. *EMBO J.*, 15, 5093-5103, 1996.

BIBLIOGRAFÍA

- Braselmann H., Bauchinger M. y Schmid E. Cell survival and radiation induced chromosome aberrations. I. Derivation of formulae for the determination of transmission and survival parameters of aberrations. *Radiat. Environ. Biophys.*, 25: 243-251, 1986.
- Bridger J.M. y Bickmore W.A. Putting the genome on the map. *Trends Genet.*, 14: 403-409, 1998.
- Brøgger A. Non-random localization of chromosome damage in human cells and targets for clastogenic action. *Chromosomes Today*, 6: 297-306, 1977.
- Brown J.M., Evans J.W. y Kovacs M.S. The prediction of human tumor radiosensitivity *in situ*: an approach using chromosome aberrations detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 24: 279-286, 1992.
- Brown J.M., Evans J.W. y Kovacs M.S. Mechanism of chromosome exchange formation in human fibroblasts: insights from “chromosome painting”. *Environ. Mol. Mutagen.*, 22: 218-224, 1993.
- Brown K.E., Guest S.S., Smale S.T., Hahn K., Merckenschlager M. y Fisher A.G. Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell*, 91: 845-854, 1997.
- Bryant P.E. Enzymatic restriction of mammalian cell DNA using Pvu II and Bam HI evidence for the double strand break origin of chromosomal aberrations. *Int. J. Radiat. Biol.*, 46: 57-65, 1984.
- Buckton K.E. Identification with G- and R-banding of the position of breakage points induced in human chromosome by *in vitro* X-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 29: 475-488, 1976.
- Buckton K.E., Court Brown W.M. y Smith P.G. Lymphocyte survival in men treated with X-rays for ankylosing spondylitis. *Nature*, 214: 470-473, 1967.
- Bunch R.T., Gewirtz D.A. y Povirk L.F. Ionizing radiation-induced DNA strand breakage and rejoining in specific genomic regions as determined by an alkaline unwinding/Southern blotting method. *Int. J. Radiat. Biol.*, 68: 553-562, 1995.
- Burger R.M., Peisach J. y Horwitz S.B. Activated bleomycin: a transient complex of drug, iron, and oxygen that degrades DNA. *J. Biol. Chem.*, 256: 11636-11639, 1981.
- Burk R.D., Szabo P., O'Brien S., Nash W.G., Yu L. y Smith K.D. Organization on chromosomal specificity of autosomal homologs of human Y chromosome repeated DNA. *Chromosoma*, 92: 225-233, 1985.
- Carrano A.V. y Heddle J.A. The fate of chromosome aberrations. *J. Theor. Biol.*, 38: 289-304, 1973.

BIBLIOGRAFÍA

- Carrano A., Minkler J. y Piluso D. On the fate of stable chromosomal aberrations. *Mutat. Res.*, 30: 153-156, 1975.
- Carroll D., Wright S.H., Wolff R.K., Grzesiuk E. y Maryon E. Efficient homologous recombination of linear DNA substrates after injection into *Xenopus laevis* oocytes. *Mol. Cell. Biol.*, 6: 2053-2961, 1986.
- Carter K.C., Bowman D., Carrington W., Fogarty K., McNeil J.A., Fay F.S. y Lawrence J.B. A three-dimensional view of precursor messenger RNA metabolism within the mammalian nucleus. *Science*, 259: 1330-1335, 1993.
- Casperson T., Zech L. y Johnsson C. Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp. Cell Res.*, 60: 315-319, 1970.
- Catena C., Villani P., Nastasi R., Conti D., Righi E., Salerno G., Righi V.A. y Rogna G. Micronuclei and 3ab-index in patients receiving iodine-131 therapy. *J. Nucl. Biol. Med.*, 38: 540-547, 1994.
- Cattanach B.M. Position effect variegation in the mouse. *Genet. Res.*, 23: 291-306, 1974.
- Cattanach B.M. Control of chromosome inactivation. *Annu. Rev. Genet.*, 9: 1-18, 1975.
- Celeda D., Bettag U. y Cremer C. PCR amplification and simultaneous digoxigenin incorporation of long DNA probes for fluorescence *in situ* hybridization. *Biotechniques*, 12: 98-102, 1992.
- Cigarrán S., Barrios L., Barquinero J.F., Caballín M.R., Ribas M. y Egozcue J. Relationship between the DNA content of human chromosomes and their involvement in radiation-induced structural aberrations analysed by painting. *Int. J. Radiat. Biol.*, 74: 449-455, 1998.
- Clayton A.L., Hebbes T.R., Thorne A.W. y Crane-Robinson C. Histone acetylation and gene induction in human cells. *FEBS Lett.*, 336: 23-26, 1993.
- Cleary M.L. Oncogenic conversion of transcription factors by chromosomal translocations. *Cell*, 66: 619-622, 1991.
- Coco-Martin J.M. y Begg A.C. Detection of radiation-induced chromosome aberrations using fluorescence *in situ* hybridization in drug-induced premature chromosome condensations of tumour cell lines with different radiosensitivities. *Int. J. Radiat. Biol.*, 71: 265-273, 1997.
- Cohen M.M. y Levy H.P. Chromosome instability syndromes. *Adv. Hum. Genet.*, 18: 143-149, 1989.
- Comings D.E. The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus. *Am. J. Hum. Genet.*, 20: 440-460, 1968.

BIBLIOGRAFÍA

- Cornforth M.N. y Bedford I.S. X-ray induced breakage and rejoining of human interphase chromosomes. *Science*, 222: 1141-1143, 1983.
- Cornforth M.N., Meyne J., Littlefield L.G., Bailey S.M. y Moyzis R.K. Telomere staining of human chromosomes and the mechanism of radiation-induced dicentric formation. *Radiat. Res.*, 120: 205-212, 1989.
- Counter C.M., Avilion A.A., LeFeuvre C.E., Stewart N.G., Greider C.W., Harley C.B. y Bacchetti S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells with express telomerase activity. *Embo J.*, 11: 1921-1929, 1992.
- Craig J.M. y Bickmore W.A. Chromosome bands-flavors to savour. *Bioessays*, 15: 349-354, 1993.
- Craig J.M. y Bickmore W.A. The distribution of CpG island in mammalian chromosomes. *Nature Genet.*, 7: 376-381, 1994.
- Cremer C., Münkler Ch., Granzow M., Jauch A., Dietzel S., Eils R., Guan X.-Y., Meltzer P.S., Trent J.M., Langowski J. y Cremer T. Nuclear architecture and the induction of chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 366: 97-116, 1996.
- Cremer T., Kurz A., Zirbel R., Dietzel S., Rinke B., Schröck E., Speicher M.R., Mathie U., Jauch A., Emmerich P., Scheehan H., Ried T., Cremer C. y Lichter P. Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 58: 777-792, 1993.
- Cremer T., Dietzel S., Eils R., Lichter P. y Cremer C. Chromosome territories, nuclear matrix filaments and intertute and function. En: P.E. Brandham y M.D. Benett (eds). *Kew Chromosome Conference IV Royal Botanic Gardens, Kew*, pp. 63-81, 1995.
- Critchlow S.E. y Jackson S.P. DNA end-joining from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.*, 23: 394-398, 1998.
- Crollius H.R., Jaillon O., Bernot A., Dasilva C., Bouneau L., Fischer C., Fizames C., Wincker P., Brottier P., Quétier F., Saurin W. y Weissenbach J. Estimate of human gene number provided by genome-wide analysis using *Tetraodon nigroviridis* DNA sequence. *Nature Genet.*, 25: 235-238, 2000.
- Chadwick K.H y Leenhouts H.P. The rejoining of DNA double-strand breaks and a model for the formation of chromosomal rearrangements. *Int. J. Radiat. Biol.*, 33: 517-529, 1978.
- Chadwick K.H y Leenhouts H.P. Radiation induced chromosomes aberrations: some biophysical considerations. *Mutat Res.*, 404: 113-117, 1998.
- Chen C. y Kolodner R.D. Gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* replication and recombination defective mutants. *Nature Genet.*, 23: 81-85, 1999.

BIBLIOGRAFÍA

- Chen D.S., Herman T. y Demple B. Two distinct human DNA diesterases that hydrolyze 3'-blocking deoxyribose fragments from oxidized DNA. *Nucleic Acids Res.*, 19: 5907-5914, 1991.
- Chiu S.M., Oleinick N.L., Friedman L.R. y Stambrook P.J. Hypersensitivity of DNA in transcriptionally active chromatin to ionizing radiation. *Biochim. Biophys. Acta*, 699: 15-21, 1982.
- Darroudi F. y Natarajan A.T. Cytogenetic characterization of Chinese hamster ovary X-ray-sensitive mutant cell xrs 5 and xrs 6. VII. Complementation analysis of X-irradiated wild-type CHO-K1 and xrs mutant cells using the prematryre chromosome condensation technique. *Mutat. Res.* 213: 249-255, 1989.
- Darroudi F., Fomina J., Meijers M. y Natarajan A.T. Kinetics of the formation of chromosome aberrations in X-irradiated human lymphocytes, using PCC and FISH. *Mutat. Res.*, 404: 55-65, 1998.
- Deloukas P., Schuler G.D., Gyapay G., Beasley E.M., Soderlund C., Rodriguez-Tomi P., Hui L., Matisse T.C., *et al.*, A physical map of 30,000 human genes. *Science*, 282: 744-746, 1998.
- Deng W. y Lucas J.N. Combined FISH with pan-telomeric PNA and whole chromosome-specific DNA probes to detect complete and incomplete chromosomal exchanges in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 75: 1107-1112, 1999.
- Dietzel S., Weilandt E., Eils R., Múnkel C., Cremer C. y Cremer T. Three-dimensional distribution of centromeric or paracentromeric heterochromatin of chromosomes 1, 7, 15 and 17 in human lymphocyte nuclei studied with light microscopic axial tomography. *Bioimaging*, 3: 121-133, 1995.
- DiGiuseppe J.A. y Dresler S.L. Bleomycin-induced DNA repair synthesis in permeable human fibroblasts: mediation of long-patch and short patch repair by distinct DNA polymerases. *Biochemistry*, 28: 9515-9520, 1989.
- Dolphin G.W., Lloyd D.C. y Purrott R.J. Chromosome aberration analysis as a dosimetric technique in radiological protection. *Health Phys.*, 25: 7-15, 1973.
- Domínguez I., Boei J.J.W.A., Balajee A.S. y Natarajan A.T., Analysis of radiation-induced chromosome aberrations in Chinese hamster cells by FISH using chromosome-specific DNA libraries. *Int. J. Radiat. Biol.*, 70: 199-208, 1996.
- Dresp J., Schimid E. y Bauchinger M. The cytogenetic effect of bleomycin on human peripheral lymphocytes *in vitro* and *in vivo*. *Mutat. Res.*, 56: 341-353, 1978.

BIBLIOGRAFÍA

- Drouin R., Holmquist G.P. y Richer C-L. High-resolution replication bands compared with morphologic G- and R-bands. *Adv. Hum. Genet.*, 22: 47-115, 1994.
- Dutrillaux B. y Lejeune J. Sur une nouvelle technique d'analyse de caryotype humain. *C.R. Acad. Sci (D) (Pairs)*, 272: 2638-2640, 1971.
- Earnshaw W.C. Mitotic chromosome structure: An update, decembre 1984. En: *Chromosomal Proteins and Gene Expression* (eds). G.R. Reeck, G.A. Goodwin y P. Puigdomenech, Plenum, New York, pp. 55-75, 1986.
- Earnshaw W.C. Mitotic chromosome structure. *BioEssays*, 9: 147-150, 1988.
- Earnshaw W.C. y Heck M.M.N. Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes. *J. Cell Biol.*, 100: 1716-1725, 1985.
- Eastmond D.A. y Pinkel D. Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in situ* hybridization with chromosome-specific DNA probes. *Mutat. Res.*, 234: 303-318, 1990.
- Eastmond D.A., Rupa D.S. y Hasegawa L.S. Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutat. Res.*, 322: 9-20, 1994.
- Ellard S., Parry E.M. y Parry J.M. Use of multicolour chromosome painting to identify chromosomal rearrangements in human lymphocytes exposed to bleomycin: a comparison with conventional cytogenetic analysis of Giemsa stained chromosomes. *Environ. Mol. Mutagen.*, 26: 44-54, 1995.
- Emmerich P., Loos P., Jauch A., Hopmann A.H.N., Wiegant J., Higgins M., White B.N., Van Der Ploeg M., Cremer C. y Cremer T. Double *in situ* hybridization in combination with digitalized image analysis: A new approach to study interphase chromosome topography. *Exp. Cell Res.*, 181: 126-140, 1989.
- Evans H.J. Chromosome aberrations induced by ionizing radiations. *Internat. Rev. Cytol.*, 13: 221-320, 1962.
- Evans H.J. Repair and recovery at chromosome and cellular levels: similarities and differences. *Brookhaven Symp. Biol.*, 20: 111-133, 1968.
- Evans H.J. Molecular mechanisms in the induction of chromosome aberrations. En: Scott D., Bridges B.A. y Sobels F.H. (eds). *Progress in Genetic Toxicology*, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, pp. 57-74, 1977.

BIBLIOGRAFÍA

- Evans J.W., Chang J.A., Giaccia A.J., Pinkel D. y Brown J.M. The use of fluorescence *in situ* hybridization combined with premature chromosome condensation in the analysis of chromosome damage and repair. *Br. J. Cancer*, 63: 517-521, 1991.
- Fernández J.L., Campos A., Goyanes V., Losada C., Veiras C. y Edwards A.A. X-ray biological dosimetry performed by selective painting of human chromosomes 1 and 2. *Int. J. Radiat. Biol.*, 67: 295-302, 1995.
- Ferreira J., Paoletta G., Ramos C. y Lamond A.I. Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus a magnified view of single chromosome territories. *J. Cell Biol.*, 139: 1597-1610, 1997.
- Fields C., Adams M.D., White O. y Venter C. How many genes in the human genome? *Nature Genet.*, 7: 345-346, 1994.
- Finch J.T. y Klug A. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 1897-1901, 1976.
- Finch J.T., Lutter L.C., Rhodes D., Brown R.S., Rushton B., Levit M. y Klug A. Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature*, 269: 29-36, 1977.
- Finnon P., Lloyd D.C. y Edwards A.A. Fluorescence *in situ* hybridization detection of chromosomal aberrations in human lymphocytes: applicability to biological dosimetry. *Int. J. Radiat. Biol.*, 68: 429-435, 1995.
- Flemming, W. *Zellsubstanz, Kern und Zellteilung*. Vogel, Leipzig. 1882.
- Folle G.A., Martínez-López W., Boccardo E. y Obe G. Localization of chromosome breakpoints: implication of the chromatin structure and nuclear architecture. *Mutat. Res.*, 404: 17-26, 1998.
- Ford C.E., Jones K.W., Plani P.E., de Almeida J.C. y Briggs J.H. A sex chromosome abnormality in case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet*, 1: 711-713, 1959.
- Gall J.G. y Pardue M.L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 63: 378-383, 1969.
- Goodhead D.T. The initial physical damage produced by ionizing radiations. *Int. J. Radiat. Biol.*, 56: 623-634, 1989.
- Gotoh E. y Asakawa Y. Detection and evaluation of chromosomal aberrations induced by high doses of γ -irradiation using immunogold-silver painting of prematurely condensed chromosomes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 70: 517-520, 1996.
- Gottshling D.E., Aparicio O.M., Billington B.L. y Zakian V.A. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: Reversible repression of Pol II transcription. *Cell*, 63: 751-762, 1990.

BIBLIOGRAFÍA

- Granath F., Grigoreva M. y Natarajan A.T. DNA content proportionality and persistence of radiation-induced chromosomal aberrations studied by FISH. *Mutat. Res.*, 145-152, 1996.
- Grigoroza M., Brand R., Xiao Y. y Natarajan A.T. Frequencies and types of exchange aberrations induced by X-rays and neutrons in Chinese hamster splenocytes detected by FISH using chromosome-specific DNA libraries. *Int. J. Radiat. Biol.*, 297-314, 1998.
- Guan X.Y., Zhang H., Bittner M., Jiang Y., Meltzer P. y Trent J. Chromosome arm painting probes. *Nature Genet.*, 12: 10-11, 1996.
- Gundy S., Katz N., Füzy M. y Ésik O. Cytogenetics study of radiation burden in thyroid disease patients treated with external irradiation or radioiodine. *Mutat. Res.*, 360: 107-113, 1996.
- Gutiérrez S., Carbonell E., Galofré P., Creus A. y Marcos R. Micronuclei induction by ^{131}I exposure: study in hyperthyroidism patients. *Mutat. Res.*, 373: 39-47, 1997.
- Gutiérrez S., Carbonell E., Galofré P., Creus A. y Marcos R. Cytogenetic damage after ^{131}I iodine treatment for hyperthyroidism and thyroid cancer. *Eur. J. Nucl. Med.*, 26: 1589-1596, 1999.
- Haber J.E. y Leung W.Y. Lack of chromosome territoriality in yeast: promiscuous rejoining of broken chromosome ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 13949-13954, 1996.
- Hagmar L., Brøgger A., Hansteen I.L., Heim S., Høgstvedt B, Knudsen L., Lambert B., Linnainmaa K., Mitelman F., Nordenson I., *et al.* Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res.*, 54: 2919-2922, 1994.
- Hagmar L., Bonassi S., Stromberg U., Brøgger A., Knudsen L.E., Norppa H. y Reuterwall C. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res.*, 58: 4117-4121, 1998.
- Hahnfeldt P., Hlatry L.R., Brenner D.J. y Sachs R.K. Chromosome aberrations produced by radiation: the relationship between excess acentric fragments and dicentrics. *Radiat. Res.*, 141: 136-152, 1995.
- Hanawalt P.C. Heterogeneity of DNA repair at the gene level. *Mutat. Res.*, 247: 203-211, 1991.

BIBLIOGRAFÍA

- Hande M.P. y Natarajan A.T. Induction and persistence of cytogenetic damage in mouse splenocytes following whole-body X-irradiation analysed by fluorescence *in situ* hybridization. IV. Dose response. *Int. J. Radiat. Biol.*, 74: 441-448, 1998.
- Hande M.P., Boei J.J.W.A., Granath F. y Natarajan A.T. Induction and persistence of cytogenetic damage in mouse splenocytes following whole-body X-irradiation analysed by fluorescence *in situ* hybridization. I. Dicentrics and translocations. *Int. J. Radiat. Biol.*, 69: 437-446, 1996.
- Harley C.B. Telomeres and aging. En: Blackburn E.H. y Greider C.W. (eds). *Telomeres*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press, pp. 247-263, 1995.
- Hastie N.D., Dempster M., Dunlop M.G., Thompson A.M., Green D.K. y Allshire R.C. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*, 346: 866-868, 1990.
- Hecht S.M. The chemistry of activated bleomycin. *Acts. Chem. Res.*, 19: 383-391, 1986.
- Heddle J.A. Randomness in the formation of radiation-induced chromosome aberrations. *Genetics*, 52: 1329-1334, 1965.
- Hendrickson E.A. Insights from model systems. Cell-cycle regulation of mammalian DNA double-strand-break repair. *Am. J. Hum. Genet.*, 61: 795-800, 1997.
- Hiss E.A. y Preston R.J. The effect of cytosine arabinoside on the frequency of single-strand breaks in DNA of mammalian cells following irradiation or chemical treatment. *Biochim. Biophys. Acta*, 478: 1-8, 1977.
- Hittelman W.N. y Rao P.N. Bleomycin induced damage in prematurely condensed chromosomes and its relationship to cell cycle regression in CHO cells. *Cancer Res.*, 35: 3027-3035, 1974.
- Hittelman W.N. y Pollard M. A comparison of the DNA and chromosome repair kinetics after irradiation. *Radiat. Res.*, 92: 497-509, 1982.
- Hlatry L.R., Sachs R.K. y Hahnfeldt P. The ratio of dicentrics to centric rings produced in human lymphocytes by acute low-LET radiation. *Radiat. Res.*, 129: 304-308, 1992.
- Hoffmann G.R., Colyer S.P. y Littlefield L.G. Induction of micronuclei by bleomycin in G₀ human lymphocytes, I. Dose-response and distribution. *Environ. Mol. Mutagen.*, 21: 130-135, 1993a.
- Hoffmann G.R., Colyer S.P. y Littlefield L.G. Induction of micronuclei by bleomycin in G₀ human lymphocytes, II. Potentiation by radioprotectors. *Environ. Mol. Mutagen.*, 21: 136-143, 1993 b.

BIBLIOGRAFÍA

- Hoffmann G.R., Sayer A.M., Joiner E.E., McFee A.F. y Littlefield L.G. Analysis by FISH of the spectrum of chromosome aberrations induced by X-rays in G₀ human lymphocytes and their fate through mitotic divisions in culture. *Environ. Mol. Mutagen.*, 33: 94-110, 1999.
- Holmberg M. y Jonasson J. Preferential location of X-ray induced chromosome breakage in the R-bands of human chromosomes. *Hereditas*, 74: 57-67, 1973.
- Holmberg M y Gumauskas E. The role of short-lived DNA lesions in the production of chromosome-exchange aberrations. *Mutat. Res.*, 160: 221-229, 1986.
- Holmquist G.P. Chromosome bands, their chromatin flavors, and their functional features. *Am. J. Hum. Genet.*, 51: 17-37, 1992.
- Hsu T.C. A possible function of constitutive heterochromatin: The bodyguard hypothesis. *Genetics*, 79 (suppl): 137-150, 1975.
- Huang X., Kitahara J., Zhitkovich A., Dowjat K. y Costa M. Heterochromatic proteins specifically enhance nickel-induced 8-oxo-dG formation. *Carcinogenesis*, 16: 1753-1759, 1995.
- ISCN (1985) An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Harnden D.G. y Klinger H.P. (eds), Karger, New York, pp. 1-117.
- Jackson D.A. Structure-function relationships in eukaryotic nuclei. *Bioessays*, 13: 1-10, 1991.
- Jacobs P.A. y Strong J.A. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature*, 183: 302-303, 1959.
- Jeppesen P. y Turner B.M. The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H₄ acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell*, 74: 281-289, 1993.
- Johnson R.T. y Rao P.N. Mammalian cell fusion: Induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature*, 226: 717-722, 1970.
- Johnson K., Tucker J.D. y Nath J. Frequency, distribution and clonality of chromosome damage in human lymphocytes by multi-color FISH. *Mutagenesis*, 13: 217-227, 1998.
- Johnson K.L., Brenner D.J., Nath J., Tucker J.D. y Geard C.R. Radiation-induced breakpoint misrejoining in human chromosomes: random or non-random?. *Int. J. Radiat. Biol.*, 75: 131-141, 1999.
- Jones K.W. The chromosomal and nuclear location of mouse satellite DNA in individual cells. *Nature*, 225: 912-915, 1970.

BIBLIOGRAFÍA

- Kanda R., Hayata I. y Lloyd D.C. Easy biodosimetry for high-dose radiation exposure using drug-induced, prematurely condensed chromosomes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 75: 441-446, 1999.
- Kaufmann B.P. Organization of the chromosome. I. Break distribution and chromosome recombination in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.*, 102: 293-320, 1946.
- Keeney S. y Linn S. A critical review of permeabilized cell systems for studying mammalian DNA repair. *Mutat. Res.*, 236: 239-252, 1990.
- Kihlman B.A. Action of chemicals on dividing cells. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1966.
- Kihlman B.A. Molecular mechanisms of chromosome breakage and rejoining, *Adv. Cell Mol. Biol.*, 1: 59-107, 1971.
- Kishi K. Effect of repair inhibition in the G₁ phase of clastogen treated human lymphocytes on the frequencies of chromosome-type and chromatid-type aberrations and sister-chromatid exchanges. *Mutat. Res.*, 176: 105-116, 1987.
- Kishi K. y Sekizawa K. Evidence for excision repair-dependent and independent processes in Ara-C induced chromosome rearrangements in G₁ human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.*, 22: 271-274, 1993.
- Klein C.B. y Costa M. DNA methylation, heterochromatin and epigenetic carcinogens. *Mutat. Res.*, 386: 163-180, 1997.
- Kligerman A.D., Halperin E.C., Erexson G.L. y Honoré G. The persistence of lymphocytes with dicentric chromosomes following whole-body X irradiation of mice. *Radiat. Res.*, 124: 22-27, 1990.
- Kligerman A.D., Bryant M.F., Doerr C.L., Halperin E.C., Kwanyuen P., Sontag M.R. y Erexson G.L. Interspecies cytogenetic comparisons: studies with X-radiation and bleomycin sulphate. *Environ. Mol. Mutagen.*, 19: 235-243, 1992.
- Knehr S., Zitzelsberger H., Braselmann H. y Bauchinger M. Analysis for DNA-proportional distribution of radiation-induced chromosome aberrations in various triple combinations of human chromosomes using fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Radiat. Biol.*, 65: 683-690, 1994.
- Knehr S., Zitzelsberger H., Braselmann H., Nahrstedt U. y Bauchinger M. Chromosome analysis by fluorescence *in situ* hybridization: further indications for a non-DNA-proportional involvement of single chromosomes in radiation-induced structural aberrations. *Int. J. Radiat. Biol.*, 70: 1385-392, 1996.

BIBLIOGRAFÍA

- Knehr S., Zitzelsberger H. y Bauchinger M. FISH-based analysis of radiation-induced chromosomal aberrations using different nomenclature systems. *Int. J. Radiat. Biol.*, 73: 135-141, 1998.
- Kodama Y., Nakano M., Ohtaki K., Dongcham R., Awa A.A. y Nakamura N. Estimation of minimal size of translocated chromosome segments detectable by fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Radiat. Biol.*, 71: 35-39, 1997.
- Kogoma T. Recombination by replication. *Cell*, 85: 625-627, 1996.
- Kornberg R.D. Chromatin structure: a repeating unit of histone and DNA. *Science*, 184: 868-871, 1974.
- Kornberg R.D. y Lorch Y. Twenty-five years of nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, 98: 285-294, 1999.
- Kovacs M.S., J.W. Evans J.W., Johnstone I.M. y Brown J.M. Radiation-induced damage repair and exchange formation in different chromosomes of human fibroblasts determined by fluorescence *in situ* hybridization. *Radiat. Res.*, 137: 34-43, 1994.
- Kreth G., Münkler Ch., Langowski J., Cremer T. y Cremer C. Chromatin structure and chromosome aberrations: modeling of damage induced by isotropic and localized irradiation. *Mutat. Res.*, 404: 77-88, 1998.
- Kuo M.T. Preferential damage of active chromatin by bleomycin. *Cancer Res.*, 41: 2439-2443, 1981.
- Kuo M.T. y Hsu T.C. Biochemical and cytological studies of bleomycin actions on chromatin and chromosomes. *Chromosoma*, 68: 229-240, 1979.
- Kurz A., Lampel S., Nickolenko J.E., Bradl J., Benner A., Zirbel R.M., Cremer T., Lichter P. Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories, *J. Cell Biol.*, 135: 1195-1205, 1996.
- Laemmli U.K., Cheng S.M., Adolph K.W., Paulson J.R., Brown J.A. y Baumbach W.R. Metaphase chromosome structure: the role of non histone proteins. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 42: 351-360, 1977.
- Lamb J., Harris P.C., Wilkie W.O., Wood W.G., Dauwese J.G y Higgs D.R. *De novo* truncation of chromosome 16p and healing with (TTAGGG)_n in the alpha thalasaemia/mental retardation syndrome (ATR-16). *Am. J. Hum. Genet.*, 52: 668-676, 1993.
- Langer P.R., Waldrop A.A. y Ward D.C. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 6633-6637, 1981.

BIBLIOGRAFÍA

- Lea D.E. Actions of radiations on living cells, 1st edn., Cambridge University Press, 1946.
- Lea D.E. y Catcheside D.G. The mechanism of the induction by radiation of chromosome aberrations in *Tradescantia*. J. Genet., 44: 216-245, 1942.
- Leandon S.A. y Cooper P.K. Preferential repair of ionizing radiation induced damage in the transcribed strand of an active human gene is defective active human gene is defective in Cockayne's syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 10499-10503, 1993.
- Lehrman M.A., Schneider W.J., Sudhof T.C., Brown M.S., Goldstein J.L. y Russell D.W. Mutations in the LDL receptor: Alu-Alu recombination deletes exons encoding transmembrane and cytoplasmic domains. Science, 227: 140-146, 1985.
- Lejeune J., Turpin R. y Gautier. Le mongolisme, premier exemple d'aberration autosomique humaine. Ann. Genet. Hum., 1: 41-49, 1959.
- Léonard A., Deknudt G y Léonard E.D. Persistence of chromosome aberrations in an accidentally irradiated subject, Radiat. Protect. Dosimetry, 22: 55-57, 1988.
- Liang F., Han M., Romanienko P.J. y Jasim M. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 95: 5172-5177, 1998.
- Liang F., Holt I., Pertea G., Karamycheva S., Salzberg S.L. y Quackenbush J. Gene index analysis of the human genome estimates approximately 120.000 genes. Nature Genet., 25: 239-240, 2000.
- Lichter P. y Cremer T. Chromosome analysis by non-isotopic *in situ* hybridization. En: Human Cytogenetics. A Practical Approach. Vol I. Rooney D.E. y Czepulkowski B.H.(eds). The United States by Oxford University Press, New York. pp. 157-189, 1992.
- Lin F.L., Sperle K. y Sternberg N. Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. Mol. Cell. Biol., 4: 1020-1034, 1984.
- Lindholm C., Tekkel M., Veidebaum T., Ilus T. y Salomaa S. Persistence of translocations after accidental exposure to ionizing radiation. Int. J. Radiat. Biol., 74: 565-571, 1998.
- Littlefield L.G. y Joiner E.E. Cytogenetic follow-up studies in six radiation accident victims (16 and 17 years post-exposure). En: Late Effects of Ionizing Radiation (International Atomic Energy Agency Vienna), pp. 297-309, 1978.
- Livingston G.K., Foster A.E. y Elson H.R. Effect of *in vivo* exposure to iodine-131 on the frequency and persistence of micronuclei in human lymphocytes. J. Toxicol. Environ. Health, 40: 367-375, 1993.

BIBLIOGRAFÍA

- Ljungman M. Repair of radiation-induced DNA strand breaks does not occur preferentially in transcriptionally active DNA. *Radiat. Res.*, 152: 444-449, 1999.
- Löbrich M., Cooper P.D. y Rydberg B. Non-random distribution of DNA double-strand breaks induced by particle irradiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, 70: 493-503, 1996.
- López-Larraza D., De Luca J.C. y Bianchi N.O. The kinetics of DNA damage by bleomycin in mammalian cells. *Mutat. Res.*, 232: 57-61, 1990.
- López-Larraza D.M. y Bianchi N.O. DNA response to bleomycin in mammalian cells with variable degrees of chromatin condensation. *Environ. Mol. Mutagen.*, 21: 258-264, 1993.
- Lucas J.N., Tenjin T., Straume T., Pinkel D., Moore II D., Litt M. y Gray J.W. Rapid human chromosome aberration analysis using fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Radiat. Biol.*, 56: 35-44, 1989.
- Lucas J.N., Awa A., Straume T., Poggensee M., Kodama Y., Nakano M., Ohtaki K., Weier H-U., Pinkel D., Gray J. y Littlefield G. Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 62: 53-63, 1992a.
- Lucas J.N., Poggensee M. y Straume T. The persistence of chromosome translocations in a radiation worker accidentally exposed to tritium, *Cytogenet. Cell Genet.*, 60: 255-256, 1992b.
- Lucas J.N., Chen A.M. y Sachs R.K. Theoretical predictions on the equality of radiation-produced dicentrics and translocations detected by chromosome painting. *Int. J. Radiat. Biol.*, 69:145-153, 1996.
- Luomahaara S., Lindholm C., Mustonen R. y Salomaa S. Distribution of radiation-induced exchange aberrations in human chromosomes 1, 2 and 4. *Int. J. Radiat. Biol.*, 75: 1551-1556, 1999.
- Lutze L.H., Cleaver J.E., Morgan W.F. y Winegar R.A. Mechanisms involved in rejoining DNA double-strand breaks induced by ionizing radiation and restriction enzymes. *Mutat. Res.*, 299: 225-232, 1993.
- Lyman S., Ujjani B., Renner K., Antholine W., Petering D.H., Whetstone J.W. y Knight J.M. Properties of the initial reaction of bleomycin and several of its metal complexes with Ehrlich cells. *Cancer Res.*, 46: 4472-4478, 1986.
- Lloyd D.C., Purrott R.J., Dolphin G.W., Bolton D. y Edwards A.A. The relationship between chromosome aberrations and low LET radiation dose to human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 28: 75-90, 1975.

BIBLIOGRAFÍA

- Lloyd D.C., Purrott R.J. y Reeder E.J. The incidence of unstable chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from unirradiated and occupationally exposed people. *Mutat. Res.*, 72: 523-532, 1980.
- M`Kacher R., Légal J.D., Schlumberger M., Voisin P., Aubert B., Gaillard N. y Parmentier C. Biological dosimetry in patients treated with iodine-131 for differentiated thyroid carcinoma. *J. Nucl. Med.*, 37: 1860-1864, 1996.
- M`Kacher R., Légal J.D., Schlumberger M., Aubert B., Béron- Gaillard N., Gausson A. y Parmentier C. Sequential biological dosimetry after a single treatment with iodine-131 for differentiated thyroid carcinoma. *J. Nucl. Med.*, 38: 377-380, 1997.
- M`Kacher R., Schlumberger M., Légal J.D., Violot D., Béron-Gaillard N., Gausson A. y Parmentier C. Biologic dosimetry in thyroid cancer patients after repeated treatments with iodine-131. *J. Nucl. Biol. Med.*, 39: 825-829, 1998.
- Manuelidis L. A view of interphase chromosomes. *Science*, 250: 1533-1540, 1990.
- Manuelidis L. y Chen T.L. A unified model of eukaryotic chromosome. *Cytometry*, 11: 8-25, 1990.
- Martens U.M., Zijlmans M.J.M., Poon S.S.S., Dragowska W., Yui J., Chavez E.A., Ward R.K. y Lansdorp P. Short telomeres on human chromosome 17 p. *Nature Genet.*, 18: 76-80, 1998.
- Martin S.G., Laroche T., Suka N., Grunstein M. y Gasser S.M. Relocalization of telomeric Ku and Sir proteins in response to DNA strand breaks in yeast. *Cell*, 97: 621-633, 1999.
- Matsumoto K., Ramsey M.J., Nelson D.O. y Tucker J.D. Persistence of radiation-induced translocations in human peripheral blood determined by chromosome painting. *Radiat. Res.*, 149: 602-613, 1998.
- Matsuoka A., Tucker J.D., Hayashi M., Yamazaki N. y Sofuni T. Chromosome painting analysis of X-ray-induced aberrations in human lymphocytes *in vitro*. *Mutagenesis*, 9: 151-155, 1994.
- May A. y Bohr V.A. Gene-specific repair of gamma-ray-induced DNA strand breaks in colon cancer cells: No coupling to transcription and no removal from the mitochondrial genome. *Biochem. Biophys Res. Commun*, 269: 433-437, 2000.
- Mayall B.H., Carrano A.V., Moore II D.H., Ashworth L., Bennett D.E. y Mendelsohn M. The DNA-based human karyotype. *Cytometry*, 5: 376-385, 1984.
- Mayron E. y Carroll D. Involvement of single-stranded tails in homologous recombination of DNA injected into *Xenopus laevis* oocyte nuclei. *Mol. Cell. Biol.*, 11: 3268-3277, 1991a.

BIBLIOGRAFÍA

- Mayron E. y Carroll D. Characterization of recombination intermediates from DNA injected into *Xenopus laevis* oocytes: evidence for nonconservative mechanism of homologous recombination. *Mol. Cell. Biol.*, 11: 3278-3287, 1991b.
- McLean A.R. y Michie C.A. *In vivo* estimates of division and death rates of human T-lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92: 3707-3711, 1995.
- Meselson M.M. y Radding C.M. A general model for genetic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 358-361, 1975.
- Michie C.A., McLean A., Alcock C. y Beverley P.C.L. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature*, 360: 264-265, 1992.
- Mills K.D., Sinclair D.A. y Guarente L. Mec1-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks. *Cell*, 97: 609-620, 1999.
- Mirkovitch J., Mirault M.E. y Laemmli U.K. Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell*, 39: 223-232, 1984.
- Mitelman F. Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat. Res.*, 462: 247-253, 2000.
- Moore R.C. y Bender M.A. Time sequence of events leading to chromosomal aberration formation. *Environ. Mol. Mutagen.*, 22: 208-213, 1993.
- Mosig G. The essential role of recombination in phage T4 growth. *Ann. Rev. Genet.*, 21: 347-371, 1987.
- Moyzis R.K. A highly conserved repetitive DNA sequence (TTAGGG)_n present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 6622-6626, 1988.
- Mullenders L.H.F., van Zeeland A.A. y Natarajan A.T. Analysis of distribution of DNA repair patches in the DNA nuclear matrix complex from human cells. *Biochim. Biophys Acta*, 740: 428-435, 1987.
- Murg M.N., Schuler M. y Eastmond D.A. Persistence of chromosomal alterations affecting the 1cen-q12 region in a human lymphoblastoid cell line exposed to diepoxybutane and mitomycin C. *Mutat. Res.*, 446: 193-203, 1999.
- Nakagome Y. y Chiyo H. Non-random distribution of exchange points in patients with structural rearrangements. *Am. J. Hum. Genet.*, 28: 31-41, 1976.
- Nakano M., Nakashima E., Pawel D.J., Kodoma Y. y Awa A. Frequency of reciprocal translocations and dicentrics induced in human blood lymphocytes by X-irradiation as determined by fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Radiat. Biol.*, 64: 565-569, 1993.
- Natarajan A.T. y Obe G. Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations: III. Restriction endonucleases. *Chromosome*, 90: 120-127, 1984.

BIBLIOGRAFÍA

- Natarajan A.T., Obe G., Zeeland A.A.V., Palitti F, Meijers M. y Verdegaal-Immerzeel E.A.M. Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. II. Utilization of *Neurospora* endonuclease for the study of aberration production by X-rays in G₁ and G₂ stages of the cell cycle. *Mutat. Res.*, 69: 293-305, 1980.
- Natarajan A.T., Darroudi F., Mullenders L.H.F. y Meijers M. The nature and repair of DNA lesions that lead to chromosomal aberrations induced by ionizing radiations. *Mutat. Res.*, 160: 231-236, 1986.
- Natarajan A.T., Vyas R.C., Wiegant J. y Curado M.P. A cytogenetic follow-up study of the victims of a radiation accident in Goiânia (Brazil). *Mutat. Res.*, 247: 103-111, 1991.
- Natarajan A.T., Vyas R.C., Darroudi F. y Vermeulen S. Frequencies of X-ray-induced chromosome translocations in human peripheral lymphocytes as detected by *in situ* hybridization using chromosome specific DNA libraries. *Int. J. Radiat. Biol.*, 61: 199-203, 1992.
- Natarajan A.T., Balajee A.S., Boei J.J.W.A., Darroudi F., Domínguez I., Hande M.P., Meijers M., Slijepcevic, Vermeulen S. y Xiao Y. Mechanisms of induction of chromosomal aberrations and their detection by fluorescence *in situ* hybridization. *Mutat. Res.*, 372: 247-258, 1996a.
- Natarajan A.T., Darroudi F., Hadjidedkova V., Vermeulen S., Chatterjee M., van den Berg M., Grigorova M., Granath F., Ramalho A.T. y Curado M.P. Biological dosimetric studies in Goiânia radiation accident. IAEA, 1996b.
- Natarajan A.T., Boei J.J.W.A., Vermeulen S. y Balajee A.S. Frequencies of X-ray induced pericentric inversions and centric rings in human blood lymphocytes detected by FISH using chromosome arm specific DNA libraries. *Mutat. Res.*, 372: 1-7, 1996c.
- Natarajan A.T., Santos S.J., Darroudi F., Hadjidikova V., Vermeulen S., Chatterjee S., v/d Berg M., Grigorova M., Sakamoto-Hojo E.T., Granath F., Ramalho A.T. y Curado M.P. ¹³⁷Cesium-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence *in situ* hybridization: eight years follow up of the Goiânia radiation accident victims. *Mutat. Res.*, 400: 299-312, 1998.
- Newman H.C., Prise K.M., Folkard M. y Michael B.D. DNA double-strand break distributions in X-rays and α -particle irradiated V79 cells: evidence for non-random breakage. *Int. J. Radiat. Biol.*, 71: 347-363, 1997.
- Noll M. y Kornberg R.D. Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H₁. *J. Mol. Biol.*, 109: 393, 1977.

BIBLIOGRAFÍA

- Nose K. y Nikaido O. Transcriptionally active and inactive genes are similarly modified by chemical carcinogens or X-ray in normal human fibroblasts. *Biochim. Biophys Acta*, 781: 273-278, 1984.
- Oleinick N.L., Chiu S.M., Ramakrishnan N. y Xue L.Y. The formation, identification and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Br. J. Cancer suppl.*, 8: 135-140, 1987.
- Olins A.L. y Olins D.E. Spheroid chromatin units (nu bodies). *Science*, 183: 330-332, 1974.
- Ozawa S., Tamura A., Suzuki H., Nishimura T. y Tanaka N. Mechanisms affecting peplomycin sensitivity of Chinese hamster cell lines. *J. Antibiotics*, 38: 1257-1265, 1985.
- Palitti F. Mechanisms of the origin of chromosomal aberrations. *Mutat. Res.*, 404: 133-137, 1998.
- Pandita T.K., Gregoire V., Dhingra K. y Hittelman W.N. Effect of chromosome size on aberration levels caused by gamma radiation as detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.*, 67: 94-101, 1994.
- Pandita T.K., Pathak S. y Geard C.R. Chromosome end association, telomeres and telomerase activity in ataxia telangiectasia. *Cytogenet. Cell Genet.*, 71: 86-93, 1995.
- Pantelias G.E. y Maillie D.H. Direct analysis of radiation induced chromosome fragments and rings in unstimulated human peripheral blood lymphocytes by means of the premature chromosome condensation, *Mutat. Res.*, 149: 67-72, 1985.
- Pâques F. y Haber J.E. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63: 349-404, 1999.
- Paulson J.R y Laemmli U.K. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12, 817-828, 1977.
- Pfeiffer P. The mutagenic potential of DNA double-strand break repair. *Toxicol. Lett.*, 96-97: 119-129, 1998.
- Pfeiffer P. y Vielmetter W. Joining of nonhomologous DNA double strand breaks *in vitro*. *Nucl. Acids Res.*, 16: 907-923, 1988.
- Pfeiffer P., Thode S., Hancke J., Keohavong P. y Thilly W.G. Resolution and conservation of mismatches in nonhomologous DNA end joining. *Mutagenesis*, 9: 527-535, 1994a.
- Pfeiffer P., Thode S., Hancke J. y Vielmetter W. Mechanisms of overlap formation in nonhomologous DNA end joining. *Mol Cell Biol.*, 14: 888-895, 1994b.

BIBLIOGRAFÍA

- Pfeiffer P., Göttlich B., Reichenberger S., Feldmann E., Daza P., Ward J.F., Milligan J.R., Mullenders L.H.F. y Natarajan A.T. DNA lesions and repair. *Mutat. Res.*, 366: 69-80, 1996.
- Pfeiffer P., Goedecke W. y Günter Obe. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations *Mutagenesis*, 15: 289-302, 2000.
- Pincheira J.V., López I.H., Tapia G.O., Navarrete M.H. y Oyarzun C.C. G₂ repair and evaluation of the cytogenetic damage induced by low doses of X-irradiation during G₀ in human lymphocytes. *Biol. Res.*, 28: 267-275, 1995.
- Pinkel D., Straume T. y Gray J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence *in situ* hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 2934-2938, 1986.
- Pinkel D., Landegent J., Collins C., Fuscoe J., Segraves R., Lucas J. y Gray J. Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 9138-9142, 1988.
- Povirk L. DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutat. Res.*, 355: 71-89, 1996.
- Povirk L.F. y Austin M.J.F. Genotoxicity of bleomycin. *Mutat. Res.*, 257: 127-143, 1991.
- Prasad R., Beard W.A. y Wilson S.H. Studies of gapped DNA substrate binding by mammalian DNA polymerase beta. Dependence on 5'-phosphate group. *J. Biol. Chem.*, 269: 18096-18101, 1994.
- Pressl S., Edwards A. y Stephan G. The influence of age, sex and smoking habits on the background level of FISH-detected translocations. *Mutat. Res.*, 442: 89-95, 1999.
- Preston R.J. The effect of cytosine arabinoside on the frequency of X-ray-induced chromosome aberrations in normal human leukocytes. *Mutat. Res.*, 69: 71-79, 1980.
- Preston R.J. The use of inhibitors of DNA repair in the study of the mechanisms of induction of chromosome aberrations. *Cytogenet. Cell Genet.*, 33: 20-26, 1982.
- Preston R.J. y Gooch P.C. The induction of chromosome-type aberrations in G₁ by methylmetanesulfonate and 4-nitroquinoline-N-oxide, and the non-requirement of an S-phase for their production. *Mutat. Res.*, 83: 395-402, 1981.
- Rae P.M. y Franke W.W. The interphase distribution of satellite DNA-containing heterochromatin mouse nuclei. *Chromosoma*, 39: 443-456, 1972.
- Ramalho A.T., Curado M.P. y Natarajan A.T. Lifespan of human lymphocytes estimated during a six year cytogenetic follow-up of individuals accidentally exposed in the 1987 radiological accident in Brazil. *Mutat. Res.*, 331: 47-54, 1995.

BIBLIOGRAFÍA

- Ramírez M.J., Surrallés J., Galofré P., Creus A. y Marcos R. Radioactive iodine induces clastogenic and age-dependent aneugenic effects in lymphocytes of thyroid cancer patients as revealed by interphase FISH. *Mutagenesis*, 12: 449-455, 1997.
- Ramírez M.J., Surrallés J., Galofré P., Creus A. y Marcos R. FISH analysis of 1cen-1q12 breakage, chromosome 1 numerical abnormalities and centromeric content of micronuclei in buccal cells from thyroid cancer and hyperthyroidism patients treated with radioactive iodine. *Mutagenesis*, 14: 121-127, 1999.
- Ramírez M.J., Puerto S., Galofré P., Parry E.M., Parry J.M., Creus A., Marcos R. y Surrallés J. Multicolour FISH detection of radioactive iodine-induced 17cen-p53 chromosomal breakage in buccal cells from therapeutically exposed patients. *Carcinogenesis*, 8: 1581-1586, 2000.
- Rao P.N., Wilson B.A. y Puck T.T. Premature chromosome condensation and cell cycle analysis. *J. Cell Physiol.*, 91: 131-142, 1977.
- Renz M. y Kurz C. A colorimetric method for DNA hybridization. *Nucl. Acids Res.*, 12: 3435-3444, 1984.
- Resnick M.A. The repair of double-strand breaks in DNA: a model involving recombination. *J. Theor. Biol.*, 59: 97-106, 1976.
- Revell S.H. A new hypothesis for "chromatid" changes, En: Bacq Z.W. y Alexander P. (eds). *Proc. Radiobiology Symposium*, 1954, Liège, Butterworth, London, pp.243-253, 1955.
- Ried T., Baldini A., Rand T.C. y Ward D.C. Simultaneous visualization of seven different DNA probes by *in situ* hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1388-1392, 1992.
- Rieger R., Michaelis A. y Green M.M. *Glosary of Genetics. Classical and Molecular* (Fourth completely revised edition). Springer- Verlag, Berlin, pp. 647, 1976.
- Roth D.B. y Wilson J.H. Illegitimate recombination in mammalian cells. En: Kucherlapati R. y Smith G. (eds). *Genetic recombination*, A.S.M. Press, Washington, D.C., pp.621-653, 1988.
- Roy S.N. y Howitz S.B. Characterization of the association of radiolabeled bleomycin A₂ with HeLa cells. *Cancer Res.*, 44: 1541-1546, 1984.
- Rufer N., Brümmendorf T.H., Kolvraa S., Bischoff C., Christensen K., Wadsworth L., Schulzer M., *et al.* Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocytes subsets points to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J. Exp. Med.*, 190: 157-167, 1999.

BIBLIOGRAFÍA

- Rupa D.S., Hasegawa L.S. y Eastmond D.A. Detection of chromosomal breakage in the 1cen-1q12 region of interphase human lymphocytes using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with tandem DNA probes. *Cancer Res.*, 55: 640-645, 1995.
- Rupa D.S., Schuler M. y Eastmond D.A. Detection of hyperdiploidy and breakage affecting the 1cen-1q12 region of cultured interphase human lymphocytes treated with various genotoxic agents. *Environ. Mol. Mutagen.*, 29: 161-167, 1997a.
- Rupa D.S., Hasegawa L.S. y Eastmond D.A. Detection of chromosomal alterations affecting the 1cen-1q12 region in irradiated granulocytes and lymphocytes by multicolour FISH with tandem DNA probes. *Mutagenesis*, 12: 195-200, 1997b.
- Sabatier L., Muleris M., Prieur M., AlAchkar W., Hoffschir F., Prod'homme-Ricoul M., Gerbault-Sereau M., Viegas-Pequinot E. y Dutrillaux B. Specific sites of chromosomal radiation-induced rearrangements. En: Jolles G. y Cordier A. (eds). *New Trends in Genetic Risk Assessment*. London, Academic Press, pp. 211-224, 1989.
- Saccone S., de Sario A., Della Valle G. y Bernardi G. The highest gene concentrations in the human genome are in T bands of metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4913-4917, 1992.
- Sachs R.K., Awa A., Kodama Y., Nakano M., Ohtaki K. y Lucas J.N. Ratios of radiation-produced chromosome aberrations as indicators of large-scale DNA-geometry during interphase. *Radiat. Res.*, 133: 345-350, 1993.
- Sachs R.K., van den Engh G., Trask B.J., Yokota H. y Hearst J.E. A random-walk/ giant loop model for interphase chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 2710-2714, 1995.
- Sachs R.K., Chen A.M. y Brenners D.J. Review: Proximity effects in the production of chromosome aberrations by ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 71: 1-19, 1997.
- Saitoh Y. y Laemmli U.K. Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell*, 76: 609-622, 1994.
- Sak A. y Stuschke M. Repair of ionizing radiation induced DNA double-strand breaks (dsb) at the c-myc locus in comparison to the overall genome. *Int. J. Radiat Biol.*, 73: 35-43, 1998.
- Salassidis K., Georgiadou-Schumacher V., Braselmann H., Muller P., Peter R.U. y Bauchinger M. Chromosome painting in highly irradiated Chernobyl victims: A follow-up study to evaluate the stability of symmetrical translocations and the influence of clonal aberrations for retrospective dose estimation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 68: 257-262, 1995.

BIBLIOGRAFÍA

- Salone B., Pretazzoli V., Bosi A. y Olivieri G. Effect of 1 Gy X-rays in G1 phase on activation of cell cycle checkpoints in human lymphocytes: role played by chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, 12: 463-468, 1997.
- Saltman D., Morgan R., Cleary M.L. y deLange T. Telomeric structure in cells with chromosome end associations. *Chromosoma*, 102: 121-128, 1993.
- Sánchez-García I. Consequences of chromosomal abnormalities in tumor development. *Annu. Rev. Genet.*, 31: 429-453, 1997.
- Sankaranarayanan K., Natarajan A.T., Mullenders L.H y van Rijn J.L. Effects of pre-treatment with sodium butyrate on the frequencies of X-ray-induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res.*, 151: 269-274, 1985.
- Sankaranarayanan K., von Duyn A., Loos M.J., Meschini R. y Natarajan A.T. Effects of sodium butyrate on X-rays and bleomycin-induced chromosome aberrations in human peripheral blood lymphocytes. *Genet Res.*, 56: 267-276, 1990.
- Sasaki M. y Miyata H. Biological dosimetry in atomic bomb survivors. *Nature*, 220, 1189-1193, 1968.
- Savage J.R.K. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J. Med. Genetics*, 12: 103-122, 1975.
- Savage J.R.K. Assignment of aberration breakpoints in banded chromosomes. *Nature*, 270: 523-514, 1977.
- Savage J.R.K. Interchange and intra-nuclear architecture. *Environ. Mol. Mutagen.*, 22: 234-244, 1993.
- Savage J.R.K. A brief survey of aberration origin theories. *Mutat. Res.*, 404: 139-147, 1998.
- Savage J.R.K. y Papworth D.G. Frequency and distribution studies of asymmetrical *versus* symmetrical chromosome aberrations. *Mutat. Res.*, 95: 7-18, 1982.
- Savage J.R.K. y Simpson P.J. On the scoring of FISH-“painted” chromosome exchange aberrations. *Mutat. Res.*, 307: 345-353, 1994a.
- Savage J.R.K. y Simpson P.J. FISH “painting” patterns resulting from complex exchanges. *Mutat. Res.*, 312: 51-60, 1994b.
- Savage J.R.K. y Tucker J.D. Nomenclature systems for FISH-painted chromosome aberrations. *Mutat. Res.*, 366: 153-161, 1996.
- Sax K. Chromosome aberrations induced by X-rays. *Genetics*, 23: 494-516, 1938.
- Sax K. An analysis of X-ray-induced chromosomal aberrations in *Tradescantia*. *Genetics*, 25: 42-68, 1940.

BIBLIOGRAFÍA

- Scarpato R., Lori A., Panasiuk G. y Barale R. FISH analysis of translocations in lymphocytes of children exposed to the Chernobyl fallout: preferential involvement of chromosome 10. *Cytogenet. Cell Genet.*, 79: 153-156, 1997.
- Scarpato R., Lori A., Tomei A., Cipollini M. y Barale R. High prevalence of chromosome 10 rearrangements in human lymphocytes after *in vitro* X-ray irradiation. *Int.J. Radiat. Biol.*, 76: 661-666, 2000.
- Schmid M., Grunert D., Haaf T. y Engel W.A. A direct demonstration of somatically paired heterochromatin of human chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 36: 554-561, 1983.
- Schmid W. y Leppert M.F. Rates of DNA synthesis in heterochromatic and euchromatic segments of the chromosome complements of two rodents. *Cytogenetics*, 8: 125-135, 1969.
- Schröck E., du Manoir S, Veldman T., Schoell B., Wienberg J., Ferguson-Smith M.A., Ning Y., Ledbetter D.H., Bar-Am I., Soenksen D., Garini Y. y Ried T. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*, 273: 494-497, 1996.
- Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*, 2: 971-972, 1971.
- Sen P. y Hittelman W.N. Kinetics and extent of bleomycin-induced chromosome damage in quiescent normal human fibroblast and human mononuclear blood cells. *Cancer Res.*, 44: 591-596, 1984.
- Simpson P.J. y Savage J.R.K. Estimating the true frequency of X-ray-induced complex chromosome exchange using fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Radiat. Biol.*, 67: 37-45, 1995.
- Simpson P.J. y Savage J.R.K. Dose-response curves for simple and complex chromosome aberrations induced by X-rays and detected using fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Radiat. Biol.*, 69: 429-436, 1996.
- Slijepcevic P. y Natarajan A.T. Distribution of X-ray-induced G₂ chromatid damage among Chinese hamster chromosomes: influence of chromatin conformation. *Mutat. Res.*, 323: 113-119: 1994a.
- Slijepcevic P. y Natarajan A.T. Distribution of radiation- induced G₁ exchange and terminal deletion breakpoints in Chinese hamster chromosomes as detected by G banding. *Int. J. Radiat. Biol.*, 66: 747-755, 1994b.
- Slijepcevic P., Xiao Y., Domíguez I. y Natarajan A.T. Spontaneous and radiation –induced chromosomal breakage at interstitial telomeric sites. *Chromosoma*, 104: 596-604, 1996.

BIBLIOGRAFÍA

- Smith L.E., Parks K.K., Hasegawa L.S., Eastmond D.A. y Grosovsky A.J. Targeted breakage of paracentromeric heterochromatin induces chromosomal instability. *Mutagenesis*, 13: 435-443, 1998.
- Smith P.J. n-Butyrate altius chromatin accessibility to DNA repair enzymes. *Carcinogenesis*, 7: 423-429, 1986.
- Sognier M-A., Hittelman W.N. y Pollard M. The relationship between DNA and chromosome damage after bleomycin treatment: dose-response measurements. *Mutat. Res.*, 93: 149-159, 1982.
- Speicher M.R., Ballard S.G. y Ward D.C. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genet.*, 12: 368-375, 1996.
- Spruill M.D., Ramsey M.J., Swiger R.R., Nath J. y Tucker J.D. The persistence of aberrations in mice induced by gamma radiation as measured by chromosome painting. *Mutat. Res.*, 356: 135-145, 1996.
- Spruill M.D., Nelson D.O., Ramsey M.J., Nath J. y Tucker J.D. Lifetime persistence and clonality of chromosome aberrations in the peripheral blood of mice acutely exposed to ionizing radiation. *Radiat. Res.*, 153: 110-121, 2000.
- Stephan G. y Pressl S. Chromosome aberrations in human lymphocytes analysed by fluorescence *in situ* hybridization after *in vitro* irradiation, and in radiation workers, 11 years after an accidental radiation exposure. *Int. J. Radiat. Biol.*, 71: 293-239, 1997.
- Strachan T. y Read A.P. Human molecular genetics. BIOS Scientific Publishers Ltd., UK, 1996.
- Stranbridge E.J. Functional evidence for human tumour supressor genes: chromosome and molecular genetic studies. *Cancer Surv.*, 2: 5-24, 1992.
- Strick R. y Laemml U.K. SARs are cis DNA elements of chromosome dynamics: synthesis of a SAR repressor protein. *Cell*, 83: 1137-1148, 1995.
- Stubbe J. y Kozarich J. Mechanisms of bleomycin induced DNA degradation. *Chem. Rev.*, 87: 1107-1136, 1987.
- Sumner T.A. The mitotic chromosome. En; Verma R.S. (eds). *Advances in Genome Biology*. Institute of Molecular Biology and Genetics Interscience, Brooklyn, NY, pp. 211-261, 1998.
- Surrallés J. y Natarajan A.T. Position effects of translocations involving the inactive X chromosome: physical linkage to XIC/XIST does not lead to long-range *de novo* inactivation in human somatic cells. *Cytogenet. Cell Genet.*, 82: 58-66, 1998.

BIBLIOGRAFÍA

- Surrallés J., Jeppesen P., Morrison H. y Natarajan A.T. Analysis of loss of inactive X chromosome in interphase cells. *Am. J. Hum. Genet.*, 59: 1091-1096, 1996.
- Surrallés J., Sebastian S. y Natarajan A.T. Chromosomes with high gene density are preferentially repaired in human cells. *Mutagenesis*, 12: 437-442, 1997.
- Surrallés J., Puerto S., Ramírez M.J., Creus A., Marcos R., Mullenders L.H.F. y Natarajan A.T. Links between chromatin structure, DNA repair and chromosome fragility. *Mutat. Res.*, 404: 39-44, 1998.
- Surrallés J., Hande M.P., Marcos R. Y Lansdorp P.M. Accelerated telomere shortening in the human inactive X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.*, 65: 1617-1622, 1999.
- Szostak J.W., Orr-Weaver T.-L., Rothstein R. y Stahl F.W. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*, 33: 25-35, 1983.
- Takeshita M., Grollman A.P., Ohtsubo E. y Ohtsubo H. Interaction of bleomycin with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 5983-5987, 1978.
- Tazi J. y Bird A.P. Alternative chromatin structure at CpG islands. *Cell*, 60: 909, 1990.
- Teoule R. Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int. J. Radiat. Biol.*, 51: 573-589, 1987.
- Thacker J. Repair of ionizing radiation damage in mammalian cells. Alternative pathways and their fidelity. *C.R.Acad. Sci.*, 322: 103-108, 1999.
- Thode S., Schäfer A., Pfeiffer P. y Vielmetter W. A novel pathway of DNA end-to-end joining. *Cell*, 60: 921-928, 1990.
- Thompson L.H. Evidence that mammalian cells possess homologous recombinational repair pathways. *Mutat. Res.*, 363: 77-88, 1996.
- Tjio J.H. y Levan A. The chromosome number of man. *Hereditas*, 42: 1-6, 1956.
- Tucker J.D., Ramsey M.J., Lee D.A. y Minkler J.L. Validation of chromosome painting as a biodosimeter in human peripheral lymphocytes following acute exposure to ionizing radiation *in vitro*. *Int. J. Radiat. Biol.*, 64: 27-37, 1993.
- Tucker J.D., Lee D.A., Ramsey M.J., Briner J., Olsen L. y Moore D.H. II On the frequency of chromosome exchanges in a control population measured by chromosome painting. *Mutat. Res.*, 313: 193-202, 1994.
- Tucker J.D., Morgan W.F., Awa A.A., Bauchinger M., Blakey D., Cornforth M.N., Littlefield L.G., Natarajan A.T. y Shasserre C. A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting. *Cytogenet. Cell Genet.*, 68: 211-221, 1995a.

BIBLIOGRAFÍA

- Tucker J.D., Morgan W.F., Awa A.A., Bauchinger M., Blakey D., Cornforth M.N., Littlefield L.G., Natarajan A.T. y Shasserre C. Paint: a proposed nomenclature for structural aberrations detected by whole chromosome painting. *Mutat. Res.*, 347: 21-21, 1995b.
- Tucker J.D., Breneman J.W., Briner J.F., Eveleth G.G., Langlois R.G. y Moore D.H. Persistence of radiation-induced translocations in rat peripheral blood determined by chromosome painting. *Environ. Mol. Mutagen.*, 30: 264-272, 1997.
- Tucker J.D., Spruill M.D., Matsumoto K., Ramsey M.J., Nelson M.J. y Nath J. Chromosome translocations: how stable and persistent are they? *Environ. Mol. Mutagen.*, 31(suppl. 29): 50, 1998.
- Umezawa H., Maeda K., Takeuchi T. y Okami Y. New antibiotics, Bleomycin A and B. *J. Antibiotics*, 19: 200-209, 1966.
- Vig B.K. y Lewis R. Genetic toxicology of bleomycin. *Mutat. Res.*, 55: 121-145, 1978.
- Vnencak-Jones C.L., Phillips J.III., Chen E.Y. y Seeburg P.H. Molecular basis of human growth hormone gene deletions. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 85: 5615-5619, 1988.
- Vogel F. y Schroeder T.M. The internal order of the interphase nucleus. *Hum. Genet.*, 25: 265-297, 1974.
- Vyas R.C., Darroudi F. y Natarajan A.T. Radiation-induced chromosomal breakage and rejoining in interphase-metaphase chromosomes of human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 249: 29-35, 1991.
- Warburton D. y Kinney A. Chromosomal differences in susceptibility to meiotic aneuploidy. *Environ. Mol. Mutagen.*, 28: 237-247, 1996.
- Ward J.F. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog. Nucl. Acids Mol. Biol.*, 35: 95-125, 1988
- Wiegant J., Wiesmeijer C.C., Hoovers J.M.N., Schuurin E., d'Azzo A., Vrolijk J., Tanke H.J. y Raap A.K. Multiple and sensitive fluorescence *in situ* hybridization with rhodamine-, fluorescein- and coumarin-labeled DNAs. *Cytogenet. Cell Genet.*, 63: 73-76, 1993.
- Wilkie A.O., Lamb J., Harris P.C., Finney R.D. y Higgs D.R. A truncated human chromosome 16 associated with alpha thalasemia is stabilized by the addition of telomeric repeats (TTAGGG)_n. *Nature*, 346: 868-871, 1990.
- Wimber D.E. y Steffensen D.M. Localization of 5S RNA genes on *Drosophila* chromosomes by RNA-DNA hybridization. *Science*, 170: 639-641, 1970.

BIBLIOGRAFÍA

- Wong K.-K., Chang S., Weiler S.R., Ganesan S., Chaudhuri J., Zhu CH., Artandi S.E., Rudolph K.L., Gottlieb G.J., Chin L., Alt F.W. y DePinho R.A. Telomere dysfunction impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation. *Nature Genet.*, 26: 85-88, 2000.
- Wojcik A. y Streffer C. Comparison of radiation-induced aberration frequencies in chromosomes 1 and 2 of two human donors. *Int. J. Radiat. Biol.*, 74: 573-581, 1998.
- Wu H., Durante M., George E., Goodwin E.H. y Yang T.Y. Rejoining and misrejoining of radiation-induced chromatin breaks. 2. Biophysical model. *Radiat. Res.*, 145: 281-288, 1996.
- Wu H. George K. y Yang T.C. Estimate of true incomplete exchanges using fluorescence *in situ* hybridization with telomere probes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 73: 521-527, 1998.
- Wuttke K., Streffer C., Müller W.U., Reiners C., Biko J. y Demidchik E. Micronuclei in lymphocytes of children from the vicinity of Chernobyl before and after ¹³¹I therapy for thyroid cancer. *Int. J. Radiat. Biol.*, 69: 259-268, 1996.
- Xiao Y. y Natarajan A.T. Heterogeneity of Chinese hamster X chromosomes in X-rays-induced chromosomal aberrations. *Int. J. Radiat. Biol.*, 75: 419-427, 1999.
- Yasui L.S., Higashikubo R. y Warters R.L. The effect of chromatin decondensation on DNA damage and repair. *Radiat Res.*, 112: 318-330, 1987.
- Yokota H., van den Engh G., Hearst J.E., Sachs R.K., Trask B.J. Evidence for the organization of chromatin in megabase pair-sized loops arranged along a random walk path in the human G₀/G₁ interphase nucleus. *J. Cell Biol.*, 130: 1239-1249, 1995.
- Yu G.L. y Blackburn E.H. Developmentally programmed healing of chromosomes by telomerase in *Tetrahymena*. *Cell*, 67: 823-832, 1993.
- Yung J.F. New FISH probes the end in sight. *Nature Genet.*, 14: 10-12, 1996.
- Yunis J.J. The chromosomal basis of human neoplasms. *Science*, 221: 227-233, 1983.
- Yunis, J.J. y Tsai M.Y. Mapping of polysomal mRNA and hnRNA to the lightly staining G-bands of human chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 22: 364-367, 1978.
- Zedenius J., Wallin G., Svensson A., Bovee J., Hoog A., Backdahl M. y Larsson C. Deletions of the long arm of chromosome 10 in progression of follicular thyroid tumors. *Human Genet.*, 97: 299-303, 1996.
- Zhu X.-D., Küster B., Mann M., Petrini J.H.J. y de Lange T. Cell-cycle-regulated association of RAD50/Mre11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nature Genet.*, 25: 347-351, 2000.

BIBLIOGRAFÍA

Zirbel R.M., Mathieu U., Kurz A., Cremer T. y Lichter P. Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries. *Chromosome Res.*, 1: 92-106, 1993.