

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
LABORATORIO DE GENETICA TOXICOLOGICA

ESTUDIO DE GENOTOXICIDAD DEL EUGENOL
MEDIANTE EL ENSAYO DE MUTACIONES
DOMINANTES LETALES EN RATONES
(*Mus musculus* CF1)

ANA VERONICA ORTEGA PINTO

TRABAJO DE INVESTIGACION
REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE
CIRUJANO-DENTISTA



PROFESOR RESPONSABLE
Dra. Nelly Lafuente Indo
DOCENTE GUIA
Lic. Manuel Ellahueñe M.

04205

SANTIAGO - CHILE
1987

A mis padres,
y a Rodrigo.

INDICE

	página
INTRODUCCION	1
MARCO TEORICO	10
HIPOTESIS, OBJETIVOS	19
MATERIALES Y METODOS	21
RESULTADOS	26
DISCUSION	35
CONCLUSIONES	41
SUGERENCIAS	42
RESUMEN	43
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi reconocimiento a todas las personas que directa o indirectamente colaboraron para que este trabajo llegara a feliz término. En especial mis agradecimientos a:

- Dra. Nelly Lafuente Indo, quien fue con su sólida preparación y experiencia unida a su gran calidad humana, significó una constante y eficiente guía.

- Licenciado en Biología señor Manuel Ellahue ñe Manquian, que junto a su apoyo en conocimiento, me brindó amistad y dedicación.

- Tecnólogo Médico señorita Margarita Orellana, Licenciadas en Biología señoritas Patricia Pérez y Janette Soto y al Dr. Marcos Solar por su gentil ayuda.

INTRODUCCION

El conocimiento de las variables del ambiente que afectan al Hombre, aún cuando ha experimentado un gran avance, sigue siendo una temática con muchas interrogantes no aclaradas. Los agentes injuriantes del entorno pueden clasificarse en tres grandes grupos: Físicos, Químicos y Biológicos, entre los agentes físicos pueden mencionarse las radiaciones, de los agentes biológicos pueden citarse virus, bacterias y hongos, y de los químicos, componentes de la dieta, fármacos, cosméticos, plaguicidas y otros.

Existe una gran cantidad de agentes químicos naturales y sintéticos, se estima que se encuentran en el mercado más de 60.000 productos elaborados por el Hombre (1-2), y también existe una enorme cantidad de toxinas químicas naturales que se encuentran en todos los vegetales. Algunas de estas toxinas naturales se presentan en cada planta constituyendo aproximadamente un 7% de su peso seco (3-4).

Estos agentes químicos pueden tener un efecto "tóxico", que generalmente se expresa en forma inmediata, o bien un efecto "genotóxico", es decir, generar un daño

sobre el material genético. El daño producido por las sustancias genotóxicas puede expresarse a mediano o largo plazo, después de ocurrida la exposición al agente químico. La alteración la puede sufrir el individuo, sus descendientes o ambos. Las sustancias genotóxicas actúan en niveles subtóxicos, lo que hace difícil su detección.

La alteración en la información genética en el individuo expuesto implica un daño genético, si este daño actúa sobre células somáticas, afectará sólo al individuo que lo porta y no tendrá mayor trascendencia para la especie, si el daño genético afecta a las células germinales, pueden producir no sólo un cambio en el mismo individuo, sino también sobre sus descendientes, lo que implica un "riesgo genético" para la especie.

Un agente genotóxico puede actuar a diferentes niveles:

- Alterando la proliferación de una población celular; efecto carcinogénico.
- Modificando la organogénesis; efecto teratogénico.
- Provocando un cambio heredable en el genoma;

efecto mutagénico.

Muchos carcinógenos son mutágenos y hay una fuerte correlación entre carcinogenicidad y mutagenicidad de los agentes químicos, pero esto no implica necesariamente que una sustancia mutágena sea también carcinógena (5). Una de las hipótesis que explica la generación de un cáncer es la "teoría de la Mutación Somática" (6), en la que se considera que una mutación sería el factor inicial conducente a la malignización. Esta hipótesis trae consigo varias implicaciones: aquellos que sufren mutaciones espontáneas tendrían un cierto nivel base para el cáncer, los agentes genotóxicos elevarían este nivel base. Los que presentan anomalías que favorecen las mutaciones tendrían un elevado riesgo de adquirir cáncer y los que han heredado una mutación tendrían una predisposición aún más alta de adquirir dicha enfermedad (6). Se sabe además que existen otros dos pasos importantes involucrados en la carcinogénesis: la "promoción", que involucra la proliferación celular, quizás de algunos tipos particulares de células (4), y la "progresión" relacionada con la capacidad de invadir y dar metástasis (3-4).

Esto se ha podido observar en los pacientes con

Xeroderma Pigmentario, los cuales presentan una alteración celular que les impide realizar un proceso de reparación del ADN. Con la radiación ultravioleta del Sol, se producen lesiones en el ADN de los fibroblastos de la piel, que en personas normales son reparadas sin dejar rastros. En los pacientes con Xeroderma Pigmentario, las lesiones permanecen sin reparar y esta acumulación de alteraciones en el ADN provoca la malignización celular (1-7). En estas personas está alterada la "reparación por escisión" (7-8), que es uno de los principales procesos destinados a corregir las lesiones del ADN. Este proceso corrige no sólo el daño producido por radiaciones, sino también lesiones originadas por sustancias genotóxicas. En este sistema una serie de enzimas corta el trozo de ADN dañado, lo elimina, se reconstruye la secuencia original y luego otra enzima ADN ligasa une los fragmentos nuevo y antiguo de ADN (1-8).

El proceso de reparación por escisión es, en general, muy efectivo, pero en determinadas ocasiones pueden quedar lesiones sin reparar. Si las lesiones son pequeñas, no son reconocidas por la célula y ésta podrá duplicarse perpetuando la alteración. A ésto se le llama "Mutación Direc-ta" (1). Si la lesión del ADN es mayor, o hay varias

agrupadas, se activan otros mecanismos entre los que se cuenta la "Reparación SOS", caracterizada en bacterias, que actúa en situaciones de emergencia. Este proceso tiende a restaurar la estructura del ADN y permite su replicación aún con errores, puesto que tolera las lesiones. Esta tolerancia hace que en la respuesta SOS se produzcan mutaciones generalizadas (8). A este mecanismo se le llama "Mutación Indirecta" (1).

Una mutación, como se dijo antes, es cualquier cambio heredable en el ADN. Por lo tanto, aquellas alteraciones que impiden la replicación del ADN, no constituyen mutaciones sino lesiones. Las mutaciones pueden clasificarse en dos tipos principales: a) Mutaciones Puntuales, que incluyen a inserción, pérdida, o sustitución de nucleótidos y, en general, a todas las mutaciones con herencia mendeliana no observables citogenéticamente o genéticamente. b) Alteraciones cromosómicas, que inducen cambios en la estructura y/o en el número de cromosomas (9). A la producción de fracturas cromosómicas se la denomina "Clastogénesis" (10).

Para la evaluación genotóxica de un determinado producto se emplea una amplia variedad de sistemas de

ensayo biológico. En una primera etapa se realizan ensayos en procariontes, especialmente en bacterias que permiten analizar gran cantidad de productos químicos en pocas horas o días y con un costo bastante bajo. En procariontes, uno de los ensayos más usados es el test de Ames, en el cual se utilizan bacterias *Salmonella typhimurium* que por mutación han perdido la capacidad de sintetizar histidina; la mutación reversa o retromutación, se produce en un porcentaje muy bajo, porcentaje que se eleva bastante por la acción de los agentes genotóxicos. El principal aporte de Ames es que agregó a su test extracto de hígado de mamífero para producir la metabolización tipo hepática que las sustancias sufren en organismos superiores (1).

A pesar del aporte de Ames a los ensayos en procariontes, persisten varias limitaciones en la extrapolación de resultados tales como: metabolismo específico en determinados órganos, diferente permeabilidad celular frente a determinados productos, o diferencias en la reparación del material genético (1).

Después de la visión general dada por los test en procariontes, las sustancias de mayor interés son

analizadas mediante ensayos en eucariontes, ya sea vegetales (12) o animales (12-14-15).

Los eucariontes presentan una alta organización, un sistema de membranas que separa el núcleo del citoplasma y, principalmente, ADN asociado a proteínas formando una compleja estructura llamada cromatina (18b).

En animales se realizan test *in vitro*, por ejemplo, con células en cultivo (12), o también test *in vivo*, directamente en el animal, de modo que se presenta una mayor similitud con los procesos que ocurren en el hombre. Los estudios *in vivo* en mamíferos pueden tener como blanco células somáticas o células germinales.

Entre los sistemas de prueba que se basan en el daño genético producido sobre células somáticas, uno de los más conocidos es el test de micronúcleos (10-11), en el cual se observan quiebres cromosómicos de un tipo particular de células de la médula ósea, los eritrocitos policromáticos (10-11). Este es, por lo tanto, un estudio de clastogénesis.

En los métodos de análisis de genotoxicidad,

cuyo blanco son las células germinales, se puede observar el daño directamente en el individuo afectado o en su descendencia. Se sabe que existen diferencias de susceptibilidad entre células germinales femeninas y masculinas frente a la acción de los agentes genotóxicos (18).

La reparación en las células germinales femeninas parece ser mucho más efectiva, incluso en el largo estadio de ovocito I, existen evidencias de múltiples sistemas reparativos (18-19). Se ha demostrado experimentalmente que después de la fertilización, los sistemas reparativos del ovocito son capaces de corregir alteraciones ocurridas en el espermatozoide (20).

Durante la espermatogénesis, sin embargo, hay estadios bastante sensibles a los agentes genotóxicos. En un principio se pensó que los agentes químicos genotóxicos sólo podían actuar sobre el ADN que está replicándose (9). Posteriormente, se demostró que ésto era erróneo, ya que muchos agentes mutagénicos pueden ejercer su acción en cualquier estadio celular, presentando cada estadio una sensibilidad al agente que le es característica. Durante la espermatogénesis se han identificado algunos estadios más sensibles como espermatozoide que es altamente lábil y espermátida

que lo es en menor grado (18). En estudios de reparación del ADN se ha visto que no se produce reparación o es muy baja en estos dos estadios: espermatida y espermatozoide (18).

Esta mayor susceptibilidad de las células germinales masculinas, junto al mayor conocimiento sobre el tiempo que dura la gametogénesis masculina y el hecho de que cualquier daño en el embrión al tratar al padre se deberá exclusivamente a factores genéticos y no epigénicos, ha conducido a la elección de las células germinales masculinas como blanco en la mayoría de los análisis en mamíferos.

MARCO TEORICO

En las pruebas de genotoxicidad *in vivo*, cuyo blanco son las células germinales de mamífero, el sistema de ensayo de elección generalmente es el ratón. Este posee un ciclo de vida y reproductor corto, siendo por lo tanto un buen sistema. Por ejemplo, la duración de la espermatogénesis es de 35 días en el ratón y 74 días en el hombre (18). El embarazo en ratones dura 21 días en relación a 9 meses en el ser humano.

Cuatro de las pruebas más usadas para evaluar genotoxicidad de un producto en células germinales de ratón serán descritas a continuación:

"TERATOSPERMIA". En ella se observan alteraciones morfológicas en la cabeza del espermatozoide maduro como duplicidad de cabeza o cola, espermatozoides acéfalos y otros tipos de modificaciones. Todos los agentes mutagénicos producen teratospermia, pero estos tipos de alteraciones también se observan, por ejemplo, en individuos muy jóvenes o con restricciones en la dieta. Por lo tanto, los resultados obtenidos

pueden estar sesgados por otras variables. Las alteraciones en los espermatozoides pueden ser de origen genético o epigénético (21).

"LOCUS ESPECIFICO". Esta es la única prueba confiable y relativamente disponible para detectar la inducción de mutaciones puntuales. Consiste principalmente en la elección de padres que portan loci específicos; uno de los progenitores, alelos recesivos, y alelos dominantes el otro. Generalmente, aquel individuo que lleva los genes dominantes recibe el tratamiento con el producto en estudio y es apareado con un individuo que tiene un stock de genes recesivos. Cualquier cambio genético en los loci específicos del individuo tratado se expresará en sus descendientes heterocigotos, que recibirán del otro progenitor genes recesivos. La principal limitación de esta prueba es que, aún cuando puedan seleccionarse gran cantidad de loci marcadores, éstos representarán una fracción muy baja del total del genoma. Además, como los marcadores se eligen por su facilidad para ser identificados, no constituyen un grupo representativo del genoma (15-18).

"TRANSLOCACIONES HEREDABLES". Una translocación recíproca es un intercambio de segmentos entre cromosomas no homólogos

y las células que han sufrido esta translocación pueden duplicarse sin perder material genético. El ensayo consiste en determinar si la descendencia de los animales tratados es semi-estéril o totalmente estéril. Si así fuera, se debería a que el agente a que fue expuesto el progenitor indujo en él una translocación heredable (18-18-22). Posiblemente, la principal limitación es su largo desarrollo, el cual requiere cuatro a cinco meses como mínimo y un número bastante alto de animales de experimentación, ya que se debe secuenciar dos generaciones. Su ventaja es la gran sensibilidad que posee, ya que con una leve dosis del agente mutágeno se observan resultados positivos (15).

"MUTACIONES DOMINANTES LETALES". Una mutación dominante letal es una alteración ocurrida en un gameto, capaz de producir la muerte del embrión antes, durante o poco después de la implantación (15). La causa principal de las mutaciones dominantes letales son los quiebres cromosómicos (22). La mutación dominante letal es entre los ensayos de genotoxicidad *in vivo* en mamíferos, el más difundido y mediante el cual se han analizado el mayor número de productos químicos (15-18). Esta prueba consiste principalmente en: tratar el animal con el agente genotóxico en la dosis y vía de

administración elegida. Después de un intervalo de tiempo, que corresponderá a una determinada etapa de la espermatogénesis en los machos o de la ovogénesis en las hembras, se aparean con individuos no tratados; luego de catorce días de gestación, se sacrifican las hembras y se cuenta el número de embriones vivos y embriones muertos (9-15). En general, el individuo tratado es el macho, ya que, como se mencionó anteriormente, la gametogénesis masculina es mejor conocida y además, al tratar a la hembra, el agente en estudio puede inducir super o subovulaciones u otro tipo de alteraciones que, al aumentar las variables hacen más difícil el análisis de los resultados (9). Entre las ventajas de este ensayo, está el menor tiempo requerido para su desarrollo, por lo que generalmente, se utiliza para determinar qué etapas de la espermatogénesis son las más sensibles a un determinado agente genotóxico (15). Las vías y formas de administración pueden ser adaptadas a las utilizadas en el hombre (aguda, subaguda, intraperitoneal, oral, etc.) (9). Además, es un método simple de fácil manipulación, que no requiere gran capacitación y los resultados son bastante objetivos (15). Una de las desventajas es que gran parte de las mutaciones puntuales pasan desapercibidas (9), y a pesar de que el tiempo y número de animales requeridos es menor que para

el test de translocaciones heredables, igualmente la cantidad de ejemplares a tratar es considerable, especialmente si se desea probar todos los estadios de la espermatogénesis (15).

Así, una sustancia química puede ser evaluada mediante variadas pruebas, todas con ventajas y desventajas, por lo que es necesario complementar éstas para tener una visión más amplia de la acción ejercida por el posible agente genotóxico. Estos estudios que en conjunto duran años, más la inmensa variedad de productos químicos hacen prácticamente imposible el análisis de todos ellos. Debe centrarse, entonces, la atención en aquellas sustancias que tienen una relación más directa con el hombre. Productos como los aditivos de alimentos o plaguicidas artificiales que afectan a un gran porcentaje de la población, o productos a los que se expone grupos reducidos de personas como es el caso de las exposiciones ocupacionales. Dentro de este grupo tenemos las sustancias de uso odontológico que requieren una mayor evaluación genotóxica, por ejemplo, el formocresol o el tan difundido Eugenol.

EUGENOL. El eugenol, 4-allyl-2-methoxyphenol, se encuentra en numerosos aceites naturales, principalmente en el aceite de clavo que se extrae de la flor del clavero *Eugenia*

caryophyllata (23). Se ha utilizado en la fabricación de perfumes y saborizantes (23). En Odontología se usa generalmente en combinación con óxido de zinc formando pastas endodónticas, cementos temporales o semi-temporales, pastas de impresión, además de ser utilizado en cementos quirúrgicos.

Su amplio uso en Odontología se debe principalmente a que es: obtundente al inhibir la transmisión nerviosa actuando como un estabilizador de membranas (24-25). Además, es antiséptico suave (26), antiinflamatorio, inhibiendo la síntesis de prostaglandinas y vasodilatador (27).

Entre sus efectos tóxicos encontramos que: inhibe la respiración celular, llegando a producir muerte celular (28-29), es neurotóxico en dosis elevadas o por períodos largos (24), es irritante sobre la mucosa oral (30) y tejidos óseos (31) y existen casos en que ha producido reacciones alérgicas como dermatitis de contacto y shock anafiláctico (32).

Se ha estudiado también su posible actividad genotóxica, ya que un compuesto relacionado, el Safrol, forma epóxido altamente reactivo en su cadena lateral (33), lo cual

está asociado con actividad carcinogénica (34).

En la detoxicación del Eugenol el metabolito que se produce en mayor proporción es el ácido homovanílico (28) y podría producirse, teóricamente, epóxido en cantidades muy bajas en relación a sus otros metabolitos (36), cantidad quizás suficiente para producir efectos genotóxicos.

Los resultados de distintos autores en relación a la actividad genotóxica del Eugenol son controvertidos.

Se ha notificado que el Eugenol y compuestos relacionados con mutagénicos en el test de Ames cuando forman óxidos en 2' y 3' (37). Según otros investigadores, la mutagenicidad del Eugenol depende de la presencia de cofactores. Mientras que se han obtenido resultados negativos con el ensayo de Ames con fracción S9 microsomal (38). Para otros autores, el Eugenol no sería inductor de carcinogénesis en ratas o ratones, ni induciría una respuesta mutagénica en *Salmonella typhimurium* (39).

Mediante la prueba de micronúcleos en ratón, se han obtenido resultados positivos con dosis de 740 mg/kg

peso (38). Sin embargo, con la misma prueba, más cafeína para inhibir los sistemas reparativos (41) el Eugenol no mostró actividad genotóxica (41).

Recientemente se ha publicado una disminución de la mutagenicidad del Benzo(a)Pireno en bacterias, en medios a los que se ha agregado fracción hepática de ratas tratadas con Eugenol (39). El eugenol sólo disminuye la mutagenicidad del Benzo(a)Pireno cuando es aplicado a las ratas y no directamente a las bacterias, por lo tanto, se cree que la fracción microsomal juega un importante papel (39).

Estos resultados son dudosos, ya que puede ocultarse la actividad del Eugenol por tres motivos: no metabolización, excelente reparación, o bien que el Eugenol no sea genotóxico.

La metabolización del Eugenol, especialmente a nivel microsomal, juega un papel importante en la magnitud del daño, ya que el posible efecto genotóxico de esta sustancia no se realizará directamente, sino a través de un metabolito activo.

Un conocido inductor de los sistemas microsoma-
les hepáticos es el fenobarbital, el cual aumenta la sín-
tesis de citocromo P-450 y otras enzimas involucradas en el
metabolismo de drogas (42-43), con lo cual aumentaría la me-
tabolización del Eugenol.

HIPOTESIS

El Eugenol presenta actividad genotóxica, a través de sus metabolitos, evidenciada como mutaciones dominantes letales en ratón, actividad que será magnificada por un inductor del metabolismo: el Fenobarbital.

OBJETIVOS GENERALES

1. Estudiar el posible efecto genotóxico del Eugenol.
2. Estudiar el efecto potenciador del Fenobarbital sobre el Eugenol.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Estudiar el efecto del Eugenol sobre dos estadios de la espermatogénesis en la inducción de Mutaciones Dominantes Letales.
2. Comparar la inducción de Mutaciones Dominantes Letales entre los tratamientos con Eugenol solo y Eugenol más Fenobarbital.

3. Evaluar la inducción de Mutaciones Dominantes Letales del control positivo (metil-metano-sulfonato) sobre los mismos períodos de la espermatogénesis.

MATERIALES Y METODOS

1. Compuestos Químicos

- Eugenol (Lab. Farmo Dental)
- Metilmetanosulfonato (Aldrich, Chemical Company, Inc.)
- Aceite de maíz (Mazola)
- Fenobarbital sódico. (Laboratorio de Toxicología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile).

2. Procedimiento Experimental

A. Test de Mutaciones Dominantes Letales

I. Tratamiento de los ratones.

60 ratones macho *Mus masculus* CF1 de nueve semanas de edad y un peso promedio de 35 gramos, fueron divididos en cinco grupos. Cada grupo, formado por 10 ratones, salvo los grupos tratados con Eugenol y Fenobarbital más Eugenol, que estaban formados por 15 ratones cada uno, recibió el siguiente tratamiento:

a) Control: aceite de maíz 25 ml/kg de peso corporal,

MATERIALES Y METODOS

1. Compuestos Químicos

- Eugenol (Lab. Farmo Dental)
- Metilmetanosulfonato (Aldrich, Chemical Company, Inc.)
- Aceite de maíz (Mazola)
- Fenobarbital sódico. (Laboratorio de Toxicología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile).

2. Procedimiento Experimental

A. Test de Mutaciones Dominantes Letales

I. Tratamiento de los ratones.

60 ratones macho *Mus musculus* CF1 de nueve semanas de edad y un peso promedio de 35 gramos, fueron divididos en cinco grupos. Cada grupo, formado por 10 ratones, salvo los grupos tratados con Eugenol y Fenobarbital más Eugenol, que estaban formados por 15 ratones cada uno, recibió el siguiente tratamiento:

a) Control: aceite de maíz 25 ml/kg de peso corporal,

inyectado intraperitonealmente.

- b) Control Positivo: Metilmetanosulfonato 100 mg/kg de peso corporal, disuelto en aceite de maíz. El metilmetanosulfonato es una sustancia genotóxica, fuerte inductor de mutaciones dominantes letales.
- c) Eugenol: 400 mg/kg de peso corporal, disuelto en aceite de maíz, en inyección intraperitoneal.
- d) Fenobarbital: 1 mg/l en el agua de bebida durante 8 días. Este grupo no recibió inyecciones.
- e) Fenobarbital + Eugenol: el Fenobarbital fue administrado, al igual que en el grupo d), en el agua de bebida durante 8 días, al cabo de los cuales estos ratones fueron inyectados con Eugenol en la misma dosis que el grupo c).

II. Apareamiento

Se emplearon 400 ratones hembras vírgenes *Mus musculus* CF1 de 8 semanas. Al tercer día de post-tratamiento cada ratón se dejó con dos hembras vírgenes *Mus musculus* CF1 para permitir el apareamiento. Las hembras que presentaron tapón vaginal fueron reemplazadas por otras hembras vírgenes

de la misma cepa y sin tratamiento el 4', 5' y 6' día post-inyección. El 6' día post-inyección fueron separadas todas las hembras en cada grupo. Los espermatozoides eyaculados el 3', 4', 5' y 6' día ya estaban en el estadio de espermatozoide maduro en el momento de la inyección.

El 10' día post-inyección se dejó a los mismos ratones macho con nuevas ratonas vírgenes *Mus musculus* CF1 y sin tratamiento, repitiéndose el mismo procedimiento antes descrito hasta el día 13' post-inyección. Los espermatozoides que fecundaron entre los días 10' y 13', en el momento de la inyección estaban en el estadio de espermátida tardía.

III. Conteo de Mutaciones Dominantes Letales

Después de 14 días de gestación, las hembras apareadas se sacrificaron por dislocación cervical y se determinó el número de embriones vivos y de embriones muertos en cada grupo.

Para calcular el porcentaje de Mutaciones Dominantes Letales se procedió de la siguiente forma:

de la misma cepa y sin tratamiento el 4', 5' y 6' día post-inyección. El 6' día post-inyección fueron separadas todas las hembras en cada grupo. Los espermatozoides eyaculados el 3', 4', 5' y 6' día ya estaban en el estadio de espermatozoide maduro en el momento de la inyección.

El 10' día post-inyección se dejó a los mismos ratones macho con nuevas ratonas vírgenes *Mus musculus* CF1 y sin tratamiento, repitiéndose el mismo procedimiento antes descrito hasta el día 13' post-inyección. Los espermatozoides que fecundaron entre los días 10' y 13', en el momento de la inyección estaban en el estadio de espermátida tardía.

III. Conteo de Mutaciones Dominantes Letales

Después de 14 días de gestación, las hembras apareadas se sacrificaron por dislocación cervical y se determinó el número de embriones vivos y de embriones muertos en cada grupo.

Para calcular el porcentaje de Mutaciones Dominantes Letales se procedió de la siguiente forma:

$$1 - \frac{\text{n}^\circ \text{ de embriones vivos/embarazo en experimento}}{\text{n}^\circ \text{ de embriones vivos/ embarazo en el control}} \times 100$$

APENDICE

TOXOCIDAD AGUDA DEL EUGENOL

Sobrevivencia (minutos) hembras *Mus musculus* CF1

n = 3	FEB-50 mg/kg	Sin FEB
EUG-1000 mg/kg	53.5 ± 4.9 *	55 ± 2.6
EUG- 800 mg/kg	138 ± 5.6 *	116 ± 6

* 1 sobreviviente. El promedio fue calculado sin considerar a los sobrevivientes.

La inyección intraperitoneal de Fenobarbital se realizó 6 hrs antes de la inyección intraperitoneal de Eugenol.

RESULTADOS

En las Tablas 1, 2 y 3 se presenta el resultado obtenido con los diversos tratamientos y el grupo control.

En la Tabla 1 se observa el promedio del total de implantes, vivos y muertos, en el grupo control y grupos experimentales. Para el grupo control el promedio de implantes fue de 10.6 en el estadio de espermatozoide maduro y de 10.7 en el estadio de espermátida tardía, presentando los embriones muertos un porcentaje de 15% y 0.0% respectivamente. El grupo tratado con Eugenol presentó un promedio de 10.3 y de 10.4 en los implantes correspondientes a espermatozoides maduro y espermátida tardía, al igual que los resultados obtenidos en el grupo tratado con Fenobarbital, que presentó un promedio de 10.1 y 10.2 respectivamente. Los porcentajes de embriones muertos en ambos grupos fueron superiores, siendo de 7% y 1.9% en el grupo tratado con Fenobarbital y de 8.7% y 5.3% en el grupo de Eugenol en los estadios analizados. El grupo tratado con Fenobarbital más Eugenol, tuvo un promedio de 10 y 9.4, mientras que el porcentaje de embriones muertos fue de 2.5% y de 3.2% en los respectivos estadios.

El promedio de implantes en el grupo control negativo, Metilmetanosulfonato, fue bastante menor 3.6 y 7 en los estadios de espermatozoide maduro y espermátida tardía respectivamente, y el porcentaje de embriones muertos ascendió a 88.9% en el estadio de espermatozoide y a 52.5% en espermátida.

En la Tabla 2 se observa el promedio de embriones vivos por embarazo del grupo control, aceite de maíz, control que se empleará para calcular el porcentaje de Mutaciones Dominantes Letales de los grupos experimentales observados en la Tabla 3.

En la Tabla 3 se presenta el promedio de embriones vivos por embarazo y el porcentaje de Mutaciones Dominantes Letales de los grupos experimentales. El grupo tratado con Metilmetanosulfonato presentó los más bajos promedios de embriones vivos por embarazo 0.4 y 3.8 en los estadios estudiados, y por lo tanto los más altos porcentajes de MDL 96.2% en el estadio de espermatozoide maduro y 64.7% en espermátida tardía. El grupo tratado con Fenobarbital tuvo un promedio de 9.4 y 10 y un porcentaje de MDL de 10.3% y 7% en los estadios ya mencionados. El Eugenol tuvo en el

estadio de espermatozoide maduro un promedio de 9.4 y un porcentaje de MDL de 10.5% en la misma etapa, en el estadio de espermátida tardía presentó un promedio de 9.8 y un 8.9% de Mutaciones Dominantes Letales, lo que se encuentra dentro de los rangos normales. El grupo tratado con Fenobarbital más Eugenol presentó un promedio de 9.7 y de 9.1 embriones vivos por embarazo en los estadios ya mencionados. El porcentaje de MDL inducido por esta combinación de sustancias fue de 7.2% y de 15.3% respectivamente.

TABLA 1

Promedio de implantes vivos más muertos y porcentaje de embriones muertos en el grupo control y los grupos experimentales, en dos estadios de la espermatogénesis.

SUSTANCIA	ESTADIO	N° DE EMBARAZOS	TOTAL DE IMPLANTES (X)	EMBRIONES MUERTOS %
ACEITE (CONTROL)	ESPERMATOZOIDE	6	10.6	1.5
	ESPERMATIDA	4	10.7	0.0
FENOB	ESPERMATOZOIDE	7	10.1	7.0
	ESPERMATIDA	5	10.2	1.9
EUGENOL	ESPERMATOZOIDE	10	10.3	8.7
	ESPERMATIDA	9	10.4	5.3
FENOB + EUGENOL	ESPERMATOZOIDE	4	10.0	2.5
	ESPERMATIDA	10	9.4	3.2
M M S	ESPERMATOZOIDE	5	3.6	88.9
	ESPERMATIDA	5	8.0	52.5

TABLA 2

Promedio de embriones vivos por embarazo para el grupo control negativo, aceite de maíz.

Estadio	Embriones vivos por embarazo	
	X	DS
Espermatozoide	10.5	0.5
Espermátida	10.7	0.9

TABLA 3

Porcentaje de embriones vivos por embarazo y porcentaje de Mutaciones Dominantes Letales de los grupos experimentales, en dos estadios de la espermatogénesis.

SUSTANCIA	ESTADIO	EMBRIONES VIVOS POR EMBARAZO		DOMINANTES LETALES
		X	+/-DS	%
Fenob	Espermatozoide	9.4	2.5	10.3
	Espermátida	10.0	1.0	7.0
Eugenol	Espermatozoide	9.4	1.7	10.5
	Espermátida	9.8	1.8	8.9
Feb + Eug	Espermatozoide	9.7	0.9	7.2
	Espermátida	9.1	1.5	15.3
M M S	Espermatozoide	0.4	0.5	96.2
	Espermátida	3.8	2.9	64.7

Grafico 1

Promedio embriones vivos / embarazo

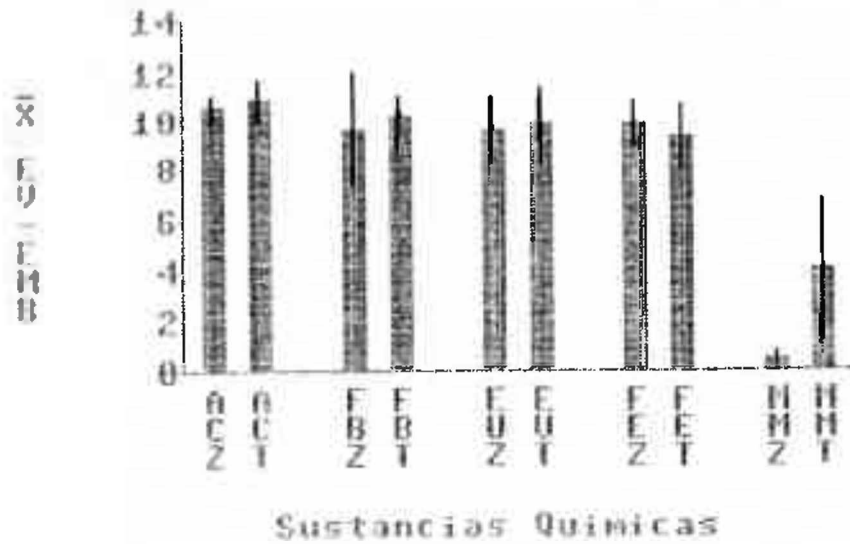
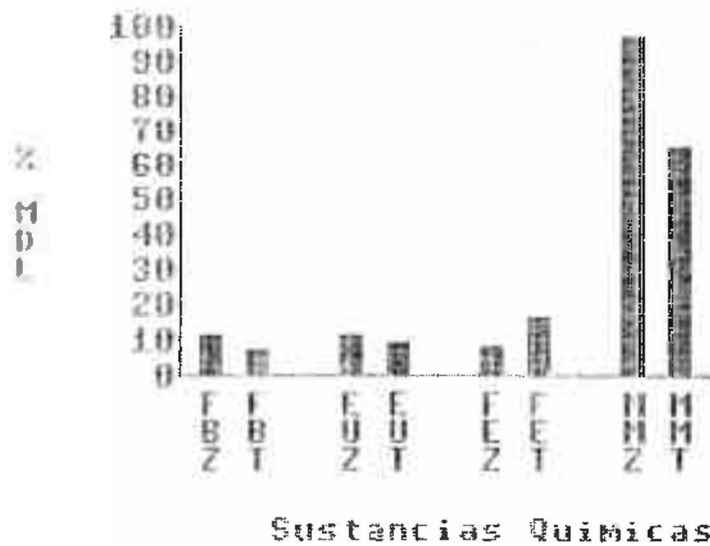


Grafico 2

Porcentaje M. Dominantes Letales



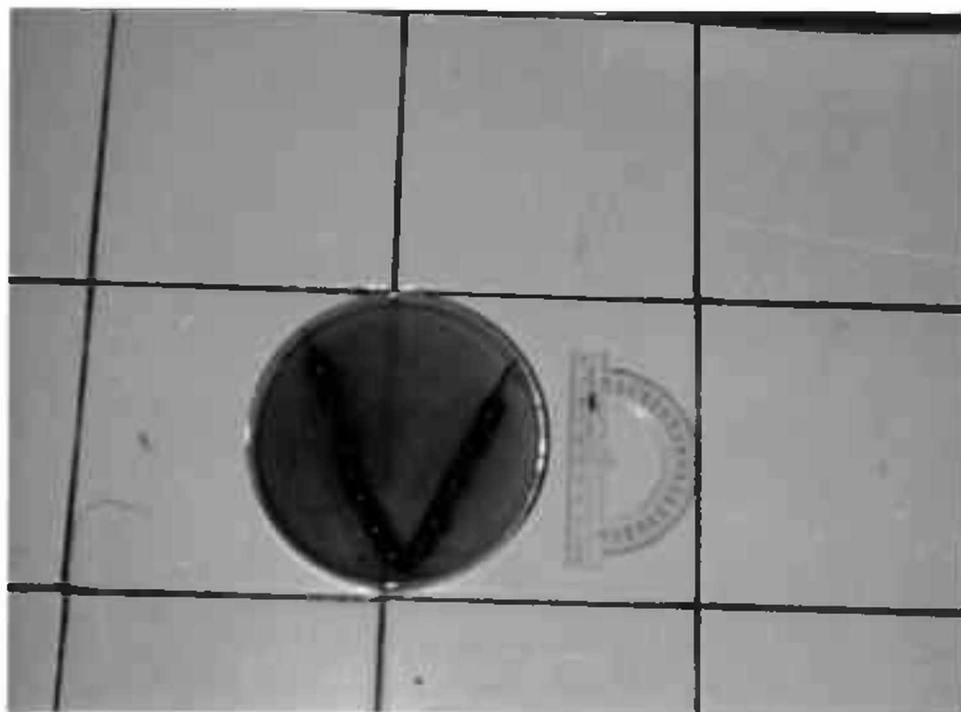


FIGURA 1: Embriones implantados, grupo control.



FIGURA 2: Embriones implantados, grupo tratado con Metilmetanosulfonato.

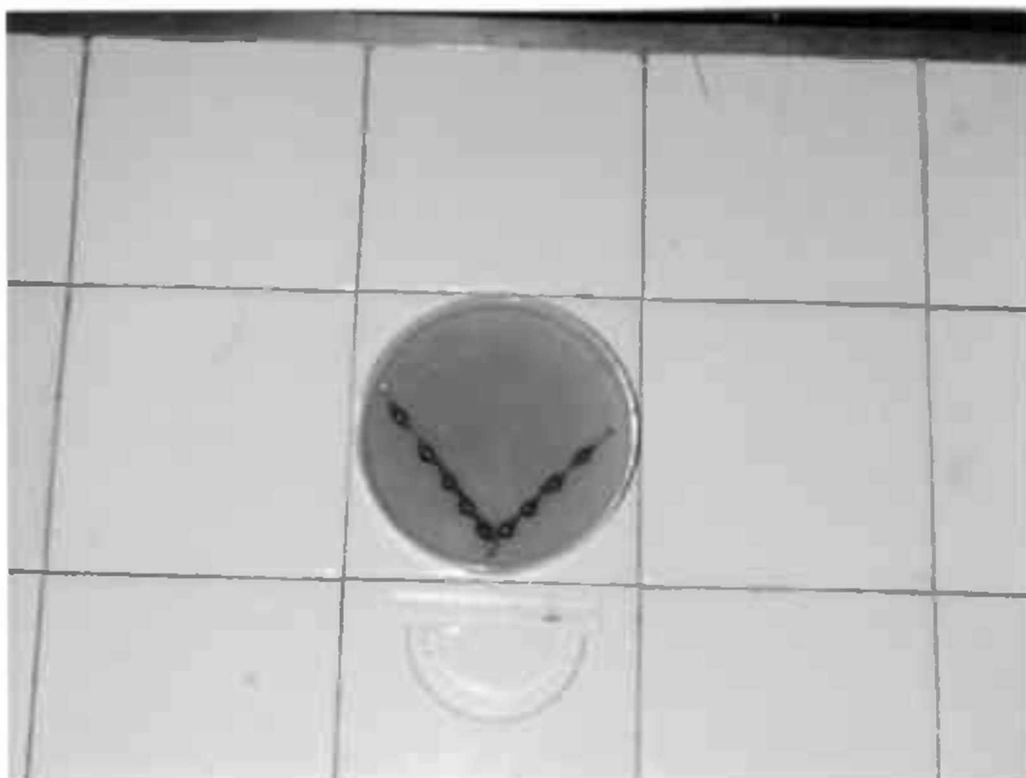


FIGURA 3: Embriones implantados, grupo tratado con Eugenol.

DISCUSION

Al realizar el trabajo el cuestión, uno de los problemas presentados fue elegir la dosis adecuada de sustancias a inyectar. Diferentes autores al realizar estudios de genotoxicidad con eugenol, han variado la vía de administración y dosis de eugenol empleada según la cepa de ratón usada.

Empleando el ensayo de Micronúcleos en individuos de la cepa Swiss-Webster, se usó inyección intraperitoneal de 740 mg/Kg de eugenol en solución salina, siendo la dosis letal cincuenta de 1109 mg/Kg (38). Al administrar la droga por vía oral, se usó 14.700 mg/Kg de peso corporal. Al comparar los resultados de ambas vías de administración resultó ser más efectiva la intraperitoneal (38). Por otro lado, Hayashi et al. (40) emplearon dosis de hasta 800 mg/Kg de peso vía intraperitoneal, en ejemplares de la cepa "ddy" no observando incremento en el porcentaje de micronúcleos. Es interesante destacar que la dosis L50 para este caso fue de 500 mg/Kg de peso.

Toxicológica de nuestra Facultad en el que se realizó esta investigación, se registraron resultados similares empleando ratones *Mus musculus* CF1, a los que se les inoculó eugenol por vía intraperitoneal en dosis de 400 mg y 600 mg por kilo de peso. La droga fue usada sola y con un pre-tratamiento con cafeína, la cual inhibe los sistemas reparativos del ADN y por lo tanto permite visualizar mejor el daño producido por la droga (47). Los resultados obtenidos, indicaron que en los distintos tratamientos, el efecto clastogénico no era detectable (41).

Al estudiar la genotoxicidad del eugenol, mediante el ensayo de Mutaciones Dominantes Letales utilizando ratones *Mus musculus* CF1, no fue posible detectar un daño evidente. La mutagenicidad de los diferentes agentes químicos se evaluó según la fórmula presentada en la página 24, en esta fórmula se ve que la mutagenicidad depende, en este caso, de una disminución del promedio de embriones vivos por embarazo, respecto al control. Este criterio, expresa por contraste, el número de embriones muertos antes de la implantación uterina, más el número de embriones muertos después de la implantación (9).

Como se ve en el gráfico 2, el porcentaje de Mutaciones Dominantes Letales del eugenol en ambos estadios de la espermatogénesis se aproxima bastante al del grupo tratado con Fenobarbital y al de Fenobarbital más Eugenol. Los cuales no sobrepasan el 15% de Mutaciones Dominantes Letales que podría considerarse normal. Sin embargo, el grupo tratado con Metilmetanosulfonato presentó altos porcentajes de mutación dominante letal y con diferencia entre ambos períodos de la espermatogénesis, lo cual coincide con los resultados de varios autores (45, 18, 46).

Los resultados del eugenol coinciden con estudios en *Salmonella typhimurium* en los cuales no se detectó actividad mutagénica incluso agregando fracción hepática (38). Según otros autores, el eugenol y compuestos relacionados son mutagénicos en el ensayo de Ames cuando forman óxidos en 2' 3'. Para otros, la mutagenicidad del eugenol en el test de Ames depende de la presencia de cofactores (38).

Mediante el ensayo de micronúcleos en nuestro laboratorio se observaron resultados semejantes a los aquí obtenidos, usando igual cepa, dosis y vía de administración (41). Hayashi et al (40) al usar una cepa diferente, llegó

a conclusiones semejantes. No obstante, Woolverton (38) obtuvo resultados positivos al emplear dosis de 740 mg/Kg de peso corporal; dosis que está sobre la DL50 encontrada por otros autores para el eugenol (40, 41). Esta menor toxicidad del eugenol puede deberse al vehículo salino empleado o simplemente, a una menor susceptibilidad de la cepa empleada.

El ensayo de micronúcleos permite utilizar mayores dosis que en el ensayo de Mutaciones Dominantes Letales, ya que, sólo se requiere una sobrevivencia de 30 hrs de los ejemplares, momento en el cual estos son sacrificados (47).

En el caso del ensayo de Mutaciones D.L., es importante, no sólo una mayor sobrevivencia, sino también que los ejemplares permanezcan en buen estado fisiológico, ya que deben tener el comportamiento adecuado que conduzca al apareamiento (46). Aunque la mortalidad del eugenol fue casi nula, se notó una leve alteración de la conducta de los ratones tratados durante los primeros días post-inyección. Este efecto se vio aumentado con la administración previa de Fenobarbital, el cual produjo un efecto hipnótico (42). Esto explicaría el bajísimo porcentaje de apareamiento observado

en el grupo de Fenobarbital más Eugenol durante el primer estadio analizado.

La ausencia de respuesta del eugenol en el ensayo realizado no indica que el Eugenol sea inocuo en la inducción de MDL en cualquier condición, ya que, sólo se analizaron dos estadios de la espermatogénesis: espermatidas y espermatozoide los que demostraron ser más sensibles a la acción de MMS, mientras que para otros agentes químicos existen estadios con diferente susceptibilidad. Por ejemplo: el estadio más sensible a la acción de 6-mercaptopurina es el de espermatogonia (46). Del eugenol en cambio, se desconoce la curva de sensibilidad para los diferentes estadios de la gametogénesis masculina.

Otro factor que puede haber influido en la expresión de la mutagenicidad del eugenol es la cepa de ratones hembras empleados; ya que se encuentran diferencias en la habilidad del huevo, para reparar lesiones portadas por el genoma del macho (22).

En relación al Fenobarbital, los resultados indican que no aumenta el porcentaje de MDL y que tiende a disminuir la toxicidad del Eugenol (ver Apéndice); efecto que puede deberse a la estimulación por el Fenobarbital del sistema microsomal hepático, produciendo una acción detoxicante

(42-43), es posible que este efecto pueda ser más notorio, si al Fenobarbital se le diera tiempo suficiente para alcanzar una concentración plasmática adecuada. En este caso (Apéndice), el Eugenol se inyectó sólo 6 hrs antes del Eugenol.

Los resultados obtenidos por diversos autores en relación a la actividad genotóxica del Eugenol son controvertidos, no sólo del Eugenol sino también de otros fenoles relacionados (3). Esto se grafica mejor con los resultados de Hiroshi (39), quien al emplear el ensayo de Ames con fracción microsomal de células de ratas tratadas con Eugenol, observó una disminución de la mutagenicidad del Benzo(a)pireno sobre *S. typhimurium*.

Puede concluirse que aún no se tiene una idea clara acerca de la actividad genotóxica del Eugenol, y que nuestros resultados son negativos sólo para las condiciones dadas en el experimento.

CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados se puede concluir que:

- El Eugenol en la dosis y vía de administración empleada, no induce mutaciones dominantes letales en los estadios de espermatozoides y espermátida, en ratones *Mus musculus* CF1.

- El Fenobarbital no aumentó el porcentaje en forma significativa de mutantes dominantes letales inducidos por Eugenol.

- Al administrar Eugenol posteriormente a la inyección de Fenobarbital aumenta el efecto sedativo del Eugenol.

SUGERENCIAS

1. Repetir la experiencia del Eugenol, con mayor cantidad de ratones para determinar la sensibilidad de las células germinales masculinas durante toda la espermatogénesis.
2. Realizar la experiencia con ratones machos de la misma cepa, hembras de distinta cepa y viceversa para observar variaciones en el porcentaje de apareamiento y en los sistemas reparativos.
3. Probar diferentes vías de administración del Eugenol.
4. Probar efectos crónicos del Eugenol.
5. Estudiar efectos del Eugenol en combinación con otras drogas.
6. Estudiar la posible genotoxicidad del Eugenol mediante otro tipo de pruebas.

RESUMEN

Se estudió la actividad mutagénica del Eugenol mediante el test de Mutaciones Dominantes Letales en ratón en dos estadios de la espermatogénesis: espermatozoide maduro y espermátida tardía.

Para ésto se emplearon ratones machos *Mus musculus* CF1 divididos en 5 grupos recibiendo cada uno de los grupos aceite de maíz (control), metilmetanosulfonato (control positivo), Eugenol, Fenobarbital y Fenobarbital + Eugenol. Cada grupo se apareó con hembras vírgenes de la misma cepa, en los días correspondientes a espermatozoide maduro y espermátida tardía. Al cabo de 14 días de gestación las hembras fueron sacrificadas y se determinó el porcentaje de Mutaciones Dominantes Letales.

Los resultados obtenidos nos muestran que el Eugenol induce un porcentaje de Mutaciones Dominantes Letales de 10.5% en el estadio de espermatozoide maduro y de 8.9% en el estadio de espermátida tardía, porcentaje considerado dentro de rangos normales. El Eugenol administrado

posteriormente a un tratamiento con Fenobarbital, indujo un porcentaje de 7.2% y 15.3%, los cuales tampoco presentaron diferencias significativas con el grupo control. El Fenobarbital presentó un porcentaje de MDL también dentro de rangos normales (10.3% y 7% respectivamente). El grupo tratado con metilmetanosulfonato indujo un alto porcentaje de Mutaciones Dominantes Letales (96.2% y 64.7%) resultados similares a los encontrados por otros autores.

De lo anterior puede concluirse que el Eugenol, en la dosis y vía de administración utilizada, no aumenta el porcentaje de Mutaciones Dominantes Letales y el uso de Fenobarbital no altera estos resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. DEVORET, R. "Tests bacterianos de sustancias potencialmente cancerígenas". *Investigación y Ciencia*. 37: 6-16, 1979.
2. EMIC. Environmental Mutagen Information Center Oak Ridge National Laboratory, P.O. Box, Y, Oak Ridge, Tennessee 37830.
3. AMES, B. "Dietary Carcinogens and Anticarcinogens". *Science* 221: 1256 - 1264, 1983.
4. AMES, B., MAGAW, R., SWIRSKY, L. "Ranking possible Carcinogenic Hazards". *Science* 236: 271-280, 1987.
5. SASAKI, M. "Chromosome Abnormalities in cancer Development", en "Mutation Cancer and Malformation", Ed. por Chu E.M.Y. y Generoso W.M., Plenum Press, New York and London, 1984. p. 35-59.
6. KNUDSON, A. "Hereditary Cancer, Oncogenes, and Antioncogenes". *Cancer Res.* 45: 1437-1443, 1985.
7. CLEAVER, J.E. "Defective repair replication of DNA In Xeroderma Pigmentosum". *Nature* 218: 652 - 656.
8. BLANCO, M. "Reparación del Material Genético". *Investigación y Ciencia*. 40: 6-15, 1980.
9. ROHRBORN, G. HEIDELBERG. "Biochemical mechanisms of Mutation", de "Chemical Mutagenesis in Mammals and Man". Ed. por Vogel, F. y G. Röhrborn. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. New York, 1970. p. 1-15. Cap. 1, p 148-155, Cap. 4.

10. INOSTROZA, M.E. "Aumento en la sensibilidad del test de Micronúcleos a la acción clastogénica de Ciclofosfamida mediante Fenobarbital, en ratones machos". Trabajo de Investigación, requisito para optar al Título de Cirujano-Dentista, Universidad de Chile, Facultad de Odontología, Departamento de Patología, Laboratorio de Genética Toxicológica. Santiago, 1986.
11. LOPEZ, J.C. "Aumento de Clastogénesis inducida por ciclofosfamida mediante cafeína en ratones machos (*Mus musculus* CF1)". Trabajo de investigación, requisito para optar al Título de Cirujano-Dentista, Universidad de Chile, Facultad de Odontología, Departamento de Patología, Laboratorio de Genética Toxicológica. Santiago, 1986.
12. HOLLAENDER, A. "Chemical Mutagens". Vol. 2, Plenum Press. New York-London 1971. p. 365-369. Cap. 13.
13. RUSSELL W.L. "Dose Response, Repair, and No-Effect Dose Levels in Mouse Germ-cell mutagenesis". Problems of Threshold in Chemical Mutagenesis. The Environmental Mutagen Society of Japan. 153-160. 1984.
14. ELLAHUENE, M.F. "*Schistocerca cancellata* (serville) un nuevo sistema de prueba en la detección de clastogénesis inducida por Ciclofosfamida (Orthoptera-Acrididae). Tesis para optar al grado de Licenciado en Biología. Universidad de Valparaíso, Facultad de Medicina, 1981.
15. RUSSELL, L.B. y B.E. MATTER. "Whole-Mammal Mutagenicity tests: Evaluation of Five Methods". Mutation Res. 75: 279-302, 1980.

16. ALBERTS, B., BREY, D., LEIONS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. y WATSON, J. "Molecular Biology of the cells". Garland Publishing, Inc. 136 Madison Ave., N.Y. 10016, U.S.A., 1983, p. 385-481. Cap. 8, p. 769-811, Cap. 14.
17. GENEROSO, W., Coin, A., KRISHNA. "Genetic Lesions induced by chemicals in spermatozoa and spermatids of mice are repaired in the egg". Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 76: 435-437, 1979.
18. LYON, M. "Sensitivity of various germ-cell stages to environmental mutagens". del International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens 323-345, 1981.
19. BRAZILL, J.L. y J. MASNI. "Changing levels of U.V. light and carcinogen induced unscheduled DNA synthesis in mouse oocytes during meiotic maturation". Exp. Cell. Res., 112: 121-125, 1978.
20. BRANDRIFF, B. y R.A. PEDERSEN. "Repair of the ultra-violet-irradiated male genoma in fertilized mouse oocytes during meiotic maturation". Exp. Cell Res. 112: 121-125, 1978.
21. Wyrobek, A.J. et al. "An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm test in non-human mammals". Mutation Research 115 (1983) 1-72.
22. GENEROSO, W.M. "Relationship between alkylation sites and induction of dominant lethals and heritable translocations in mice". Genetic Toxicology of Environmental Chemicals. Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis 494-400, 1986.

23. OTHNER, K. "Enciclopedia de Técnicas Químicas" UTEHA Edit. Hispano Americana, 1962.
24. KOZAM, G. y N. NEWARK. "Effect of Eugenol on nerve transmission". Oral Surg. 44 (5): 799-805, 1977.
25. BRODIN, P. y A. ROED. "Effects of Eugenol on rat phrenic nerve-diaphragm preparations". Arch. Oral Biol. 29 (8): 611-615, 1984.
26. THOMAS, P.A., K.S. BHAT y K. MOHAN KOTIAN. "Antibacterial properties of dilute formo cresol and Eugenol and propilene glycol". Oral Surg. 49 (2): 166 - 170, 1980.
27. HUME, W.R. "Effect of Eugenol on constrictor responses in blood vessels of the rabbit ear". J. Dent. Res. 62 (9): 1013-1015, 1983.
28. COTMORE, J.M., A. BURKE y M. SHAPIRO. "Respiratory inhibition of isolated rat liver mitochondria by Eugenol". Arch. Oral Biol. 24: 565-568, 1979.
29. HUME, W.R. "Effect of Eugenol on respiration and division of human pulp, mouse fibroblast, and liver cells *in vitro*". Dental Research Vol. 63: 11: 1262-1265, 1984.
30. KOZAM, G. y G. MANTELL. "The effect of Eugenol on oral mucous membranes". J. Dent. Res., Vol. 57 N° 11-12: 954-957, 1973.
31. GOLDMAN, H.M. y COHEN, W.D. "Peridontal Therapy", 5th ed. St. Louis, Mosby, p. 642.
32. BARKIN, M., J. BOYD y S. COHEN. "Acute allergic reaction to Eugenol". Oral Surg. 57: 441-442, 1984.
33. BORCHET, P. et al. "1' Hydroxysafrole, a proximate carcinogenic metabolite of safrole in the rat and mouse". Cancer Research 33: 590-600, March, 1973.

34. MIHARA, S. y T. SHIBAMOTO. "Photochemical reactions of Eugenol and related compounds: Synthesis of new flavor chemicals". J. Agric. Food. Chem. 30 (6): 1215-1218, 1982.
35. WEINBERG, J.E., BARBAG, H., NAHAS, G. and RABINOWITZ, J.L. 1972. "The *in vivo* and *in vitro* metabolism of ^{14}C Eugenol in the rat. Internat. Assoc. for Dent. Res. Preprinted Abstract, 50th General Meeting, Abstract 529.
36. TAPIA, R. Comunicación personal. Prof. Laboratorio de Toxicología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
37. SWANSON, A., CHAMBLISS, D., BLONQUIST, J., MILLER, E., MILLER, J. "The mutagenicities of Safrole, Estragole, Eugenol, Trans Enethole and their known of possible metabolites for *Salmonella typhimurium* Mutants". Mutation Res. 1979. 60: 143.
38. WOOLVERTON, C.J., FOTOS, P.G., MOKAS, M.J. and MERSMIGAS, M.E. "Evaluation of Eugenol for mutagenicity by the mouse micronucleus test". J. Oral Pathol. 15: 450-453, 1986.
39. HIROSHI, Y., HOSHINO, J. y A. YUASA. "Suppressed mutagenicity of Benzo(a)Pirene by the liber S9 fraction and microsomes from Eugenol treated rats". Mutation Res. 172: 231-238, 1986.
40. HAYASHI et al. "A pilot experiment for the micronucleus test". Mutation Res. 141: 165-169, 1984.

41. LOPEZ, J.C. "Estudio de la acción clastogénica del Eugenol, utilizando cafeína en ratones machos (*Mus musculus* CF1). Trabajo de Investigación, requisito para optar al título de Cirujano-Dentista. Santiago, 1986.
42. GOODMAN y GILMAN. "Las bases farmacológicas de la terapéutica". 7a. Edición. Editorial Médica Panamericana 1986, p. 29-36 y p. 439-441.
43. MULDER, G.J. "The effect of Phenobarbital on the submicrosomal distribution of uridine diphosphate glucuronyltransferase from rat liver". *Biochem. J.* 117: 319-324, 1970.
44. EPSTEIN, S. "Environmental determinants of human cancer". *Cancer Res.* 34: 2425-2534, 1974.
45. ELLAHUEÑE, M. y W. GENEROSO. Comunicación personal.
46. GENEROSO, W.M. "Dominant-lethal mutations and heritable Translocations in mice", en *Basic Life Science* (Plenum Press). Proceedings of the International Workshop on the Principles of Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Teratogenesis", held May 25 - June 1, 1983 in Shanghai, The People's Republic of China.
47. SCHIMD, W. "The micronucleus test for cytogenetic analysis", en *Chemical Mutagenesis. Principles and Methods for their Detection. Vol. 4*, Edit. A. Hollander, Plenum Press, N.Y., 1976.