

UCH-FC
MAD-6
P 438
C.1

**EVALUACION EXPERIMENTAL DEL EFECTO ANEUNOGENO
MEDIANTE LOS ENSAYOS DE MICRONUCLEOS Y
CITOGENETICO EN MEDULA OSEA DE RATON**

Tesis entregada a la
Universidad de Chile
Facultad de Ciencias
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Magister en Ciencias Biológicas
con Mención en Genética.

Por

LUZ PATRICIA PEREZ ALZOLA

Director de Tesis: Nelly Lafuente Indo

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

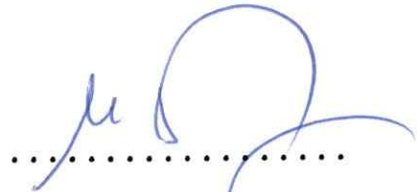
Se informa a la Escuela de Posgrado de la
Facultad de Ciencias que la tesis de Magister
presentada por la candidata :

LUZ PATRICIA PEREZ ALZOLA

ha sido aprobada por la Comisión Informante
de Tesis como parte de los requisitos para
optar al grado de Magister en Ciencias
Biológicas con mención en Genética

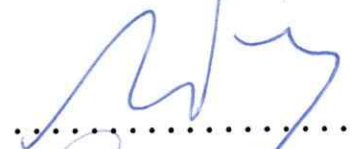
Director de Tesis:

Dra. Nelly Lafuente Indo

.....


Comisión Informante de Tesis:

Dr. Alberto Veloso

.....


Dra. Patricia Iturra

.....


Dr. Luis Valladares

.....


A mi familia :

mis padres
mis hermanos
Eduardo y
Eduardo Ignacio.

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos a :

La Dra. Nelly Lafuente Indo por haber confiado en mi y haberme permitido realizar esta tesis en su laboratorio.

A todas las personas que pertenecen o pertenecieron al laboratorio de Genética Toxicológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas: al Prof. Manuel Ellahueñe M., por sus consejos, a la T.M. Srta. Margarita Orellana V., por su valiosa ayuda técnica, a la Sra. Patricia Cárdenas C., por su excelente disposición, al Sr. Luis Valenzuela, por su esmerado trabajo para cuidar los animales, a la Srta. Jeannette Soto y al Sr. Sergio Cofré por haberme acompañado tantas veces.

Al Prof. Sr. Eduardo Kessi C. por su gran ayuda en la confección de los gráficos y por su infinita paciencia para conmigo.

Al Prof. Sr Pedro Cattán, por sus valiosos consejos en el análisis estadístico de los resultados.

A la Comisión Informante, por la invaluable ayuda en la corrección de esta tesis, en especial a la Dra. Patricia Iturra, quien dedicó varias horas de su valioso tiempo a dicha corrección.

Finalmente , deseo agradecer en forma muy especial a mi madre, quien al hacerse cargo de mi hijo me permitió disponer del tiempo necesario para terminar este trabajo. ¡Gracias Mamá!

INDICE DE MATERIAS

| | |
|---------------------------------|------|
| ABREVIATURAS | VII |
| RESUMEN | VIII |
| INTRODUCCION | 10 |
| MATERIALES Y METODOS | 26 |
| - Animales | 26 |
| - Compuestos Químicos | 26 |
| - Tiempos de tratamiento | 28 |
| - Tratamientos | 30 |
| - Procesamiento | 31 |
| Ensayo Citogenético | 31 |
| Ensayo de Micronúcleos | 32 |
| - Análisis de las Preparaciones | 34 |
| Ensayo de Micronúcleos | 34 |
| Ensayo Citogenético | 35 |
| - Análisis Fotográfico | 36 |
| - Análisis Estadístico | 37 |
| RESULTADOS | 41 |
| - Ensayo de Micronúcleos | 41 |
| - Ensayo Citogenético | 45 |
| - Análisis Fotográfico | 55 |
| DISCUSION | 60 |
| BIBLIOGRAFIA | 89 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA N° 1: Esquema de los estadios del ciclo Eritropoyético en ratón | 29 |
| FIGURA N° 2: Fotomicrografías de Eritrocitos Policromáticos con micronúcleos | 38 |
| FIGURA N° 3: Fotomicrografías de Placas con Aberraciones Cromosómicas | 39 |
| FIGURA N° 4: Fotomicrografías de Placas con Aberraciones Cromosómicas | 40 |
| FIGURA N° 5: Frecuencia promedio de Eritrocitos Policromáticos con Micronúcleos, en ratones tratados con MMS y COL | 44 |
| FIGURA N° 6: Frecuencia de células con Aberraciones Cromosómicas, en ratones tratados con MMS y COL | 47 |
| FIGURA N° 7: Frecuencia que representa cada tipo de aberración cromosómica con respecto al total de aberraciones encontradas. | 50 |
| FIGURA N° 8: Porcentaje de células con Micronúcleos y Aberraciones Cromosómicas | 54 |
| FIGURA N° 9: Frecuencia de la distribución del porcentaje que representa el fragmento acéntrico al largo total de las cromátidas | 57 |
| FIGURA N°10: Frecuencia de la distribución del porcentaje que representa el volumen del MN al volumen nuclear en ratones tratados con MMS y COL | 58 |
| FIGURA N°11: Frecuencia de la distribución del porcentaje que representa el volumen del MN al volumen nuclear en ratones controles | 59 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| TABLA N°1: " Frecuencia de Eritrocitos Policromáticos con micronúcleos, en ratones tratados y controles" | 43 |
| TABLA N°2: " Aberraciones Cromosómicas en Placas Metafásicas de ratones tratados y controles" | 46 |
| TABLA N°3: " Porcentaje que representa cada tipo de Aberración Cromosómica con respecto al total de Aberraciones, en ratones tratados y controles" | 49 |
| TABLA N°4: " Distribución del número de aberraciones cromosómicas en PMAC de ratones tratados y controles" | 52 |
| TABLA N°5: " Distribución de Placas Metafásicas según número de cromosomas en ratones tratados y controles" | 53 |

ABREVIATURAS

COL : Colchicina

ENC : Eritrocito Norcromático

EOC : Eritrocito Ortocromático

EPC : Eritrocito Policromático

FA : Fragmento Acéntrico

FC : Fractura de Cromátida

FI : Fractura de Isocromátida

GC : Gap de Cromátida

GI : Gap de Isocromátida

MMS : Metil Metanosulfonato

MN : Micronúcleo

PMAC: Placa Metafásica con Aberraciones Cromosómicas

STC : Separación Temprana de las Cromátidas

RESUMEN

Una gran variedad de compuestos químicos interactúan con el material genético, induciendo mutaciones o fracturas cromosómicas (clastogénesis), efectos que pueden ser detectados, a través de distintos ensayos genotóxicos. Sin embargo, existe otro grupo de compuestos químicos que producen cambios en el número cromosómico de las células expuestas (aneuploidias), para los cuales no se han desarrollado ensayos confiables que permitan su evaluación.

En este trabajo, se propone que dos ensayos, ampliamente usados para la evaluación de compuestos clastógenos, el ensayo de Micronúcleos y el ensayo Citogenético, pueden ser usados para evaluar efecto aneunógeno.

Para determinar, cuales son las variables que discriminan entre ambos efectos, se trataron ratones (Mus musculus), machos y hembras, de la cepa CF1, con dos compuestos químicos de acción conocida, Metilmetanosulfonato (MMS) como agente clastógeno, y Colchicina (COL) como agente aneunógeno. Los ratones fueron sacrificados a distintos tiempos de tratamiento, y la médula ósea se procesó de acuerdo a los procedimientos adecuados para ambos ensayos.

Los resultados indican que, las variables que permiten discriminar entre ambos efectos son: tiempo de tratamiento, tamaño de los MN y, tipo de aberraciones cromosómicas inducidas.

Usando estas variables discriminantes, se concluye que ambos ensayos se pueden utilizar para evaluar efecto clastógeno y aneunógeno inducido por compuestos químicos.

INTRODUCCION

El desarrollo científico y tecnológico, junto con traer notables beneficios en la calidad de vida, introdujo en el medio ambiente una gran cantidad de productos químicos, tales como : fármacos, aditivos, preservativos, plaguicidas, etc. Algunos de estos compuestos pueden interactuar con el material genético, produciendo cambios que se traducen en mutagénesis , carcinogénesis y/o teratogénesis.

El estudio de los mutágenos condujo, en la década de los 70, al desarrollo de la Genética Toxicológica, cuyos propósitos son detectar, entender y prevenir las acciones de aquellos agentes, físicos o químicos, capaces de interactuar y dañar el DNA, y estudiar los mecanismos de acción a través de los cuales se produce dicho daño, cambiándose el término mutágenos, por el de agentes genotóxicos, para incluir todo tipo de agente capaz de producir alteraciones genéticas a concentraciones subtóxicas.

Aún cuando, las sustancias genotóxicas que actúan como mutágenos representan un gran riesgo para todas las

especies, lo que justifica el desarrollo de numerosas pruebas para su detección, existe otro grupo de agentes, que ha recibido menor atención, a pesar que sus efectos en células e individuos pueden ser más devastadores que las mutaciones puntuales. Estos agentes han sido denominados aneunógenos (Parry, J., 1987). Por definición los aneunógenos no son mutágenos, puesto que no afectan directamente al DNA, pero se les considera agentes genotóxicos porque causan alteraciones genéticas del tipo macrolesiones.

Las aneuploidias se definen como cambios numéricos del complemento euploide con pérdida o ganancia de uno o más cromosomas. La mantención del número cromosómico de una célula eucarionte, durante la mitosis ó la meiosis, depende de la fidelidad de la replicación cromosómica y de la segregación de los cromosomas a las células hijas. Estos procesos son dependientes de diversas estructuras celulares y de actividades metabólicas específicas de la división celular, incluyendo la síntesis y funcionamiento de proteínas del huso y el movimiento de los cromosomas en éste.

Por años se ha reconocido que las aneuploidias representan un serio daño a la salud humana, tanto a nivel

somático como germinal. Hay evidencias que sugieren que están involucradas en los procesos de transformación celular "in vitro" y formación de tumores "in vivo" (Parry, J. y Parry, E., 1987). Se sabe que producto de gametos aneuploides desbalanceados existe, no sólo, una alta tasa de abortos espontáneos, si no además, nacimientos viables con graves desórdenes como son los Síndromes de Down, Turner y Klinefelter.

A pesar que existen evidencias de que algunas sustancias químicas pueden inducir aneuploidias, no hay pruebas confiables para detectar dicha capacidad (Parry, J. y Parry, E., 1987). La mayoría de los datos disponibles para aneuploidias inducidas, en células somáticas de mamíferos "in vivo", son observaciones numéricas auxiliares en estudios de acción de clastógenos. De 112 trabajos analizados en 1986, sólo tres tenían un procedimiento experimental adecuado y pertinente para estudios de aneuploidias (Cimino, M. y col., 1986). En ese mismo año el "Comité de Revisión de Datos sobre Aneuploidias" concluye que es necesario desarrollar, estandarizar y validar métodos apropiados para el estudio de inducción de aneuploidias por compuestos químicos (Dellarco, V. y col., 1986).

A diferencia de lo que ocurre con las mutaciones puntuales y la clastogénesis, que son el producto de la acción de un agente sobre un blanco único, el DNA, una aneuploidia puede resultar del daño a múltiples blancos celulares, algunos de ellos comunes a células mitóticas y meióticas y otros exclusivos de estas últimas. El huso mitótico aparece como el blanco más importante, por su rol fundamental en la segregación de los cromosomas, permitiendo que estos se muevan a los polos de la célula (McIntoch, J. y McDonald, K., 1988). Puesto que el componente principal del huso es el microtúbulo, y que éstos se forman por polimerización de moléculas de tubulina, sustancias químicas que interfieran con este proceso pueden inducir aneuploidias (Bond, D., 1987).

En el aparato mitótico, además están, los llamados centros organizadores de los microtúbulos, centrosomas y cinetocoros, los cuales tienen una activa participación en los movimientos que permiten la segregación cromosómica (McIntoch, J. y McDonald, K., 1988), siendo blancos potenciales para la acción de agentes aneunógenos. Como también pueden serlo las proteínas y enzimas que forman parte del huso, como: quinasas, quinesina, dineína, proteínas del cinetocoro, etc. (McIntoch, J. y Koonce, M., 1989)

Otro blanco importante son los centrómeros; cualquier agente que actúe sobre éstos en el momento de la separación durante la división celular, podrá inducir aneuploidias. Si se produce una separación temprana, cada cromátida actuará en forma independiente, pudiendo no unirse a las fibras del huso, lo que resultará en la pérdida de cromosomas. Si los centrómeros no se separan a tiempo, se producirá una no-disyunción cromosómica que se traducirá en una pérdida o ganancia de cromosomas (Galloway, S. e Ivett, J., 1986, Bond, D., 1987)

El nucléolo, puede ser otro blanco importante para los cromosomas que llevan el organizador nucleolar. Ciertas sustancias químicas, incluidos los inhibidores de la síntesis de DNA, aumentan la permanencia nucleolar durante la división celular, contribuyendo a una segregación errónea de estos cromosomas (Galloway, S. e Ivett, J., 1986).

Finalmente, no se debe olvidar el hecho que las divisiones celulares están bajo control multigenético. En Drosophila melanogaster se conocen dos mutaciones (ord y meiS-32) que producen separación temprana de los centrómeros. En levaduras, con las técnicas de DNA recombinante, se han podido clonar dos genes (MIF1 y MIF2)

que cuando están en plásmidos con alto número de copias aumentan la frecuencia de pérdida de cromosomas (Parry, J. y Parry, E., 1987).

En el caso de las células meióticas, se debe considerar un nuevo blanco sobre el cual pueden actuar los agentes aneunógenos, el apareamiento y posterior recombinación de los cromosomas. Errores en estos procesos, como variación en la duración del período de apareamiento, conducirán a una segregación errónea de los cromosomas involucrados.

Esta gran diversidad de blancos celulares dificulta, el desarrollo de ensayos adecuados para detectar aneunógenos y, la comparación de los resultados obtenidos en distintas especies, puesto que las características de algunos de los blancos pueden ser especie específicas.

Cualquier evaluación aneunogénica debe involucrar la determinación del número cromosómico de las células expuestas mediante métodos citogenéticos (recuento de cromosomas) ó genéticos (expresión de marcadores específicos).

La inducción de aneuploidias se ha medido en diversos organismos eucariontes, como son, hongos, vegetales, insectos y mamíferos. En hongos y drosophila, las

aneuploidias son detectadas por la presencia o ausencia de marcadores cromosómicos específicos (Käffer, E. y col., 1986 Resnick, M. y col., 1986, Zimmering, S. y col., 1986). Las diferencias en el mecanismo de la división celular, entre hongos y células eucariontes superiores, como la permanencia de la envoltura nuclear durante la mitosis, hace difícil la extrapolación de resultados. Compuestos químicos que actúan como aneunógenos en Saccharomyces cerevisiae no presentan una respuesta positiva en ensayos con células de mamíferos, indicando una sensibilidad diferencial entre ambos sistemas (Basler, A., 1986).

Los sistemas en plantas, que permiten detectar aneunógenos, se basan en análisis citogenético mediante conteo cromosómico en células meióticas (microesporocitos) y mitóticas (células del meristema radicular) (Sandhu, S. y col., 1986). A pesar que las plantas ofrecen ventajas para la evaluación de compuestos químicos, por el bajo costo y la rapidez para obtener los resultados, han sido poco utilizadas como sistemas de ensayo ya que los resultados no son extrapolables a células animales.

En células de mamífero en cultivo, se ha evaluado inducción de aneuploidias, a través de la observación de alteraciones del huso mitótico, medido como,

cuantificación de C-metafases, ó por tinción diferencial para cromosomas y fibras del huso (Parry,E. y col.,1982, Salassidis,K. y col.,1991). Si bien, las alteraciones del huso mitótico puede ser un indicador de efecto aneunógeno, la evidencia más directa de éste, es el recuento del número cromosómico en placas metafásicas. Normalmente, se han considerado sólo las hiperploidias, puesto que las hipoploidias pueden ser el resultado de las técnicas utilizadas en la obtención de los cromosomas (Galloway,S. e Ivett,J.,1986). Algunos autores, han sugerido mejorar el recuento de los cromosomas identificándolos en el cariotipo. Con este propósito, han construido una línea celular monocromosomal híbrida entre humano y ratón que lleva el cromosoma 2 humano, diferenciándolo de los cromosomas de ratón por tinción específica (Athwal,R. y Sandhu,S.,1985).

Aún cuando las células en cultivo, representan una buena alternativa para la evaluación de sustancias aneunogénicas, los estudios genotóxicos más decisivos son aquellos que se realizan "in vivo".

La mayoría de los trabajos que informan sobre aneuploidias inducidas en células somáticas de mamíferos "in vivo", corresponden a observaciones numéricas en

estudios clastogénicos y, por lo tanto, tienen procedimientos inadecuados para la detección de efecto aneunógeno. Además, del número de cromosomas, también se han usado otros parámetros para evaluar efecto aneunógeno como: análisis de anafases, formación de husos multipolares, separación temprana o tardía de los centrómeros, aumento significativo de C-mitosis, adhesividad cromosómica y diplocromosomas (Cimino, M. y col., 1986).

Por la importancia que tienen las aneuploidias a nivel de células germinales, se han diseñado procedimientos para su detección. Se estima que en el 80% de los casos de trisomía 21 en la especie humana, el cromosoma extra es de origen materno (Mailhes, J. y col., 1986); en tanto que, los gametos masculinos serían responsables de alrededor de un 25 % de trisomias cromosómicas en nacidos vivos (Allen, J. y col., 1986). Las especies más usadas en los estudios de aneuploidias inducidas en células germinales, han sido ratón y hamster Chino. En los animales, previamente expuestos a posibles agentes aneunógenos, se han contado los cromosomas en metafase II y metafases embrionarias desde el primer clivaje hasta los 16 días de gestación (Mailhes, J. y col., 1986, 1988).

En los machos además se ha determinado el número de

cromosomas en metafases espermatogoniales, cuerpos X e Y en espermatidas y número de cromosomas en pronúcleos masculinos (Allen, J. y col.,1986).

Además, de los parámetros citogenéticos, también se han usado parámetros genéticos para evaluar aneuploidias inducidas en células germinales, como la expresión de marcadores genéticos ligados al cromosoma X, en la progenie de machos o hembras expuestos a aneunógenos (Cattanach, B. y col.,1984).

Aún cuando, todos los ensayos aquí mencionados permiten reconocer aneuploidias inducidas, son muy pocas las sustancias químicas que han sido convenientemente evaluadas, puesto que no existen recomendaciones estrictas de cómo deben aplicarse estos ensayos. Como lo confirman todas las conclusiones del último Comité de Revisión de Datos en Aneuploidia, " se requiere de una batería de ensayos normalizados para la evaluación de compuestos aneunógenos, como los que existen para la evaluación de compuestos mutágenos" (Dellarco, V. y col.,1986).

A pesar que, una de las principales críticas para los datos de aneuploidias inducidas, es que han sido obtenidos como observaciones auxiliares en estudios clastogénicos, parece posible que algunos ensayos diseñados para la eva-

luación de clastógenos, determinando los marcadores apropiados, puedan servir para la evaluación de compuestos aneunógenos. Cualesquiera sean los marcadores seleccionados siempre resultará más sencillo y menos costoso, adecuar ensayos clastogénicos ampliamente conocidos que desarrollar y estandarizar nuevos procedimientos. El usar un mismo ensayo para estudiar ambos efectos (aneunógeno y clastógeno) permitiría evaluar para una sustancia química ambas capacidades simultáneamente, ahorrando tiempo y dinero.

Dentro de los ensayos clastogénicos conocidos, existen dos, ampliamente usados y recomendados, el ensayo Citogenético y el ensayo de Micronúcleos, ambos, permiten evaluar el efecto de los compuestos químicos sobre los cromosomas, y podrían ser adecuados para la detección de aneuploidias inducidas.

Ensayo Citogenético en Ratón:

Consiste en la observación de placas cromosómicas en metafase de células de la médula ósea de ratones expuestos a compuestos químicos. Se evalúan diferentes lesiones cromosómicas, de tipo cromosoma y cromátida, como son: fracturas, intercambios, fragmentos acéntricos, etc. El procedimiento se encuentra bien estudiado y aceptado

internacionalmente (Preston, J. y col., 1987).

El ensayo Citogenético presenta la ventaja que los cromosomas pueden contarse directamente en las placas metafásicas, pudiendo determinarse la frecuencia de hipo e hiperploidias. La modificación más importante, que debería hacerse con respecto a cómo está diseñado para la evaluación de clastógenos, son los tiempos de tratamiento. Para la detección de clastógenos, en médula ósea de ratón, se recomiendan 6 y 12 hrs de tratamiento para poder analizar la primera metafase que sigue a la síntesis de DNA, momento en que habría actuado el clastógeno (Preston, J. y col., 1987). Para los aneunógenos, los tiempos de tratamiento deberían ser más largos, puesto que se requiere que las células afectadas pasen por una división celular para que se manifieste el efecto (Manca, A. y col., 1990 , Gustavino, B. y col., 1991)

Ensayo de Micronúcleos

Desde que fue diseñado en la década del 70 (Schmid, W., 1975), ha sido el ensayo más recomendado para evaluar clastógenos, por su facilidad, rapidez, bajo costo y alta sensibilidad. Los micronúcleos están definidos como masas de cromatina citoplasmática que aparecen como pequeños núcleos, que en el caso de los Eritrocitos

Policromáticos de la médula ósea de ratón, son evidentes puesto que estas células han expulsado su núcleo. El procedimiento experimental ha sido ampliamente revisado en los últimos años (Yamamoto, K. y Kikuchi, Y., 1981, Heddle, J. y col., 1983 , Salamone, M y Heddle, J., 1983 , Hayashi, M. y col., 1984(a) , Fenech, M. y Morley, A., 1985 , Mitchell, I. y Brice, A., 1986 , Mirkova, E. y Ashby, J., 1987 , Romagna, F. y Stainforth, C., 1989 , Mavournin, K. y col., 1990).

Los micronúcleos, pueden ser buenos marcadores en la detección de aneunógenos. La principal diferencia entre los micronúcleos inducidos por clastógenos y aneunógenos es su origen, mientras los primeros se originan de fragmentos acéntricos los segundos están constituidos por cromosomas enteros, que quedan rezagados durante la anafase. Un criterio para diferenciarlos ha sido el tamaño, los originados de cromosomas enteros son micronúcleos más grandes que los que son producto de fragmentos acéntricos (Yamamoto, K. y Kikuchi, Y., 1980). Aunque algunos autores han postulado que los fragmentos acéntricos podrían fusionarse para producir micronúcleos grandes (Cimino, M. y col., 1986).

En los últimos años, se ha desarrollado una técnica que permite diferenciar micronúcleos con cromosomas enteros, identificando la presencia de

centrómero con anticuerpos anti-cinetocoro presente en el suero de pacientes con el Síndrome Escleroderma "CREST" (Eastmond,D. y Tucker,J.,1989 , Gudi,R.,1990). Otros autores, han desarrollado un procedimiento distinto que apunta al mismo objetivo y que resulta menos costoso, aplicando el procedimiento de Bandeó C a preparaciones de micronúcleos han podido detectar la presencia de centrómero (Verschaeve,L. y col.,1988).

Además del tamaño de los micronúcleos , otra variable que permitiría diferenciar entre efecto clastógeno y aneunógeno , es el tiempo que se debe esperar entre el tratamiento con el agente y la determinación de la frecuencia de Eritrocitos Policromáticos con micronúcleos.

Para clatógenos, se recomienda muestrear 24 y 30 horas post-tratamiento puesto que según los tiempos del ciclo celular la mayoría de los Eritrocitos Policromáticos que se analicen se encontraban en período S al tiempo de tratamiento (Heddle,J. y col.,1983 , Salamone,M. y Heddle, J.,1983 , Mavournin,K. y col., 1990).

Para aneunógenos , no existe ningún tipo de recomendación sobre cuales serían los tiempos más adecuados para analizar los EPC después del tratamiento

con el compuesto. Lo más probable, es que se necesite de tiempos más cortos de tratamiento, puesto que, estos compuestos actúan durante la mitosis, son M dependientes, a diferencia de los clastógenos que son S dependientes.

De acuerdo a todos los antecedentes expuestos, se propone la utilización de los ensayos Citogenético y de Micronúcleos para la evaluación de efecto aneunógeno.

Con el propósito de establecer, cuales son las variables que permiten discriminar para efecto aneunógeno con ambos ensayos se han elegido dos compuestos químicos con mecanismos de acción conocidos, Metilmetanosulfonato (MMS) como clastógeno y Colchicina (COL) como aneunógeno. Usando estos dos compuestos químicos, se realizarán los ensayos Citogenético y de Micronúcleos en ratón, para evaluar los siguientes parámetros:

En el ensayo de Micronúcleos se evaluarán: a) frecuencia de Eritrocitos Policromáticos con micronúcleos, b) tiempo de inducción post-tratamiento, c) tamaño de los micronúcleos, d) presencia o ausencia de centrómero en los micronúcleos

En el ensayo Citogenético se evaluarán: a) frecuencia de placas con aberraciones cromosómicas, b) tipo de

aberraciones cromosómicas inducidas, c) número cromosómico, d) tiempo de inducción post-tratamiento.

Una vez evaluadas estas variables, y establecidas las correlaciones, podrán hacerse las sugerencias necesarias para el uso adecuado de estos ensayos en la evaluación aneunogénica de compuestos químicos.

MATERIALES Y METODOS

Animales: Se usaron ratones (Mus musculus), machos y hembras, de la cepa CF1. De 7 a 9 semanas de edad, según las edades recomendadas para el ensayo Citogenético (Preston, J. y col., 1987) y el de Micronúcleos (Heddle, J. y col., 1983, Salamone, M. y Heddle, J., 1983, Mavournin, K y col., 1990). El peso promedio de los ratones fue de $25,9 \pm 3,0$ g para las hembras y de $29,6 \pm 3,7$ g para los machos. Durante el tratamiento, los ratones recibieron agua y comida "ad libitum".

Compuestos Químicos:

Metilmetanosulfonato (MMS): (Aldrich Chem.Comp.) El MMS (N°CAS:66-27-3) es un compuesto químico sintetizado para investigación, que no se produce espontáneamente en la naturaleza. Tiene propiedades alquilantes y probadas actividades mutagénicas y carcinogénicas. Es un mütageno de acción directa, que no requiere de activación metabólica para ejercer su acción. Da positivos los ensayos genotóxicos que detectan mutaciones puntuales y clastogénesis (Kondo, S., 1982). Usando MMS marcado radioactivamente con $^3\text{[H]}$ o $^{14}\text{[C]}$, se ha estudiado, "in vivo" e "in vitro", las alteraciones que produce en la

molécula de DNA , encontrándose que el principal producto de alquilación es la N⁷-alquilguanina, y en menor cantidad la O⁶-alquilguanina. La alquilación de una purina, como N⁷-alquilguanina, y su posterior depurinación, puede producir quiebres en la molécula de DNA que se traducirán en lesiones cromosómicas, visibles al microscopio óptico.

La dosis letal 50 (DL₅₀) en ratón, por administración intraperitoneal, es de 290 mg/Kg de peso corporal (Tsuyoshi,T. y col.,1989). En este trabajo, se ha elegido una dosis que representa 1/3 de la DL₅₀ (100 mg/Kg), para inducir una frecuencia significativa de aberraciones cromosómicas y Eritrocitos Policromáticos con micronúcleos, sin causar efectos tóxicos en los individuos tratados.

Colchicina (COL):(Aldrich Chem.Comp.) La Col (N°CAS:64-86-8) es un alcaloide que impide la formación del huso mitótico por inhibición de la polimerización de los microtúbulos. Su unión a dímeros de tubulina, involucra grupos sulfhidrilos de residuos de Cisteina en las moléculas de tubulina (Ghaskadbi,S. y Vaidya,V.,1991). Esta acción sobre el huso le confiere propiedades aneunogénicas (Waters,M. y col., 1986).

En mamíferos induce hipo e hiperploidias en Metafase II de oocitos de ratón (Mailhes,J. y

col.,1986,1989). Trabajos más recientes informan que COL induce micronúcleos en Vicia faba y células de Hamster Chino (Rizzoni,M. y col.,1989) y en Eritrocitos Policromáticos de ratón (Asano,N. y col.,1989).

La DL₅₀ en ratón, vía intraperitoneal, fue estimada en 8 mg/Kg de peso corporal (Asano,N. y col.,1989). En este trabajo se usó una dosis baja (1 mg/Kg) capaz de inducir una frecuencia significativa de Eritrocitos Policromáticos con micronúcleos sin causar efectos tóxicos.

Tiempos de tratamiento:

Los tiempos de tratamiento para ambos compuestos químicos (MMS y COL), fueron elegidos de acuerdo a los tiempos del ciclo celular de la eritropoyesis de ratón (Salamone,M. y Heddle,J.,1983), que se encuentran resumidos en la Figura N°1.

En el ensayo Citogenético, las células son analizadas en metafase. De acuerdo a los tiempos del ciclo celular, al momento del tratamiento estas células se encontraban en un estadio previo:

4 hrs de tratamiento las células se afectaron en mitosis

6 hrs de tratamiento las células se afectaron a fines de

G₂ ó inicio de M

12 hrs de tratamiento las células se afectaron en S

24 y 30 hrs de tratamiento las células se afectaron en el ciclo anterior

En el ensayo de Micronúcleos, las células son analizadas en el estadio de Eritrocito Policromático (EPC). -Al momento del tratamiento con el compuesto químico, estas células se encontraban en un estadio previo:

4 y 6 hrs de tratamiento las células fueron afectadas en EOC

12 hrs de tratamiento las células fueron afectadas a fines de S y principio de G₂

24 y 30 hrs de tratamiento las células fueron afectadas en S

ENSAYO CITOGENETICO

24 a 30 h _____ *

 12 h _____ *

 6 h _____ *

 4 h _____ *

| EB | S | G ₂ | M | EOC | EN | EPC | ENC |
|----|---|----------------|---|-----|----|-----|-----|
|----|---|----------------|---|-----|----|-----|-----|

 4 h _____ *

 6 h _____ *

 12 h _____ *

24 a 30 h _____ *

ENSAYO DE MICRONUCLEOS

Figura N°1: Esquema de los estadios del ciclo eritropoyético en ratón. Se indica en qué momento del ciclo ha actuado el compuesto químico, de acuerdo al tiempo de tratamiento y al ensayo utilizado. *:estadio en que se analizan las células, EB:estadios blásticos, S: último periodo S, G₂:último periodo G₂, M:mitosis, EOC:eritrocito ortocromático, EN:expulsión del núcleo, EPC:eritrocito policromático, ENC:eritrocito norcromático.

Tratamientos:

MMS: 40 ratones, 20 de cada sexo, se inyectaron, vía intraperitoneal, con una dosis de 100 mg/Kg de MMS disuelto en aceite de maíz "Mazola". La dosis se ajustó al peso de cada animal y se inyectó en un volumen máximo de 0,5 ml. Grupos de 8 ratones (4 machos y 4 hembras) fueron sacrificados a distintos tiempos post-tratamiento :4,6,12, 24 y 30 hrs.

COL: 40 ratones, 20 de cada sexo, se inyectaron, vía intraperitoneal, con una dosis de 1 mg/Kg de COL disuelta en suero fisiológico para mamíferos (NaCl (Merck) al 0,9%). La dosis fue ajustada al peso de cada animal, y se inyectó en un volumen máximo de 0,5 ml. Grupos de 8 ratones (4 machos y 4 hembras) fueron sacrificados a distintos tiempos post-tratamiento:4,6,12,24 y 30 hrs.

Controles: Se establecieron grupos de 8 ratones (4 machos y 4 hembras) que fueron inyectados vía intraperitoneal, con 0,5 ml de aceite de maíz ó suero fisiológico. Los ratones fueron sacrificados a 12 y 30 hrs post-inyección, según los tiempos recomendados para los ensayos Citogenético y de Micronúcleos, respectivamente (Preston, J. y col., 1987 Heddle, J. y col., 1983 , Salamone, M. y Heddle, J., 1983 , Mavournin, K. y col., 1990).

Todos los ratones, tanto los tratados como los controles, 2 hrs antes de ser sacrificados por dislocación

cervical, se inyectaron, vía intraperitoneal, con 2 mg/Kg de COL, para acumular placas metafásicas y obtener cromosomas con una morfología adecuada.

Procesamiento:

A cada ratón se le extrajo ambos fémures y tibias, los cuales fueron limpiados para proceder a la extracción de la médula ósea, según los siguientes procedimientos:

1.-ENSAYO CITOGENETICO:

- a) Cortar las epifisis de ambas tibias y de un fémur
- b) Extraer la médula de la diáfisis haciendo pasar 3 ml de solución hipotónica KCl (Merck) 0,075M, contenidos en una jeringa tuberculina.
- c) Dejar en hipotonía por 20 min a temperatura ambiente
- d) Agregar 6 ml de fijador frío metanol (Merck):ácido acético (Merck)(3:1), y dejar a temperatura ambiente por 20 min.
- e) Resuspender y centrifugar a 225 x g (1.200 rpm) por 5 min.
- f) Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 10 ml de fijador frío.
- g) Centrifugar a 225 xg por 5 min.
- h) Repetir los pasos f y g.
- i) Eliminar el sobrenadante, resuspender el pellet en 0,2 ml de fijador frío.
- j) Hacer 3 goteos en portas frios.

Tinción y Montaje de las Preparaciones:

- a) Teñir con Giemsa (Merck) al 9% en Buffer Sørensen (pH 6,8) por 10 min.
- b) Lavar en Buffer Sørensen (KH_2PO_4 1/15M + Na_2HPO_4 1/15M (Merck))
- c) Lavar en agua destilada
- d) Secar al aire y montar con Bálsamo del Canadá (Merck)

2.-ENSAYO DE MICRONUCLEOS:

- a) Cortar ambas epífisis de un fémur
- b) Extraer la médula ósea de la diáfisis haciendo pasar 0,3 ml de Suero Fetal de Bovino (Sigma Chem.Comp.) contenidos en una jeringa tuberculina
- c) Resuspender la médula y centrifugar a 156 x g (1.000 rpm) por 5 min.
- d) Eliminar el sobrenadante, resuspender el pellet y hacer 3 frotis

Tinción y Montaje de las Preparaciones:

Un frotis por animal se tiñó con el siguiente procedimiento:

- a) Fijar en Metanol (Merck) puro durante 15 min.
- b) Teñir con Giemsa (Merck) al 6% en Buffer Sørensen (pH 6,8) por 10 min.
- c) Lavar en Buffer Sørensen

- d) Lavar en ácido Cítrico (Merck)(0,8 ml de solución al 1% en 200 ml de agua destilada)
- e) Lavar en agua destilada
- f) Secar al aire y montar con Bálsamo del Canadá

Esta tinción permite diferenciar entre los dos estadios de la serie eritroblástica que han perdido el núcleo. Los EPC se tiñen de color azul, por la presencia de RNA y ribosomas en su citoplasma. Los ENC se tiñen de color rosado.

Bandeo C en micronúcleos:

En un frotis por individuo, de los grupos de tratamiento con MMS y COL durante 24 hrs, se aplicó el procedimiento descrito por Verschaeve y col.(1987). Los frotis fueron guardados por lo menos por una semana antes del bandeo. Conjuntamente, se aplicó el procedimiento a preparaciones de cromosomas para controlar que el bandeo estuviera funcionando adecuadamente. El procedimiento utilizado fue el siguiente:

- a) Fijar en Metanol(Merck) puro durante 15 min.
- b) Incubar en HCl(Merck) 0,2N por una hora a temperatura ambiente
- c) Lavar en agua destilada
- d) Incubar con Ba(OH)₂(Merck) al 5% por 10 min a 45°C
- e) Lavar con agua destilada

- f) Lavar con HCl(Merck) 0,2N
- g) Lavar con agua destilada
- h) Incubar en solución 2xSSC (0,3M de NaCl(Merck) y 0,03M de Tricitrato de Sodio(Merck)) por una hora a 60°C
- i) Lavar en agua destilada
- j) Teñir con Giemsa (Merck) al 5% en Buffer Sörensen(pH 6,8) por 20 min.
- k) Lavar en Buffer Sörensen
- l) Lavar en agua destilada
- m) Secar al aire y montar con Bálsamo del Canadá (Merck)

Análisis de las preparaciones:

Todas las preparaciones fueron analizadas en un microscopio Nikon Optiphot con aumento de 1000x.

1.- Ensayo de Micronúcleos:

Se contaron 1000 EPC por ratón y se determinó la frecuencia de EPC con MN (Fig.Nº2). Se determinó la relación EPC/ENC en 200 eritrocitos totales, como indicador de la posible citotoxicidad producida por los compuestos químicos inyectados. Si la relación EPC/ENC es menor o igual a 0,1 se considera que hay efecto citotóxico producto del tratamiento (Heddle,J. y col.,1983 , Salamone,M. y Heddle,J.,1983 , Mavournin,K. y col.,1990).

En las preparaciones sometidas a Bando C, se analizaron 10 EPC con MN por individuo tratado durante 24

hrs con MMS o COL. Se determinó la presencia de heterocromatina centromérica en los MN.

2.- Ensayo Citogenético:

En cada ratón se analizaron 50 placas metafásicas. En cada placa se determinó la presencia de las siguientes lesiones cromosómicas: Fractura de cromátida(FC)(Fig.N°3), Fractura de Isocromátida(FI)(Fig.N°3), Gap de Cromátida (GC)(Fig.N°3), Gap de Isocromátida(GI)(Fig.N°3), presencia de Fragmentos Acéntricos(FA)(Fig.N°4), y Separación Temprana de los Centrómeros(STC)(Fig.N°4).

Toda zona acromática, independiente de su extensión, fue clasificada como Gap. Como fracturas, sólo fueron clasificadas aquellas lesiones que mostraron evidente desviación del fragmento acéntrico con respecto al eje central de la cromátida (Savage,J.,1976). Se consideró como STC, cuando uno o más cromosomas metafásicos presentaron una evidente separación de sus cromátidas. Los FA fueron considerados como tales, cuando se observó la presencia de un FA que no pudo ser atribuido a una fractura en la misma placa metafásica.

No se incluyeron en el análisis, aquellas placas que presentaron lesiones múltiples, por la dificultad para cuantificarlas (Fig.N°4b), ni aquellas con lesiones tipo intercambio (Fig.N°4d).

En cada placa, se contabilizó el número de cromosomas y se determinó cuantas difieren de la dotación diploide de la especie ($2n=40$, todos cromosomas telocéntricos)

Análisis Fotográfico:

Todas las fotografías fueron tomadas con aumento 1000x, con película de 100 ASA, en un microscopio Nikon Optiphot.

Se fotografiaron 20 placas metafásicas con fracturas de cromátida en individuos tratados con MMS y se ampliaron a un tamaño de 9x12 cms. En cada fotografía se midió el tamaño del fragmento acéntrico y el largo total de las cromátidas. Se determinó a qué porcentaje del largo total de las cromátidas corresponde el largo del fragmento acéntrico.

Se fotografiaron, 20 EPC con MN de ratones tratados con COL y con MMS, y 10 EPC con MN de ratones controles. Se determinó el diámetro del MN(d) y el diámetro del citoplasma de los EPC(D). Cuando los MN o los citoplasmas fueron irregulares, el diámetro se calculó como el promedio entre el diámetro mayor y el diámetro menor. Para cada EPC con MN, se calculó la relación entre ambos diámetros. Por convención, si d es mayor o igual a $D/4$, se considera que el MN es grande (Yamamoto, K. y Kikuchi, Y., 1980).

Se fotografiaron, 10 núcleos de EOC controles y se determinó el volumen nuclear promedio. Se calculó a que porcentaje del volumen nuclear corresponde el volumen de los MN fotografiados en cada grupo de tratamiento y controles. Los volúmenes, tanto de los núcleos como de los MN, fueron calculados de acuerdo a la fórmula para calcular el volúmen de una esfera.

Las fotografías de MN y núcleos, fueron ampliadas 6,4 veces con respecto a la fotografía tomada en el microscopio.

Análisis Estadístico:

En el ensayo de Micronúcleos, se comprobó que los resultados presentan una distribución de Poisson. Se les aplicó una prueba de comparaciones múltiples con el estadístico de Dunnett (Amphlett, J. y Dellow, G., 1984).

En el ensayo Citogenético, los resultados siguen una distribución normal. Se les aplicó un Análisis de Varianza, para determinar si los grupos de tratamiento presentan un aumento significativo de placas con aberraciones cromosómicas con respecto al control, y un análisis de Scheffe para determinar cuál de los tiempos de tratamiento es el que más difiere del control.

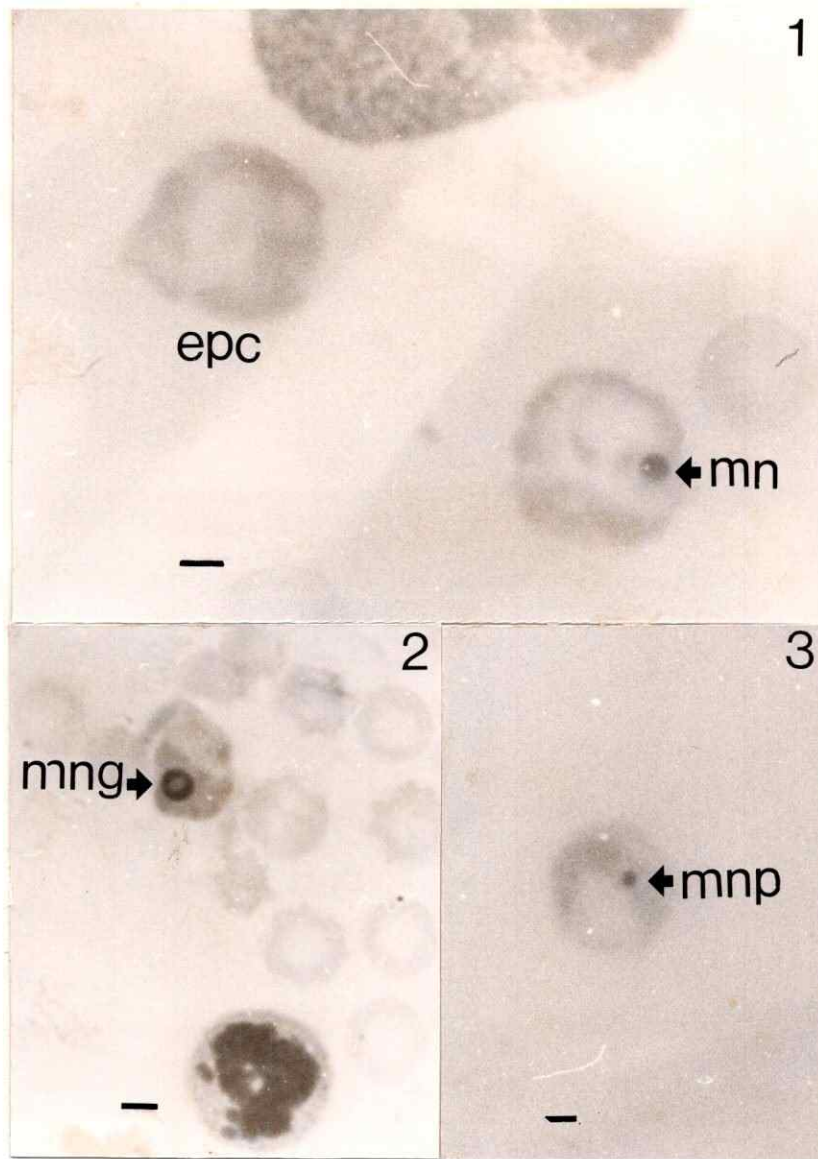


FIGURA N°2: Fotomicrografía de Eritrocitos Policromáticos.
Foto 1: epc = Eritrocito policromático, mn = micronúcleo
Foto 2: mnp = micronúcleo pequeño
Foto 3: mng = micronúcleo grande
Tinción Giemsa. La barra corresponde a 1 μ m

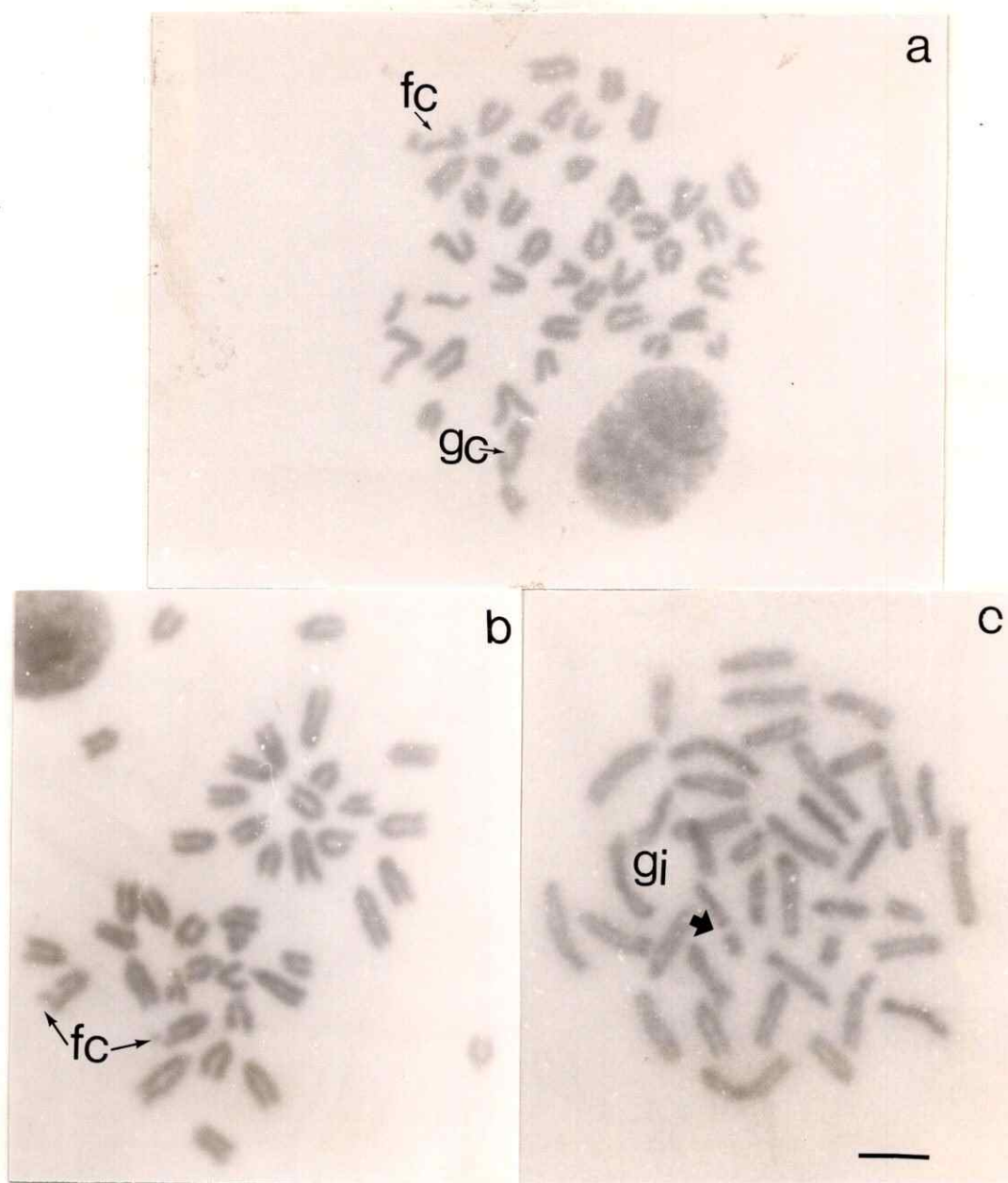


FIGURA N°3: Fotomicrografías de metafases de ratones tratados con MMS. fc= fractura de cromátida , gc= gap de cromátida, gi= gap de isocromátida Tinción Giensa. La barra representa 10 µm

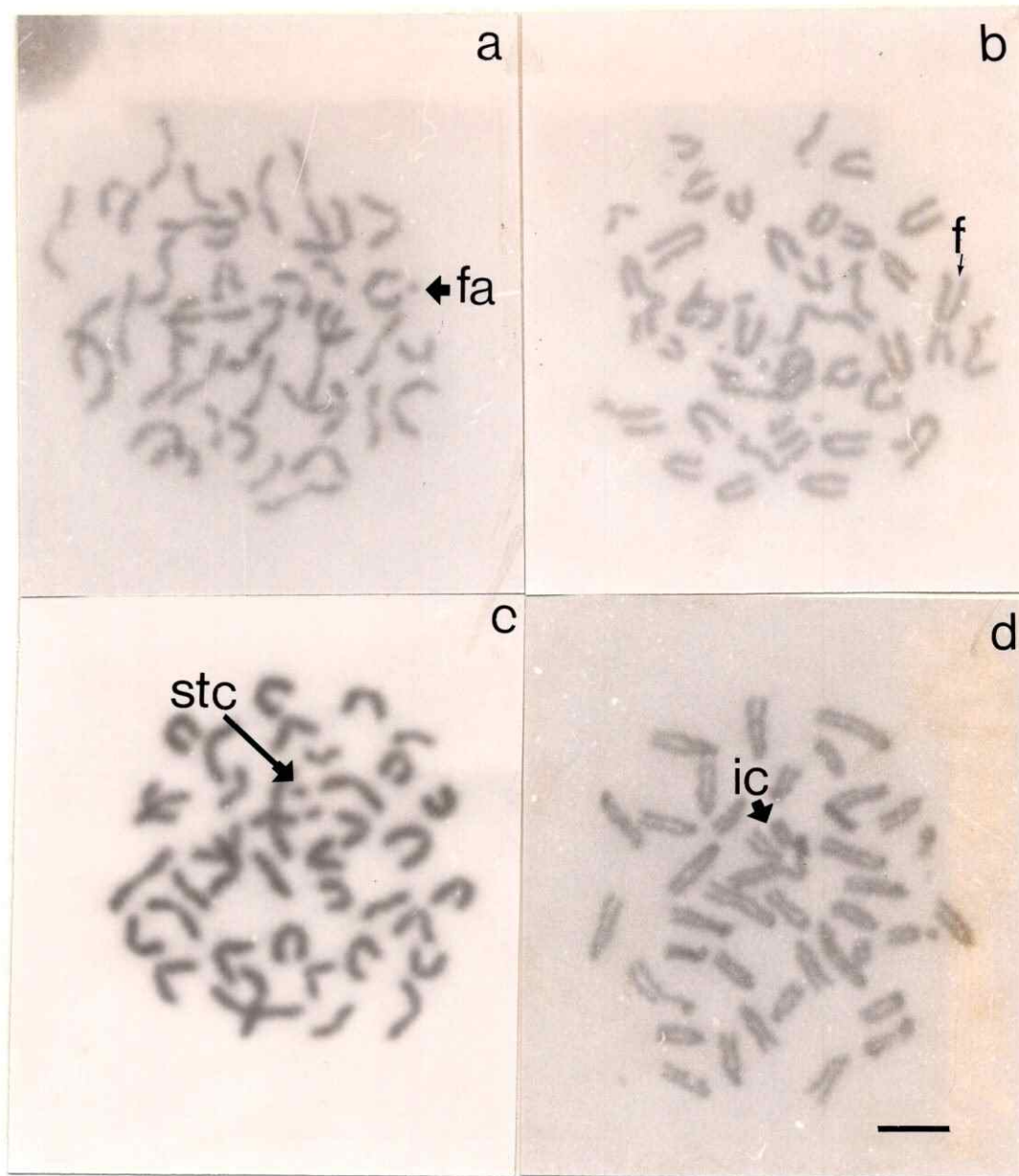


FIGURA N°4: Fotomicrografías de placas metafásicas de ratones tratados con MMS. fa= fragmento acéntrico stc= separación temprana de las cromátidas, ic= intercambio cromosómico, f= fusión centromérica. Tinción Giemsa. La barra representa 10 μ m

RESULTADOS

Ensayo de Micronúcleos:

No se observa un efecto citotóxico en los grupos de tratamiento y controles, medido como la razón promedio EPC/ENC, la cual se presenta dentro del rango normal (mayor que 0,1) (Tabla N°1). Sin embargo, en el grupo de ratones tratados con MMS a 30 hrs, se encuentra el valor promedio más bajo de EPC/ENC ($0,19 \pm 0,17$), en este grupo, 4 ratones presentaron una razón EPC/ENC menor a 0,1, indicando que hay un efecto citotóxico sobre los EPC.

La frecuencia promedio de EPC con MN en ratones tratados con MMS, es significativamente superior ($p < 0,001$) al control a las 12, 24 y 30 hrs de tratamiento (Tabla N°1). Con una frecuencia máxima de EPC con MN a las 24 hrs de tratamiento.

En los ratones tratados con COL, la frecuencia de EPC con MN, es significativamente más alta ($p < 0,001$) que el control en los mismos tiempos de tratamiento, 12, 24 y 30 hrs (Tabla N°1). Sin embargo, no se observa un máximo en ninguno de los tiempos de tratamiento utilizados, por el contrario, la frecuencia va aumentando progresivamente con respecto al tiempo.

Con respecto al número de MN por EPC, se observa que tanto para los ratones controles como los tratados, a todos los tiempos de tratamiento utilizados, la mayor proporción de EPC con MN presenta un solo MN (Tabla N°1). En menor porcentaje, se encuentran EPC con 2 MN, mientras que los EPC con 3, 4 ó más MN son escasos, observándose casi exclusivamente en ratones tratados con MMS (Tabla N°1)

Al comparar las frecuencias de EPC con MN, inducidas con MMS y COL (Fig. N°5), se observa que en los tiempos cortos de tratamiento, 4 y 6 hrs, no hay diferencias significativas. A 12 hrs de tratamiento, la frecuencia de EPC con MN es significativamente mayor ($p < 0,001$) en los ratones tratados con COL con respecto al tratamiento con MMS. A tiempos largos de tratamiento, 24 y 30 hrs, la frecuencia de EPC con MN inducida por MMS es superior a la de COL, pero sólo a las 24 hrs la diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0,001$).

Bandeo C: La técnica de Bandeo C en micronúcleos, fue repetida varias veces, con diversas modificaciones, incluyendo una o dos preparaciones de cromosomas para controlar el funcionamiento de la técnica, obteniéndose una buena resolución de la heterocromatina centromérica en los cromosomas. Las preparaciones de MN, inducidos por MMS, COL y controles, se tiñeron uniformemente sin que se pudiera diferenciar la presencia de centrómero.

TABLA N° 1. Frecuencia de Eritrocitos Policromáticos con micronúcleos en ratones tratados y controles.

| TRAT | T | EPC/ENC±de | EPCMN±de | N° MN por EPC | | | |
|------|----|------------|------------|---------------|----------|---------|--------|
| | | | | 1 (%) | 2 (%) | 3 (%) | 4 (%) |
| MMS | 4 | 0,84±0,32 | 5,0± 2,1 | 39(97,5) | 1(2,5) | - | - |
| | 6 | 0,51±0,14 | 5,6± 2,6 | 40(88,9) | 3(6,7) | 1(2,2) | 1(2,2) |
| | 12 | 0,73±0,44 | 8,1± 3,3* | 59(90,8) | 5(7,7) | 1(1,5) | - |
| | 24 | 0,47±0,27 | 76,7±26,2* | 535(87,1) | 72(11,7) | 6(1,0) | 1(0,2) |
| | 30 | 0,19±0,17 | 58,0±30,5* | 404(87,1) | 44(9,5) | 15(3,2) | 1(0,2) |
| AM | 12 | 0,80±0,29 | 4,1±2,0 | 33(100) | - | - | - |
| | 30 | 0,48±0,40 | 4,5±1,8 | 33(91,7) | 3(8,3) | - | - |
| COL | 4 | 0,45±0,13 | 4,8±3,5 | 34(87,2) | 5(12,8) | - | - |
| | 6 | 0,23±0,12 | 4,0±2,1 | 30(93,7) | 2(6,3) | - | - |
| | 12 | 0,35±0,08 | 15,9±3,7*& | 115(90,6) | 12(9,4) | - | - |
| | 24 | 0,34±0,29 | 32,4±8,6*& | 248(95,7) | 8(3,1) | 2(0,8) | 1(0,4) |
| | 30 | 0,33±0,06 | 42,0±11,6* | 317(94,3) | 19(5,7) | - | - |
| SF | 12 | 0,79±0,34 | 4,0±2,4 | 32(100) | - | - | - |
| | 30 | 0,66±0,33 | 3,4±1,4 | 21(91,3) | 2(8,7) | - | - |

MMS: Metilmetanosulfonato EPC: Eritrocitos policromáticos
 COL: Colchicina ENC: Eritrocitos norcromáticos
 AM : Aceite de maíz MN : Micronúcleo
 SF : Suero fisiológico de : desviación estándar
 * : Estadísticamente significativo respecto del control
 (p<0,001)
 & : Estadísticamente significativo respecto de MMS
 (p<0,001)
 T : Tiempo de tratamiento (hrs.)

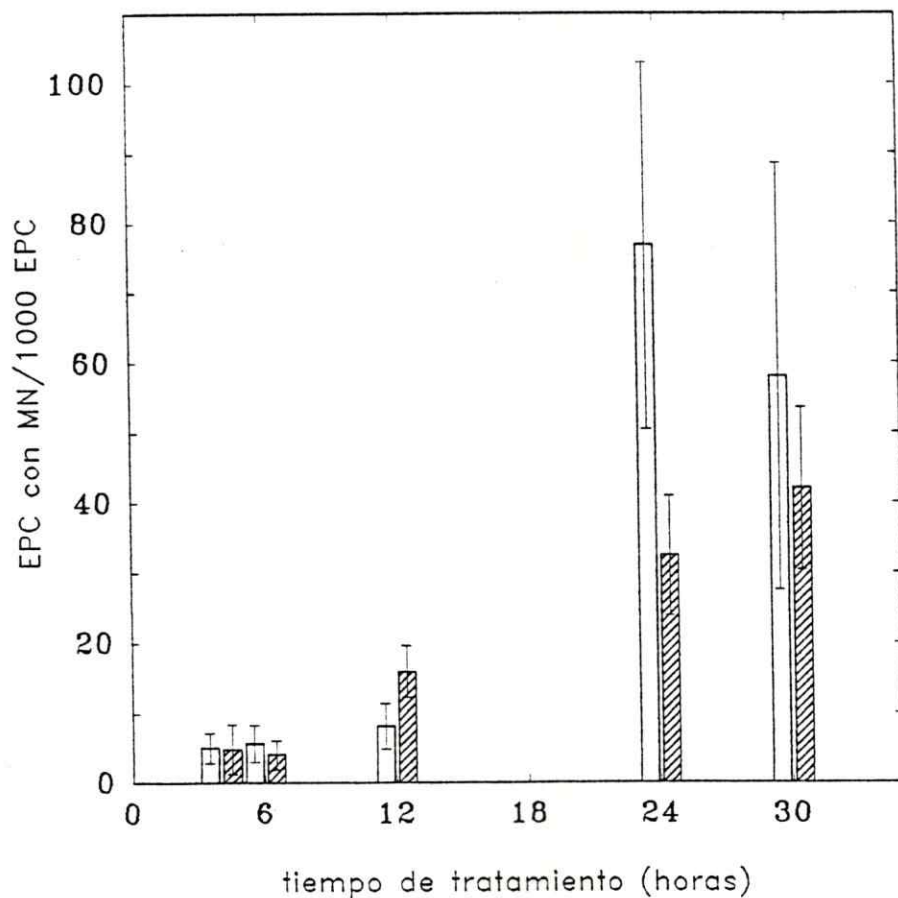


FIGURA N°5: Frecuencia promedio de Eritrocitos Policromáticos (EPC) con micronúcleos (MN) en 1000 EPC por ratón, en ratones tratados con MMS (□) y COL (▨) a distintos tiempos post-tratamiento.

Ensayo Citogenético:

En los grupos de ratones tratados con MMS, hay un aumento significativo ($p < 0,001$) de placas metafásicas con aberraciones cromosómicas (PMAC) respecto al control.

La mayor diferencia se encuentra a las 12 hrs de tratamiento, tiempo en que se observa el máximo de PMAC (31,2%) (Tabla N°2).

En los ratones tratados con COL, sólo a las 4, 6 y 24 hrs de tratamiento, hay un incremento significativo ($p < 0,05$) de PMAC con respecto al control (suero fisiológico) (Tabla N°2). Encontrándose el mayor número de PMAC a los tiempos más cortos de tratamiento, 4 y 6 hrs.

Al comparar el porcentaje de PMAC inducidas por ambos compuestos químicos (Fig.N°6), se observa que a 4 y 6 hrs de tratamiento no hay diferencias significativas, mientras que en los otros tres tiempos de tratamiento, la frecuencia de PMAC es significativamente mayor ($p < 0,001$) en los ratones tratados con MMS.

También, se observan diferencias en el tipo de aberraciones cromosómicas inducidas por ambos compuestos químicos (Tabla N°2). Con MMS, se inducen, principalmente lesiones de tipo cromátida, más que de isocromátida, tanto en el caso de las fracturas como los gaps. En ambos la lesión se ubica, preferentemente, en posición distal o medial con respecto al centrómero (Tabla N°2).

TABLA N° 2. Aberraciones cromosómicas en placas metafásicas de ratones tratados y controles.

| TRAT | T | PMAC* | | | FRACTURAS | | | | | | GAPS | | | | | |
|------|----|-------|----|-----|-----------|----|----|----|----|----|------|----|----|----|-----|----|
| | | FC | FI | +FA | -FA | d | p | m | GC | GI | d | m | p | FA | STC | |
| MMS | 4 | 45 | 13 | 1 | 14 | - | 3 | 9 | 2 | 30 | 1 | 9 | 20 | 2 | - | 3 |
| | 6 | 39 | 10 | - | 8 | 2 | 6 | 4 | - | 25 | - | 15 | 7 | 4 | 3 | 3 |
| | 12 | 125 | 91 | 8 | 97 | 2 | 33 | 46 | 20 | 57 | 4 | 27 | 26 | 7 | 17 | 4 |
| | 24 | 75 | 47 | 3 | 43 | 7 | 19 | 18 | 12 | 25 | 1 | 11 | 10 | 5 | 16 | 3 |
| | 30 | 50 | 33 | 1 | 23 | 11 | 18 | 11 | 4 | 18 | - | 4 | 10 | 4 | 3 | 6 |
| AM | 12 | 6 | 2 | - | 2 | - | 1 | 1 | - | 3 | - | - | 2 | 1 | - | 1 |
| | 30 | 14 | 5 | - | 5 | - | 3 | 2 | - | 7 | 1 | 3 | 5 | - | - | 1 |
| COL | 4 | 36 | 2 | 2 | 4 | - | 3 | 1 | - | 8 | - | 5 | 3 | - | 1 | 28 |
| | 6 | 35 | - | - | - | - | - | - | - | 3 | - | 3 | - | - | - | 32 |
| | 12 | 7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 6 |
| | 24 | 18 | 1 | - | 1 | - | 1 | - | - | 1 | - | - | 1 | - | 1 | 15 |
| | 30 | 7 | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | 1 | - | - | 6 |
| SF | 12 | 8 | 4 | 1 | 5 | - | 3 | 2 | - | - | - | - | - | - | - | 3 |
| | 30 | 8 | 2 | - | 2 | - | 1 | 1 | - | 4 | - | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 |

MMS : Metilmetanosulfonato
 COL : Colchicina
 AM : Aceite de maíz
 SF : Suero fisiológico
 T : Tiempo de tratamiento(hrs)
 PMAC: Placas metafásicas con aberraciones cromosómicas
 FC : Fractura de cromátida
 FI : Fractura de isocromátida
 +FA : Fractura con fragmento acéntrico
 STC : Separación temprana de las cromátidas
 * : En 400 placas por tiempo de tratamiento

-FA: Fractura sin fragmento acéntrico
 GC: Gap de cromátida
 GI: Gap de isocromátida
 d: Lesión en posición distal
 m: Lesión en posición medial
 p: lesión en posición proximal
 FA: Fragmento acéntrico

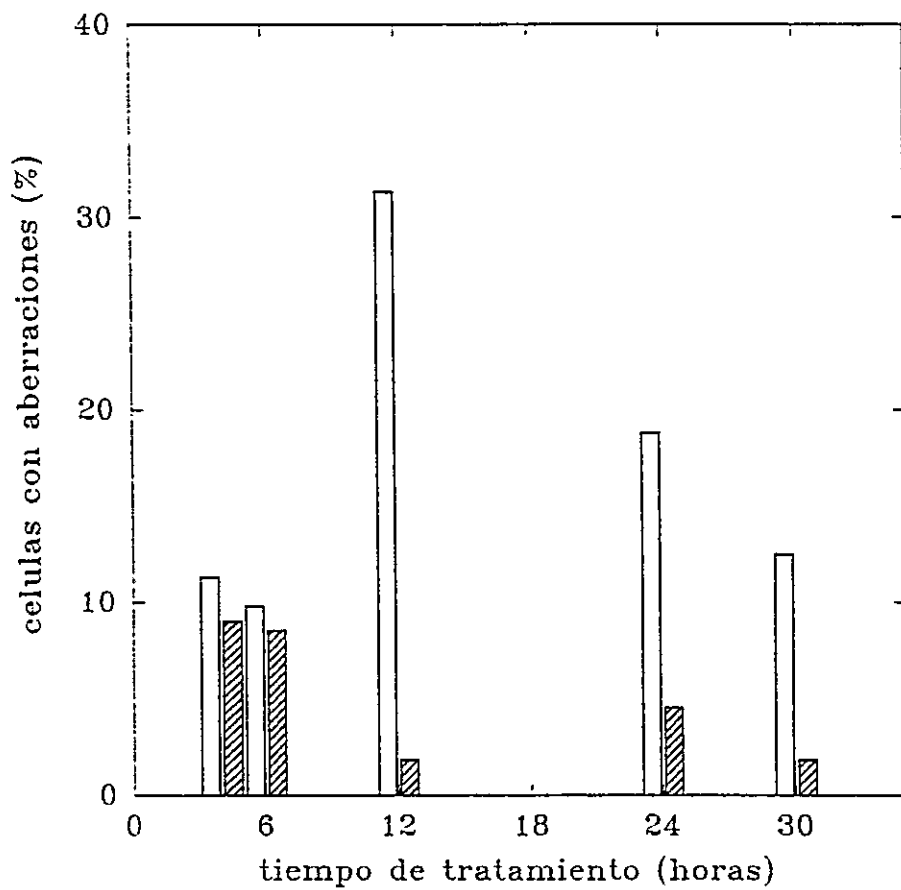


FIGURA N°6: Frecuencia de células con aberraciones cromosómicas en 400 células totales, en ratones tratados con MMS (□) y COL (▨) a distintos tiempos de tratamiento.

El porcentaje que representa cada lesión con respecto al total de lesiones encontradas, en cada tiempo de tratamiento con MMS (Tabla N°3, Fig.N°7), muestra que a tiempos cortos de tratamiento, 4 y 6 hrs., el total de lesiones está, principalmente, constituido por GC. Este porcentaje disminuye a las 12 hrs de tratamiento, y se mantiene bajo, alrededor de un 25%, en los tiempos largos de tratamiento, 24 y 30 hrs.

Las FC, muestran un comportamiento opuesto en relación con los GC. Representan porcentajes bajos a tiempos cortos de tratamiento, 4 y 6 hrs, aumentando a las 12 hrs y manteniéndose en estos niveles, aproximadamente un 50%, durante los tiempos largos de tratamiento, 24 y 30 hrs (Tabla N°3, Fig.N°7).

En los ratones tratados con MMS, se inducen FA a partir de las 6 hrs de tratamiento, alcanzando un porcentaje máximo, con respecto al total de lesiones inducidas, a las 24 hrs post-tratamiento (Tabla N°3, Fig.N°7)

Las STC, se encuentran en todos los tiempos de tratamiento con MMS, pero representan un porcentaje muy bajo del total de lesiones observadas, no más del 9,2% (Tabla N°3, Fig.N°7).

A diferencia de lo que se observa en el tratamiento con MMS, en los ratones tratados con COL, la inducción de

fracturas, gaps y fragmentos acéntricos, tiene muy poca incidencia en el total de aberraciones encontradas (Tabla N°3, Fig.N°8). Mientras que, en todos los tiempos de tratamiento, las STC representan entre un 60 a un 90 % del total de lesiones cromosómicas cuantificadas. Con un máximo de 91,4% a las 6 hrs de tratamiento.

Tabla N°3 : Porcentaje que representa cada tipo de aberración cromosómica con respecto al total de aberraciones en ratones tratados y controles

| TRAT. | TIEMPO DE MUESTREO | ABERRACIONES TOTALES | PORCENTAJE DE ABERRACIONES | | | | | STC |
|-----------|--------------------|----------------------|----------------------------|------|------|-----|------|------|
| | | | FC | FI | GC | GI | FA | |
| MMS | 4 h | 49 | 27,1 | 2,1 | 62,5 | 2,1 | - | 6,2 |
| | 6 h | 42 | 24,4 | - | 61,0 | - | 7,3 | 7,3 |
| | 12 h | 181 | 50,0 | 4,4 | 31,5 | 2,2 | 9,4 | 2,2 |
| | 24 h | 96 | 49,5 | 3,2 | 26,3 | 1,0 | 16,8 | 3,2 |
| | 30 h | 65 | 50,8 | 1,5 | 27,7 | - | 4,6 | 9,2 |
| ACEITE | 12 h | 6 | 33,3 | - | 50,0 | - | - | 16,7 |
| MAIZ | 30 h | 14 | 35,7 | - | 50,1 | - | 7,1 | 7,1 |
| COL | 4 h | 41 | 4,9 | 4,9 | 1,5 | - | 2,4 | 68,3 |
| | 6 h | 35 | - | - | 8,6 | - | - | 91,4 |
| | 12 h | 7 | - | - | - | - | 14,3 | 85,7 |
| | 24 h | 27 | 3,7 | - | 7,4 | - | 3,7 | 85,2 |
| | 30 h | 8 | - | - | 12,5 | - | - | 87,2 |
| SUERO | 12 h | 8 | 50,0 | 12,5 | - | - | - | 37,5 |
| FISIOLOG. | 30 h | 8 | 25,5 | - | 50,0 | - | 12,5 | 12,5 |

MMS: Metilmetanosulfonato
 COL: Colchicina
 FC : Fractura de cromátida
 FI : Fractura de Isocromátida

GC : Gap de cromátida
 GI : Gap de Isocromátida
 FA : Fragmento acéntrico
 STC: Separación Temprana de las cromátidas

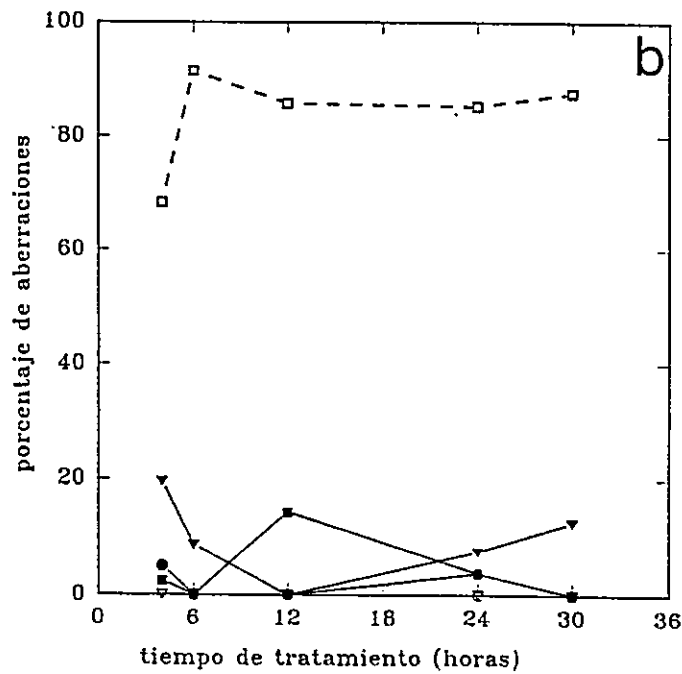
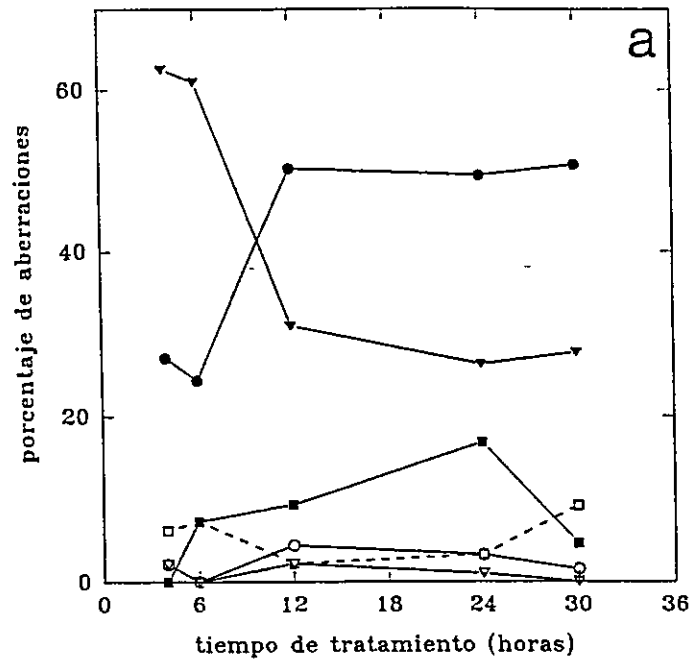


FIGURA N°7: Porcentaje que representa cada tipo de aberración cromosómica con respecto al total de aberraciones encontradas. A: Tratamiento con MMS. B: Tratamiento con COL. FC (●-●), FI (○-○), GC (▼-▼), GI (▽-▽), FA (■-■), STC (□--□)

La cuantificación del número de lesiones cromosómicas por PMAC (Tabla N°4) muestra que, tanto para los controles como para los distintos grupos de tratamiento, un porcentaje importante de PMAC presentan una sola lesión, un 100 % para los controles y más de 60 % en los tratados. Células con 2 lesiones, se observan en los ratones tratados. En el tratamiento con MMS, el porcentaje máximo (24,8 %) se observa a las 12 hrs post-tratamiento (Tabla N°4). En el tratamiento con COL, el porcentaje máximo de PMAC con 2 aberraciones (33,3 %), se encuentra a las 24 hrs de tratamiento (Tabla N°4). Las PMAC con 3, 4 ó más lesiones cromosómicas, son escasas en los tratamientos con COL, mientras que en los ratones tratados con MMS se observan, principalmente, a partir de las 12 hrs de tratamiento (Tabla N°4).

El recuento del número de cromosomas, por placa analizada, muestra que, tanto las hipo como las hiperploidias son más frecuentes en los ratones tratados con COL en comparación con los tratados con MMS o controles. La frecuencia máxima de hipoploidias, en los controles, fue de un 3% similar a la encontrada en el tratamiento con MMS durante 30 hrs (4%) (Tabla N°5). Mientras que, para los ratones tratados con COL, la frecuencia mínima fue de 7,25 %, a las 6 hrs, y la máxima de 20 % , a las 30 hrs de tratamiento (Tabla N°5). Una

situación similar se observa con respecto a las hiperploidias. La frecuencia para los controles fue de 0,25 %, igual a la frecuencia mínima observada en el tratamiento con MMS. La frecuencia máxima, en el tratamiento con MMS fue de 1,25 %, igual a la mínima encontrada en los ratones tratados con COL, a las 6 hrs de tratamiento. Mientras que, la frecuencia máxima de hiperploidias se encontró en los ratones tratados con COL a las 30 hrs post-tratamiento, con un valor de 7,75 % (Tabla N°5).

Tabla N°4: Distribución del número de aberraciones cromosómicas en PMAC de ratones tratados y controles

| TRAT. | TIEMPO MUESTREO | N° DE ABERRACIONES /CELULA | | | |
|---------|-----------------|----------------------------|----------|--------|------------|
| | | 1(%) | 2(%) | 3(%) | 4 ó más(%) |
| MMS | 4 h | 42(93,3) | 2(4,4) | 1(2,3) | - |
| | 6 h | 36(92,3) | 3(7,7) | - | - |
| | 12 h | 85(68,0) | 31(24,8) | 4(3,2) | 5(4,0) |
| | 24 h | 61(81,3) | 9(12,0) | 3(4,0) | 2(2,7) |
| | 30 h | 42(84,0) | 6(12,0) | 1(2,0) | 1(2,0) |
| ACEITE | 4 h | 6(100) | - | - | - |
| MAIZ | 6 h | 14(100) | - | - | - |
| COL | 4 h | 31(86,1) | 5(13,9) | - | - |
| | 6 h | 33(97,1) | 1(2,9) | - | - |
| | 12 h | 7(100) | - | - | - |
| | 24 h | 11(61,1) | 6(33,3) | - | 1(5,6) |
| | 30 h | 6(85,7) | 1(14,3) | - | - |
| SUERO | 12 h | 8(100) | - | - | - |
| FISIOL. | 30 h | 8(100) | - | - | - |

MMS : Metilmetanosulfonato COL : Colchicina
 PMAC: Placas Metafásicas con Aberraciones Cromosómicas

Tabla N°5: Distribución de placas metafásicas según número de cromosomas en ratones tratados y controles

| TRAT. | TIEMPO MUESTREO | HIPOPLOIDIA | | | 2n 40 | HIPERPLOIDIA | |
|---------|-----------------|-------------|-------|-------|----------|--------------|-------|
| | | 31/34 | 35/37 | 38/39 | | 41/42 | 43/79 |
| MMS | 4 h | | | 1 | 398 | 1 | |
| | 6 h | | 1 | 8 | 387 | 4 | |
| | 12 h | | | 2 | 397 | 1 | |
| | 24 h | | | 3 | 396 | 1 | |
| | 30 h | | 1 | 15 | 379 | 5 | |
| ACEITE | 12 h | | | 5 | 394 | 1 | |
| MAIZ | 30 h | | | 4 | 395 | 1 | |
| COL | 4 h | 2 | 3 | 26 | 362 | 8 | 1 |
| | 6 h | 2 | 3 | 24 | 363 | 4 | 1 |
| | 12 h | 1 | 10 | 57 | 318 | 13 | 1 |
| | 24 h | 4 | 18 | 58 | 303 | 13 | 2 |
| | 30 h | 3 | 7 | 47 | 309 | 30 | 1 |
| SUERO | 12 h | | 1 | 11 | 387 | 1 | |
| FISIOL. | 30 h | | | 8 | 391 | 1 | |

MMM : Metilmetanosulfonato

COL : Colchicina

Al graficar las curvas de frecuencia de PMAC y de EPC con MN, a los distintos tiempos de tratamiento, se observa que, en el tratamiento con MMS la frecuencia de PMAC inducidas es siempre superior a la frecuencia de EPC con MN. La frecuencia máxima de PMAC se produce a las 12 hrs de tratamiento, mientras que la de EPC con MN está desplazada en 12 hrs, con un máximo a las 24 hrs de tratamiento (Fig.N°9). En el tratamiento con COL, no se observa un patrón similar, el máximo de PMAC se observa a las 6 hrs, mientras que la curva de EPC con MN no presenta un máximo. A las 12 hrs, ambas curvas se juntan y a las 30

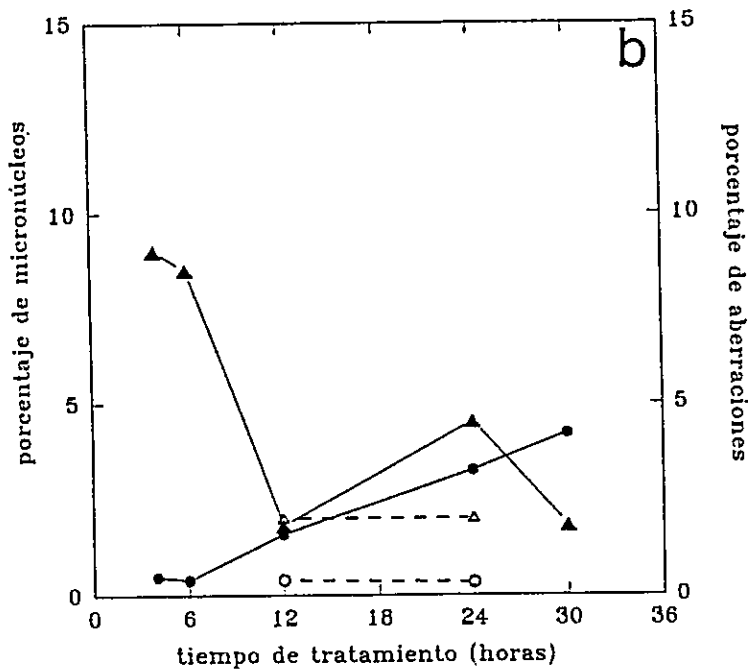
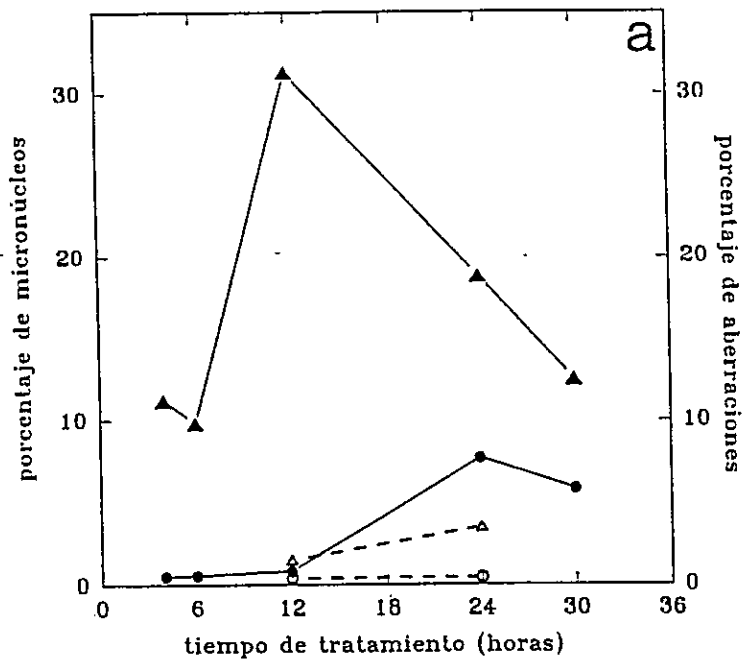


FIGURA N°8: Porcentaje de células con MN (● ○) y aberraciones cromosómicas (▲ △) en ratones tratados (—) y controles (---). A: Tratamiento con MMS, B: Tratamiento con COL.

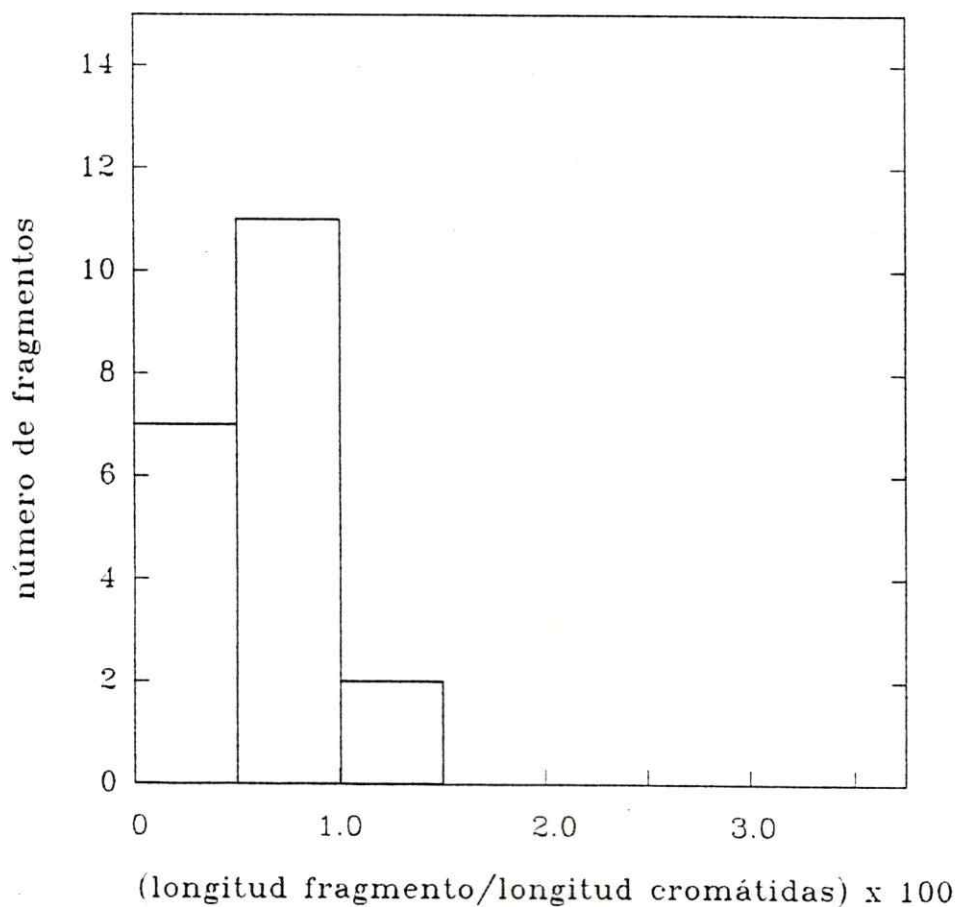


FIGURA N°9: Frecuencia de la distribución del porcentaje que representa el fragmento acéntrico al largo total de las cromátidas, en 20 placas con fracturas de cromátida, de ratones tratados con MMS.

igual a $D/4$.

El diámetro promedio, de 10 núcleos de EOC, fue de $3,12 \pm 0,47 \mu\text{m}$ lo que da un volumen promedio de $15,9 \mu\text{m}^3$. El volumen de los MN inducidos con MMS se distribuyen entre 0,18 - 2,5 % del volumen nuclear, estando el mayor número de ellos entre 0,5 - 1,0 % (Fig.N°10). Esta distribución es muy similar a la encontrada en los MN de los controles, que presentan un rango de 0,18 - 2,17 %, estando la mayoría entre 0,5 - 1,0 % (Fig.N°11) del volumen nuclear. Los MN inducidos con COL, representan un porcentaje mayor del volumen nuclear, con un rango de 1,5 - 35,7 % y con la mayoría distribuidos entre 2 - 6 % (Fig.N°10).

hrs la curva de EPC con MN supera a la de PMAC (Fig.N°8).

Análisis Fotográfico de las Aberraciones Cromosómicas:

En las 20 PMAC, elegidas al azar, de ratones tratados con MMS, se encontró que los FA corresponden a un porcentaje promedio de $0,65 \pm 0,32$ % del largo total de las cromátidas. Los porcentajes se distribuyen en un rango de $0,16 - 1,50$ % , encontrándose el mayor número entre $0,5$ a $1,0$ % (Fig.N°9).

El diámetro promedio de los citoplasmas(D), en los EPC con MN fotografiados , de ratones tratados con MMS, COL y controles, fue de: $3,83 \pm 0,4 \mu\text{m}$, $3,78 \pm 0,67 \mu\text{m}$ y $3,32 \pm 0,22 \mu\text{m}$ respectivamente.

Los MN inducidos con MMS, se distribuyen en un rango de diámetro (d) de $0,13 - 0,78 \mu\text{m}$ con un diámetro promedio de $0,53 \pm 0,14 \mu\text{m}$. Los diámetro de los MN controles se distribuyen entre $0,13 - 0,62 \mu\text{m}$, con un diámetro promedio de $0,56 \pm 0,14 \mu\text{m}$. Los diámetros de los MN inducidos con COL son mayores, con un rango de $0,62 - 1,79 \mu\text{m}$ y un promedio de $1,09 \pm 0,31 \mu\text{m}$.

El cálculo de la relación entre el diámetro del citoplasma (D) y el diámetro del MN (d), muestra que en los MN controles y los inducidos con MMS, el 100 % presentó un diámetro menor a $D/4$. Mientras que en los MN inducidos con COL, el 55% presentó un diámetro mayor o

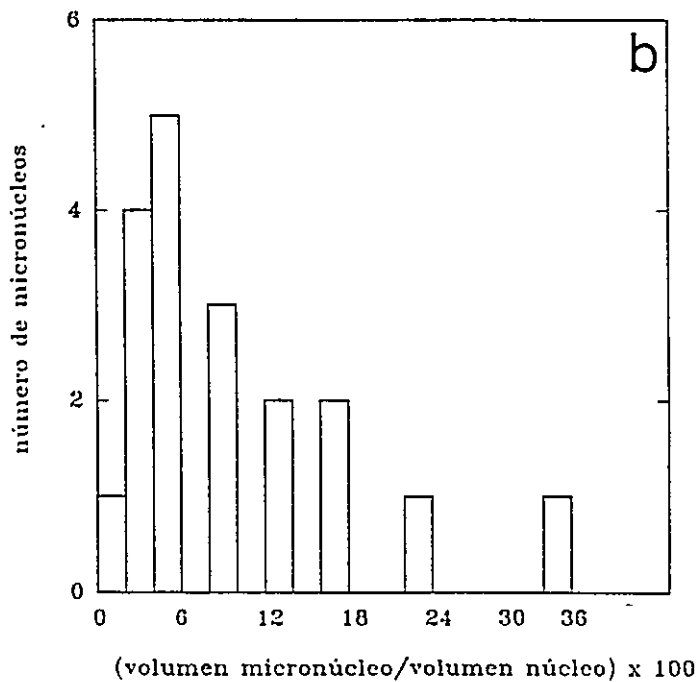
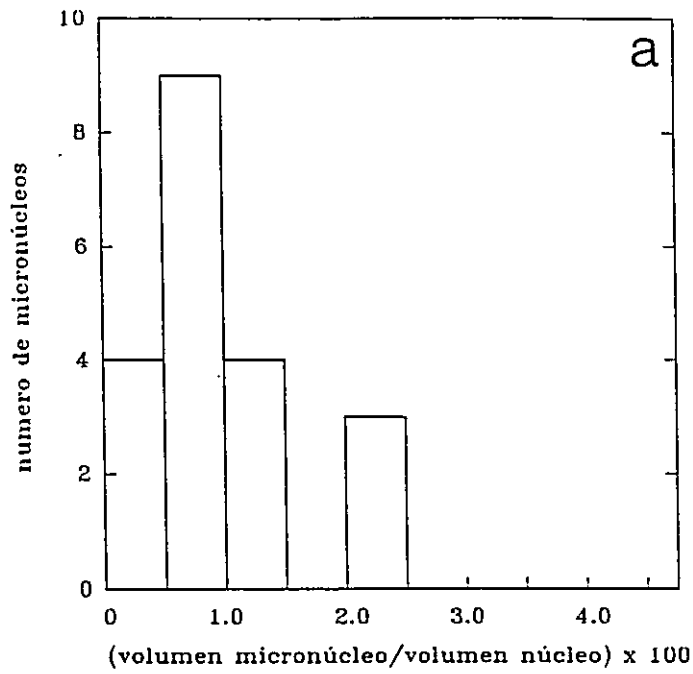


FIGURA N°10: Frecuencia de la distribución del porcentaje que representa el volumen del MN con respecto al volumen nuclear, en 20 MN de ratones tratados con MMS (A) y COL (B).

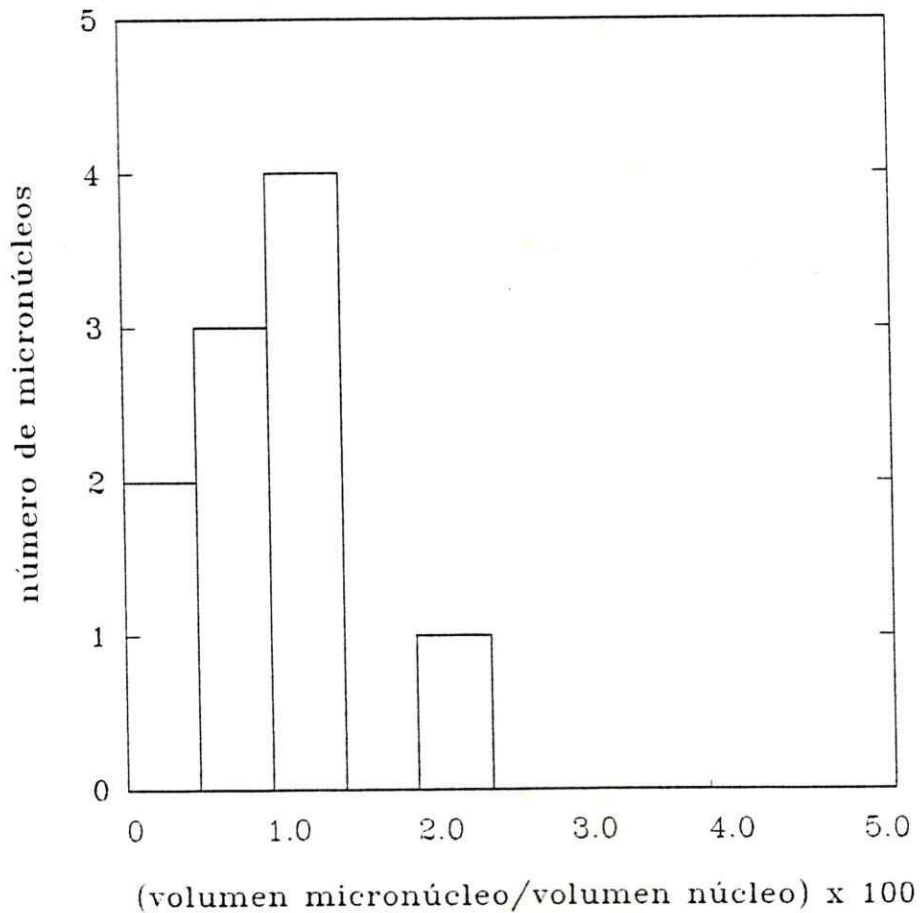


FIGURA N°11: Frecuencia de la distribución del porcentaje que representa el volumen del MN con respecto al volumen nuclear, en 10 MN de ratones controles.

DISCUSION

Los tiempos establecidos para el ciclo celular, en la eritropoyesis de ratón, indican que, desde el último período S hasta la expulsión del núcleo, transcurren entre 10 a 12 horas y que los EPC permanecen en la médula alrededor de 20 a 22 horas. A las 18 horas después de un tratamiento con un compuesto químico, un 50 % de los EPC presentes en la médula, se encontraban en período S al momento del tratamiento. A las 28 horas de tratamiento la población de EPC estará casi completamente constituida por EPC que fueron afectados durante su último período S (Salamone, M. y Heddle, J., 1983).

La mayoría de los compuestos clastógenos actúan durante el período S, de manera que, se sugiere determinar la frecuencia de EPC con MN a las 30 horas post-tratamiento, para tener la seguridad que la población de EPC, que se está analizando, esté mayoritariamente compuesta por células que recibieron el tratamiento durante su último período S (Schmid, W., 1975). Otros autores, han sugerido usar tres tiempos de muestreo, 24, 30 y 48 hrs, para considerar alteraciones en los tiempos del ciclo celular, producto de la posible acción citotóxica inducida por el

compuesto químico (Salamone, M. y Heddle, J., 1983), a pesar que, a las 48 hrs la respuesta, generalmente, es muy baja.

Los resultados obtenidos, en el presente trabajo, se ajustan a lo esperado para un compuesto clastógeno como es MMS (Tabla N°1, Fig. N°5). A tiempos cortos de tratamiento, 4 y 6 hrs, la frecuencia de EPC con MN es similar a la encontrada en los controles, puesto que, los EPC analizados ya eran EPC al momento del tratamiento.

A las 12 hrs, la frecuencia de EPC con MN es significativamente más alta comparada a la encontrada en los controles de este trabajo, sin embargo, si se compara con el valor máximo de EPC con MN que se acepta para controles en ratón, que es de 6% (Salamone, M. y Heddle, J., 1983), la frecuencia observada a las 12 hrs no es significativamente alta.

En los tiempos largos de tratamiento, la frecuencia de EPC con MN es alta, puesto que, la mayoría de los EPC analizados fueron afectados durante su último período S. La frecuencia máxima de EPC con MN se encontró a las 24 hrs de tratamiento, a pesar que, según los tiempos del ciclo celular, se esperaba a las 30 hrs post-tratamiento. Esta diferencia puede explicarse por la citotoxicidad, medida como la relación EPC/ENC, que presenta el grupo de

ratones tratados a 30 hrs. Por efecto citotóxico los EPC pueden haber muerto y, por lo tanto, se ha enmascarado el efecto genotóxico.

Los resultados obtenidos, concuerdan con los informados para otras cepas de ratón, CD-1 y Ms/Ae, en las cuales, la frecuencia máxima de EPC con MN también se produce a las 24 horas post-tratamiento, independiente de la dosis usada. La razón EPC/ENC más baja, también se encuentra a las 30 hrs post-tratamiento (Tsuyoshi, T. y col., 1989).

En los ratones tratados con COL (Tabla N°1, Fig.N°6), se observa que, a tiempos cortos de tratamiento, 4 y 6 hrs, la frecuencia de EPC con MN es similar a la de los controles. A las 12 hrs, hay un aumento significativo de EPC con MN, el que continua en forma progresiva durante los tiempos más largos de tratamiento. A diferencia de lo que ocurre con MMS, no se observa un máximo durante los tiempos de muestreo utilizados, por el contrario, parece haber un efecto acumulativo. No se puede descartar, que el máximo esté en un tiempo de tratamiento más largo ó a las 30 hrs, que fue el último tiempo muestreado. En otras cepas de ratón (CD-1 y MS/Ae) usando la misma dosis y vía de administración, se ha informado que la inducción máxima de EPC micronucleados se produjo a las 24 hrs

después del tratamiento (Asano, N. y col., 1989). Sin embargo, esta diferencia puede deberse a que los autores muestrean a las 24, 48 y 72 hrs post-tratamiento, y es posible que el máximo se encuentre justo a las 30 hrs de tratamiento. La frecuencia de EPC con MN encontrada por estos autores, a las 24 hrs de tratamiento, 3,18 % y 2,3 % para MS/Ae y CD-1, respectivamente, son similares a las encontradas en este trabajo para CF1 (Tabla N°1), de manera que, parece razonable pensar que si hubieran muestreado a las 30 hrs, podrían haber encontrado una frecuencia mayor de EPC con MN, similar a la observada para CF1. Es importante recalcar el valor de realizar las observaciones en el tiempo adecuado.

Se sabe que el ciclo proliferativo del último estadio blástico, demora aproximadamente 10 hrs, estando el 80 % del tiempo ocupado por el período S, y que después de la última división, las células pasan al estadio de EOC, permaneciendo como tales, entre 3 a 10 hrs hasta expulsar el núcleo y convertirse en EPC (Heddle, J. y col., 1983). Como COL actúa durante la mitosis, se eligieron tiempos cortos de tratamiento para contabilizar la frecuencia de EPC con MN. Esta frecuencia no aumenta hasta las 12 hrs de tratamiento, lo que parece sugerir que la permanencia como EOC puede no ser tan corta como el rango

menor informado. Sin embargo, se debe tener en cuenta, que COL induce arresto mitótico, el que puede explicar el retraso en el aumento de la frecuencia de EPC con MN, independiente de la duración del estadio de EOC.

Al comparar las frecuencias de EPC con MN, inducidas por MMS y COL (Fig.5), se observa que sólo a las 12 hrs de tratamiento la frecuencia inducida por COL supera, en forma significativa ($p < 0,001$), a la inducida por MMS. Mientras que, a 24 y 30 hrs sucede lo contrario, aún cuando, a las 30 hrs la diferencia no es significativa. De acuerdo a estos resultados, no existe un tiempo de tratamiento en que se pueda discriminar, inequívocamente, el efecto clastógeno del aneunógeno. Se esperaba que a tiempos cortos de tratamiento, la inducción de EPC con MN fuera significativamente mayor en los ratones tratados con COL. Si bien es cierto, esta diferencia se observa a las 12 hrs de tratamiento, la frecuencia inducida por MMS también es significativamente mayor que la del control correspondiente.

Con los resultados obtenidos, sólo se puede sugerir que al evaluar, con el ensayo de Micronúcleos, una sustancia química de acción desconocida, además de usar los tiempos de tratamiento recomendados para la acción

clatogénica se incluyan las 12 hrs de tratamiento, y que los resultados obtenidos sean comparados con los de algún compuesto de conocida acción clatogénica usado como control positivo, puesto que al observar ambos efectos simultáneamente las 12 hrs es un tiempo discriminante.

Tradicionalmente, se ha supuesto que los MN inducidos con compuestos clatogénicos, por ser producto de fragmentos acéntricos, son de tamaño pequeño, mientras que los inducidos con aneunógenos, por ser el resultado de cromosomas enteros, son de mayor tamaño.

De la sola observación, de los diámetros promedio de los MN, obtenidos en los diferentes grupos de tratamiento, se desprende que, los MN inducidos con COL tienen un diámetro promedio ($1,09 \pm 0,13$) que representa el doble que los MN inducidos con MMS ($0,53 \pm 0,14$) y que los MN de los controles ($0,56 \pm 0,14$).

Algunos autores, han sugerido usar como criterio, para diferenciar entre MN grandes y pequeños, la relación entre el diámetro del MN (d) y el diámetro del citoplasma (D). Si d es mayor o igual a $D/4$ se considera un MN grande (Yamamoto, K. y Kikuchi, Y., 1980). Usando este mismo criterio, los resultados de este trabajo, muestran que tanto los MN encontrados en el tratamiento con MMS

como en los controles, son pequeños ($100 \% d < D/4$), mientras que en los MN inducidos con COL un 55 % presentó un diámetro igual o mayor que $D/4$. Esta observación concuerda con el rango de porcentajes informados para 6 agentes clastógenos (0-2 %) y 4 agentes aneunógenos (44-74 %). Para COL, se ha informado que un 54 % de los MN presentaron un diámetro mayor o igual que $D/4$ (Yamamoto, K. y Kikuchi, Y., 1980), porcentaje concordante con el que se encontró en el presente trabajo.

A partir de estos resultados, se puede concluir que el tamaño de los MN es, efectivamente, un parámetro adecuado para diferenciar MN inducidos por compuestos clastógenos o aneunógenos. Y que la sola observación microscópica de la relación entre el diámetro del MN y el diámetro del citoplasma, es suficiente para diferenciar entre MN grandes y pequeños.

Si la diferencia en el tamaño de los MN se debe al origen de éstos, fragmentos acéntricos para los agentes clastógenos y cromosomas enteros para los aneunógenos, se esperaba encontrar alguna relación entre el tipo de lesiones observadas en el ensayo Citogenético y la frecuencia y tamaño de los MN resultantes.

En los ratones tratados con MMS, el mayor número de

PMAC se produce a las 12 hrs de tratamiento (Tabla N°1, Fig.N°6). Se observa un desplazamiento de 12 hrs, entre el máximo de PMAC y el máximo de EPC con MN inducidos (Fig.N°8). Este desplazamiento, significa que las células que fueron afectadas durante el último período S, a las 12 hrs se encuentran en metafase y el daño inducido puede evaluarse con PMAC, mientras que 12 hrs después, se encuentran como EPC y el daño se evidencia como frecuencia de EPC con MN. Con otros agentes clastógenos, como Mitomicina-C y 6-Mercaptopurina, también se ha informado de un desplazamiento de 12 hrs entre las frecuencias máximas de inducción de aberraciones cromosómicas y de MN (Hayashi, M. y col., 1984)

Dentro de los tipos de lesiones observadas, la más frecuente, en el tratamiento con MMS, es la fractura de cromátida (FC) con el fragmento acéntrico presente (+FA) (Tabla N°2). Normalmente, la fractura se produjo en posición distal o medial con respecto al centrómero (Tabla N°2), originando, por lo tanto, FA pequeños. La medición del largo de los FA y el largo total de las cromátidas, en las placas metafásicas respectivas, muestra que la mayoría de los FA corresponden a sólo un 0,5 a 1,0 % del largo total (Fig. N°9), demostrando que efectivamente son pequeños. Un porcentaje similar se

encontró al medir el porcentaje que representa el volumen de los MN con respecto al volumen nuclear, donde la mayoría de los MN inducidos con MMS se distribuyen entre 0,5 a 1,0 % (Fig.N°10). Esta correlación demuestra que los MN inducidos con el agente clastógeno son producto de los FA inducidos.

Otros autores, han encontrado una correlación entre los porcentajes de los FA, con respecto al largo total de las cromátidas, y el porcentaje que representa el contenido de DNA de los MN con respecto al contenido de DNA nuclear (2c), usando Arabinofuranocilcitosina, se ha encontrado que la mayoría, de los FA y los MN inducidos, se distribuyen entre 1,0 a 1,5 % (Hayashi,M.,y col.,1984). La correlación en los porcentajes que representan FA y MN, demuestra que la medición de los volúmenes de los MN y los núcleos, es un criterio adecuado, puesto que es similar a la obtenida haciendo mediciones de contenido de DNA.

La correlación, entre tamaño de FA y volumen o contenido de DNA de los MN, sugiere que cada MN es producto de un solo FA y que difícilmente dos o más FA se fusionarán para producir MN grandes, como han sugerido algunos autores tratando de invalidar el criterio del tamaño del MN para diferenciar entre efecto clastógeno o

aneunógeno (Cimino, M. y col., 1986). Otra evidencia, que apoya la no fusión de los FA, es la correlación observada entre el número de aberraciones cromosómicas y el número de MN por célula. EL porcentaje de células con más de una aberración cromosómica es mayor a las 12 hrs post-tratamiento (Tabla N°4). Exactamente, 12 hrs después, se observa el máximo de EPC con MN (Tabla N°1), coincidiendo con los tiempos del ciclo celular. De manera que, si una célula posee más de un FA y si ambos pasan a una misma célula hija, éstos no se fusionan, sino que, cada uno se expresará como un sólo MN.

A pesar de , la relación temporal entre aberraciones cromosómicas y MN, la frecuencia de aberraciones observada es mayor que la de MN (Fig.N°8). En el campo teórico, se ha planteado que existe una gran disparidad en la tasa $R = MN$ en célula hija / FA en célula parental (Savage, J., 1988). El modelo teórico, que permite explicar esta disparidad, se basa en que si una célula tiene un sólo FA, cuando esta célula se divide el FA pasará a una sola célula hija, pudiendo quedar incluido o excluido del núcleo, solamente en este último caso formará un MN. Por lo tanto, la frecuencia de MN/célula será una función de la probabilidad de que el FA quede incluido en el núcleo (P_1). La frecuencia será máxima, cuando $P_1=0$, sin embargo

normalmente, $P_1 > 0$, de manera que, teóricamente, se espera una relación MN/FA de 1/3 a 1/4 ó menos. El cálculo de la relación MN/FA con la máxima frecuencia de MN (7,67 %), encontrada a 24 hrs de tratamiento con MMS, y la máxima frecuencia de células con aberraciones (31,3 %), a las 12 hrs de tratamiento, da una razón MN/PMAC de 1/4. Si sólo se consideran las lesiones que producen, sin ningún tipo de dudas, fragmentos acéntricos, como son : FC, FI y FA, el porcentaje de células con estas aberraciones es de 22,75 % a las 12 hrs, y la relación MN/FA baja a 1/3. En ambos casos, el valor calculado está dentro de lo esperado en el modelo teórico y, experimentalmente, reafirma la idea, que una gran proporción de los FA inducidos con un agente clastógeno, quedan incluidos en el núcleo de las células hijas y no llegan a constituir MN.

Otro factor a considerar, que influiría en la discrepancia entre FA por célula parental y MN por células hijas, es el desplazamiento en el tiempo entre la determinación de la frecuencia de FA y de MN. Savage (1989) hizo una simulación computacional de las curvas esperadas, para las frecuencias de FA y MN por célula, con respecto al tiempo, suponiendo varias condiciones ideales. Entre ellas, que las células en que se encuentran los MN son poblaciones puras, producto de una sola división

después del tratamiento, y que cada FA segrega en forma independiente , con una probabilidad constante de exclusión del núcleo. Es interesante destacar, que las curvas, que este autor obtiene, para un compuesto S dependiente, coinciden con las curvas observadas en el tratamiento con MMS. Estos resultados, demuestran experimentalmente, que la población de EPC analizados se ajusta a las condiciones ideales propuestas , y que los MN inducidos son efectivamente producto de un solo FA, los cuales, segregan en forma independiente. Cabe hacer notar, que éste es el único trabajo experimental que apoya el modelo teórico de Savage.

Los MN encontrados en los ratones controles, son similares a los inducidos con MMS, con respecto al tamaño ($100 \% d \leq D/4$) y la distribución porcentual en relación al volumen nuclear (Fig.N°10 y Fig.N°11). Estos resultados indican que, los MN encontrados en los controles deben ser, al igual que los inducidos con MMS, producto de FA. Estudios recientes, en pacientes que presentan una elevada tasa espontánea de fibroblastos con MN, han demostrado que estos MN son producto de FA, puesto que no se detecta centrómero usando anticuerpos anti-cinetocoro (Kratohvil, M. y col., 1991).

Los resultados obtenidos con COL, no se ajustan a la

suposición que los MN son producto de FA. Son MN más grandes (55 % con $d \geq D/4$) y el porcentaje que representan del volumen nuclear es mayor que el encontrado en los inducidos con MMS o controles (Fig.N°10). Las curvas de frecuencia de aberraciones cromosómicas y de EPC con MN no muestran un patrón definido, no se observa correlación entre FA y MN (Fig.N°8) y no se ajustan al modelo teórico de Savage (1989).

El ensayo Citogenético, muestra importantes diferencias entre los ratones tratados con MMS y COL. La frecuencia de PMAC es, para todos los tiempos de tratamiento, significativamente superior en los ratones tratados con MMS (Tabla N°2, Fig.N°6), al igual que el número de aberraciones por célula (Tabla N°4). Además del número de aberraciones, también hay diferencias en el tipo de lesiones presente (Tabla N°3).

Para los ratones tratados con MMS, las aberraciones más frecuentes son las FC y GC (Fig.N°7), ambos tipos tienen un comportamiento opuesto con respecto al tiempo mientras las FC aumentan los GC decrecen (Fig.N°7).

Los gaps están definidos como lesiones acromáticas de naturaleza desconocida. El procedimiento recomendado para el ensayo Citogenético, indica que no deben ser incluidos

en la cuantificación de aberraciones cromosómicas (Preston, J., 1987). Sin embargo, algunos autores han indicado que, al hacer simulaciones computacionales de la respuesta de MN inducidos a partir de células con aberraciones cromosómicas, éstas no tienen una correlación adecuada a menos que se incluyan los gaps inducidos (Hayashi, M. y col., 1984). El problema parece radicar en el criterio existente para clasificar las lesiones como gaps; por convención, cualquier región cromosómica no-teñida, que no pierda el eje de la cromátida, se debe clasificar como gap. Este criterio no asegura, que realmente exista una continuidad entre los dos trozos separados por la región acromática, ó si dicha continuidad existe, que las fibras de cromatina sean tan frágiles que se rompan durante la migración de los cromosomas, dando lugar a la formación de FA.

El que la frecuencia de gaps, encontradas en el tratamiento con MMS, sea superior a las 4 y 6 hrs post-tratamiento, indica que fueron inducidos durante G_2 y principios de M. Estos resultados coinciden con los encontrados en tratamientos con radiaciones ionizantes, donde la frecuencia de gaps inducidos es superior cuando el tratamiento es aplicado durante G_2 tardío y profase temprana (Savage, J., 1976).

Las aberraciones de tipo isocromátida, son menos frecuentes en todos los tiempos de tratamiento con MMS (Tabla N°3 y Fig.N°7). Se esperaba un resultado como éste, puesto que los compuestos clastógenos que actúan durante o después del período S, no inducen una alta frecuencia de aberraciones del tipo cromosoma, a diferencia de aquellos compuestos que actúan antes del período S, como por ejemplo, las radiaciones ionizantes (Savage, J., 1976).

Con respecto a la presencia de FA no asociados a una fractura, presente en las placas metafásicas de ratones tratados con MMS, éstos son más frecuentes a las 24 hrs de tratamiento (Tabla N°3 y Fig.N°7). Si consideramos que la mayoría de estas células fueron afectadas 24 hrs antes y, que según los tiempos del ciclo celular están en su segunda metafase posterior al tratamiento, estos FA observados son la consecuencia de las FC inducidas durante el período S. Esta conclusión es coincidente con el hecho que a las 24 y 30 hrs se encuentra el mayor número de FC sin el FA presente (Tabla N°2). Sin embargo, la frecuencia de FA, a 24 hrs de tratamiento, es varias veces menor que la de FC a 12 hrs de tratamiento. Esta diferencia, podría explicarse, suponiendo que muchas células con FC, especialmente aquellas que tienen más de

una, mueren antes de llegar a la segunda división mitótica puesto que las células con más de un FA fueron extraordinariamente escasas, indicando inviabilidad de las células portadoras de muchas lesiones cromosómicas.

Las lesiones de tipo intercambio, fueron muy pocas, sólo se encontraron en un ratón de los tratados con MMS durante 24 hrs, y por lo tanto, no fueron incluídas en el análisis de los resultados. La falta de intercambios, lleva a pensar en los dos modelos que existen para explicar las fracturas cromosómicas. El primero de ellos, denominado "Clásico o de Quiebre y Unión", propuesto por Sax en 1938 (citado en : Savage, J., 1976), postula que, a partir de una lesión primaria, que para compuestos como MMS será una alquilación, se producirán fracturas cromosómicas, que en un 90% de los casos podrán ser reparadas, si no lo son, conducirán a intercambios o permanecerán como tales.

El segundo modelo, llamado "de Intercambio", propuesto por Revell en 1959 (citado en : Savage, J., 1976), plantea que, las fracturas cromosómicas son un suceso secundario, producto de un intercambio, el cual a su vez es producto de la lesión primaria inducida.

Hay evidencias experimentales que apoyan uno u otro modelo (Savage, J., 1976). Los resultados encontrados en

este trabajo concuerdan con el modelo de "quiebre y unión", puesto que la frecuencia de fracturas cromosómicas es varias veces superior a la de intercambios y, además, éstos se observan solamente a tiempos largos de tratamiento, indicando que es necesario que la célula pase por un ciclo celular, para que se manifieste este tipo de lesión. Aquellas células, en que el MMS actuó durante su último período S (12 hrs de tratamiento), sólo presentan fracturas, mientras que, en aquellas en que el daño fue inducido en el período S del ciclo anterior (24 hrs de tratamiento) además de fracturas presentan intercambios. Si los intercambios fueran una lesión previa a las fracturas se hubieran encontrado en mayor frecuencia y a partir de las 12 hrs de tratamiento.

La última de las aberraciones analizadas, fueron las STC. En los ratones tratados con MMS y en los controles, la incidencia de STC es muy baja en el total de aberraciones encontradas (Tabla N°3). Sin embargo, en los ratones tratados con COL, en todos los tiempos de tratamiento, más del 60 % del total de aberraciones encontradas corresponden a STC (Tabla N°3 y Fig.N°7). De manera que la frecuencia de PMAC esta casi en su totalidad constituida por células con STC, siendo superior a 4, 6 y 24 hrs post-tratamiento.

Se sabe que los cromosomas no se separan al azar sino que secuencialmente. El momento de separación de los centrómeros, parece estar determinado por la cantidad y calidad de la heterocromatina paracentromérica constitutiva propia de cada cromosoma. Aquellos cromosomas que tienen poca heterocromatina son los que se separan más tempranamente. Por ejemplo, el cromosoma Y de ratón, que no tiene heterocromatina centromérica detectable, es el primer cromosoma en separarse durante la mitosis (Vig, B., 1984).

Si los centrómeros se separan más temprano de lo que les corresponde durante meta-anafase de la mitosis, el centrómero puede no estar suficientemente maduro para unirse a las fibras del huso. Hay evidencias, que los centrómeros que se han separado antes de la formación del huso mitótico, son incapaces de unirse a las fibras del huso (Vig, B., 1984).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que, con COL se induce un alta frecuencia de STC detectadas durante la metafase. Generalmente se observaron placas con, solamente, uno o dos pares de cromosomas cuyos centrómeros se separaron tempranamente. De acuerdo a la hipótesis de Vig, estos cromosomas pueden ser los que normalmente se

separan más temprano durante la meta-anafase. Con el tratamiento de COL, se produce un arresto mitótico durante la metafase, por la no formación del huso, sin embargo, es probable que los cromosomas continúen con su patrón característico de separación de las cromátidas, observándose como una separación temprana de éstas. Como esta separación de las cromátidas se está produciendo antes de la formación del huso, según lo propuesto por Vig, cuando pasa el efecto de COL y los microtúbulos pueden ensamblarse para formar el huso mitótico, los centrómeros de los cromosomas que se separaron, no están lo suficientemente maduros para unir las fibras del huso. Como consecuencia, estos cromosomas quedarán a la deriva, durante la migración de los cromosomas a los polos de la célula, y podrán pasar a constituir MN.

Trabajos en Vicia faba, muestran que en tratamientos con COL, los MN derivan en su mayoría de cromátidas, que pueden replicar antes que la célula entre en mitosis y proseguir con una condensación sincrónica con el núcleo, llegando incluso a reincorporarse a éste en la siguiente división celular (Gustavino, B. y col., 1987, Rizzoni, M. y col., 1989).

La mejor evidencia de que los MN están constituidos

por cromosomas enteros es la detección de la presencia de centrómero. Algunos autores, han informado que la técnica de Bando C les ha resultado muy exitosa en MN de ratón, y por lo tanto "métodos más elaborados no son necesarios"(Verschaeve,L. y col.,1988). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran lo contrario, puesto que no fue posible evidenciar centómeros en los MN con la técnica de Bando C , tanto usando el procedimiento descrito por los autores antes mencionados, como haciendo algunas modificaciones. A pesar de este resultado negativo, la técnica funcionó adecuadamente en las preparaciones de cromosomas. El Bando C está relacionado con extracción de DNA durante el procedimiento, de manera que, donde no hay extracción hay tinción con Giemsa y se observa como una banda C. En la heterocromatina centromérica hay mayor resistencia a la extracción de DNA por la presencia de DNA satélite altamente repetido (Comings,D.,1978). La identificación de heterocromatina centromérica por la técnica de Bando C, parece estar relacionada con la organización de la cromatina, pudiendo identificarse en cromosomas , pero no así en MN. Puede ser probable que los MN de ratón, sigan un patrón de condensación de la cromatina sincrónico con el núcleo de la célula, tal como

ha sido observado en Vicia faba (Gustavino, V. y col., 1987 y Rizzoni, M. y col., 1989), en tal caso, la cromatina está altamente condensada, puesto que los núcleos de los eritrocitos, antes de ser expulsados, se observan con su cromatina en un grado de condensación máximo y uniformemente teñidos después del procedimiento de Bando C, a diferencia de los núcleos de los tipos celulares de la línea blanca, en los cuales si se observaron zonas de heterocromatina fuertemente teñidas, diferencias debidas a los diferentes patrones de condensación a nivel de las distintas poblaciones celulares.

Además de la condensación de la cromatina, si se asume la explicación de que los MN inducidos con COL son producto de la separación temprana de las cromátidas, y que esta separación temprana se produjo, preferentemente, en aquellos cromosomas que normalmente se separan más temprano, los cuales poseen menor cantidad de heterocromatina paracentromérica (Vig, B., 1984), es más difícil aún, obtener una buena resolución de la presencia de centrómero en los MN grandes mediante la técnica de Bando C.

De cuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir que, el procedimiento de Bando C no es

discriminante para la identificación de centrómeros en los MN, a lo menos en esta cepa de ratón. Por lo tanto se sugiere, para tener certeza en la identificación del centrómero, utilizar una técnica más exacta, basada en la presencia de anticuerpos anti-cinetocoro en el suero de pacientes con el Síndrome Escleroderma "CREST", él cual tiene alta afinidad con el centrómero y ha dado buenos resultados en la identificación de éstos en los MN (Eastmond,D. y Tucker,J.,1989 , Gudi,R. y col.,1990 , Katrochvil,M. y col.,1991).

Si bien, la identificación de la presencia de centrómero en los MN, es la evidencia más directa que éstos están constituidos por cromosomas enteros y que, por lo tanto, son producto de un efecto aneunógeno. Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que no es estrictamente necesario contar con esta evidencia para evaluar efecto aneunógeno con el ensayo de Micronúcleos, puesto que el tamaño de los MN inducidos, es criterio suficiente para discriminar entre efecto clastógeno y aneunógeno.

Se ha propuesto, que la separación de las cromátidas fuera de fase durante meta-anafase de la mitosis, es decir, antes o después del momento en que les corresponde

separase, puede traducirse en aneuploidias (Vig, B., 1984 , Galloway, S. e Ivett, J., 1986 , Bond, B., 1986). Los resultados encontrados en este trabajo, coinciden con esta proposición. En el recuento de cromosomas (Tabla N°5), se observa un aumento de células con hipo e hiperploidias, en los ratones tratados con COL, principalmente a las 24 y 30 hrs post-tratamiento. Trabajos usando BrdU, han mostrado que, a 18 hrs post-tratamiento hay un 90 % de metafases segundas (Manca, A. y col., 1990), y a 30 hrs post-tratamiento hay metafases segundas y terceras con respecto a la mitosis en que fue inducido el daño (Gustavino, B. y col., 1991). De acuerdo a los resultados obtenidos, las STC inducidas en la primera mitosis afectada por COL (4 y 6 hrs de tratamiento) se traducen en aneuploidias en la segunda división celular (24 y 30 hrs de tratamiento)

Se ha sugerido, para la evaluación de aneuploidias inducidas, contabilizar solamente las hiperploidias, ya que las hipoploidias pueden ser producidas por la metodología utilizada en el proceso de obtención de cromosomas (Galloway, S. e Ivett, J., 1986). Los resultados obtenidos, muestran que , bajo el procedimiento experimental aquí usado, tanto las hiper como las hipoploidias son buenos indicadores de efecto aneunógeno.

A pesar que las hipoploidias encontradas en los ratones tratados con MMS y los controles, son mayores que las hiperploidias encontradas en estos grupos, las hipoploidias inducidas con COL son varias veces superiores que éstas, al igual que las hiperploidias (Tabla N°5). Además de diferencias en el número total de placas con aneuploidias, también se observa, que en el tratamiento con COL hay una mayor dispersión en el número de cromosomas que se pierden o ganan, con respecto al tratamiento con MMS o los controles (Tabla N°5).

Si bien, los dos compuestos químicos elegidos, son representativos de efecto clastógeno y aneunógeno, no cabe duda que, se requiere usar un mayor número de compuestos químicos, con variados mecanismos de acción, para hacer recomendaciones generales en el uso de ambos ensayos genotóxicos. Sin embargo, con los resultados obtenidos en este trabajo, sí se puede concluir que ambos ensayos, Citogenético y de Micronúcleos, son adecuados para la evaluación de efecto aneunógeno inducido por agentes químicos, y que los parámetros indicadores de efecto clastógeno ó aneunógeno son los siguientes:

1.- TIEMPO DE TRATAMIENTO:

En el ensayo de Micronúcleos, no se encontró un

tiempo de tratamiento absolutamente discriminante entre ambos efectos. Sin embargo, a 12 hrs de tratamiento, tiempo que generalmente no se evalúa en este ensayo (Mavournin, K. y col., 1990), se observó que la frecuencia de EPC con MN es significativamente superior ($p < 0,001$) en los ratones tratados con el aneunógeno en comparación a los tratados con el clastógeno. De manera, que este tiempo de tratamiento, podría ser usado como un indicador de efecto aneunógeno, siempre y cuando, la frecuencia de EPC con MN inducida se compare con la inducida con un clastógeno de acción conocida.

En el ensayo Citogenético, tal como se sugiere en la literatura, las 12 hrs de tratamiento es el mejor tiempo para evidenciar efecto clastógeno (Preston, J. y col., 1987). Mientras que, el efecto aneunógeno, se puede reconocer a tiempos largos de tratamiento, medido como inducción de aneuploidias, criterio que tradicionalmente se ha recomendado para su evaluación (Dellarco, V. y col, 1986), pero además, de acuerdo a los resultados obtenidos, a tiempos cortos de tratamiento, como son las 6 hrs, evaluado como separación temprana de las cromátidas, lo que representa una ventaja, puesto que la evaluación puede ser más rápida.

2.- TAMANO DE LOS MICRONUCLEOS:

Los resultados obtenidos, muestran que , los MN inducidos con el agente aneunógeno son de mayor tamaño que los inducidos por el agente clastógeno y los MN controles. De manera que, el parámetro tamaño de los MN, es efectivamente, un parámetro discriminante entre ambos efectos. Los MN inducidos por el agente clastógeno, son producto de fragmentos acéntricos, y los resultados demuestran que, cada fragmento se comporta en forma independiente y constituye un MN, de manera que dos ó más FA no se fusionan y, por lo tanto, no producen MN grandes.

Los MN inducidos con el agente aneunógeno, son producto de cromátidas que se separan antes de la formación del huso mitótico y que quedan a la deriva durante la migración de los cromosomas, por lo tanto , éstos MN son de mayor tamaño

El criterio propuesto para diferenciar los MN grandes, la relación entre el diámetro del MN (d) y el diámetro del citoplasma del EPC (D), es adecuado, de manera que, si d es mayor o igual a $D/4$ el MN es grande.

3.- TIPOS DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS INDUCIDAS:

El análisis de las aberraciones cromosómicas estructurales, inducidas en el ensayo Citogenético,

muestran que , hay lesiones características para ambos tipos de compuestos. Como se esperaba, las fracturas cromosómicas, especialmente las de tipo cromátida, caracterizan la acción del clastógeno. Más importante que éste resultado, es el observado en el tratamiento con el aneunógeno, donde la aberración característica es la separación temprana de las cromátidas. Este tipo de aberración, no se considera en el análisis clásico de los resultados obtenidos con el ensayo Citogenético (Preston, J., y col.,1987), sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, deberían ser consideradas para poder evaluar efecto aneunógeno de compuestos químicos.

Además de las aberraciones estructurales, las aberraciones numéricas también aparecen como variable discriminante. La inducción de aneuploidias es evidencia de efecto aneunógeno, sin embargo, las aberraciones numéricas, no han sido incluidas en el ensayo Citogenético clásico (Preston,J. y col.,1987). Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que es necesario incluir las hipo e hiperploidades para utilizar el ensayo Citogenético en la evaluación de efecto aneunógeno.

Considerando, las variables discriminantes para efecto clastógeno y aneunogeno, en los ensayos Citogenético y de

Micronúcleos, ambos ensayos pueden ser utilizados, para evaluar los dos tipos de efecto para un mismo compuesto químico, según las siguientes sugerencias:

1.- El ensayo de Micronúcleos se debe realizar con un tiempo más de los sugeridos para evaluar agentes clastógenos. Para clastógenos, se sugieren 24, 30 y 48 hrs de tratamiento, se debe agregar las 12 hrs de tratamiento para evaluar un posible efecto aneunógeno.

2.- Al contabilizar los EPC con MN, se debe evaluar el tamaño de los MN encontrados, para clasificarlos como grandes ó pequeños. El criterio sugerido para la clasificación, es que si el diámetro del MN corresponde a $1/4$ ó más del diámetro del citoplasma del EPC, se considera un MN grande. Si más del 5 % de los MN son de este tipo, se trataría de un efecto aneunógeno.

3.- Se sugiere fotografiar, un mínimo de 20 EPC con MN, elegidos al azar, y hacer las mediciones correspondientes en caso que resulte difícil la clasificación por tamaño a través de observación microscópica.

4.- En el ensayo Citogenético, además de las 12 hrs de tratamiento, tiempo tradicionalmente sugerido para evaluar efecto clastógeno, se deben hacer tratamientos de 6 y 30 hrs para evaluar un posible efecto aneunógeno.

5.- En el análisis de aberraciones cromosómicas, además de las aberraciones estructurales típicas de la acción clastogénica, como son, fracturas, gaps, fragmentos acéntricos e intercambios. Se debe incluir, la separación temprana de las cromátidas y aberraciones numéricas (tanto hipo como hiperploidades), como indicadores de efecto aneunógeno. Se incluyen las hipoploidades, ya que con el procedimiento utilizado se descartan las producidas por problemas de técnicas al hacer las comparaciones correspondientes con los controles.

6.- Por último, considerando la metodología utilizada en este trabajo, es evidente que ambos ensayos pueden realizarse en un mismo ratón, procedimiento que daría un margen mayor de seguridad para la evaluación de agentes genotóxicos. Por lo tanto se sugiere, que al evaluar un compuesto químico de acción desconocida, los ratones tratados con él, sean procesados para ambos ensayos a las 6, 12 y 30 hrs post-tratamiento, y se utilicen los criterios antes descritos para determinar si presenta efecto clastógeno ó aneunógeno.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ALLEN, J.W., LIANG, J.C., CARRANO, A.V. y PRESTON, R.J. (1986) "Review of literature on chemical-induced aneuploidy in mammalian male germ cell" Mutation Res. 167: 123-137.
- 2.- AMPHLETT, G.E. y DELOW, G.F. (1984) "Statistical analysis of the micronucleus test" Mutation Res. 128: 161-166.
- 3.- ASANO, N., MORITA, T. y WATANABE, Y. (1989) "Micronucleus test with colchicine given by intraperitoneal injection and oral gavage" Mutation Res. 223: 391-394
- 4.- ATHWAL, R.S. y SANDHU, S.S. (1985) "Line of human x mouse hibrid cell line to detect aneuploidy induced by environmental chemicals" Mutation Res. 149: 73-81.
- 5.- BASLER, A. (1986) "Aneuploidy-inducing chemicals in yeast evaluated by the micronucleus test" Mutation Res. 174: 11-13.
- 6.- BOND, D.J. (1987) "Mechanisms of aneuploidy induction" Mutation Res. 181: 257-266.

- 7.- CATTANACH, B.M., APPWORTH, D. y KIRK, M. (1984) "Genetic tests for autosomal non-disjunction and chromosome loss in mice" Mutation Res. 126: 189-204.
- 8.- CIMININO, M.C., TICE, R. y LIANG, J.C. (1986) "Aneuploidy in mammalian somatic cells in vivo" Mutation Res. 167: 107-122.
- 9.- COMMINGS, D.E. (1978) "Mechanisms of chromosome banding and implication for chromosome structure" Ann. Rev. Genet. 12: 25-46.
- 10.- DELLARCO, V.L., MAVOURNIN, K.H. y WATERS, M.D. (1986) "Aneuploidy Data Review Committee: Summary compilation of chemical data base and evaluation of test methodology" Mutation Res. 167: 149-169.
- 11.- EASTMOND, D.A. y TUCKER, J.D. (1989) "Kinetochore localization in micronucleated cytokinesis-blocked chinese hamster ovary cells: A new and rapid assay for identifying aneuploidy-inducing agents" Mutation Res. 224: 517-525
- 12.- FENECH, M. y MORLEY, A.A. (1985) "The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei" Mutation Res. 148: 99-105

- 13.- GALLOWAY, S.M e IVETT, J.L. (1986) "Chemically induced aneuploidy in mammalian cells in culture" Mutation Res. 167: 89-105
- 14.- GHASKADBI, S. y VAIDYA, V.E. (1991) "Studies on modulation of the effects of colchicine by L-cysteine using bone marrow of Swiss mice" Mutation Res. 260: 181-185
- 15.- GUDI, R., SANDHU, S.S. y ATWAL, R.S. (1990) "Kinetochore identification in micronuclei in mouse bone marrow erythrocytes: An assay for the detection of aneuploidy-inducing agents" Mutation Res. 234: 263-268
- 16.- GUSTAVINO, B., VITAGLIANO, E., SOTTILI, A. Y RIZZONI, M (1987) "A comparison between short-term evolution of micronuclei induced by X-rays and colchicine in root tips of Vici faba" Mutation Res. 192: 109-119
- 17.- GUSTAVINO, B., BASSANI, B. y PACCHIEROTTI, F. (1991) "Vinblastine-induced numerical chromosome changes and selection processes in mouse bone marrow cell" Mutation Res. 248: 45-50
- 18.- HAYASHI, M., SOFUNI, T. e ISHIDATE, M. (1984) (a) "A pilot experiment for the micronucleus test. The

multi-sampling at multi-dose level method" Mutation Res. 141: 165-169

- 19.- HAYASHI, M., SOFUNI, T. e ISHIDATE, M. (1984) (b) "Kinetics of micronucleus formation in relation to chromosomal aberrations in mouse bone marrow" Mutation Res., 127: 129-137
- 20.- HEDDLE, J.A., HITE, M., KIRKHART, B., MAVOURNIN, K., MCGREGOR, J.T., NEWELL, E.W. y SALAMONE, M.F. (1983) "The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program" Mutation Res. 123: 61-118
- 21.- KAUFER, E., SCOTT, B.R y KAPPAS, A. (1986) "Systems and results of test for chemical induction of mitotic missegregation of aneuploidy in Aspergillus nidulans" Mutation Res. 167: 9-34
- 22.- KRATOCHVIL, M., RUMMELEIN, B., REIMERS, U., EHLERT, U., WEICHTAL, M., MENSING, H., BREITBART, E.W. y RUDIGER, H.W. (1991) "Constitutively increased micronuclei are predominantly caused by acentric fragments" Mutation Res. 249: 223-226

- 23.- KONDO,S. (1982) "Comparative mutagenesis of Methyl Methanesulfonate and Ethyl Methanosulfonate" en "Comparative Chemical Mutagenesis" Editado por: F.J de Serres y M.D.Shelby, Cap.26 p:743-786
- 24.- MAILHES,J.B., PRESTON,R.J. y LAVAPPA,K.S. (1986) "Mammalian in vivo assays for aneuploidy in female germ cells" Mutat Res. 167: 139-148
- 25.- MAILHES,J.B., PRESTON,R.J., YUAN.Z.P. y PAYNE,H.S. (1988) "Analysis of mouse metaphase II oocytes as an assay for chemically induced aneuploidy" Mutation Res. 198: 145-152
- 26.- MANCA,A., BASSANI,B., RUSSO,A. y PACHIEROTTI,F. (1990) "Origin of aneuploidy in relation to disturbance of cell-cycle progression.I Effects of Vinblastine on mouse bone marrow cells" Mutation Res. 229: 29-36
- 27.- MAVOURNIN, K.H., BLAKEY, D.H., CIMINO, M.C., SALAMONE,M.F. y HEDDLE,J.A. (1990) "The in vivo micronuclei assay in mammalian bone marrow and peripheral blood" A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutat Res. 239: 29-80

- 28.- McINTOCH,J.R. y McDONALD,K.L. (1988) "El huso mitótico" Investigación y Ciencia 159: 18-27
- 29.- McINTOCH,J.R. y KOONCE,M.P. (1989) "Mitosis" Science 246: 18-27
- 30.- MIRKOVA,E y ASHBY,J. (1987) "Relative distribution of mature erythrocytes, polychromatic erythrocytes (PE) and micronucleated PE on mouse bone marrow smears:control observations" Mutation Res. 182: 203-209
- 31.- MITCHEL,I. y BRICE,A.J. (1986) "Investigations into parametric analysis of data from in vivo micronucleus assays by comparison with non-parametric methods" Mutation Res. 159: 139-146
- 32.- PARRY,E.M., DANFORD,N., PARRY,J.M. (1982) "Differential staining of chromosome and spindle and its use as an assay for determining the effect of diethylstilboestrol on cultured mammalian cell" Mutation Res. 105: 143-252
- 33.- PARRY,J.M, PARRY,E.M. (1987) "Comparisson of tests for aneuploidy" Mutation Res. 181: 256-287
- 34.- PRESTON,R.J., DEAN,B.J., GALLOWAY,S., HOLDEN,H., McFEE,A.F. y SHELBY,M. (1987) "Mammalian in vivo

cytogenetic assay. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells" Mutation Res. 189: 157-165

- 35.- RESNICK, M.A., MAYER, Y.W. y ZIMMERMANN, F.K. (1986)
"The detection of chemical induced aneuploidy in Saccharomyces cerevisiae: an assesment of mitotic and meiotic systems" Mutation Res. 167: 47-60
- 36.- RIZZONI, M., TANZARELLA, C., GUSTAVINO, B., DEGRASSI, F. GUARINO, A. y VITAGLIANO, E. (1989) "Indirect mitotic non-disjunction in Vicia faba and chinese hamster cells" Chromosoma 97: 339-346
- 37.- ROMAGNA, F. y STAINFORTH, C.D. (1989) "The automated bone marrow micronucleus test" Mutation Res. 213: 91-104
- 38.- SALAMONE, M.F. y HEDDLE, J.A. (1983) "The bone marrow micronucleus assay: rationale for a revised protocol" En "Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection" Editado por A.Hollander Cap.4, p.111-148
- 39.- SALASSIDIS, K., SCHMID, E. y BAUCHINGER, M. (1991)
"Mitotic spindle damage induced by 2-chlorobenztydine malonitrile in V79 chinese hamster cells examined by differential staining of the

- spindle apparatus and chromosomes" Mutation Res.
262: 263-266
- 40.- SAVAGE, J.R. (1976) "Classification and relationships
of induced chromosomal structural changes" J. Medical
Genetics 13: 103-122
- 41.- SANDHU, S.S, VIG, B.K. Y CONSTANTIN, M. (1986)
"Detection of chemically induced aneuploidy with
plant test systems" Mutation Res. 167: 61-69
- 42.- SAVAGE, J.R. (1988) "A comment on the quantitative
relationship between micronuclei and chromosomal
aberrations" Mutation Res. 207: 33-36
- 43.- SAVAGE, J.R. (1989) "Acentric chromosomal fragments
and micronuclei: the time displacement factor"
Mutation Res. 225: 171-173
- 44.- SCHMID, W. (1975) "The micronucleus test" Mutation
Res. 31: 9-15
- 45.- TSUYOSHI, Y., TAKENCHI, M., HIRONO, H. y MASAMOTO, Y.
(1989) "Micronucleus test with Methyl
Methanesulfonate administered by intraperitoneal and
oral gavage" Mutation Res. 223: 383-386

- 46.- VERSCHAEVE,L., VANDERKERKEN,K. y KIRSCH-VOLDERS,M.
(1988) "C-banding as a simple tool to discriminate
between micronuclei induced by clastogens and
aneunogens" Stain Technology 63(6): 351-354
- 47.- VIG,B.K. (1984) "Sequence of centromere separation
another mechanism for the origin of nondisjunction"
Hum. Genet. 66: 239-2
- 48.- WATERS,M.D., STACK,H.F., MAVOURNIN,K.H. y
DELLARCO,V.L. (1986) "Genetic activity profiles of
chemicals selected from the Aneuploidy Data Base"
Mutation Res. 167: 171-188
- 49.- YAMAMOTO,K.I. y KIKUCHI,Y. (1980) "Studies of
micronuclei induced by clastogens and by spindle
poissons" Mutation Res. 71: 127-131
- 50.- YAMAMOTO,K.I. y KIKUCHI,Y. (1981) "Studies of
micronuclei time reponse and on the effects of
multiple treatments of mutagens on induction of
micronuclei" Mutation Res. 90: 163-173
- 51.- ZIMMERING,S., MASON,J.M y OSGOOD,C. (1986) "Current
status of aneuploidy testing in Drosophila" Mutation
Res. 167: 71-87