

## Tesis de Posgrado

# Estudios citogenéticos In Vivo e In Vitro de sustancias químicas potencialmente mutagénicas, carcinogénicas y/o teratogénicas

González Cid, Marcela Beatriz

1987

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

González Cid, Marcela Beatriz. (1987). Estudios citogenéticos In Vivo e In Vitro de sustancias químicas potencialmente mutagénicas, carcinogénicas y/o teratogénicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2112\\_GonzalezCid.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2112_GonzalezCid.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

González Cid, Marcela Beatriz. "Estudios citogenéticos In Vivo e In Vitro de sustancias químicas potencialmente mutagénicas, carcinogénicas y/o teratogénicas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2112\\_GonzalezCid.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2112_GonzalezCid.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TEMA DE TESIS

"ESTUDIOS CITOGÉNÉTICOS "IN VIVO" E "IN VITRO" DE SUSTANCIAS  
QUÍMICAS POTENCIALMENTE MUTAGÉNICAS, CARCINOGENÉTICAS Y/O  
TERATOGÉNÉTICAS".

AUTORA

MARCELA BEATRIZ GONZALEZ CID

DIRECTORA DE TESIS

EUGENIA SACERDOTE DE LUSTIG

CODIRECTORA DE TESIS

ELENA LINA MATOS

LUGAR DE TRABAJO

INSTITUTO DE ONCOLOGÍA "ANGEL H. ROFFO"

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

1987

2112  
E.J. 2

Dedico esta Tesis a mis hijas,  
Mercedes y Mariana y a todos  
aquellos que hicieron posible que  
ahora usted la esté leyendo.

"Si te postran diez veces, te levantas  
otras diez, otras cien, otras quinientas:  
no han de ser tus caídas tan violentas  
ni tampoco, por ley, han de ser tantas".

Siete Sonetos Medicinales, Almafuerte

## INDICE

	Pag.
I. <u>Introducción.</u>	
I.1. Mecanismos de acción de los agentes químicos ambientales.....	6
I.2. Ensayos para probar la acción genotóxica de sustancias químicas.....	8
I.3. Principios y tipos de daños analizados.....	11
I.3.1. Aberraciones cromosómicas (AC).....	12
I.3.1.1. Aberraciones cromosómicas estructurales.....	12
I.3.1.2. Inducción de AC por agentes físicos y químicos.....	13
I.3.1.3. El linfocito como ensayo de las AC.....	15
I.3.2. Intercambio de cromátidas hermanas (ICH).....	18
I.3.2.1. Ciclo celular.....	22
I.3.2.2. Mecanismo molecular y significado biológico del ICH.....	22
I.3.2.3. Inducción de ICH por agentes físicos y químicos.....	24
I.4. Relaciones entre AC e ICH con otras respuestas biológicas.....	29
I.5. Linfocitos humanos como sistema de prueba.....	33
I.5.1. Tipos de daños analizados en linfocitos periféricos.....	37
I.5.1.1. AC inducidas por radiación.....	37
I.5.1.2. AC inducidas por agentes químicos.....	40
I.5.1.3. ICH inducidos por radiación y agentes químicos.....	42
I.5.1.4. Ciclo celular en linfocitos periféricos.....	43
I.5.2. Análisis de muestras de médula ósea.....	45
I.6. Objetivo.....	47
II. <u>Parte Experimental.</u>	
II.1. Estudios citogenéticos "in vivo".....	49

	Pag.
II.1.1. Monitoreo biológico de la exposición a agentes genotóxicos en el ambiente laboral.....	49
II.1.2. Factores que influyen sobre la frecuencia de ICH y de AC.....	54
II.1.3. ICH en trabajadores de una industria química.....	57
II.1.4. AC estructurales en individuos expuestos a pesticidas.....	70
II.2. Estudios citogenéticos "in vitro".....	83
II.2.1. Sistema de activación metabólica.....	83
II.2.2. Correlación de los datos hallados "in vitro" con los datos "in vivo".....	88
II.2.3. Efectos citogenéticos del Aldicarb y del Nitroso Aldicarb sobre linfocitos humanos en cultivo.....	91
II.2.3.1. Aldicarb: Inducción de ICH y efecto sobre el ciclo celular.....	93
II.2.3.2. Aldicarb: Análisis de AC.....	101
II.2.3.3. Nitroso-Aldicarb: Análisis del ICH y del ciclo celular....	108
III. <u>Resumen</u> .....	119
IV. <u>Bibliografía</u> .....	123

## I. Introducción.

Nuestra sociedad ha estado y continúa estando expuesta a agentes químicos ambientales que son deletéreos para la salud. Los tipos de compuestos que pueden encontrarse en el ambiente pertenecen a muchas clases diferentes; pueden ser orgánicos o inorgánicos, productos sintéticos o naturales. Las rutas de exposición humana a estos agentes son igualmente variadas y pueden presentarse a través de la polución del aire, de la contaminación de la comida o del agua por productos que se forman sintética o naturalmente, por el uso de drogas terapéuticas o aún a través de la propia administración habitual de numerosas sustancias (Epstein, 1974; Miller, 1978; Miller y Miller, 1981; Vainio y col., 1983).

Los agentes químicos entran en el organismo vía inhalación, ingestión o absorción a través de la piel, y se distribuyen en los tejidos de una forma específica para cada agente.

Los tipos de problemas sobre la salud que pueden surgir de la exposición a agentes deletéreos incluyen defectos en el nacimiento, enfermedades neurológicas y cardiovasculares, cáncer y problemas orgánicos diversos. Estos problemas asociados con exposición son de particular interés tanto para la comunidad científica como para la que no lo es, debido a las consecuencias físicas, psicológicas y económicas involucradas.

En el caso particular del cáncer humano, los datos experimentales y epidemiológicos obtenidos han permitido establecer que del 80 al 90% de los tumores tienen su etiología en factores ambientales (Epstein, 1974; Matos y Lustig, 1978; Hemminki y col., 1979).

Entre los factores ambientales se han identificado a tipos específicos de radiaciones, pero la mayoría es de naturaleza química.

Mientras la carcinogénesis en el hombre tiene su manifestación final en la aparición de un tumor maligno, el fenómeno de daño en células germinales es más difícil de demostrar. Sin embargo, hay razones que permiten suponer que aquí también, los agentes físicos y químicos ambientales constituyen un factor etiológico importante de las enfermedades genéticas y de las malformaciones congénitas.

Por otro lado, la exposición a factores ambientales no puede eliminarse totalmente, como sucede en algunos lugares de trabajo o en zonas urbanas altamente industrializadas.

#### I.1. Mecanismos de acción de los agentes químicos ambientales.

A pesar de la gran diversidad de estructuras químicas, muchos agentes son electrófilos o metabolizados a intermediarios electrofílicos (compuestos con átomos deficientes en electrones) capaces de reaccionar con centros nucleofílicos (sitios con átomos ricos en electrones) que están presentes en los constituyentes celulares.

Si bien un gran número de agentes químicos reaccionan covalentemente con el ácido desoxirribonucleico (ADN), otros ejercen sus efectos a través de mecanismos diferentes. Los metales (plomo, mercurio, etc) y los agentes intercalantes (actinomicina D, daunomicina, etc) forman asociaciones no-covalentes estrechas con los ácidos nucleicos, los antimetabolitos (metotrexato, 6-mercaptopurina, 5-fluorouracilo) pueden interferir con el material genético indirectamente; y los venenos del huso mitótico son capaces de perturbar la segregación normal de los cromosomas durante la división celular. Finalmente, los radicales oxígeno liberados por determinados agentes también están implicados entre los que dañan al ADN (Vainio y col., 1983).

Un mutágeno es un agente capaz de causar cambios que pueden ser heredables, en el material genético.

Las mutaciones pueden dividirse en dos categorías, microlesiones y macrolesiones (Hemminki y col., 1979). En eucariontes se observaron ambos tipos: microlesiones a nivel molecular (mutaciones de punto) o macrolesiones a nivel cromosómico, como cambios estructurales en los cromosomas (deleciones, rearrreglos o roturas) o cambios numéricos en el genoma (aneuploidía, poliploidía). En procariontes, las mutaciones ocurren por sustitución de pares de bases o por cambio en el marco de lectura del código genético. En ciertas bacterias, la existencia de secuencias móviles también contribuye a la presencia de mutaciones por rearrreglos en la cadena del ADN (Chorazy, 1985).

Cada vez hay más evidencias de que los mismos agentes químicos pueden exhibir mutagenicidad, carcinogenicidad y teratogenicidad (Hemminki y col., 1979). En estos casos, los compuestos ejercen sus efectos carcinogénicos y teratogénicos por inducción de mutaciones.

Un rango de fenotipos aberrantes puede ser inducido en mamíferos expuestos a agentes químicos. Estos pueden incluir tumores (definiendo así a un carcinógeno), cromosomas dañados (definiendo a un clastógeno), o malformación congénita (definiendo a un teratógeno).

En sentido general, teratogenicidad es la inducción de una malformación congénita es decir, de una anomalía estructural que se desarrolla durante el período prenatal. Esta anomalía puede ser el resultado de dos eventos distintos: 1) una mutación presente en una de las células germinales involucradas o 2) una desorganización estructural durante la organogénesis. Solamente el segundo evento es considerado como un efecto teratogénico, mientras el primero sería un efecto mutagénico, aunque en la consecuencia de los dos procesos, es decir en la malformación no puede discriminarse.

Desde ahora, el término genotóxico será utilizado para representar cualquier evento que involucre modificación química, reparación o rearre



glos del ADN nuclear. Por lo tanto, dentro de este término se incluyen a las mutaciones génicas, cromatídicas y cromosómicas, a la síntesis de ADN no-programada, etc. Frecuentemente, mutagenicidad, carcinogenicidad y teratogenicidad están agrupadas bajo el nombre de genotoxicidad.

Hay también diferencias entre mutágenos, carcinógenos y teratógenos (Hemminki y col., 1979). Mientras carcinogénesis puede ser causada principalmente por agentes que se unen covalentemente con el ADN, mutagénesis y teratogénesis pueden ser el resultado de interacciones no-covalentes como la intercalación. Las mutaciones y malformaciones son causadas por agentes químicos que interfieren con la replicación del ADN, tales como los análogos de base y los venenos del huso mitótico; además, las malformaciones son producidas por un gran número de compuestos (por ejemplo, antimetabolitos, antagonistas de aminoácidos, inhibidores enzimáticos y citotoxinas no-específicas) que ejercen sus efectos sobre otras funciones diferentes a la de la replicación del ADN.

## 1.2. Ensayos para probar la acción genotóxica de sustancias químicas.

El paulatino conocimiento de los mecanismos que conducen a mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis ha contribuido a adoptar medidas preventivas de la enfermedad cada vez más eficaces.

Una primera línea de defensa en esta prevención se apoya en la detección de los agentes que dañan al ADN. En base a esto, el desarrollo de métodos de monitoreo a corto plazo para predecir el riesgo sobre la salud a largo plazo (mutaciones, cáncer y malformaciones), como así también de sistemas de prueba "in vitro", han sido prioritarias en la investigación sobre este tema.

Estos sistemas son esenciales en vista de los requerimientos multigeneracionales para la expresión de mutaciones y al largo período de latencia necesario, generalmente, para la expresión de tumores.

Es por ello que un aumento en la frecuencia de mutaciones en células germinales o en tumores humanos debido a la exposición a agentes químicos puede no ser observada por varias décadas o generaciones.

Se han utilizado numerosas pruebas distintas de genotoxicidad para detectar compuestos químicos presentes en el medio ambiente. Las pruebas pueden agruparse de acuerdo al organismo empleado y al resultado biológico obtenido.

Como organismos de prueba se ha utilizado una amplia gama que va desde procariontes hasta eucariontes. Entre los procariontes se desarrollaron cepas especiales de bacterias para diferenciar las mutaciones resultantes de sustituciones de pares de bases de las obtenidas por cambios en la lectura del código genético.

Entre las bacterias utilizadas ampliamente se encuentran Salmonella typhimurium (Ames y col., 1973) y Escherichia coli (Mc Carrolly y col., 1981).

Los organismos eucariontes abarcan fundamentalmente los hongos (Saccharomyces, Neurospora, Aspergillus), la mosca de la fruta Drosophila melanogaster, plantas (Allium, Vicia faba) y mamíferos.

De acuerdo al resultado biológico obtenido las pruebas incluyen la detección de mutación génica en los microorganismos ya nombrados, en ratón (Shibuya y Murota, 1984), en líneas celulares como las células de ovario (Morris y col., 1985) y células de pulmón (Rogers y col., 1985) de hamster Chino entre otras.

El análisis de otros efectos genotóxicos como síntesis de ADN no-programada, inhibición de la síntesis de ADN y roturas de las cadenas de ADN (Stich y col., 1983) como así también la detección de aductos en el ADN (Poisier, 1984) pueden utilizarse para la identificación de daño en el material genético.

La observación de efectos cromosómicos como la formación de intercambio de cromátidas hermanas y de aberraciones cromosómicas estructurales (Gebhart, 1981), de micronúcleos (Heddle y col., 1983) y de aneuploidía (Dellarco y col., 1986) permiten evaluar la genotoxicidad de los agentes estudiados.

Por último, la transformación celular es otro de los parámetros analizados para detectar alteraciones en el ADN luego de la exposición a un agente químico (Popescu y col., 1985).

Hay cientos de miles de agentes químicos aún no testeados y se intenta permanentemente identificar a aquellos que sean un riesgo potencial para el hombre. El efecto dañino sobre la salud ejercido por diferentes agentes es más difícil de evaluar en el medio ambiente general donde la exposición involucra comúnmente muy bajas concentraciones, que se extienden por amplias regiones afectando a una gran parte de la población.

En el ambiente laboral, en cambio, las concentraciones a las que están expuestos los trabajadores son altas y están presentes en espacios más reducidos.

El monitoreo biológico para la vigilancia de la salud consiste en evaluar individuos expuestos a fin de detectar la presencia de un tóxico en el organismo o los efectos tempranos del mismo, la manifestación de cualquiera de estos fenómenos es una razón para tomar medidas preventivas.

En esta área que se refiere a los problemas que afectan la salud humana, se ha cambiado una alta eficiencia en el cuidado médico del enfermo por una prevención más efectiva de la enfermedad.

Hasta el presente entre los métodos más útiles para acceder al posible daño sobre el material genético en grupos ocupacionalmente expuestos a agentes exógenos se encuentra el análisis de cromosomas metafási-

cos para la detección de aberraciones cromosómicas (AC) y del intercambio de cromátidas hermanas (ICH).

El interés por monitorear individuos con supuesta o conocida exposición a través del uso de pruebas citogenéticas a corto plazo como AC e ICH se basa en parte, en la imposibilidad de detectar clínicamente efectos tempranos de una exposición perjudicial antes de que se manifieste la enfermedad. Cualquier variación en la frecuencia de AC o de ICH es considerada como un efecto adverso, llevando a la adopción de medidas de higiene en el lugar de trabajo y/o a la reducción de los niveles de contaminación ambiental.

Sin embargo es importante hacer notar que, la presencia de cambios citogenéticos no pueden usarse para predecir efectos específicos sobre la salud de un individuo sino que dan una estimación de la magnitud de la exposición que podría incrementar el riesgo de enfermedad en la población.

### I.3. Principios y tipos de daños analizados.

La forma estandar de determinar los efectos citogenéticos de agentes genotóxicos ha sido la de cuantificar las AC inducidas en células somáticas.

Recientemente, un método nuevo ha comenzado a usarse para estudiar otro tipo de daño cromosómico, el ICH, que puede verse en cromosomas que posean sus cromátidas hermanas diferenciadas.

La inducción de ICH se produce a concentraciones inferiores a las necesarias para producir AC. Esta diferencia en la sensibilidad, unida a otros aspectos de la formación de AC y de ICH, permite que estos ensayos sean utilizados para determinar distintos rasgos de la respuesta genética de las células a los agentes genotóxicos.

### 1.3.1. Aberraciones cromosómicas (AC)

El daño citogenético que producen los agentes físicos o químicos se manifiesta con la discontinuidad del cromosoma para dar origen a fragmentos acrocéntricos libres o a rearrreglos de segmentos de ADN dentro del cromosoma o a intercambios de segmentos de ADN entre los cromosomas.

Estos cambios en la estructura cromosómica, referidas como aberraciones, clasificables en distintas categorías, son visibles al microscopio óptico.

#### 1.3.1.1. Aberraciones cromosómicas estructurales.

Las aberraciones observadas en células metafásicas son básicamente de dos clases, distinguidas sobre la base de la unidad de rotura/intercambio: aquellas en las que los cambios estructurales involucran el cromosoma entero, es decir, ambas cromátidas hermanas en el mismo locus, o aberraciones tipo cromosoma, y aquellas en las que la unidad de rotura/intercambio es la mitad del cromosoma o cromátida, es decir, aberraciones tipo cromátida. (Evans y col., 1980).

(i) Aberraciones tipo cromosoma: Las aberraciones de este tipo son características del daño sustentado en células en G1 que es trasladado a eventos de rotura/intercambio antes de la replicación cromosómica.

Las aberraciones inducidas incluyen gaps, deleciones terminales e intersticiales, inversiones, anillos acéntricos y céntricos, intercambios asimétricos (dicéntricos, tricéntricos, etc.) e intercambios simétricos (intercambios recíprocos y translocaciones).

(ii) Aberraciones tipo cromátida: Las aberraciones cromatídicas son características del daño en una cromátida (ocurrido en cualquier estado del ciclo celular) que es trasladado a eventos de rotura/intercambio

durante o después de la replicación de los cromosomas en la fase S del ciclo. La independencia de las cromátidas hermanas con respecto a la rotura, y su estrecho apareamiento dentro de los cromosomas, da origen a una variedad algo mayor de cambios estructurales cuando se los compara con las aberraciones tipo cromosoma.

En general, sin embargo, las aberraciones son similares e incluyen a los gaps, deleciones terminales e intersticiales, duplicaciones, inversiones, anillos acéntricos y céntricos, aberraciones isocromatídicas e intercambios simétricos y asimétricos, estos últimos resultando en la formación de cromátidas dicéntricas.

#### 1.3.1.2. Inducción de AC por agentes físicos y químicos.

Las radiaciones ionizantes y un pequeño número de agentes químicos tienen la propiedad de inducir AC en forma próxima a la exposición de las células, de modo tal que aquellas células expuestas en la fase G1 del ciclo desarrollan aberraciones tipo cromosoma en la primera mitosis luego del tratamiento. Con estos agentes, las células expuestas en la fase G2 del ciclo revelan aberraciones cromatídicas en la primera mitosis luego del tratamiento. Muchos agentes químicos, sin embargo, junto con la luz ultra-violeta, no producen aberraciones inmediatamente luego de la exposición de las células, pero las aberraciones ocurren como consecuencia de la presencia de lesiones inducidas en los cromosomas que se transforman en eventos de rotura e intercambio durante la fase S del ciclo celular (con errores durante la replicación celular). Estos agentes químicos son frecuentemente llamados "de acción retardada", y como el daño cromosómico producido no se manifiesta como aberraciones hasta que los cromosomas pasen a través de la fase de replicación, las células expuestas en G2 no producen aberraciones en la primera mitosis lue-

go del tratamiento, sino en la segunda división. En todos los casos, nuevas aberraciones producidas por errores durante la replicación son del tipo cromatídico, pero hay que tener presente que la duplicación de una aberración cromatídica existente resulta en un evento de tipo cromosómico luego de la replicación en el ciclo celular siguiente.

Las sustancias químicas o sus derivados metabólicos que producen AC son compuestos reactivos que interactúan con varios componentes del ADN. Según Evans (1983), en muchos casos, pero no en todos, esta interacción no da origen directamente a una rotura de la cadena fosfodiéster del ADN, sino que tal rotura o intercambio surge como consecuencia de errores en la replicación en los sitios del daño durante la siguiente fase S. Siendo la cromátida simple el blanco de la rotura las aberraciones cromatídicas prevalecen sobre las cromosómicas como consecuencia de agentes químicos.

El hecho que la mayoría de las aberraciones tipo cromatídicas inducidas por agentes químicos son manufacturadas durante la replicación del ADN en la fase S, conduce a otros dos rasgos que están relacionados con la inducción de aberraciones.

En primer lugar cuando las células en proliferación son expuestas a agentes químicos, la incidencia de aberraciones más alta ocurre en aquellas células que están en la fase G1 tardía/S temprana del ciclo en el momento de la exposición. La misma sensibilidad se observa respecto a las mutaciones, debido a que al acortarse el intervalo entre el tratamiento y la replicación disminuye la oportunidad que poseen los mecanismos de reparación del ADN para remover las lesiones. Además, el daño a los nucleótidos ocurre más fácilmente en los "pools" precursores que en las bases protegidas del ADN empaquetado.

En segundo término, se ha demostrado que la exposición de células

a agentes químicos con vidas medias muy cortas resulta en aberraciones cromatídicas no solamente en la primera sino también en la segunda y aún en las mitosis siguientes al tratamiento. Estos hallazgos muestran que si las lesiones persisten en el ADN y no son removidas por los procesos normales de reparación del ADN, entonces pueden surgir más aberraciones durante las sucesivas replications del mismo.

#### 1.3.1.3. El Linfocito como ensayo de las AC.

Como se verá en la próxima parte, el sistema de linfocitos periféricos es la forma más simple de estudiar la inducción de AC estructurales en células somáticas humanas.

Desde el punto de vista citológico, la mayoría de los linfocitos está en la fase G<sub>0</sub> del ciclo celular conteniendo un número diploide de cromosomas no replicados ( $2n=46$ ). Bajo la estimulación de mitógenos comienzan las actividades metabólicas asociadas con la división celular. Probablemente el factor más importante que influye sobre la producción de AC "in vitro" es el tiempo de cultivo. Alrededor de las 48 hs luego de la iniciación de los cultivos la mayoría de los linfocitos transformados están en su primera mitosis. Las preparaciones efectuadas de células cultivadas por períodos más largos contendrán proporciones incrementadas de células en su segunda o subsiguientes divisiones.

En consecuencia, si los linfocitos con daño tipo cromosómico no atraviesan por repetidas divisiones "in vitro", debido a su desbalance genético o dificultades mecánicas en anafase, el análisis de células luego de 72 hs de cultivo puede no reflejar el nivel real de aberraciones "in vivo". Además, una proporción de aberraciones tipo cromosómico observada en este momento puede ser un tipo "derivado" de una duplicación de aberraciones que eran inicialmente tipo cromatídico. Por lo tanto, las pruebas que son designadas para detectar la presencia o au-



sencia de daño cromosómico en linfocitos de individuos expuestos "in vivo" a un agente determinado, no pasarán las 48 hs. La misma restricción se aplica a los estudios "in vitro", pero con la consideración que el agente puede inhibir el desarrollo celular y así prolongar el tiempo de cultivo necesario para obtener células mitóticas.

Las AC normalmente encontradas en linfocitos son de los siguientes tipos según Natarajan y Obe (1980):

(a) Lesiones acromáticas, también llamadas gaps, representan regiones no coloreadas en la cromátida que no son más largas que el ancho de la misma y los segmentos aparentemente "rotos" del área cromatídica están alineados.

Los gaps no serían indicadores reales de daño en el material genético y en general, no son incluidos en el recuento de las aberraciones. Para Evans y O'Riordan (1975) muchos gaps son causados por artificios técnicos, como por ejemplo, pobres condiciones de cultivo y uso de procedimientos drásticos durante la preparación de los vidrios. Por esta razón, es particularmente importante que los cultivos controles sean tratados en forma similar y al mismo tiempo que aquellos expuestos al agente a ser analizado.

Por otro lado, Brogger (1975) ha establecido que los gaps se deben a un error en el plegamiento de las proteínas más que a un daño sobre el ADN.

Donde el gap involucra ambas cromátidas en la misma posición se habla de un gap isocromatídico o cromosómico.

(b) Rotura cromatídica (B'), cuando hay una discontinuidad en el brazo cromatídico con desplazamiento de modo tal que los extremos cromatídicos rotos no están alineados. Representan roturas reales en una cromátida.

(c) Rotura cromosómica o isocromatídica (B''), representa una rotura en la misma posición en ambas cromátidas de un cromosoma.

(d) Translocación cromatídica (RB'): este tipo de aberración involucra un intercambio (o intercambios) entre cromátidas de dos (o más) cromosomas distintos. Los intercambios simples entre cromátidas de dos cromosomas resultan en una configuración que tiene cuatro brazos (cuadrirradial).

(e) Cromosomas dicéntricos (DIC): aberraciones que surgen del intercambio entre dos cromosomas, conduciendo a un cromosoma con dos centrómeros y un fragmento acéntrico asociado.

(f) Cromosoma en anillo, representa un intercambio dentro de un cromosoma. Las estructuras anulares formadas pueden contener o no al centrómero. Los anillos de tamaño pequeño parecen pequeños puntos a menudo llamados "minute" (diminuto).

(g) Translocación balanceada: es una aberración que involucra intercambios recíprocos entre dos cromosomas distintos sin pérdida de material cromosómico. Los métodos de coloración convencionales no permiten la detección de este tipo de aberración y se requieren técnicas de bandeado cromosómico para su identificación. Generalmente, las translocaciones balanceadas no son contadas en los estudios de monitoreo poblacional debido a que este análisis lleva mucho tiempo.

(h) Inversiones: las inversiones cromosómicas pueden clasificarse en dos categorías:

(i) inversiones paracéntricas: donde ambos puntos de rotura y reunión están sobre el mismo brazo del cromosoma.

(ii) inversiones pericéntricas: donde los puntos de rotura y reunión están en lados opuestos del centrómero. En células donde los dos puntos de intercambio están a distancia desigual del centrómero, el cromosoma

soma anormal puede distinguirse por la posición alterada del centrómero. Sin embargo, donde los puntos de intercambio están a la misma distancia del centrómero, y en los casos de inversiones paracéntricas, no hay cambios en la posición relativa del centrómero. La detección de tales inversiones puede ser solamente posible mediante el uso de técnicas de bandeo cromosómico.

### I.3.2. Intercambio de cromátidas hermanas (ICH).

El ICH representa el intercambio de subunidades cromatídicas aparentemente idénticas dentro del cromosoma. Su formación involucra la rotura de las dos cadenas de ADN seguida por el intercambio de las dos cadenas duplicadas recientemente de modo tal que se preserve la polaridad del ADN. El ICH, por lo tanto, no produce alteración de la morfología cromosómica y podrá visualizarse en células tratadas para obtener cromátidas hermanas diferenciadas

Este evento fue observado originariamente por el Dr. J. Hebert Taylor y sus colaboradores (1957) en células de las raíces de plantas luego de la incorporación de timidina tritiada en el ADN en replicación. Estudios posteriores (Taylor, 1958) demostraron que muchos de los ICH observados en los experimentos autorradiográficos fueron inducidos por los rayos beta de la timidina tritiada incorporada.

En base a esto se desarrollaron técnicas para distinguir las cromátidas hermanas sin el uso de radioisótopos ni autorradiografía; estas técnicas se basaron en la incorporación en el ADN de un átomo pesado, polarizable como el bromo en la forma de la base análoga 5-bromodeoxiuridina (BrdU). Esta base puede ser detectada por la perturbación que el bromo provoca sobre los estados excitados y por consecuencia sobre las propiedades de luminiscencia de las drogas que se unen al ADN.

Los experimentos iniciales se realizaron utilizando drogas fluores

centes como naranja de acridina (Kato, 1974,a) y quinacrina (Latt, 1974,a), como complemento de los estudios ya realizados acerca de la habilidad de estos compuestos de producir patrones de bandeado en los cromosomas metafásicos.

Esta investigación continuó con la incorporación de nuevos tipos de drogas como drogas bisbenzimidazoles (por ejemplo, Hoechst 33258), observándose que las cromátidas sustituidas con BrdU presentaban intensidades de fluorescencia marcadamente distintas cuando se teñían con estas drogas. Si se permite a las células incorporar BrdU durante dos ciclos de replicación, los cromosomas de la segunda división mitótica tendrán una cromátida con una cadena de ADN sustituida con BrdU y su hermana con las dos cadenas sustituidas. El colorante Hoechst 33258 fluoresce menos eficientemente cuando se une a poli (dA-BrdU) que cuando se une a poli (dA-dT), por lo tanto, la cromátida que fluoresce más débilmente contiene BrdU en ambas cadenas de ADN, mientras que la que fluoresce brillantemente lo posee en sólo una de las dos cadenas (Latt, 1973). Los intercambios pueden verse como alteraciones recíprocas en la fluorescencia a lo largo de estos cromosomas. Estos mismos resultados también pueden obtenerse con drogas relacionadas estructuralmente con el Hoechst 33258.

Sin embargo, como la emisión fluorescente del Hoechst 33258 es i nestable ante iluminaciones repetidas y las células sustituidas con BrdU y expuestas a la droga son sensibles a la luz, el análisis de ICH se realizó sobre células que se procesaron adicionalmente con Giemsa con (Perry y Wolff, 1974) o sin (Korenberg y Freedlander, 1974) fotosensibilización de la droga unida, para obtener preparaciones con coloración diferencial permanente. Esta técnica de coloración con Giemsa permite el uso del ensay de ICH en laboratorios sin equipo microscópico de fluorescencia, siendo

además de mayor sensibilidad ya que se observan intercambios pequeños no detectables con la metodología anterior. La cromátida con BrdU en ambas cadenas es menos condensada y se colorea más débilmente con Giemsa que la cromátida hermana sustituida en una sola cadena del ADN.

Mientras las técnicas con BrdU han obviado el uso de radioactividad para la detección de los intercambios, no han contestado la pregunta acerca de la espontaneidad de los ICH. El incremento en la concentración de BrdU produce un aumento relacionado en la frecuencia de ICH en las células expuestas (Kato, 1974). Este efecto es pequeño a bajas dosis de BrdU, pero una extrapolación sin ambigüedad a una concentración cero de BrdU no es posible.

Del mismo modo que la radiación proveniente del tritio incorporado indujo ICH, el BrdU posee la habilidad en sí mismo de introducir ICH, ya sea como consecuencia de su incorporación directa en el ADN (Latt, 1974, b, Suzuki y Yosida, 1983) o por producir perturbaciones en el "pool" de deoxiribonucleótidos intracelulares (Davidson y col., 1980; Maier y col., 1983). Los resultados sugieren que ambos fenómenos son reales y dependerán del tipo celular utilizado y del rango de concentración de BrdU.

Ha sido de considerable interés el uso de otras pirimidinas halogenadas para caracterizar la formación de ICH. Al comparar la eficiencia de diferentes análogos halogenados de deoxicitidina y deoxiuridina para inducir intercambios se observó que a concentraciones equimolares los primeros análogos son inductores más potentes que los últimos. Se ha especulado que esta diferencia puede deberse a la incorporación preferencial de las deoxicitidinas halogenadas en el ADN (Tice y col., 1984).

Entre las tres distintas pirimidinas halogenadas se observa una relación entre la frecuencia de ICH y el tamaño del halógeno (Heartlein, 1985). Estos resultados permiten establecer una relación entre cambios

conformacionales en la cromatina y formación de ICH.

Se considera normalmente, que la dosis óptima de BrdU es la que:

- (i) da una coloración diferencial de alta calidad de las cromátidas hermanas,
- (ii) no inhibe marcadamente la replicación celular o las tasas del ciclo celular y
- (iii) da una frecuencia de ICH basal apropiada (Allen y col., 1984).

Además de BrdU en el medio de cultivo, cuya presencia es necesaria para la detección de las cromátidas hermanas, existen otros factores metodológicos que influyen sobre la frecuencia de ICH. Entre estos factores se encuentran el medio de cultivo, la fuente de suero utilizada, las técnicas de coloración diferencial, el tipo de tejido (por ejemplo, tejido adulto versus tejido fetal o tejidos de especies distintas como humano y roedor) y el tiempo de cultivo. (Kram y col., 1980; Mc Fee y Sherrill, 1981; Morgan y Crossen, 1981; Sharma y Das, 1981; Mc Nally y Ray, 1983).

Cuando se analiza la frecuencia de ICH en linfocitos periféricos es importante tener presente que los microcultivos es decir, los cultivos de sangre entera, producen niveles más bajos de ICH que los macrocultivos. Esta diferencia entre micro y macrocultivos podría deberse al tipo de suero usado, ya que los macrocultivos generalmente utilizan suero humano autólogo, mientras que el suero fetal bovino es usado en los microcultivos (Lambert, 1984).

La tasa de proliferación celular en el cultivo es otro factor importante en la determinación de la frecuencia de ICH. Algunos resultados indican que los cultivos con una tasa de proliferación rápida poseen un nivel de ICH más bajo que los cultivos en los que la proliferación celular es más lenta; esto es lo que sucede con los linfocitos T que tienen una tasa de proliferación más lenta y una frecuencia de ICH más elevada que los

linfocitos B (Lindblad y Lambert, 1981; Parkes y col., 1985; Miller, 1986).

Es obvio que el método utilizado para el análisis de ICH necesita una cuidadosa estandarización con respecto a todos aquellos factores que puedan influir sobre los resultados a obtener.

#### I.3.2.1. Ciclo Celular

Cuando las células crecen en presencia de BrdU no solamente se pueden analizar los ICH sino también se puede determinar cuantas veces se han dividido las células en cultivo mediante la identificación de metafases en primera, segunda o tercera y más mitosis. Esta técnica involucra la continua incorporación de BrdU en el ADN eucariótico y la subsecuente obtención de las cromátidas hermanas coloreadas diferencialmente (Tice y col., 1976). Las células en mitosis 1 (M1) tienen ambas cromátidas coloreadas oscuramente, las células en mitosis 2 (M2) poseen una coloración diferencial de las cromátidas hermanas (una oscura y una clara) en todos los cromosomas y las células en mitosis 3 o más (M3+) poseen 1/4 o menos de las cromátidas coloreadas oscuramente.

Como ha sido demostrado en el análisis de ICH, esta técnica ofrece mayor resolución y permite un rápido procesamiento de los datos en comparación con los procedimientos autoradiográficos (Tice y col., 1976).

Por lo tanto, en el mismo cultivo, puede determinarse si un compuesto induce o no ICH y también como afecta la cinética de proliferación celular, siendo la inducción de ICH una medida de la genotoxicidad del compuesto y la alteración del ciclo celular una medida de su citotoxicidad.

#### I.3.2.2. Mecanismo molecular y significado biológico del ICH

El mecanismo molecular de la formación de ICH es incierto. Aunque los ICH presentan alguna semejanza citológica con los productos de entrecruzamiento meiótico y con ciertas formas de AC y son bioquímicamente

cercanos a varios pasos o a los resultados conseguidos con los mecanismos de reparación del ADN, no existe una evidencia contundente en apoyo a relaciones directas con estos procesos. Por el contrario, los ICH son considerados como eventos únicos en el ADN, que, cuando se inducen surgen a partir de una fracción del número total verdadero de lesiones del ADN. Su mecánica de formación ocurre aparentemente durante la síntesis del ADN in distintamente del momento en que haya sido inducida la lesión.

Muchos modelos se han propuesto para la formación de ICH (Painter, 1980; Cleaver, 1981; Conner y col., 1984; Fujiwara y col., 1984). Por ejemplo, Painter (1980) ha sugerido un modelo atractivo donde se representan a los ICH surgiendo del daño no-reparado en las uniones entre grupos de replicones. Estos sitios son especialmente susceptibles a roturas de doble cadena, con posterior recombinación entre las cadenas parentales y las hijas conduciendo a ICH. (replicón: unidad de replicación).

Algunas evidencias favorecen la participación crítica de la "horquilla" de replicación en la formación de los intercambios, sin embargo, ningún mecanismo general, hasta el presente, se ha confirmado.

Por otro lado, una de las preguntas que cabría hacerse es justamente cómo la inducción de ICH puede generar daño genético si, como aparenta a nivel citológico el intercambio de material genético es perfectamente recíproco.

Tsongas (1984) establece que la presencia de ICH en una célula indicaría un cambio en el ADN de esa célula. Si este cambio está libre de errores entonces se puede asumir que el intercambio de material entre cromátidas hermanas no tendría consecuencias sobre la vida o las actividades de la célula. En realidad, el ICH no parece estar asociado con muerte celular, la cual podrá ser el resultado de exposiciones a agentes en concentraciones altas o a tiempos de exposición prolongados, reflejando quizás



otro tipo de daño más que ICH.

Hay que tener presente que numerosas evidencias apoyan la asociación entre un incremento en el valor de ICH y una exposición a agentes que dañan el ADN. Por lo tanto, aún si el intercambio de porciones de cromátidas hermanas no es dañino en sí mismo, indica exposición a un agente nocivo.

Si el ICH en sí mismo es una manifestación de daño en el ADN, es decir, el intercambio involucra errores y así posiblemente mutaciones u otro tipo de alteraciones del ADN, entonces se tiene un indicador directo de un efecto adverso de la exposición a un agente que produce ICH.

En cualquiera de los casos, intercambio sin o con errores, el ICH indica que ha ocurrido exposición a una sustancia de riesgo.

#### 1.3.2.3. Inducción de ICH por agentes físicos y químicos

Como ya se ha mencionado determinados agentes como las radiaciones ionizantes y algunos agentes químicos que no dependen de la fase de síntesis del ciclo celular pueden inducir lesiones en el ADN y producir aberraciones eficientemente en cualquier parte del ciclo. Otros agentes, tales como luz ultravioleta y muchos agentes químicos, dependen de la fase S de síntesis del ADN, esto significa que inducen lesiones en el ADN que solamente se convertirán en aberraciones de tipo cromatídico cuando las células entren en S.

El ICH inducido por agentes químicos, como las aberraciones cromatídicas, depende de la fase S y se manifiesta cuando las lesiones no-reparadas están presentes al pasar la célula por S y replicarse los cromosomas.

Los intercambios pueden incrementarse por una variedad de agentes que dañan el ADN. Algunos mutágenos químicos pueden causar un aumento de diez veces en el nivel basal de ICH a concentraciones molares cien veces menores que las requeridas para producir AC.

Como en el caso de aberraciones cromatídicas, los ICH pueden ser producidos por agentes que interactúan directamente con el ADN sin ninguna modificación química. Esto pudo conocerse a partir del trabajo pionero de Kato (1974, b) en el cual se determinó autorradiográficamente que los agentes alquilantes podrían inducir ICH. El nuevo método de alta resolución para estudiar los intercambios en células tratadas con BrdU fué usado por Latt (1974, b) para demostrar que los linfocitos humanos son extremadamente sensibles a la mitomicina C, un agente que produce uniones entrecruzadas en el ADN. Este interés en la técnica de ICH como prueba para detectar agentes genotóxicos se generalizó por el extenso estudio realizado por Perry y Evans (1975). En esta investigación se observó que los agentes de acción directa pueden causar un incremento de diez veces en el nivel basal de ICH y los únicos compuestos que no inducen ICH bajo las condiciones usadas por ellos son los que requieren activación metabólica para convertirse de pro-mutágeno o pro-carcinógeno a la forma mutagénica o carcinogénica final.

Hasta ese momento, la prueba de ICH era capaz solamente de detectar compuestos que fueran activos sin activación metabólica. Desde entonces se buscó la forma de incorporar a la prueba aquellos agentes que necesitaban ser metabolizados para ejercer su acción. El primer sistema consistió en inyectar los compuestos en organismos vivos de modo tal que los compuestos se activaban pasando por el hígado y otros tejidos que contienen las oxidasas de función mixta y otras enzimas requeridas para la activación. El otro sistema se basó en el cultivo de células tratadas "in vitro" en presencia de un sistema de activación extraído de animales.

En el primer caso, los experimentos consistieron en tratar al animal entero y luego cultivar su sangre en presencia de BrdU para analizar los ICH en linfocitos (Stetka y Wolff, 1976, a), o tratar a los animales

con BrdU y el agente a analizar, y luego contar los ICH en células de la médula ósea (Allen y col., 1977, Qin y Huang, 1984), en células de la mucosa bucal (Shuler y Latt, 1979) o espermatogonias (Allen y Gwaltney, 1984), entre otros tejidos.

En el segundo caso, el uso del ensayo de ICH pudo extenderse a aquellos compuestos de acción indirecta con la simple adición de microsomas de hígado de ratas (Stetka y Wolff, 1976, b). Se realizaron varios experimentos para establecer si los agentes que requerían activación metabólica, podrían ser detectados en este sistema "in vitro". El análisis de los niveles de ICH se realizaron en distintos tipos celulares, células ováricas de hamster Chino (CHO), células pulmonares V-79 de hamster Chino y linfocitos humanos entre otros, en presencia de dietilnitrosamina, dimetilnitrosamina, benzopireno, 7,12-dimetilbenz(a) antraceno, 3-metilcolantreno que son compuestos que necesitan ser metabolizados por microsomas hepáticos (Natarajan y col., 1976; Craig-Holmes y Shaw, 1977; Popescu y col. 1977; Wojciechowski y col., 1981; Okinaka y col., 1981).

El sistema puede ser aún más sensible mediante el uso de líneas celulares más sensibles que las células normales a la inducción de ICH por distintos agentes físicos o químicos (Shiraishi y col., 1979; Popescu y col., 1983; Morimoto y col., 1984). El tratamiento de una línea celular de xeroderma pigmentosa, que es defectuosa en la reparación por excisión, realza la respuesta a estos agentes de un modo análogo al uso de cepas especiales de Salmonella en el test de Ames en las que la sensibilidad se ha incrementado por inhibición de la reparación (Wolff, 1981).

Una vez que los compuestos pudieron ser activados para producir lesiones en el ADN que conducen a la formación de ICH, surgieron otras preguntas acerca de la duración de estas lesiones en el ADN celular. Los

intercambios se forman durante la fase S del ciclo celular, por tanto, en teoría, la inducción de ICH podría estar influenciada por cualquier proceso que lleva a la remoción o modificación del daño antes que las células comiencen a replicar su ADN. La frecuencia de ICH inducida en consecuencia, será dependiente de la tasa de remoción y del tiempo disponible para la reparación y/o modificación de la lesión (Lambert y col., 1984). Algunos tipos de daños que llevan a la formación de ICH son de larga vida, permaneciendo por varias generaciones celulares, mientras el efecto de otras lesiones está restringido a la primera o segunda fase S luego de la exposición a los distintos compuestos.

Se realizaron experiencias para determinar si un intercambio era producido en el primer, segundo o tercer ciclo luego de la administración del agente. Es posible realizar esto por el agregado de colchicina a las células antes que se dividan por primera vez. Las células son entonces, tetraploides luego de dos ciclos de replicación. Estas células tetraploides contienen cromosomas con cromátidas diferenciadas si está presente la droga BrdU en el cultivo. En estas células, un ICH que fue inducido durante el primer ciclo de replicación afectaría a los dos cromosomas hijos en forma similar y sería contabilizado como un "ICH gemelar", mientras que un ICH inducido en el segundo ciclo, es decir, luego que los dos cromosomas hijos se formaron, afectaría a uno de los dos cromosomas y sería analizado como un "ICH simple" (Wolff, 1981). En células CHO, que son relativamente deficientes en su capacidad de reparación, los ICH son inducidos en los dos ciclos (primero y segundo) posteriores al tratamiento con un número diverso de agentes químicos, entre ellos N-acetoxiacetilaminofluoreno (AAAF) que tiene una vida media extremadamente corta de 7.5 min en agua. Cuando se estudian las células CHO en tercera división, en las que solamente la mitad de los cromosomas presentan diferenciación en sus cromátidas, se halló que las lesiones

inducidas por AAAF no persistían y no hubo incremento en el nivel de ICH. De modo tal que, en células CHO las lesiones duran dos ciclos pero no tres.

Experimentos similares con otra línea celular de hamster Chino (B14FAF) que es más deficiente en su reparación que las células CHO, indicaron que las lesiones persisten durante el tercer ciclo.

Por último, cuando se llevó a cabo esta investigación en linfocitos humanos con eficiente capacidad de reparación, se observó que AAAF era muy ineficiente inductora de ICH.

Así, la prueba de ICH puede usarse para determinar la permanencia de las lesiones en el ADN de los distintos tipos celulares, indicando que el tiempo de vida de las mismas depende de las capacidades de reparación del ADN celular.

Finalmente, la sensibilidad en la inducción de ICH se explotó de otra manera para obtener información acerca de los mecanismos bioquímicos presentes en células de mamíferos. La respuesta adaptativa descubierta en Escherichia coli por la cual bacterias expuestas a bajas dosis de un mutágeno son resistentes a subsecuentes exposiciones a concentraciones más altas de los compuestos, fue hallada en células de hamster Chino y en células humanas.

El posible mecanismo para esta respuesta adaptativa sería la inducción de enzimas de reparación, ADN metil-transferasa y glicosilasa. Los linfocitos humanos tienen estas enzimas, y la estimulación con fitohemaglutinina resulta en un incremento de esa actividad enzimática. Se ha demostrado que los linfocitos muestran una respuesta adaptativa a la inducción de AC por una dosis alta de rayos X luego de una irradiación crónica de bajo nivel por timidina tritiada incorporada (Olivieri y col., 1984). Este fenómeno también se ha observado en linfocitos tratados químicamente. Morimoto y col. (1986) comunicaron que los linfocitos cuando

se han pretratado con una baja concentración de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), pueden mostrar una respuesta adaptativa a la inducción de ICH por la siguiente exposición a alta dosis de MNNG, pero no de mitomicina C o etil-nitrosourea.

#### I.4. Relaciones entre AC e ICH con otras respuestas biológicas.

Los mecanismos involucrados en la inducción de AC y de ICH son diferentes, y los resultados no son siempre paralelos (Palitti y Becchetti, 1977; Hemminki y col., 1979; Wolff, 1979). Así, por ejemplo, bromuro de etidio, citosina arabinosa, cloranfenicol y cicloheximida inducen AC pero no ICH. Mientras que cafeína, hidroxiaurea, teofilina, teobromida y actinomicina D inducen ICH pero no AC.

Wolff (1977) utilizando células de xeroderma pigmentosa (deficientes en su capacidad de reparación del ADN), demostró que los niveles de AC inducidos por sulfonato de metilmetano (MMS), sulfonato de etilmetano (EMS) y N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) son los mismos que los de células normales. En cambio, los valores de ICH inducidos por estos mismos compuestos son más altos en células de xeroderma pigmentosa que en normales. Esto permite establecer que las lesiones que conducen a la producción de ICH por MMS, EMS, y MNNG no son reparadas por las células de xeroderma pigmentosa y en consecuencia parecen ser distintas de aquellas que conducen a AC.

Como menciona Gebhart (1981) ambas pruebas tienden a complementarse. Por otro lado, la comparación entre el número de anomalías cromosómicas y la frecuencia de ICH en líneas celulares de tumores linfáticos revela una buena correlación (Fonatsch y col., 1980).

El ensayo de micronúcleos "in vitro" que detecta tanto a los agentes que actúan sobre los cromosomas o clastógenos como a los que afec

tan al huso mitótico, es ligeramente menos sensible que la prueba de ICH "in vitro" (Lasne y col., 1984).

Respecto a la relación entre la formación de ICH y la inducción de mutaciones, se demuestra que las respuestas no son las mismas para los diferentes agentes químicos. Estas observaciones conducen a varios autores a establecer que los mecanismos por los cuales se producen ambos fenómenos no están relacionados. Esta hipótesis se sustenta en la evidencia aportada por los efectos de diferentes agentes físicos o químicos como luz ultravioleta (Fujiwara y col., 1981), agentes alquilantes (Morris y col., 1983), hidrocarburos policíclicos (Nayak y col., 1985), arilaminas N-oxidadas (Morris y col., 1985), etc. Ni ICH ni AC se correlacionan con la inducción de mutaciones de punto, indicando que diferentes lesiones primarias en el ADN y distintos caminos de reparación estarían involucrados en estos procesos biológicos (Natarajan y col., 1984).

Sin embargo, Carrano y col. (1978) demuestran que en algunos casos existe una relación estrecha entre la inducción de ICH y la respuesta mutagénica. Los compuestos empleados difieren en su capacidad de interacción con el ADN: EMS y N-etil-N'-nitrosourea (ENU) son agentes alquilantes simples, mitomicina C es un agente que produce entrecruzamientos de las cadenas del ADN y sulfato de proflavina es un agente intercalante.

Analizando transformación celular, Popescu y col. (1985) sostienen que, aunque no existe una relación absoluta entre la inducción de ICH y otras respuestas biológicas, el ICH puede correlacionarse con transformación celular.

La inducción de transformación celular neoplásica está asociada con alteraciones en el ADN luego de la exposición a agentes carcinogénicos. La inducción paralela de transformación celular y de ICH sugiere que las lesiones del ADN involucradas en la formación de ICH pueden ser

esenciales para la inducción de transformación morfológica (Popescu y col., 1985).

Por ejemplo, las sales de arsénico, níquel y berilio a concentraciones efectivas para causar transformación celular inducen ICH y AC, mientras que el tungstato de sodio, un agente químico no-transformante, ni induce ICH ni produce AC (Larramendy y col., 1981).

Los cambios cromosómicos son también importantes en los estados tempranos de la transformación. Los carcinógenos dietilstilbestrol (DES), arsénico y asbestos inducen transformación en presencia de alteraciones cromosómicas (Barrett y col., 1984). DES induce no-disyunción cromosómica llevando a aneuploidía, arsénico es un clastógeno efectivo y asbestos es un inductor potente de cambios cromosómicos numéricos.

Sin embargo, según Popescu y Di Paolo (1984) las aberraciones están asociadas más estrechamente con letalidad que con la inducción de transformación.

En base a la correlación existente entre la inducción de ICH y la presencia de toxicidad celular para agentes metilantes (Morris y col., 1982) y para derivados de arilaminas N-oxidadas (Morris y col., 1984), entre otros, un paso común estaría involucrado en las dos respuestas biológicas; aunque los intercambios se observan a dosis de los tóxicos que no producen una reducción medible en la sobrevivencia celular (Morris y col., 1985).

Las células con una frecuencia elevada de ICH, como la hallada en los linfocitos periféricos de pacientes con síndrome de Bloom, no son menos viables que las que poseen menores valores de ICH (Wolff, 1983).

La relación entre ICH y citotoxicidad no se extiende a todas las clases de compuestos químicos, por ejemplo, radiación ionizante y ciertos agentes químicos radiomiméticos como bleomicina son ineficientes inducto-



res de ICH pero son letales para las células de mamíferos. Tampoco existe esta relación con derivados de benzo (a) pireno (Hsu y col., 1979).

Swenson y col. (1980), por su parte, han comunicado que la alquilación en el oxígeno 6 de la guanina (O<sup>6</sup>-alquil guanina) parece ser relevante para la inducción de ICH por los agentes alquilantes [MS, N-metil-N'-nitrosourea (MNU) y ENU].

Como las células deficientes en la remoción de O<sup>6</sup>-alquil guanina tienen frecuencias más altas de ICH luego de la exposición a agentes alquilantes que las células eficientes en su reparación, la presencia de O<sup>6</sup>-alquil guanina sería una lesión inductora de ICH (Popescu y col., 1985).

Cuando la inducción de ICH es comparada con la formación de cada producto de alquilación por Morris y col. (1984), no se observa una relación cuantitativa entre los niveles de cada aducto específico de ADN y la frecuencia de ICH. Los estudios moleculares indican que la alquilación del O<sup>6</sup> de la guanina es la causa más probable de lesiones que llevan a mutaciones de punto luego del tratamiento con agentes etilantes (EMS y ENU). La inducción de ICH no se correlaciona con estos dos parámetros medidos (Natarajan y col., 1984).

Hay datos que indican una posible participación de la alquilación del oxígeno en la producción de aberraciones (Abbondandolo, 1984). Las bases con oxígeno alquilado, tales como O<sup>6</sup>-alquilguanina y O<sup>4</sup>-alquiltimina, pueden aparearse mal con timina y guanina, respectivamente.

Por último, no existiría una relación simple entre reparación del ADN y la inducción de mutaciones, AC o ICH. Las células de xeroderma pigmentosa ya mencionadas, son deficientes en la reparación del ADN pero no muestran una aumentada sensibilidad a todos los clastógenos.

Inversamente, células con una buena respuesta a los agentes clastogénicos no necesitan poseer un defecto en su capacidad de reparación.

La aplicación de cafeína reduce la reparación posterior a la replicación del ADN, eleva la letalidad, aumenta la frecuencia mutacional e incrementa las aberraciones en células tratadas con carcinógenos, indicando que el mismo tipo de daño en el ADN es responsable de todos los efectos analizados (Stich y col., 1983). Kato (1973) observó que el valor de ICH disminuye en células irradiadas luego del tratamiento con cafeína.

Sin conocer aún el mecanismo involucrado en la formación de ICH, estos intercambios no serían el resultado de la reparación posterior a la replicación del ADN (Palitti y Becchetti, 1977; Bowden y col., 1979).

De lo expresado en esta sección se puede deducir que diferentes agentes inducen respuestas genotóxicas medibles en células de mamíferos. Estas respuestas incluyen inducción de mutaciones, transformación celular, muerte celular, formación de aductos, reparación del ADN, producción de AC y de ICH. La comparación entre ellas sugiere la presencia de distintos aspectos biológicos de la interacción entre el agente estudiado y la célula "blanco" que puede responder con AC e ICH según el agente en juego y según la célula ensayada.

#### I.5. Linfocitos humanos como sistema de prueba.

Tanto las AC como los ICH son estudiados esencialmente en cualquier población celular en división, o en cualquier población celular que pueda ser estimulada por un agente mitogénico a entrar en división. En animales hay varios tipos celulares que reúnen estas condiciones. Aparte de la sangre periférica, los linfocitos se encuentran en varios órganos: bazo, timo, médula osea, nódulos linfáticos, tejido gastrointestinal, amígdalas y apéndice. En sistemas experimentales con roedores, algunos de estos tejidos han sido utilizados para el análisis de AC y de ICH

(Conner y col., 1980; Tice y col., 1980; Sugujama y col., 1981; Kligerman y col., 1981; Morimoto y Koizumi, 1983; Putman y col., 1985; Sinha y col., 1985).

El índice mitótico elevado de los tipos celulares que se encuentran en la médula ósea, ha hecho a este tejido muy útil para la elección rutinaria.

En humanos hay solamente dos tipos celulares que se utilizan para estos propósitos. Estos son, las células de la médula ósea, que constituyen una población en división y los linfocitos periféricos, que normalmente no están en división pero pueden entrar en el ciclo celular cuando son estimulados "in vitro" con un mitógeno.

Por la facilidad de obtención de las muestras sanguíneas en comparación con la toma de muestras de la médula ósea, la mayoría de los estudios sobre la inducción de alteraciones cromosómicas en humanos se han realizado en linfocitos periféricos. En esta tesis se utilizará este ensayo.

Dentro de los contextos experimentales y de monitoreo humano, los linfocitos constituyen un tejido conveniente y revelante para el análisis citogenético (Evans y O'Riordan, 1975). Las muestras se obtienen fácilmente y pueden hacerse en forma reiterada sobre el mismo individuo, disponiéndose de un gran número de células humanas con pocos mililitros de sangre ya que cada mililitro puede contener de 1 a  $3 \times 10^6$  linfocitos pequeños.

Los linfocitos se distribuyen por todo el cuerpo estando en contacto íntimo y continuo con el suero que es el medio natural para el transporte e intercambio de los compuestos activos y los metabolitos entre las células y los tejidos. Desde este punto de vista, los linfocitos humanos constituyen un indicador celular casi ideal para el estudio

del daño sobre el material genético.

Nordenson y col. (1984) han comunicado que "el uso de los linfocitos como detectores del daño cromosómico se basa en la presunción que habría una correlación entre el grado de daño cromosómico en linfocitos y el existente en otras células somáticas, y por lo tanto, los linfocitos pueden servir como células indicadoras".

Virtualmente todos los linfocitos sanguíneos constituyen una población celular sincronizada en el mismo estado G<sub>0</sub> del ciclo celular y en individuos sanos estas células están infrecuentemente involucradas en proliferación mitótica "in vivo".

Desde la observación de Moorhead y col. (1960) que los linfocitos periféricos pueden ser estimulados para entrar en el ciclo celular y ser observados en metafase, se han obtenido una gran cantidad de datos utilizando a los linfocitos humanos como sistema de prueba.

La fitohemaglutinina (PHA), un extracto del poroto Phaseolus vulgaris, es el mitógeno usado más frecuentemente para este propósito. Se cree que el mecanismo por el cual actúa involucraría la unión del mitógeno a receptores de la superficie celular, un proceso que presenta alguna semejanza con las reacciones inmunes inducidas por el antígeno y este proceso estaría acompañado por cambios metabólicos (Allen y col., 1984)

Además de la PHA, se han utilizado otros mitógenos como concanavalina A, extracto de Wistaria floribunda y lenticil lectina para estimular a los linfocitos a entrar en mitosis (Deknudt y Kamra, 1983). De los mitógenos nombrados es la PHA la que posee la mayor actividad mitogénica (Deknudt, 1982). Actualmente se sabe que en el hombre todos estos mitógenos activan primariamente a los linfocitos T, es decir, las células derivadas del timo. El linfocito T está comprometido con la respuesta inmune, de modo tal que, cuando se realiza un análisis de una exposición a

agentes físicos o químicos "in vivo", cualquier exposición reciente del individuo a un estímulo inmunológico puede alterar positivamente o negativamente el número de células con alteraciones cromosómicas, dependiendo del momento en que las células se hayan extraído del individuo (Evans y O'Riordan, 1975).

Si bien son los linfocitos T los que primero responden a la PHA, existe una pequeña fracción de los linfocitos B que también proliferan (Evans y Vijayalaxmi, 1980). Los linfocitos T que se replican más tempranamente comienzan la síntesis del ADN aproximadamente 24 hs. después de la estimulación, otros responden en forma asincrónica hasta cuatro días o más luego del tratamiento con PHA. Los linfocitos B responden a la PHA más lentamente y poseen una tasa de proliferación celular en cultivo más alta que las células T (Allen y col. 1984).

El tiempo de vida de los linfocitos humanos es variable, siendo de hasta varios años. Debido al largo tiempo de vida de muchos de los linfocitos T en sangre periférica, el uso de la estimulación con PHA ofrece la posibilidad de detectar daño acumulado (Vainio y Sorsa, 1983). En realidad son los datos de roturas cromosómicas los que indican una vida media de los linfocitos de aproximadamente dos años o más (Hook, 1981; Leónard y col., 1984). La evidencia para los efectos de irradiación puede manifestarse varios años después de la exposición, como es evidente de los estudios de pacientes expuestos a radiación terapéutica o a la radioactividad de las explosiones de la bomba atómica hace más de cuarenta años. Las lesiones cromosómicas inestables lentamente desaparecen, mientras que las translocaciones balanceadas permanecen relativamente constantes. Las aberraciones inestables son aproximadamente 3.5 veces más frecuentes que las translocaciones balanceadas inmediatamente después de la exposición, pero se nivelan de modo tal que son aproximadamente

iguales luego de dos años para luego disminuir. Aberraciones similares pero menos evidentes fueron inducidas por agentes químicos. Una evidencia directa de rearrreglos cromosómicos luego de la exposición a agentes químicos se obtiene de los datos sobre trabajadores expuestos a benceno dos años antes y de pacientes que habían recibido quimioterapia siendo evidente en un caso el efecto once años después de la exposición (Hook, 1981).

#### I.5.1. Tipos de daños analizados en linfocitos periféricos.

##### I.5.1.1. AC inducidas por radiación.

Por una variedad de razones, es importante analizar la utilidad del ensayo de linfocitos para estimar la exposición a radiación ionizante en forma separada de los casos expuestos a agentes químicos. Todos los primeros estudios sobre el análisis de AC en linfocitos se realizaron sobre individuos expuestos a radiaciones. El hecho que, en estos casos la estimación de la exposición podría hacerse con alguna exactitud ha llevado a pensar que procedimientos similares podrían aplicarse a personas, grupos o poblaciones expuestas a agentes químicos ambientales o en el lugar de trabajo.

Radiación y un pequeño número de agentes químicos (por ejemplo, estreptonigrina, bleomicina, neocarzinostatín, citosina arabinosida y 8-metoxicafeína) son capaces de producir aberraciones en todos los estados del ciclo celular; aberraciones tipo cromosoma en G1 y aberraciones tipo cromátida en S y G2.

Luego de la exposición a radiación, aberraciones tipo cromosoma serán inducidas en los linfocitos en el estado G<sub>0</sub> del ciclo celular, que son células que no se dividen, y podrán ser vistas en la primer metafase luego de la estimulación mitogénica en cultivo. El hecho que la aberra-

ción pueda producirse en células en Go significa que su frecuencia puede ser relacionada directamente con la dosis recibida (es decir, la frecuencia de aberraciones es proporcional a la dosis). Se ha demostrado para muchas especies que la frecuencia de aberraciones inducidas "in vitro" es la misma que la frecuencia inducida por la misma dosis recibida "in vivo". (Preston, 1985).

Esto significa que puede obtenerse una curva estandar dosis-respuesta para cualquier tipo de radiación "in vitro" y luego esa curva usarse para estimar las dosis recibidas por los individuos como resultado de accidentes, y exposiciones médicas o ambientales a radiaciones. La frecuencia de aberraciones (generalmente dicéntricos) es medida en muestras de sangre de individuos expuestos y luego convertida a una dosis estimada por medio de la curva dosis-respuesta estandar. Hay extensa literatura sobre el uso de los linfocitos como dosificador biológico para muchas radiaciones diferentes (Brandom y col., 1978; Natarajan y Obe, 1980; Pohl-Rüling y Fischer, 1979).

La prueba de linfocitos también puede usarse para estimar las dosis resultantes de exposiciones crónicas a radiaciones (Evans y col., 1979). Esto es posible nuevamente porque las aberraciones son inducidas en células en Go, y su frecuencia estaría directamente relacionada con la exposición.

Las células que contienen aberraciones inducidas por radiación se perderán gradualmente del "pool" de linfocitos periféricos, como también sucede con las células normales, es decir que no contienen aberraciones, como resultado del recambio de linfocitos. Sin embargo, las células que repueblan el "pool" periférico derivarán de precursores celulares normales, y no de aquellos que contienen aberraciones. Esto conduce a que, durante las exposiciones crónicas (meses o años) la frecuencia de

aberraciones no será aditiva con el tiempo, sino que se alcanzará algún equilibrio donde se formarán nuevas aberraciones y algunas ya existentes se perderán de la población muestreada.

Un argumento similar puede aplicarse para determinar el tiempo máximo de muestreo luego de una exposición aguda con el fin de medir la máxima frecuencia de aberraciones o la frecuencia real inducida. El recambio de los linfocitos resultaría en la pérdida de células del "pool" periférico, tanto normales como anormales, y la repoblación por precursores celulares normales. Según Preston (1985) la frecuencia de aberraciones permanece constante por seis semanas aproximadamente luego de la exposición.

Se han tomado muestras de sangre muchos años después de la exposición como por ejemplo, en personas expuestas a la bomba atómica en Hiroshima y Nagasaki. Basándonos en el hecho que alguna porción de los linfocitos son de muy larga vida (más de 20 años), las aberraciones inducidas por radiación pudieron ser aún observadas en los linfocitos presentes en el momento de la exposición (Bender, 1984). Si se tiene presente que la frecuencia de aberraciones declina exponencialmente con el tiempo, puede hacerse una estimación aproximada de la dosis recibida.

#### I.5.1.2. AC inducidas por agentes químicos.

Basados en el éxito de la prueba con linfocitos para estimar las exposiciones a radiaciones, pareció apropiado analizar las aberraciones presentes en muestras de sangre de individuos expuestos ocupacionalmente a uno o a una mezcla de agentes químicos, e intentar determinar si existía exposición a un clastógeno, y relacionar frecuencias de aberraciones con el posible nivel de exposición.



Aquí, sin embargo, hay que tener en cuenta que la cantidad de daño en el ADN presente en el momento de la replicación que tiene el potencial de convertirse en AC dependerá de varios factores:

- 1) la dosis recibida,
- 2) la cantidad inducida de daños particulares que pueden resultar en AC (un valor que puede variar de agente a agente),
- 3) la cantidad de reparación del ADN en las células G<sub>0</sub> antes del muestreo (es decir, tiempo transcurrido entre exposición y muestreo) y
- 4) la cantidad de reparación en células G<sub>1</sub> a partir de la estimulación mitogénica a la primer fase S "in vitro".

Por supuesto, muchos de estos factores estarán sujetos a la variación individual.

Las AC inducidas por tratamientos químicos son producidas durante la fase S independientemente del estado del ciclo celular donde las células fueron tratadas, siendo estas aberraciones principalmente del tipo cromatídico como ya fue mencionado.

Se sostiene entonces, que las aberraciones inducidas por muchos agentes químicos son el resultado de un mecanismo que depende del pasaje por la fase S, ya sea a través de la replicación del ADN en sí misma o por un fenómeno de post-replicación.

Sin embargo, bajo condiciones determinadas las células tratadas en G<sub>0</sub> con agentes químicos que normalmente inducen aberraciones tipo cromátida, también producen cambios tipo cromosoma. Evans y Vijayalaxmi (1980) han observado que linfocitos tratados con mitomicina C en G<sub>0</sub> y estimulados a entrar en división con PHA a diferentes tiempos luego del tratamiento presentan cambios cromosómicos estructurales que dependen de los días en cultivo entre la exposición al agente químico y el inicio de la división.

Finalmente es más apropiado considerar que la posibilidad de producir aberraciones en células G1 o G2 luego de la exposición a agentes químicos es normalmente baja, y que la probabilidad está considerablemente aumentada cuando las células pasan a través de la fase S.

#### I.5.1.3. ICH inducidos por radiación y agentes químicos.

La respuesta de ICH es débil ante la exposición a radiaciones ionizantes en cualquier estado del ciclo celular. En linfocitos irradiados en G0 la reparación del daño inducido en el ADN conduce a que poco o ningún daño esté presente cuando las células alcanzan la fase S, momento de la formación de los ICH (Preston, 1985). Por lo tanto, el análisis de AC en linfocitos es preferible al análisis de ICH en los casos de exposición a radiación.

Sin embargo, a pesar de lo reportado en la literatura acerca de los resultados negativos para linfocitos de individuos expuestos a radiación ionizante, Gundy y col. (1984) han demostrado que aumenta el valor de ICH en personas expuestas ocupacionalmente a radiación ionizante. Más investigaciones serán necesarias en relación con este tema.

En el caso de exposiciones a agentes químicos el análisis de ICH es un ensayo más sensible para establecer si los individuos han estado expuestos a un agente capaz de producir cambios cromosómicos.

Esta mayor sensibilidad de la prueba de ICH se debe posiblemente al hecho que el daño inducido en células en G0 y que per-

manece no reparado hasta la replicación, tiene una probabilidad más alta de resultar en un ICH que en una AC (Preston, 1985).

Sin embargo, la prueba de ICH con linfocitos humanos expuestos "in vivo" está sujeta a muchos de los problemas discutidos para AC. Como los ICH se producen en el momento de la síntesis del ADN, y la exposición se produjo en células en Go que no se dividen, la frecuencia de ICH estará influenciada por la reparación del daño entre la exposición y el muestreo de las células en Go, y por la reparación durante la primer fase G1 "in vitro".

En base a esto la frecuencia de ICH estaría relacionada indirectamente con la exposición debido principalmente a la reparación del daño inducido en el ADN.

Hay casos donde puede determinarse alguna estimación razonable de la exposición, habiendo una relación lineal entre valores crecientes de ICH e incrementos en la misma, como sucede en el caso de la exposición a óxido de etileno (Stolley y col., 1984). Lambert y col. (1978) han comunicado que al aumentar el número de cigarrillos fumados por día aumenta la frecuencia de ICH obtenida.

#### I.5.1.4. Ciclo Celular en linfocitos periféricos.

Luego de la estimulación de los linfocitos humanos con PHA los cultivos contienen diferentes generaciones celulares, es decir, células que se dividen un diferente número de veces (Tice y col., 1976; Morimoto y Wolff, 1980).

Esta heterogeneidad de la división celular ha sido atribuida a diferencias en la duración del ciclo celular, a diferencias en

los tiempos en que las células comienzan su blastogénesis en respuesta a la PHA (Snope y Rary, 1979).

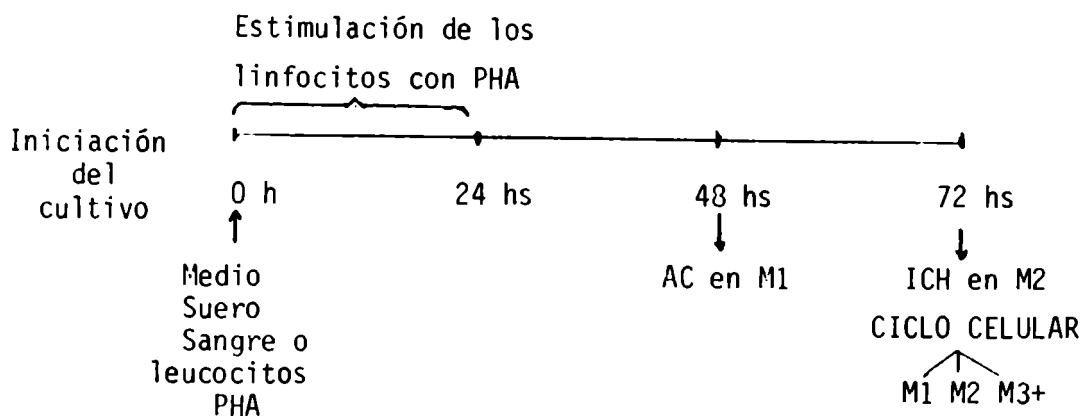
Morimoto (1984) estableció que esta heterogeneidad se debe al momento en el cual las células comienzan su primer síntesis de ADN en respuesta a la PHA. Los linfocitos en división, ya sea que entren en mitosis temprano o tardíamente luego de la estimulación tienen aproximadamente el mismo tiempo medio del ciclo celular.

Los resultados sobre la proliferación de los linfocitos sanguíneos varían dependiendo, en gran medida, del sistema de cultivo y método de medición empleados. Por ejemplo, Crossen y Morgan (1979) hallaron tiempos más largos entre una generación y la siguiente, utilizando una concentración de timidina tritiada más alta que la reportada por Morimoto (1984).

Tanto Tice y col. (1976) como Morimoto y Wolff (1980) examinando cultivos de linfocitos de 72 hs., encontraron porcentajes similares de células en M1, M2 y M3+ (aproximadamente el 4% de las células está en M1, el 20% en M2 y 76% en M3+).

Para estudiar los efectos de un compuesto sobre la cinética de proliferación celular, se mantienen los cultivos durante 72 hs. (Wolff, 1981). Si la adición de un compuesto produce enlentecimiento de la proliferación celular, entonces a las 72 hs. el número relativo de células que se dividen una, dos o tres veces será el observado en un tiempo anterior, pudiéndose medir la cantidad de depresión celular en base a la proporción de estas células. Por ejemplo, si los porcentajes de células en M1, M2 y M3+ obtenidos luego de 56 hs en cultivos controles es observado a las 72 hs en un cultivo tratado, ha ocurrido una depresión del ciclo celular de 16 hs.

Los pasos básicos involucrados en el cultivo de linfocitos para el análisis de AC, ICH y ciclo celular serían los siguientes:



De acuerdo a lo establecido previamente, el análisis de AC se realiza en cultivos de 48 hs, donde la mayoría de los linfocitos transformados está en su primera mitosis (M1). Rutinariamente, el análisis de ICH se efectúa en cultivos de 72 hs en presencia de BrdU durante dos ciclos celulares; aunque las tasas de proliferación de los linfocitos pueden variar, una proporción elevada de células se hallan en M2 a las 72 hs de cultivo.

#### I.5.2. Análisis de muestras de médula ósea.

También es posible analizar cambios cromosómicos en muestras de médula ósea. Sin embargo, el uso de esta prueba no puede considerarse rutinario debido al problema asociado con la obtención de las muestras.

Las células de la médula ósea constituyen una población en división, a diferencia de la población de linfocitos periféricos. Por lo tanto, en el momento de una exposición aguda, las células estarán presentes en todos los estados del ciclo. Para una exposición a radiación esto significa que las aberraciones tipo cromosoma se inducirán en células en G1 y aberraciones tipo cromátida en células en S y G2, y estas serán vistas como tales en la primera mitosis luego de la exposición. Si trans

curre algún tiempo entre la exposición y el muestreo (más de 24 hs), la población analizada estará en su segunda o subsecuentes divisiones luego de la exposición, ya que las células de la médula ósea están normalmente en división. La frecuencia de aberraciones medida no representará la frecuencia inducida sino la frecuencia transmitida. Esta será mucho menor que la frecuencia inducida debido a la muerte celular como resultado de la pérdida de fragmentos acéntricos durante la división o a la inhibición mecánica de la mitosis por la presencia de dicéntricos. Además, las aberraciones tipo cromátida se convertirán en tipo cromosoma derivadas de las replicaciones subsecuentes. Los únicos tipos transmitidos con una alta probabilidad son las translocaciones recíprocas y las inversiones. La eficacia de su análisis no es particularmente alto aún con preparados bandeados.

No se recomienda el análisis de muestras de médula ósea en situaciones de exposición a radiaciones a menos que se tomen muestras muy tempranas.

Se aplican argumentos similares luego de una exposición a agentes químicos. Se esperan únicamente aberraciones tipo cromátida independientemente del estado del ciclo celular tratado. Se necesitan nuevamente muestras analizadas en la primera mitosis, luego de la exposición, para medir la frecuencia inducida. En tiempos posteriores se producirán aberraciones tipo cromosoma a partir de las aberraciones cromatídicas inducidas, y la muerte celular será el resultado de la división de células aberrantes, dando una frecuencia de aberraciones disminuída. También, la probabilidad de la transmisión de una translocación recíproca del tipo cromátida es más baja que la existente para una translocación recíproca del tipo cromosoma.

Sin embargo, si se puede extraer una muestra temprana, el ensayo

de la médula ósea es más sensible para la detección de una exposición química que la prueba de linfocitos (Jensen y Nyfors, 1979). Esto se debe al hecho que alguna proporción de las células de la médula estarán en la fase S en el momento de la exposición, y las aberraciones pueden producirse en estas células, a diferencia de los linfocitos donde las células expuestas están en G<sub>0</sub>. También, como la fase G<sub>1</sub> en células de la médula es mucho más corta que la primer G<sub>1</sub> "in vitro" de los linfocitos, se espera que el daño inducido y no reparado en estas células en G<sub>1</sub> estará aún presente en la fase S y se formarán aberraciones. Así una alta proporción de células de la médula ósea tiene la potencialidad de contribuir a la población celular aberrante, mientras que solamente una pequeña proporción de linfocitos tiene este mismo potencial.

En el caso de exposiciones crónicas a agentes químicos es difícil extraer conclusiones del ensayo de médula ósea debido al ciclaje de la población celular durante la exposición.

Por la dificultad de tomar muestras de médula ósea en forma rutinaria, esto podrá aplicarse únicamente bajo circunstancias particulares donde existan indicaciones de riesgo para la salud genética humana (Vainio y col., 1983), extrayéndose preferentemente muestras cercanas al momento de la exposición.

Debido a su versatilidad dentro de los sistemas experimentales y a su relevancia para el monitoreo humano, la prueba de linfocitos asegura su aplicación continuada para acceder al riesgo genético resultante de la exposición a agentes físicos o químicos.

#### 1.6. Objetivo

El objetivo de esta tesis es la de emplear las técnicas citogenéticas de AC y de ICH para detectar los efectos provocados por la expo-

sición a industrias químicas y a pesticidas sobre el material genético. Los estudios se realizan utilizando los fluidos corporales (sangre y orina) de las poblaciones expuestas.

La importancia de este tipo de estudio se fundamenta en la ausencia de datos al respecto en nuestro país.

Por otro lado y mediante la utilización de las mismas pruebas citogenéticas se investiga el efecto del pesticida Aldicarb y de su derivado nitrosado sobre linfocitos humanos cultivados en presencia de un sistema de activación metabólica exógeno.

Se ha comunicado que el Aldicarb, principio activo del Temik, es un veneno muy tóxico, siendo para los mamíferos 250 veces más mortal que el DDT (un pesticida organoclorado) y 850 veces más potente que el carbaril (un pesticida carbámico) (Marshall, 1985).

Teniendo en cuenta que el Temik es uno de los pesticidas más usados en la Argentina en floricultura y horticultura para el control de insectos y nematodos y que son escasas las descripciones de sus efectos sobre el material genético, nos pareció interesante elegir al Aldicarb para los ensayos "in vitro".



## II. Parte Experimental.

### II.1. Estudios citogenéticos "in vivo".

#### II.1.1. Monitoreo biológico de la exposición a agentes genotóxicos en el ambiente laboral.

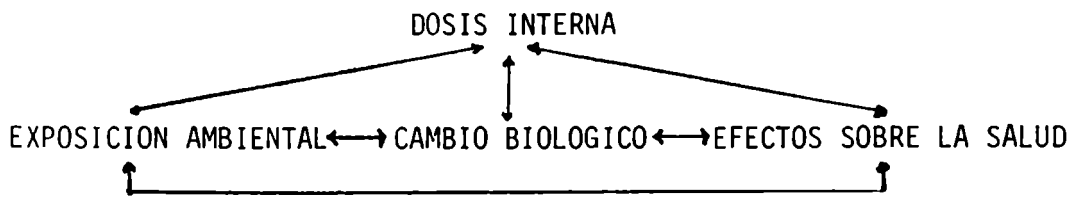
Los métodos de bio-monitoreo para medir la exposición a sustancias potencialmente mutagénicas y/o carcinogénicas están dentro de dos grupos distintos (Van Sittert y de Jong, 1985):

- (a) Métodos que se basan en la medición de la concentración de la sustancia misma, de sus metabolitos o de los productos de reacción de la sustancia activa con las macromoléculas celulares en medios biológicos (por ejemplo, sangre, orina y aire exhalado) y
- (b) Métodos basados en la medición de efectos biológicos que resultan de la exposición a estas sustancias.

En el primer grupo, la dosis total en el cuerpo, la dosis presente en un tejido específico o la dosis presente en el órgano "blanco" puede determinarse usando métodos bioquímicos. Esto proporciona una medida más exacta de la absorción de la sustancia que la que puede ser estimada de la concentración del agente en el medio ambiente.

En el segundo grupo, los métodos son usados para la detección y cuantificación de los efectos biológicos que pueden considerarse como indicadores de la presencia de agentes químicos en el cuerpo. Esto permite la detección temprana de efectos adversos para la salud que resultan de la exposición a una sustancia o mezcla de sustancias determinadas.

La relación entre exposición ambiental, datos de monitoreo biológico y efectos sobre la salud se muestra en el cuadro siguiente:



Los métodos biológicos para monitorear poblaciones expuestas incluyen las pruebas basadas sobre efectos biológicos como AC e ICH en linfocitos sanguíneos periféricos, micronúcleos en eritrocitos maduros o en linfocitos, reparación del ADN en células somáticas, mutantes hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa (HGPRT) en células sanguíneas y mutantes de hemoglobina en glóbulos rojos.

Los métodos más desarrollados son la medición de AC e ICH en linfocitos periféricos. Las otras técnicas están aún bajo análisis.

El monitoreo de individuos expuestos para acceder al daño producido en el material genético requiere del uso de procedimientos no-invasivos para la obtención de las muestras en las que ese daño será analizado.

Una evaluación de la literatura acerca del uso de pruebas con espermatozoides humano en relación al daño presente en células germinales enfatiza las dificultades en aplicar estos métodos a grupos de individuos expuestos en ausencia de enfermedad. Aunque las anomalías espermáticas pueden ser indicadores de exposición, se desconoce su significado sobre la función reproductora. Hasta ahora existe escasa evidencia a favor o en contra de una asociación entre anomalías en el espermatozoides (número, motilidad y morfología espermática) y consecuencias no deseadas como abortos espontáneos o defectos en el nacimiento (Maugh, 1982; Wyrobek y col., 1983).

Al estudiar la formación de AC y de ICH en los linfocitos circulantes, uno está asumiendo que la sangre es un tejido que representa el

daño que ocurre en todo el organismo. Por lo tanto, al examinar las células sanguíneas se está monitoreando indirectamente los efectos que están ocurriendo en tejidos distantes e inaccesibles.

El rol del monitoreo citogénético en el caso de radiación ionizante ha sido reconocido y practicado durante años. En cambio, los datos sobre efectos clastogénicos en grupos de trabajadores expuestos ocupacionalmente a agentes químicos son aún limitados y de naturaleza cualitativa.

A pesar de esto y sobre la base de datos experimentales y de observaciones reiteradas de daño cromosómico inducido "in vivo", podría considerarse al monitoreo citogenético como un método útil para detectar exposiciones peligrosas (Vainio y Sorsa, 1983).

Varias investigaciones se realizaron midiendo los efectos de genotóxicos químicos sobre la frecuencia de AC y de ICH en linfocitos periféricos de poblaciones expuestas laboralmente (Tabla 1)

TABLA 1. Resultados publicados sobre exposición ocupacional a agentes químicos y determinaciones de AC y de ICH.

Agente Químico	Resultado del estudio		Referencias
	AC	ICH	
Agentes de la goma	(+)	+	Mäki-Paakkanen y col.(1984)
Asbestos	*	+	Rom y col. (1983)
Benceno	+		Sarto y col. (1984)
Cloruro de Vinilo	+		Hansteen y col.(1978) Anderson y col.(1981)
Combustible fósil	+		Léonard y col. (1984)
Epiclorohidrina	+		Picciano (1979)
Epoxi-resinas			Mitelman y col. (1980)
Estireno		+	Meretoja y col. (1977) Andersson y col. (1980)
Formaldehído			Bauchinger y Schmid (1985)
Hidrocarburos aromáticos policíclicos			Becher y col. (1984)
Metil-paratión			Stocco y col. (1982) Yu y col. (1984)
Níquel	+		Waksvik y col.(1984)
Oxido de etileno	+	+	Stolley y col. (1984) Galloway y col. (1986)
Plomo		(+)	Mäki-Paakkanen y col.(1981)
Solventes orgánicos	+	+	Funes-Cravioto y col. (1977)
Tolueno	+		Schmid y col. (1985)

+ Resultados positivos

- Resultados negativos

(+) posibles resultados positivos

\* no hay datos

La orina es otro de los fluidos corporales utilizados para el monitoreo biológico en el ambiente laboral.

Muchos agentes químicos son excretados en la orina como metabolitos mutagénicos activos, mientras que otros mutágenos químicos son excretados como conjugados no-mutagénicos.

Debido a esta conjugación de grupos funcionales del compuesto original o de sus metabolitos vía glucuronil-transferasas para dar O-glucurónicos, es importante que el ensayo se realice en presencia de B-glucuronidasa para hidrolizar los metabolitos conjugados (Bartsch y col., 1982).

Por otro lado, en la orina las concentraciones de compuestos mutagénicos son generalmente bajas (Sorsa y col., 1981). Por tal motivo, comúnmente se utilizan procedimientos para la concentración de los componentes urinarios para su posterior análisis (Yamasaki y Ames, 1977).

Una limitación obvia de esta prueba es que puede detectar solamente genotóxicos que sean excretados en la orina ya sea en forma activa o como conjugados. Aún con esta limitación el ensayo ofrece posibilidades promisorias para el monitoreo biológico de poblaciones expuestas.

Se han identificado metabolitos mutagénicos en orinas de individuos expuestos usando bacterias, células de hamster Chino o linfocitos humanos como células indicadoras y contando mutaciones, ICH y AC, respectivamente.

Existió un aumento en la actividad mutagénica con orina de trabajadores de la industria de la goma (Vainio y col., 1982), en la frecuencia de ICH con orina de pacientes que recibieron drogas citostáticas (Guerrero y col., 1979) y de AC con orina de fumadores y de trabajadores expuestos a pesticidas (Pilinskaia, 1985).

### II.1.2. Factores que influyen sobre la frecuencia de ICH y de AC.

Aún cuando los pasos técnicos como condiciones de cultivo y tiempo de cultivo celular sean mantenidos constantes, los linfocitos de individuos diferentes, como así también de un mismo individuo a través del tiempo, pueden exhibir considerable variación en los niveles basales e inducidos de ICH (Lambert, 1984; Speit y col., 1986).

Aunque los estudios de mellizos monocigóticos y dicigóticos indican que la variación genética no tiene mayor influencia sobre la variación de las frecuencias de ICH espontáneos o inducidos (Hedner y col., 1984,a), otros resultados claramente sugieren que hay una susceptibilidad aumentada y/o una resistencia disminuída, determinadas genéticamente, a los efectos de agentes ambientales que dañan el cromosoma.

Morimoto y Wolff (1980) expusieron linfocitos humanos a benceno y sus metabolitos (fenol, hidroquinona y catecol) y hallaron que aunque el benceno y el fenol inducen muy pocos ICH, hidroquinona y catecol son muy activos, indicando que estos son los metabolitos responsables de los efectos deletéreos del benceno. En experimentos recientes (Wolff 1984) se encontró que esta respuesta no es universal y que la constitución genética de cada persona puede afectar el metabolismo de la hidroquinona.

Habría dos clases de individuos: aquellos cuya sangre responde a la hidroquinona y aquellos cuya sangre no responde. Una actividad enzimática determinada genéticamente, podría afectar el modo con el que una persona respondería a un daño químico.

Por un lado existen evidencias que indican que la edad y sexo no influyen significativamente sobre la frecuencia de ICH en linfocitos humanos normales (Galloway y Evans, 1975; Morgan y Crossen, 1977), mientras que por otro lado hay observaciones opuestas: se ha demostrado un

incremento significativo en el valor de ICH con el aumento de la edad de los individuos analizados (Schmidt y Sanger, 1981; Sarto y col., 1984) y las mujeres poseen una frecuencia de ICH más alta que los varones entre adultos normales (Hedner y col., 1982; Soper y col., 1984; Margolin y Shelby, 1985).

También, los hábitos de fumar y beber pueden afectar los niveles de ICH.

A partir de los primeros trabajos acerca de exposición ocupacional que mostraban un aumento en el valor de ICH por célula en los fumadores, varias investigaciones han confirmado esta observación (Hopkin y Evans, 1980; Sinha y col., 1985; Stucker y col., 1986), mientras otros no han obtenido los mismos resultados (Hollander y col., 1978; Ardito y col., 1980).

Una explicación de esta discrepancia podría ser la gran superposición en las frecuencias de ICH entre no-fumadores y fumadores, lo cual lleva a que cada grupo deba comprender un número relativamente grande de individuos para permitir la detección, si es que existen, de diferencias estadísticamente significativas.

Teniendo presente que el humo de cigarrillo "in vivo" puede afectar la frecuencia de ICH, tanto el grupo control como el expuesto deben ser cuidadosamente encuestados con respecto al hábito de fumar cuando se usa la técnica de ICH en el monitoreo de poblaciones expuestas.

Butler y Sanger (1981) y Hedner y col. (1984,b) han encontrado un incremento en los valores de ICH en alcohólicos cuando se los compara con grupos controles.

Estos mismos factores influyen sobre la frecuencia de AC. En efecto, se ha observado un aumento significativo en los valores de AC aso

ciados con el incremento de la edad (Hedner y col., 1982; Galloway y col. 1986).

Contrariamente, Sinha y col. (1986) no detectaron una influencia significativa de la edad sobre el número de aberraciones totales.

Existen diferencias entre los sexos en los valores de AC según Hedner y col. (1982).

También se han hallado datos contradictorios en relación al hábito de fumar y su influencia sobre la frecuencia de AC (Andersson y col. 1980; Hopkin y Evans, 1980; Galloway y col, 1986; Sinha y col. 1986).

La identificación y cuantificación de estas potenciales variables debe ser tan completa como sea posible en el monitoreo de poblaciones con el objeto de ajustarlas al máximo grado. Como tales variables (edad, sexo, fumar, uso de drogas, radiación diagnóstica o terapéutica) afectan la frecuencia de ICH o de AC, para determinar si los cambios citogenéticos han sido inducidos por la exposición a un agente físico o químico, la frecuencia debe ser comparada a la de un grupo apareado no-expuesto.

Es ideal que el mismo individuo sea usado como control antes de la exposición. Generalmente, esto no es posible de realizar en la práctica. Es muy difícil conseguir un control apareado para cada individuo ya que dos seres humanos son genéticamente diferentes y además no tienen hábitos idénticos.

Por lo tanto, se trata de seleccionar el grupo control más apropiado para que la única variable a considerar sea la exposición al compararlo con el grupo expuesto en el ambiente laboral.



### II.1.3. Intercambio de cromátidas hermanas en trabajadores de una industria química.

El objetivo de esta investigación fue el estudio de los fluidos corporales (sangre y orina) de los trabajadores de una industria química de Buenos Aires. En dicha industria se producen taninos sintéticos, EDTA y blanqueadores estilbénicos y se formulan los pesticidas malation, diazinón y heptacloro.

Se ha informado que malati6n produce aumentos en la frecuencia de ICH en células de hamster Chino V79 (Chen y col., 1981), en células CHO (Nishio y Uyeki, 1981) y en fibroblastos fetales humanos (Nicholas y col., 1979). Además incrementa la frecuencia de micronúcleos en células de médula ósea de ratones Rockland luego de tratamiento dérmico (Dulout y col., 1982, b) y el número de AC, también en células de médula ósea, de hamster Sirio tratados "in vivo" (Dzwonkowska y Hubner, 1986).

Diazin6n produce aumentos en la frecuencia de ICH en células linfoides humanas en presencia del sistema S9 de activaci6n metab6lica (Sobti y col., 1982) y AC en células pulmonares de hamster Chino (Matsuoka y col., 1979).

Heptacloro es mutagénico en Salmonella typhimurium TA 98 y TA 100 en presencia de la fracci6n S9 de hígado de rata o de la fracci6n S1 de maíz (Gentile y col., 1982). Induce AC en células de médula ósea de ratones tratados y síntesis de ADN no-programada en células humanas transformadas con SV 40; es hepatocarcinogénico para ratones (IARC, 1979).

No se ha hallado informaci6n acerca de la genotoxicidad de los otros compuestos químicos manipulados.

El monitoreo biológico de los individuos expuestos de la industria química se efectuó mediante el análisis de la frecuencia de ICH en linfocitos periféricos y del efecto de los concentrados de orina sobre el ICH de linfocitos de un único dador sano.

## Materiales y Métodos

### Descripción de la población.

Se estudiaron 42 individuos: 22 trabajadores de la empresa y 20 controles constituídos por dadores voluntarios de sangre no expuestos ocupacionalmente a sustancias químicas.

Los expuestos y los controles fueron apareados por edad. El rango de edad fué de 23 a 56 años, con un promedio de 41.0 en los trabajadores y de 38.4 en los controles.

Se recolectó información sobre hábitos de fumar y beber, uso de drogas, síntomas de enfermedades anteriores, tipo de trabajo realizado, antigüedad en el mismo, historia de intoxicaciones previas y niveles de colinesterasa en sangre.

### Preparación de los concentrados de orina (CO).

Se estudiaron 14 CO: 9 trabajadores y 5 controles. Las muestras de orina de los trabajadores y de los controles, que ingirieron una dieta normal y no recibieron medicación alguna en las últimas 48 hs, se recogieron durante 12 hs comenzando el día martes 4 hs después de finalizado el día de trabajo.

El análisis de rutina de las orinas por el ensayo de Combur (Boehringer) dió valores normales. Se determinó la concentración de creatinina de todas las orinas.

Las orinas fueron filtradas a través de papel de filtro Whatman n° 1 y almacenadas a -40°C. Posteriormente las muestras fueron descongeladas y nuevamente filtradas. Se usaron cartuchos Sep-pack C18 (Waters Associated Inc.; Milford, Mass) para concentrar las sustancias hidrofóbicas de la orina.

La orina se dividió en fracciones que contenían dos mmoles de

creatinina. Cada fracción se inyectó en el cartucho. Luego de remover la histidina residual, otras sustancias hidrofílicas y sales inorgánicas del cartucho con 3 ml de agua destilada, los compuestos no polares se eluyeron con 3 ml de acetona.

Antes de usarlo nuevamente se lavó el cartucho con 3 ml de metanol y se regeneró con 3 ml. de agua. Para la concentración de todas las fracciones de orina de un mismo individuo fue usado un cartucho.

Las fracciones eluidas de un individuo se reunieron y la acetona se evaporó a 60°C bajo una atmósfera de nitrógeno.

El residuo se disolvió en 0,4 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) por mmol de creatinina y se almacenó a -40°C hasta su uso.

Con este procedimiento se logró concentrar aproximadamente 170 veces el volumen inicial de orina.

#### ICH en linfocitos periféricos.

Se usó medio F15 (Gibco) suplementado con 13% de suero fetal bovino (Gibco), 0,5% de fitohemaglutinina P (Difco), 10 µg/ml de bromodeoxiuridina (Sigma) y 80 µg/ml de gentamicina..

Esta mezcla se llamará en adelante Medio Completo (MC).

Se agregó sangre entera heparinizada de los individuos estudiados de modo tal que la concentración final de sangre en el MC fue del 4%. Los cultivos se incubaron a 37°C en oscuridad durante 72 hs. Se logró el arresto mitótico con 0.2 µg/ml de colchicina, la cual se agregó durante los últimos 90 min del período de cultivo.

Luego las células se trataron 15 min. con 0.075 M de ClK y se fijaron en metanol: ácido acético (3:1).

Los preparados cromosómicos obtenidos se trataron de acuerdo al método descrito por Perry y Wolff (1974) con ligeras modificaciones: los preparados se colorearon con Hoechst 33258 (1 µg/ml de agua) durante 20 min

en oscuridad, se expusieron a la luz solar durante 3.5 hs, se lavaron con agua y se incubaron 1 h. en 2XSSC (0.3 M de cloruro de sodio-0.03 M de citrato trisódico) a 60°C.

Finalmente los preparados se colorearon con Giemsa 10% en buffer Sörensen pH 6.8, durante 4 min.

El valor de ICH/célula/individuo se calculó del análisis de 30 metafases (2n=46) en segunda división. El recuento fué realizado por un observador en preparados codificados.

Para la evaluación estadística de los resultados se utilizó el test "t" de Student.

#### Efecto de los CO sobre el ICH de linfocitos periféricos.

El efecto de los CO sobre el valor de ICH de linfocitos se estudió utilizando la técnica ya descrita. En este caso sangre entera heparinizada de un único dador sano se agregó al MC de forma tal que la concentración final fuese del 4%. A estos frascos se les agregaron 5  $\mu$ l/ml de los CO disueltos en DMSO desde el inicio del tiempo de incubación.

Cada CO se probó con y sin el tratamiento de 833 unidades/ml de B-glucuronidasa (B-G)(Sigma, tipo H-1). El promedio de ICH/célula se calculó del análisis de 30 metafases (2n=46) durante el segundo ciclo de división, contadas por un mismo observador en preparados codificados.

Los resultados se analizaron estadísticamente por el test "t" de Student.

#### Efecto de los CO sobre el ciclo celular de linfocitos periféricos.

El efecto que los CO tuvieron sobre la frecuencia de células en primera (M1), segunda (M2) o tercera o más (M3+) mitosis se determinó en los mismos cultivos descriptos anteriormente.

El índice de replicación celular (IR)(Schneider y col., 1981) se

calculó del recuento de 100 células en base a la siguiente fórmula:

$IR \times 100 = 1$  (% de células en M1) + 2 (% de células en M2) + 3 (% de células en M3+).

### Resultados.

#### Caracterización de la población.

El 46% de los trabajadores de la empresa y el 55% de los controles eran fumadores. Mientras que el 36% de los expuestos bebía medio litro o más de vino por día, sólo el 10% de la población control tenía este hábito.

El 73% de los trabajadores tenía más de 5 años de antigüedad en la empresa, no habiendo relatado ninguno de ellos intoxicaciones previas por sustancias químicas. En el momento de la extracción de las muestras de sangre, 11 de los trabajadores pertenecen al sector de la producción de taninos sintéticos y EDTA, 4 trabajan en la producción de blanqueadores estilbénicos y 7 en la formulación de pesticidas. Los niveles de colinesterasa plasmática de los últimos 7 individuos, determinados por el servicio médico de la planta, estaban dentro de los valores normales.

#### ICH en linfocitos periféricos de los trabajadores expuestos y de los controles.

En las tablas 2 y 3 se muestran los datos recogidos de cada uno de los individuos de los grupos control y expuesto.

Tabla 2. Frecuencias de ICH en el grupo control.

Individuo N°	Edad	N° de cigarrillos por día	ICH/célula		
			rango	media	ESM
1	23	+	4-15	8.90	0.58
2	26		4-14	7.10	0.42
3	27	+++	4-20	9.93	0.77
4	28		2-16	8.73	0.62
5	29	++	2-20	9.50	0.64
6	31		3-18	10.80	0.79
7	31		3-16	8.23	0.66
8	31		2-17	8.26	0.55
9	32		1-17	7.36	0.51
10	36	+++	4-21	11.40	0.88
11	37	++	2-18	10.20	0.77
12	37	+	2-15	7.30	0.58
13	46		2-12	5.53	0.42
14	46	+	2-18	6.53	0.66
15	47	+++	2-19	9.20	0.77
16	48		2-16	8.10	0.66
17	50		1-14	7.66	0.55
18	53		2-17	7.23	0.60
19	54	+	3-20	9.20	0.79
20	55	+++	3-21	9.16	0.75

ESM: Error estandar de la media.

+ : 1-10 cigarrillos/día.

++: 11-19 cigarrillos/día.

+++ :  $\geq$  20 cigarrillos/día.

Tabla 3. Frecuencias de ICH en el grupo expuesto.

Individuo N°	Edad	N° de cigarrillos por día	ICH/célula		
			rango	media	ESM
1	24	+++	5-17	10.77	0.51
2	27	+	3-17	7.43	0.53
3	28		4-15	8.57	0.51
4	29		1-15	7.67	0.62
5	33		2-13	7.53	0.62
6	34	+++	3-21	8.87	0.71
7	36		2-10	6.70	0.42
8	36		2-18	7.70	0.68
9	38		4-16	8.67	0.51
10	38		3-16	7.83	0.66
11	40	+	3-12	7.93	0.46
12	40		1-15	6.07	0.60
13	42	+++	4-16	8.53	0.53
14	43		2-19	7.17	0.64
15	43		3-16	6.63	0.49
16	48	+	4-18	9.73	0.69
17	51		1-21	8.40	0.80
18	52	+	2-18	8.03	0.66
19	54		2-13	7.73	0.57
20	55		3-15	8.33	0.60
21	55		2-11	6.33	0.42
22	56	+	3-12	6.07	0.46

ESM: Error estandar de la media

+: 1-10 cigarrillos/día.

++: 11-19 cigarrillos/día.

+++:  $\geq$  20 cigarrillos/día.

Los valores individuales de ICH/célula entre los trabajadores es tuvieron comprendidos dentro de un rango que va desde 6.07 hasta 10.77; las variaciones individuales no estuvieron correlacionadas con el tipo de ocupación.

Tanto en el grupo control como en el expuesto la edad no influyó sobre la frecuencia de ICH. El valor medio de ICH/célula en linfocitos periféricos de los 22 trabajadores estudiados fue de  $7,85 \pm 0.26$  y el valor medio de los 20 controles fue de  $8.52 \pm 0.34$  (Tabla 4). La diferencia entre estas dos medias no fue estadísticamente significativa. Los fumadores de ambos grupos presentaron valores de ICH más altos que los de los no fumadores ( $p < 0.05$ ).

Tabla 4. Frecuencia de ICH en no-fumadores y fumadores del grupo control y del grupo expuesto.

Grupo	N° de individuos	Edad		ICH/célula/individuo	
		media	rango	media $\pm$ ESM	rango
Control	20	38.35	23-55	$8.52 \pm 0.34$	5.53-11.40
No fumadores	9	38.33	26-53	$7.86 \pm 0.47$	5.53-10.80
Fumadores	11	38.37	23-55	$9.05 \pm 0.39$ <sup>(a)</sup>	6.53-11.40
Expuesto	22	41.00	24-56	$7.85 \pm 0.26$	6.07-10.77
No-fumadores	12	42.67	28-55	$7.41 \pm 0.23$	6.07- 8.57
Fumadores	10	39.33	24-56	$8.37 \pm 0.41$ <sup>(a)</sup>	6.07-10.77

(a)  $p < 0.05$



Efecto de los CO sobre linfocitos periféricos.

Las siguientes tablas muestran las frecuencias de ICH en los linfocitos de un úrido dador inducidas por los CO de controles y trabajadores. El valor de ICH/célula/individuo sin el agregado de CO y de B-glucuronidasa (B-G) fué de  $7.1 \pm 0.36$ .

Tabla 5. Efecto de los CO de controles sobre el ICH de linfocitos humanos.

concentrado de orina N°	-B-G			+B-G		
	ICH/célula			ICH/célula		
	rango	media	ESM	rango	media	ESM
1	1-12	6.56	0.53	4-15	10.03	0.47
2	2-14	7.10	0.58	4-18	8.77	0.60
3	2-15	7.60	0.64	2-17	9.57	0.64
4	2-15	8.00	0.55	2-16	9.77	0.66
5	1-20	8.23	0.71	5-17	10.90	0.62

Tabla 6. Efecto de los CO de trabajadores sobre el ICH de linfocitos humanos.

concentrado de orina N°	-B-G			+B-G		
	ICH/célula			ICH/célula		
	rango	media	ESM	rango	media	ESM
1	1-15	6.10	0.49	3-14	7.10	0.53
2	2-12	6.13	0.46	3-18	7.73	0.60
3	2-15	7.03	0.57	4-16	9.13	0.51
4	4-15	7.93	0.47	4-13	7.87	0.46
5	3-15	8.33	0.55	inhibición del crecimiento		
6	3-18	8.40	0.68	3-18	9.87	0.71
7	1-14	8.80	0.55	4-16	9.53	0.57
8	2-18	9.10	0.60	7-22	11.93	0.57
9	3-18	9.33	0.69	4-16	10.07	0.62

En todos los casos se produjo un incremento de los valores de ICH/célula ante el agregado de B-glucuronidasa a las orinas de controles y de expuestos. Este efecto se hizo más notorio en el individuo expuesto N°5

donde el concentrado de orina con la presencia de la enzima provocaron una fuerte inhibición del crecimiento celular.

En la tabla 7 se observa el efecto que los CO ejercieron sobre el número de células en primera (M1), segunda (M2) y tercera o más (M3+) mitosis y se determina el IR como una medida de la cinética de división celular.

Tabla 7. Efecto de los CO sobre la división celular de linfocitos humanos.

Concentrado de orina N°	-B-G				+B-G			
	% de células en				% de células en			
	M1	M2	M3+	IR	M1	M2	M3+	IR
<b>Controles</b>								
1	20	54	26	2.06	27	63	10	1.83
2	22	62	16	1.94	25	58	17	1.92
3	13	64	23	2.10	38	57	5	1.67
4	43	54	3	1.60	25	59	16	1.91
5	21	63	16	1.95	49	49	2	1.53
<b>Expuestos</b>								
1	8	47	45	2.37	37	26	37	2.00
2	14	77	9	1.95	29	65	6	1.77
3	27	69	4	1.77	18	44	38	2.20
4	31	62	7	1.76	23	53	24	2.01
5	88	12	0	1.12	100	0	0	1.00
6	19	64	17	1.98	32	57	11	1.79
7	25	67	8	1.83	21	69	10	1.89
8	18	52	30	2.12	40	56	4	1.64
9	59	41	0	1.41	17	46	37	2.20

IR sin la adición de CO ni B-G fue de 2.20

La media de ICH/célula en los linfocitos tratados con CO de controles fué de  $7.50 \pm 0.31$  y en los tratados con CO de expuestos de  $7.91 \pm 0.40$ . Los valores de ICH individuales de los trabajadores estuvieron dentro de un rango de 6.10 a 9.33. Cuando se agregó B-glucuronidasa a los cultivos se observó un incremento estadísticamente significativo en el número de ICH/célula de ambos grupos, controles y expuestos. (Tabla 8).

Los IR de los linfocitos tratados con los CO son similares para controles y expuestos, aunque ligeramente inferiores a los IR de los linfocitos cultivados sin CO (IR=2.20).

De los resultados obtenidos con los CO pudo establecerse que no hubo relación entre los parámetros analizados, es decir, valor de ICH/célula y cinética del ciclo celular.

Tabla 8. Efecto de los CO sobre el ICH y la división celular de linfocitos humanos.

Grupo	CO de fum/ CO totales	B-G	ICH/célula/ind		% de células en			
			media $\pm$ ESM	rango	M1	M2	M3+	IR
Control	3/5		7.50 $\pm$ 0.31	6.56- 8.23	23.80	59.40	16.80	1.93
		+	9.81 $\pm$ 0.36 <sup>(a)</sup>	8.77-10.90	32.80	57.20	10.00	1.77
Expuesto	3/9		7.91 $\pm$ 0.40	6.10- 9.33	32.11	54.56	13.33	1.81
		+	9.15 $\pm$ 0.57 <sup>(b)</sup>	7.10-11.93	35.22	46.22	18.56	1.83

B-G= B-Glucuronidasa

(b)  $p < 0.05$ ; (a)  $p < 0.005$

### Discusión

Los valores de ICH observados en ambos grupos estuvieron dentro del rango citado por otros autores para linfocitos de sangre periférica de individuos normales (Morgan y Crossen, 1977; Sinha y col., 1985). Al igual que lo comunicado en estos trabajos la frecuencia de ICH obtenida

fue independiente de la edad.

Cuando se consideró el hábito de fumar se encontró un ligero aumento en el ICH tanto en los controles como en los expuestos. Este hecho confirmó resultados anteriores que evidenciaron efectos genotóxicos del humo de cigarrillo (Lambert y col., 1978; Lambert y col., 1982, Husgafvel-Pursiainen y col., 1984; Sinha y col., 1985; Stucker y col., 1986).

Por otro lado, no se observó aumento en el número de ICH cuando los CO de controles y trabajadores, sin B-glucuronidasa, fueron adicionados a los cultivos de linfocitos. Los valores son similares a los obtenidos en cultivos realizados sin CO.

En oposición a esta observación, Beek y col. (1982) hallaron valores elevados de ICH cuando CO de fumadores, no-fumadores y pacientes cirróticos se agregaron a cultivos de células de hamster Chino. La diferencia con estos resultados puede deberse a las distintas sensibilidades de los sistemas biológicos de prueba empleados (Morgan y Crossen, 1982; Nishio y Uyeki, 1981; Tucker y Ong, 1984).

El hecho que la adición de CO con B-glucuronidasa indujo el mismo incremento de ICH en ambos grupos en relación al número de ICH inducidos por los CO sin B-glucuronidasa, sugiere que la concentración de metabolitos genotóxicos conjugados a los ácidos glucurónicos, detectables por este método, fue semejante en los dos grupos, control y expuesto.

Cuando se consideró la cinética de división celular se encontró que la frecuencia de células en primera, segunda y tercera o más mitosis en presencia de orinas tratadas con B-glucuronidasa no mostraron diferencias con la frecuencia de células tratadas sin B-glucuronidasa. De esto se deduce que, en este caso, no existió relación entre un valor

elevado de ICH y una inhibición del ciclo celular, lo cual había sido sugerido por otros autores (Giulotto y col., 1980; Wilmer y col., 1981).

Paralelamente con estos estudios otro grupo de investigadores analizaron el efecto mutagénico de los CO en el test de Salmonella-S9. Esta prueba mostró que algunos CO eran tóxicos y la mayor proporción de orinas tóxicas correspondió a los trabajadores de las plantas que producen taninos sintéticos, EDTA y blanqueadores estilbénicos.

Este efecto tóxico evidenciado en inhibición del crecimiento celular, se presentó con la orina proveniente del individuo número 5 que pertenece al sector de producción de blanqueadores estilbénicos. Fue difícil establecer si la toxicidad observada se correlaciona con la exposición ocupacional, ya que no se sabe nada acerca de los metabolitos genotóxicos que podrían ser generados por la mezcla compleja de agentes químicos empleados en el proceso de producción.

No se observaron efectos genotóxicos en el estudio de los flujos corporales correspondientes a los trabajadores que formulan pesticidas, a pesar de conocerse que los pesticidas involucrados producen daños sobre el ADN como ya fue mencionado.

El pequeño tamaño de los grupos analizados hizo difícil establecer conclusiones definitivas acerca del riesgo genotóxico de los trabajadores basándonos en los valores similares de ICH en sangre y orina con los del grupo control.

Además, es necesario tener presente que las lesiones que inducen ICH deben persistir y no ser removidas por procesos de reparación o por el recambio de los linfocitos circulantes desde el momento de la exposición hasta que las muestras sean tomadas. Por estas razones, la prueba de ICH puede no dar una respuesta satisfactoria para exposiciones crónicas de bajo nivel como sucede en este caso y como ha sido expresado por otros autores (Hansteen y col., 1978; Anderson y col., 1981; Lambert, 1984).

#### II.1.4. Aberraciones cromosómicas estructurales en individuos expuestos a pesticidas.

En esta parte el estudio se centralizó en determinar el posible riesgo genotóxico de una población de la Provincia de Buenos Aires expuesta a pesticidas.

Se ha hallado un incremento de AC estructurales en linfocitos de aplicadores de pesticidas durante el período de aplicación más intenso (Yoder y col., 1973). Van Bao y col. (1974) analizaron los cromosomas de pacientes intoxicados con organofosforados y también hallaron un aumento de roturas cromatídicas y aberraciones tipo cromosoma estables.

Sin embargo, mientras los linfocitos de trabajadores expuestos a metil-paratión de dos plantas de pesticidas evidenciaron un incremento en la frecuencia de ICH (Yu y col., 1984), el estudio citogenético de otro grupo expuesto crónicamente a metil-paratión no mostró una frecuencia aumentada de AC en los linfocitos cultivados (Stocco y col., 1982). Linnainmaa (1983) encontró que no existían diferencias significativas en los valores de ICH por célula de muestras tomadas antes, durante o después de la exposición a herbicidas fenoxiacéticos.

Como son pocas las investigaciones realizadas sobre poblaciones expuestas a pesticidas y los resultados obtenidos no son concluyentes, se decidió aportar nuevos datos a los ya nombrados analizando citogenéticamente a una población de la Provincia de Buenos Aires expuesta ocupacionalmente a pesticidas. Este análisis citogenético forma parte de un estudio epidemiológico más amplio en el que intervinieron investigadores de las siguientes instituciones: Instituto Multidisciplinario de Biología Celular - La Plata (IMBICE); Instituto de Oncología "Angel H. Roffo", INTA y Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez".

El análisis se limitó al estudio de AC estructurales en linfoc*u*

tos periféricos.

## Materiales y Métodos.

### Caracterización de la Población.

La población bajo estudio está localizada en José C. Paz, Provincia de Buenos Aires, la principal actividad de la misma es el cultivo de plantas ornamentales en macetas (helecho, begonias, etc.) y sus integrantes están agrupados en la Asociación Japonesa "Tsubomi".

Se entrevistaron 188 individuos requiriéndose información acerca de hábitos personales, antigüedad en el trabajo, tipo de tareas realizadas, plaguicidas utilizados, período de uso, tipo de protección habitual durante la aplicación y presencia de síntomas de intoxicación sospechosos de ser producidos por exposición a pesticidas.

Los datos recogidos mostraron que más del 90 % de la población habita en el lugar de trabajo, desempeñando sus tareas sin límites de horario los 7 días de la semana. La antigüedad en esta actividad es importante, siendo de por lo menos 10 años en más del 70% de los trabajadores.

Los cultivadores de plantas usan cerca de 15 clases diferentes de pesticidas.

A pesar del hecho que la población tiene un nivel cultural considerablemente alto (el 79% de los mayores de 14 años alcanzó algún estudio secundario), solamente el 6,8% de los aplicadores usan simultáneamente máscara, guantes y ropa especial durante la aplicación de plaguicidas.

El 72% de la población exhibe síntomas relacionados con la exposición crónica a pesticidas.

### Cultivo de linfocitos periféricos.

De la encuesta realizada a las 188 personas de la Asociación "Tsubomi" se seleccionó la población a estudiar citogenéticamente entre los trabajadores activos con una edad comprendida entre 20 y 50 años. Sobre esta población se efectuó un muestreo estratificado por sexo y edad, quedando constituido el grupo final por 40 individuos.

Treinta y tres dadores voluntarios de sangre concurrentes al Instituto "A.H. Roffo", del mismo sexo y edad, que los expuestos, cuando fue posible, se utilizaron como controles.

Las muestras de sangre de los trabajadores de la Asociación fueron obtenidas por personal del IMBICE. Luego de la extracción, la mitad de cada muestra se usó para el análisis hematológico en el laboratorio de análisis clínicos del Instituto "A.H. Roffo", se determinaron las colinesterasas plasmáticas por el método de Ellman y las transaminasas glutámico oxalacética (GOT) y glutámico pirúvica (GTP) por el método de Reitman y Frankel.

La otra mitad de la muestra de sangre se utilizó para el análisis citogenético. Los cultivos de linfocitos, realizados en el IMBICE, se efectuaron en presencia de medio Ham F10, suero fetal bovino, fitohemaglutinina y antibióticos; se incubaron a 37°C durante 48 hs. Luego las células se trataron con solución hipotónica y se fijaron; finalmente los vidrios obtenidos se colorearon con Giemsa 2% durante 7 a 8 min.

Los preparados se codificaron en el IMBICE y para cada trabajador se estableció analizar parte de los vidrios en el IMBICE y parte por mí en el Instituto "A. H. Roffo" para obtener un total de 200 a 300 metafases por individuo. En la mayoría, de los casos me fueron enviados los preparados suficientes para poder contar 100 metafases por individuo.



El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba de  $\chi^2$ .

### Resultados.

Los valores del examen hematológico (glóbulos rojos, blancos, GOT, GPT, colinesterasa plasmática, etc) fueron similares en expuestos y controles. Una cantidad menor o igual a 5000 células blancas por  $\text{mm}^3$  fue hallada en el 30% de los individuos de cada población. Solamente 3 expuestos y 1 control mostraron valores de colinesterasas plasmáticas ligeramente inferiores al normal. Estos bajos valores no estuvieron relacionados con exposición a pesticidas.

En el grupo control, constituido por dadores voluntarios de sangre, la relación de sexos fue de 25 varones y 8 mujeres, con un rango de edad de 19 a 52 años, siendo el promedio de las edades igual a 36.9 años.

La siguiente tabla muestra las principales características de los 38 individuos del grupo expuesto estudiados citogenéticamente por mí.

En la tabla se observan los tipos de compuestos utilizados en distintas combinaciones por los cultivadores de plantas, estos datos corresponden a la última aplicación antes de la extracción de la sangre. El lapso entre la última aplicación de pesticidas y la obtención de la muestra de sangre varía desde 1 día hasta 8 meses.

El 33.3% de los individuos fueron fumadores en el grupo control y el 39,5% en el grupo expuesto.

Tabla 9: Datos individuales de los integrantes de la Asociación "Tsubomi"

Individuo N°	Sexo	Edad	Fumador	Aplicador(a)	Tipo de pesticida <sup>(b)</sup>	T. transcurrido e/ aplic. y extracción <sup>(c)</sup>
1'	M	26	*	*	C/T	2 meses
2'	F	26			N.R.	N.R.
3'	M	27			OF, C/T, M	1 mes
4'	F	28			C/T, M	1 mes
5'	M	28			C/T, M	1 mes
6'	M	28			C/T	10 días
7'	F	30			C/T	10 días
8'	M	31			C/T, M	10 días
9'	M	31			C/T, M	7 días
10'	F	32			C/T	15 días
11'	M	33			C/T	2 meses
12'	M	35			OF, C/T, M	1 mes
13'	M	37			OF, M	2-3 meses
14'	F	37			OF, C/T, M	7 días
15'	M	38			OF, C/T, M	8 meses
16'	M	38			C/T, M	7 días
17'	F	38			OF, M	1 mes
18'	F	39			OF, C/T, M	10 días
19'	F	39			OF	7 días
20'	F	39			M	1 mes
21'	M	40			C/T, M	7 días
22'	M	42			OF, OC	1 mes
23'	F	42			N.R.	15 días
24'	M	43			OF, C/T	10 días
25'	F	43			OF	15 días
26'	M	44			OF, C/T, M	7 días
27'	M	44			OC	2 meses
28'	M	44			OF, C/T, M	7 días
29'	F	44			C/T, M	7 días
30'	M	45			C/T	15 días
31'	M	46			C/T	15 días
32'	M	47		*	M	2 días
33'	F	47		*	C/T, OC	1 mes
34'	F	47		N.R.	N.R.	7 días
35'	M	48			OF, C/T, M	10 días
36'	F	48			N.R.	N.R.
37'	F	49		*	C/T	1 día
38'	M	51	*	*	C/T, M	7 días

F: Femenino

M: Masculino

N.R.: No registrado

(a) Individuo que mezcla, diluye y aplica los pesticidas.

(b) Tipos de pesticidas a los que están ocupacionalmente expuestos los cultivadores de plantas.

OF: Organofosforados (Mevinfos, Paratión, Fenitrotión).

C/T: Carbamatos y Tiocarbamatos (Aldicarb, Benomil, Tiofanato, Mancozeb, Zineb).

OC: Organoclorados (Heptacloro, Endosulfan, Mirex).

M: Misceláneos (Captan, Bromuro de metilo, Nicotina, Permetrina).

(c) Tiempo transcurrido entre la última vez que se aplicó pesticidas en el lote donde el individuo trabaja, independientemente de que la persona encuestada lo haya hecho, y la extracción de sangre.

Los valores individuales de los parámetros citogenéticos estudiados están presentes en la tabla 10 para el grupo control y en la tabla 11 para el grupo de cultivadores de plantas.

Tabla 10: Frecuencia de AC en el grupo control.

Individuo N°	N° de células contadas	Células anormales	AC por 100 células				
			gaps	B'	B''	DIC+	DIC-
1	100	1	9	1	0	0	0
2	100	10	11	9	1	0	0
3	100	0	2	0	0	0	0
4	100	2	14	2	0	0	0
5	100	0	7	0	0	0	0
6	100	1	8	0	1	0	0
7	100	4	5	3	1	0	0
8	100	0	2	0	0	0	0
9	100	1	4	0	1	0	0
10	100	2	15	1	1	0	0
11	100	1	3	1	0	0	0
12	100	0	9	0	0	0	0
13	100	0	4	0	0	0	0
14	100	0	2	0	0	0	0
15	48	0	0,5	0	0	0	0
16	100	1	10	1	0	0	0
17	100	1	16	1	0	0	0
18	100	2	4	1	0	1	0
19	100	3	7	3	0	0	0
20	100	0	5	0	0	0	0
21	100	0	13	0	0	0	0
22	100	0	3	0	0	0	0
23	100	0	4	0	0	0	0
24	100	0	1	0	0	0	0
25	100	2	2	2	0	0	0
26	100	0	0	0	0	0	0
27	100	0	3	0	0	0	0
28	100	0	1	0	0	0	0
29	100	0	1	0	0	0	0
30	100	3	11	1	2	0	0
31	100	0	8	0	0	0	0
32	100	1	8	1	0	0	0
33	100	0	3	0	0	0	0

Para las abreviaturas ver página n° 78.

Tabla 11: Frecuencia de AC en los integrantes de la Asociación "Tsubomi"

Individuo N°	N° de células contadas	Células anormales	AC por 100 células				
			gaps	B'	B''	DIC+	DIC-
1'	100	1	3	1	0	0	0
2'	100	2	5	2	0	0	0
3'	100	3	4	3	0	0	0
4'	100	1	7	1	0	0	0
5'	100	2	20	2	0	0	0
6'	100	0	5	0	0	0	0
7'	100	4	5	3	1	0	0
8'	63	0	3.8	0	0	0	0
9'	100	3	9	2	1	0	0
10'	100	0	6	0	0	0	0
11'	100	4	8	1	2	0	1
12'	100	1	4	1	0	0	0
13'	100	2	3	1	1	0	0
14'	100	0	8	0	0	0	0
15'	100	1	6	0	1	0	0
16'	100	3	7	2	1	0	0
17'	100	0	8	0	0	0	0
18'	100	1	6	0	1	0	0
19'	100	0	1	0	0	0	0
20'	100	1	4	0	0	0	1
21'	muy pocas metafases						
22'	100	0	2	0	0	0	0
23'	100	0	4	0	0	0	0
24'	100	2	3	2	0	0	0
25'	100	0	4	0	0	0	0
26'	100	0	3	0	0	0	0
27'	100	2	10	1	1	0	0
28'	100	1	4	1	0	0	0
29'	100	0	5	0	0	0	0
30'	100	0	4	0	0	0	0
31'	100	0	2	0	0	0	0
32'	100	1	12	1	0	0	0
33'	100	1	5	1	0	0	0
34'	100	2	6	0	2	0	0
35'	100	3	5	2	0	1	0
36'	100	2	4	1	1	0	0
37'	100	0	6	0	0	0	0
38'	100	2	7	1	0	0	1

para las abreviaturas ver página n° 78.

Células anormales: Células que poseen por lo menos una aberración cromosómica estructural, no incluyen a los gaps.

gaps: regiones no coloreadas en la cromátida cuyo largo no es mayor que el ancho de la cromátida. (lesiones acromáticas).

B': rotura cromatídica.

B'': rotura cromosómica o isocromatídica.

DIC+: cromosoma dicéntrico con fragmento asociado.

DIC-: cromosoma dicéntrico sin fragmento asociado.

La tabla 12 resume las frecuencias de aberraciones cromosómicas halladas en ambos grupos.

Tabla 12: Frecuencia de AC en el grupo control y en los cultivadores de plantas.

Grupo	Número de individuos (a)	N° de células contadas	% de células anormales $\pm$ ESM (b)	AC por 100 células $\pm$ ESM			
				gaps	roturas	roturas cromatídicas cromosómicas dicéntricos	
Control	32	3.200	1.10 $\pm$ 0.35	6.10 $\pm$ 0.79	0.84 $\pm$ 0.31	0.22 $\pm$ 0.09	0.02 $\pm$ 0.02
No Fumadores	22	2.200	1.27 $\pm$ 0.50	5.14 $\pm$ 0.88	1.00 $\pm$ 0.43	0.23 $\pm$ 0.11	0.02 $\pm$ 0.02
Fumadores	10	1.000	0.70 $\pm$ 0.31	8.20 $\pm$ 1.48	0.50 $\pm$ 0.22	0.21 $\pm$ 0.13	0.00
Cultivadores de plantas	36	3.600	1.25 $\pm$ 0.21	5.70 $\pm$ 0.56	0.81 $\pm$ 0.15	0.33 $\pm$ 0.10	0.06 $\pm$ 0.04
No Fumadores	22	2.200	0.86 $\pm$ 0.22	4.82 $\pm$ 0.44	0.55 $\pm$ 0.18	0.23 $\pm$ 0.11	0.05 $\pm$ 0.03
Fumadores	14	1.400	1.86 $\pm$ 0.35	7.07 $\pm$ 1.21	1.21 $\pm$ 0.24	0.50 $\pm$ 0.17	0.07 $\pm$ 0.05

(a) No se consideran los individuos con menos de 100 metafases analizadas.

(b) ESM: Error estandar de la media.

Células anormales: Células que poseen por lo menos una aberración cromosómica estructural, no incluyen a los gaps.  
gaps: lesiones acromáticas.

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de células anormales entre el grupo control y el grupo de cultivadores de plantas y entre los no-fumadores controles y los no-fumadores expuestos, sin embargo existieron diferencias significativas entre los fumadores de ambos grupos ( $p < 0.05$ ).

Con respecto a los diferentes tipos de aberraciones cromosómicas estructurales, las lesiones acromáticas y las roturas cromatídicas y cromosómicas son similares en ambos grupos, notándose un ligero aumento en el grupo expuesto en el valor de los cromosomas dicéntricos con o sin fragmento asociado.

### Discusión

Bajo las condiciones de trabajo utilizadas, es decir, invernaderos sin ventilación apropiada, medidas de protección insuficientes, inadecuado almacenamiento de los compuestos utilizados y empleo de pesticidas en distintas combinaciones, los integrantes de la Asociación Japonesa "Tsubomi" pueden considerarse como expuestos ocupacionalmente a pesticidas.

A pesar de esta exposición, no se halló un incremento en la frecuencia de AC en el grupo expuesto en relación al grupo control. Sin embargo, se observó un aumento del valor de células anormales de los fumadores expuestos cuando se los compara con los fumadores controles. Esta diferencia no se encontró cuando se reunieron los datos hallados por los investigadores del IMBICE y los analizados por mí, es decir, al elevarse el número de células contadas por individuo de 100 a 200 o 300 metafases, dando un total de células contadas de 4.892 versus 1.400 entre los fumadores expuestos y de 2.413 versus 1.000 entre los fumadores controles (manuscrito en elaboración).



Conner y Wald (1981) han informado que en su laboratorio de citogenética para la preparación, el recuento y el análisis de 200 células mitóticas se necesitan aproximadamente 14 horas-hombre.

Un monitoreo citogenético por medio del recuento de AC para una investigación epidemiológica puede ser de utilidad en grupos expuestos a agentes químicos si se tiene un tamaño muestral suficiente.

En base a lo ya mencionado en relación a las horas que insume la realización de un análisis citogenético y a la importancia del número de metafases contadas por individuo, se hace evidente la necesidad de trabajar en colaboración obteniéndose así resultados que de otra forma serían difíciles de concretar.

Los datos obtenidos, como fue dicho anteriormente, indicaron que no existen diferencias en cuanto a la presencia de AC estructurales entre la población de cultivadores de plantas y el grupo control.

Tratándose de cultivos de 48 hs, los valores para roturas cromatídicas y cromosómicas como así también para cromosomas dicéntricos fueron más bajos que los de la población de floricultores de Florencio Varela, Provincia de Buenos Aires, estudiada anteriormente, donde los linfocitos fueron cultivados durante 72 hs (Dulout y col., 1985).

Este análisis citogenético realizado en floricultores expuestos a pesticidas me dio la oportunidad de interiorizarme de la técnica de AC estructurales bajo la supervisión del Ing. F.N. Dulout del IMBICE.

Los floricultores exhibieron una frecuencia de aberraciones de tipo intercambio de  $43 \times 10^4$  células que difirió de la frecuencia de  $6 \times 10^4$  células hallada en los cultivadores de plantas. Esta frecuencia está dentro de los valores presentes en la literatura para grupos controles. Natarajan y Obe (1980) hallaron una frecuencia de AC de tipo intercambio de  $9.64 \times 10^4$  células, Sinha y col. (1984) informaron una frecuen

cia de aberraciones de intercambio cromatídico de  $13 \times 10^4$  células y de dicéntricos de  $8 \times 10^4$  células y Dulout y col. (1985) una frecuencia de tipo intercambio de  $10 \times 10^4$  células.

Tanto la presencia de invernaderos sin ventilación apropiada, medidas de protección insuficientes cuando se mezclan, diluyen y aplican los pesticidas y también un inadecuado almacenamiento de los compuestos utilizados, coloca a los cultivadores de plantas en una situación similar a la observada entre los floricultores. Además ambas poblaciones están expuestas a la misma variedad de pesticidas.

A pesar de todo esto de acuerdo a los valores citogenéticos hallados la exposición a pesticidas sería menor en los cultivadores de plantas. Esto podría atribuirse a la frecuencia con que son utilizados los plaguicidas, esa frecuencia es mucho mayor en los cultivos intensivos de flores en comparación con la producción de plantas ornamentales.

Mientras es evidente que intensas exposiciones pueden producir daño cromosómico, no existe aumento significativo en el nivel de anomalías cromosómicas en los estudios que se refieren a trabajadores expuestos a bajos niveles. Una exposición alta a estireno por ejemplo, está correlacionada con una frecuencia incrementada de AC (Meretoja y col., 1977; Andersson y col., 1980), en cambio, una reducción en la exposición a cloruro de vinilo disminuye la frecuencia de roturas cromosómicas (Hansteen y col., 1978).

La exposición a pesticidas parece ser similar a la existente con otros agentes químicos, por lo tanto, el daño cromosómico detectado por medio del sistema de linfocitos periféricos dependería del grado de exposición.

## II.2. Estudios citogenéticos "in vitro".

### II.2.1. Sistema de activación metabólica.

Los metabolitos electrofílicos finales se forman ya sea directamente o a través de uno o más intermediarios a partir de pre-mutágenos/pre-carcinógenos. Una vez que el mutágeno/carcinógeno final se ha formado, puede reaccionar con macromoléculas como el ADN por ejemplo, o ser desactivado por unión a otros nucleófilos celulares, por roturas espontáneas, o por detoxificación enzimática. De modo semejante, los pre-mutágenos/pre-carcinógenos y los compuestos intermedios pueden estar sujetos a reacciones enzimáticas y no-enzimáticas de detoxificación.

Por lo tanto, el efecto genotóxico de muchos agentes químicos está determinado en gran parte, por la competencia entre reacciones de activación y de detoxificación.

Los diversos estudios realizados para evaluar si las pruebas a corto plazo son reales indicadoras del riesgo potencial que los agentes químicos puedan ejercer sobre el hombre (Mc Cann y col., 1975; Purchase y col., 1978; Bartsch y col., 1982), han revelado que además del organismo indicador utilizado y del efecto genético analizado, es de importancia crítica el sistema de activación metabólica usado.

La biotransformación de diversos agentes, incluidos muchos mutágenos/carcinógenos químicos, es generalmente un proceso de varios pasos que involucran reacciones clasificadas comúnmente en Fase I y Fase II. Las reacciones de la Fase I crean o modifican grupos funcionales (hidroxilación, epoxidación, hidrólisis, etc), mientras que las reacciones de la Fase II son reacciones esencialmente de conjugación que unen varios grupos al compuesto original o a uno de sus metabolitos (transferencia de glucuronil, sulfuril y acetil entre otros grupos, y conjuga-

ción con glutatión, aminoácidos, etc.).

Si un mutágeno/carcinógeno es un agente de acción directa, su metabolismo en mamíferos conduce generalmente a su detoxificación. En el caso de agentes pre-mutagénicos/pre-carcinogénicos, que no son activos biológicamente "per se" pero son convertidos a intermediarios reactivos finales por el metabolismo en la célula, órgano o cuerpo susceptibles, el metabolismo de los mamíferos juega normalmente, un papel doble, activación y detoxificación (Bartsch y col., 1982).

Entre las reacciones de activación enzimática de la fase I se encuentra el sistema de oxidasas de función mixta (OFM). Las oxidasas de función mixta o monooxigenasas comprenden un sistema de cadena transportadora de electrones que requiere NADPH y oxígeno molecular para catalizar las reacciones generales:  $RH + NADPH + H^+ + O_2 \longrightarrow ROH + NADP^+ + H_2O$ .

La detoxificación de agentes químicos de acción directa o de aquellos activados metabólicamente es catalizada por enzimas de la fase I y de la fase II. Muchas de las enzimas involucradas son las mismas que catalizan los pasos de activación. Por ejemplo, la hidroxilación de varios átomos de carbono de anillos aromáticos y cadenas alifáticas puede ser catalizada en reacciones de detoxificación por el sistema de OFM.

Muchas de las enzimas asociadas con el metabolismo de diferentes compuestos químicos están localizadas en el retículo endoplasmático y en el citosol; entre ellas, cuantitativamente el sistema enzimático más importante para la activación y detoxificación de mutágenos y carcinógenos es el de OFM.

La actividad de OFM está localizada principalmente en las membranas del retículo endoplasmático, las cuales son recuperadas en la fracción microsomal por centrifugación de un homogenato tisular.

Las comparaciones entre y dentro de las especies han demostrado que el hígado generalmente posee la actividad más alta. Esta actividad enzimática también ha sido identificada en pulmón, piel, epitelio intestinal, riñón, testículos, placenta, glándulas mamarias y otros órganos (Bartsch y col., 1982; Poiley y Raineri, 1984).

La actividad de las OFM varía con el pretratamiento de los animales con varios agentes químicos. Los inductores comúnmente usados en sistemas experimentales son fenobarbital (que incrementa la forma mayor del citocromo P-450, que es uno de los componentes de este complejo enzimático) 3-metilcolantreno (que aumenta una forma principal de otro citocromo p-450 o P-448) y un policloruro de bifenilo, el Aroclor 1254.

Se ha generalizado el uso de un sistema subcelular de activación metabólica, la fracción sobrenadante de 9000 g (S9) de hígado de ratas tratadas con inductores enzimáticos, para la metabolización de agentes químicos "in vitro".

El uso de la fracción S9 de hígado de ratas pretratadas con Aroclor 1254 en los ensayos rutinarios para la detección de agentes que dañan el ADN comienza con las investigaciones de Ames y col. (1975).

En estos estudios el sistema descrito se une a microorganismos como células indicadoras y aunque la preparación y uso del sobrenadante post-mitocondrial fué formulado específicamente para la prueba de Salmonella/microsomas, el sistema puede aplicarse a otros tipos de ensayos a corto plazo.

De este modo, la fracción S9 fué utilizada exitosamente para activar clases diferentes de compuestos químicos a productos que alteran el ADN de células de mamíferos (Madle, 1981; Winckler y col., 1984).

NADPH (o un sistema generador de NADPH), que se requiere para

la actividad del sistema de OFM, es el único cofactor enzimático agregado al ensayo de Salmonella/microsomas por Ames y col.(1975). Sin embargo, se ha demostrado que muchos otros cofactores o modificadores de las enzimas de las fases I y II han incrementado o disminuído la genotoxicidad de pre-mutágenos/pre-carcinógenos (Bartsch y col., 1982).

Debido al amplio uso del hígado para la obtención de la fracción S9 para las pruebas realizadas "in vitro", cabría preguntarse acerca de por qué se utiliza la fracción sobrenadante de este órgano en particular como fuente de activación de carcinógenos químicos, sabiendo que, no todos ellos producen tumores hepáticos en animales o en el hombre.

Con algunas excepciones, los estudios han apoyado el uso de la fracción S9 de hígado más que la de otros tejidos extrahepáticos como una primera aproximación al metabolismo de los carcinógenos "in vivo" por el sistema de OFM y de otras enzimas: 1°) las fracciones de tejidos extrahepáticos de roedores no producen una actividad mutagénica más alta que las fracciones hepáticas de roedores cuando se estudian diferentes clases de pre-carcinógenos como N-nitrosaminas, halo-olefinas y aminas aromáticas; y 2°) no hay evidencia de que los pasos por los cuales muchos carcinógenos son activados metabólicamente en el hígado de roedores difieran cualitativamente de aquellos de tejidos extrahepáticos.

Estos datos, unidos al conocimiento de que el hígado posee la actividad más alta de enzimas involucradas en el metabolismo de compuestos extraños, pueden explicar porque las pruebas de mutagenicidad usando fracciones hepáticas son confiables en predecir que un agente químico puede convertirse en electrófilo en el organismo (y así en predecir su potencial carcinogénico), aunque en muchos casos tales pruebas no den indicación del órgano(s) destinatario de su carcinogenicidad. Es-

ta limitación puede atribuirse en parte al hecho de que: 1°) los ensayos que usan fracciones subcelulares (como S9 más un sistema generador de NADPH) favorecen los caminos de activación y por lo tanto, no imitan la capacidad metabólica total de la célula intacta y 2°) otros factores (no relacionados con procesos de activación/detoxificación) determinan si un tumor se desarrollará en un órgano particular. El uso de células intactas de mamíferos como fuente de activación puede hacer posible la investigación de la especificidad celular o tisular de carcinógenos químicos.

Algunas células de mamíferos contienen en cultivo, una cantidad apreciable de enzimas involucradas en el metabolismo de agentes químicos. Estas células incluyen cultivos primarios de hepatocitos de ratas, líneas celulares de hígado, cultivos primarios o secundarios de fibroblastos embrionarios de roedores, la línea celular C3H 10T 1/2 de ratón entre otras (Langenbach y col., 1978; Tu y col., 1984).

El uso de estas células para la activación metabólica "in vitro" posee tanto ventajas como desventajas. En células cultivadas, la arquitectura celular, la localización de varios sistemas enzimáticos y el nivel endógeno de cofactores permanecen intactos. De este modo, en comparación con las reacciones catalizadas por los sistemas libres de células como la fracción S9, las reacciones que ocurren en células se parecen más a las que ocurren "in vivo".

El uso de células intactas permite investigar la especificidad celular o tisular de un carcinógeno químico, por ejemplo benzo (a) pireno puede detectarse como mutágeno en ensayos con fibroblastos y no en ensayos mediados por hepatocitos.

La especificidad en las reacciones de activación por otro lado,

implica que solamente un espectro limitado de agentes puede ser metabolizado, indicando que sistemas celulares de activación no son útiles como un primer ensayo de mutágenos/carcinógenos potenciales. Además, el uso de células intactas es técnicamente más difícil, limitando la aplicación de estas pruebas.

Un fenómeno que hay que tener en cuenta es que además de la presencia de un sistema de activación exógeno, los organismos indicadores usados para detectar los agentes genotóxicos pueden también ser capaces de metabolizar el compuesto de prueba o sus metabolitos. Si esto sucede, hay que tenerlo presente al analizar los resultados obtenidos.

Los organismos eucarióticos son metabólicamente más competentes que los procarióticos.

Anteriormente se mencionó que algunos tipos de células cultivadas eran capaces de activar premutágenos/pre-carcinógenos. Entre ellos están los linfocitos estimulados con mitógenos.

Los linfocitos humanos y otros leucocitos contienen OFM, siendo capaces de activar muchos agentes químicos. Pre-mutágenos y pre-carcinógenos clásicos como ciclofosfamida y benzo(a)pireno ejercen sus efectos genotóxicos en cultivos de linfocitos sin sistemas metabólicos exógenos (Norppa y Tursi, 1984).

#### II.2.2. Correlación de los datos hallados "in vitro" con los datos "in vivo".

El término correlación refleja el grado en el cual, la respuesta cualitativa a un agente particular en una prueba a corto plazo es la misma que la obtenida en el ensayo crónico y/o en estudios epidemiológicos.



La interpretación de los resultados de una determinada prueba "in vitro" y su extrapolación a un organismo entero serán realizadas con cautela y en el contexto de los resultados de otras pruebas como por ejemplo, toxicológicas o de otra información relacionada.

No obstante, a pesar de las limitaciones impuestas por la metodología corriente, cada vez hay más evidencia que el uso de sistemas de activación metabólica apropiados en las pruebas a corto plazo ha contribuido a la predicción o confirmación del efecto genotóxico de agentes químicos en animales y seres humanos.

La siguiente tabla, basada en Vainio y col. (1983), compara los hallazgos experimentales con los epidemiológicos.

Tabla 13: Correlación entre hallazgos experimentales y epidemiológicos.

Método/Efecto analizado	Agentes estudiados					
	Humo de Cigarrillo	Tinturas del pelo	Anestésicos	Drogas Citosáticas	Oxido de Etileno	
In vitro / genotoxicidad	+	+	+	+	+	+
Bioensayo / carcinogenicidad en animales				+		
Estudios en individuos expuestos / agente en fluidos corporales	+	+	+		+	+
	+	+	+	+		*
	+	*	*	+		+
	+	+	*	+		+
Estudios epidemiológicos / abortos espontáneos	+	*	+	*		(+)
	±	*	±	+		*
	+	±	±	+		(+)
+ Datos positivos, (+) posibles datos positivos, ± datos contradictorios, * no hay datos						

En base a los datos aportados por las pruebas "in vitro", estos ensayos pueden considerarse como un primer paso en predecir el potencial genotóxico de un agente químico particular.

### II.2.3. Efectos citogenéticos del Aldicarb y del Nitroso-Aldicarb sobre linfocitos humanos en cultivo.

A continuación se analizan los efectos citogenéticos del Aldicarb y del Nitroso-Aldicarb (Figura 1) sobre linfocitos humanos en cultivo.

Comparado con otros sistemas celulares, los linfocitos sanguíneos ofrecen varias ventajas en las investigaciones para la inducción de cambios cromosómicos, como fue establecido previamente.

Además, el sistema tiene la ventaja de que los estudios son realizados sobre células humanas con un complemento cromosómico normal, no dependiendo de líneas celulares transformadas, como sucedió en la mayoría de los análisis efectuados "in vitro" (Mehnert y col., 1984).

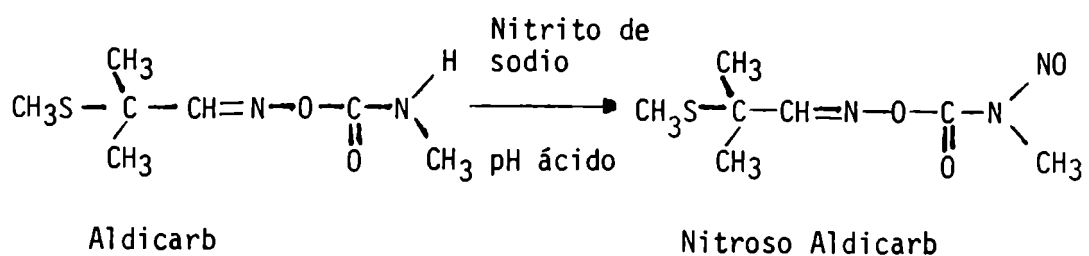


Fig. 1. Fórmulas químicas del Aldicarb y del Nitroso-Aldicarb

Los carbamatos, tiocarbamatos y compuestos relacionados constituyen un grupo importante de agentes químicos ambientales utilizados como insecticidas, fungicidas o herbicidas. Algunos de estos compuestos han demostrado ser mutagénicos en diferentes ensayos (Dulout y col., 1982, a; IARC, 1976; Paschin y Bakhitova, 1985; Woo, 1983), teratogénicos, o carcinogénicos en animales (IARC, 1976; IARC, 1983, b).

El Aldicarb no presenta efectos carcinogénicos, neurotóxicos, reproductivos o cualquier otro efecto crónico sobre los mamíferos expuestos a él (Marshall, 1985).

Este pesticida como otros ésteres carbámicos, ejerce su actividad como tal a través de la inhibición reversible de la enzima acetilcolinesterasa, por imitación de la acetil-colina, de modo tal que la enzima se une a la molécula carbámica más que al agente químico real. Las terminaciones nerviosas se recargan de señales conduciendo a una estimulación permanente. Esto lleva a movimientos incontrolados, parálisis y muerte. (Zaki y col., 1982).

Se analizó la genotoxicidad del Aldicarb midiendo el daño sobre el ADN en fibroblastos humanos (Blevins y col.; 1977), usando la prueba de micronúcleos en ratón (Seiler, 1977) y el test de Ames (Dunkel y Simmon, 1980). En todos estos estudios los resultados fueron negativos.

El propósito de esta parte fue investigar los efectos del Aldicarb sobre linfocitos humanos "in vitro" en presencia de un sistema de activación metabólico exógeno por medio del análisis de: 1) ICH y ciclo celular y 2) AC.

### II.2.3.1. Inducción de ICH y efecto sobre el ciclo celular del Aldicarb en linfocitos humanos.

#### Agentes químicos utilizados.

Aldicarb, 2-metil, 2-tiometil oxima del propionaldehído O-metil carbamoil, (Unión Carbide Corporation, grado analítico CAS Reg. 116-06-03) fue un obsequio del INTA de Castelar.

Ciclofosfamida (Labinca) adquirida bajo el nombre comercial de Endoxan-Asta<sup>R</sup>.

#### Cultivo de linfocitos periféricos.

Sangre entera (0,45 ml) de un dador sano se agrega a 10 ml de medio MEM (Gibco, Cat. N° 410-1500) suplementado con 13% de suero fetal bovino (Gibco), 0,5% de fitohemaglutinina P (Difco), 10µg/ml de bromodeuxiuridina(Sigma) y 80µg/ml de gentamicina (Gador).

Los cultivos se incuban a 37°C en total oscuridad. A las 48 hs de iniciado el período de incubación se realiza el tratamiento con los agentes químicos mencionados en presencia o ausencia de la mezcla S9.

El Aldicarb se disuelve en acetona inmediatamente antes de su uso. El volumen del solvente fue de 5 µl/ml de medio de cultivo (0,5%). Los cultivos de linfocitos se tratan con las siguientes concentraciones de Aldicarb: 10, 40, 75, 150 y 250 µg/ml de medio de cultivo (aproximadamente 5, 20, 40, 80 y 130 x 10<sup>-5</sup> M).

La ciclofosfamida (CP) se usa como control positivo a las concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 x 10<sup>-5</sup> M.

Los cultivos controles se procesan de la misma manera, agregándose 0.5% de acetona.

Luego de dos horas de tratamiento, los cultivos se centrifugan

y las células se lavan con medio precalentado.

Los linfocitos se cultivan nuevamente durante 24 hs con medio condicionado recogido de los cultivos realizados simultáneamente. De esta forma, las condiciones experimentales fueron las mismas antes y después del tratamiento.

Durante los últimos 90 min. del período de cultivo se agregan 0.2  $\mu\text{g/ml}$  de colchicina. Las células se centrifugan y el botón celular se resuspende en solución hipotónica precalentada (ClK 0.075 M) durante 15 min., fijándose luego en metanol: ácido acético (3:1).

Los preparados cromosómicos obtenidos se procesan de acuerdo a la técnica modificada de fluorescencia más Giemsa ya mencionada. (Perry y Wolff, 1974).

#### Preparación de la mezcla S9.

Se usan ratas machos Sprague-Dawley de aproximadamente 100 g de peso inducidas con fenobarbital sódico durante 3 días. Se inyectó i.p. a cada rata una dosis de 80 mg/kg de peso. Las ratas se dejan en ayunas 12 hs. antes de ser sacrificadas.

Los pasos siguientes se realizan a 4°C. Se extraen los hígados, se pesan (4-6 g cada uno) y se procesan de acuerdo a Madle (1981): 1-3g de hígado se homogeneiza con 10 ml de buffer fosfato 18.6 mM, pH 7.4, que contiene 16 mM de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  y 20 mM de ClK. El homogenato se centrifuga 10 min a 9.000 g y el sobrenadante se extrae y conserva (fracción S9). Se determina el contenido proteico de la fracción obtenida mediante el método de Lowry y col. La mezcla S9 se obtiene agregando los cofactores NADP (Sigma) y glucosa 6-fosfato (Sigma) a la fracción S9 en el momento de usarse.

La siguiente mezcla S9 se agrega a cada mililitro de medio de cul

tivo: 166  $\mu$ l de fracción S9 (equivalente a 8 mg de proteínas hepáticas), 1.4  $\mu$ mol de NADP y 2.8  $\mu$ mol de glucosa 6-fosfato.

#### Análisis del ICH y del ciclo celular.

El promedio de ICH/célula se obtiene del recuento de 30 metafases (2n=46) en segunda división.

Para el análisis del ciclo celular, se examinan 200 metafases clasificadas según el patrón de coloración en primera ( $M_1$ ), segunda ( $M_2$ ) o tercera o más ( $M_3+$ ) mitosis. El índice de replicación (IR) se calcula de acuerdo a Schneider y col. (1981).

Tanto el análisis del ICH como del ciclo celular fue realizado por una persona en preparados codificados.

El valor de ICH y la cinética de división celular fueron analizados estadísticamente por el test "t" de Student y la prueba de  $\chi^2$ , respectivamente.

#### Resultados

Los valores correspondientes al ICH se muestran en la tabla 14.

Tabla 14: Frecuencias de ICH en linfocitos humanos tratados con Aldicarb o con Ciclofosfamida.

Tratamiento	Concentración	ICH/cél. sin mezcla S9		ICH/cél. con mezcla S9	
		rango	media $\pm$ ESM	rango	media $\pm$ ESM
Control		4-14	7.5 $\pm$ 0.5 <sup>a,b</sup>	2-12	7.4 $\pm$ 0.5 <sup>b,c</sup>
Aldicarb	10 $\mu$ g/ml	1-9	5.8 $\pm$ 0.4 <sup>d</sup>	2-16	7.5 $\pm$ 0.6 <sup>d'</sup>
	40 $\mu$ g/ml	1-13	7.7 $\pm$ 0.6 <sup>d</sup>	4-18	9.7 $\pm$ 0.7 <sup>b',d'</sup>
	75 $\mu$ g/ml	4-18	8.6 $\pm$ 0.6	3-16	9.4 $\pm$ 0.5 <sup>b'</sup>
	150 $\mu$ g/ml	5-16	9.1 $\pm$ 0.5 <sup>a',e</sup>	5-24	13.4 $\pm$ 0.9 <sup>c',e'</sup>
	250 $\mu$ g/ml	4-15	10.0 $\pm$ 0.6 <sup>*,b'</sup>	sin mitosis	
Ciclofosfamida	0.5 x 10 M	3-14	7.4 $\pm$ 0.5	12-43	26.5 $\pm$ 1.3 <sup>c'</sup>
	1.0 10 M	1-15	6.3 $\pm$ 0.5	14-59	29.4 $\pm$ 1.9 <sup>c'</sup>
	2.0 10 M	2-18	10.2 $\pm$ 0.7 <sup>b'</sup>	sin mitosis	

\* Se contaron solamente 25 metafases.

Leer verticalmente: a,a'  $p < 0.05$ ; b,b'  $p < 0.005$ , c,c'  $p < 0.0005$

Leer horizontalmente: d,d'  $p < 0.05$ ; e,e'  $p < 0.0005$



Se observa un incremento dependiente de la dosis en los valores de ICH luego del tratamiento con diferentes concentraciones de Aldicarb (coeficiente de regresión  $b_{yx} = 2.6$ ; ecuación de la recta de regresión  $y_x = 2.6x + 6.9$ ). Sin embargo, solamente se observan diferencias significativas entre los cultivos tratados con dosis de 150 o 250  $\mu\text{g/ml}$  de Aldicarb y el cultivo control tratado con el solvente ( $p < 0.05$  y  $p < 0.005$ , respectivamente).

El agregado de Aldicarb y de la mezcla S9 al cultivo de linfocitos indujo valores de ICH/célula más altos que los anteriores, siendo estos incrementos también, dependientes de las dosis utilizadas (coeficiente de regresión  $b_{yx} = 7.5$ ; ecuación de la recta de regresión  $y_x = 7.5x + 7.3$ ). Las diferencias fueron estadísticamente significativas para las dosis de 40 y 75  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.005$ ) y de 150  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.0005$ ). En los cultivos de linfocitos tratados con 250  $\mu\text{g/ml}$  de Aldicarb y la mezcla S9 no se observan mitosis.

Se hallan diferencias estadísticamente significativas entre los cultivos tratados con Aldicarb y los tratados con Aldicarb y mezcla S9 para la dosis de 10 y 40  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.05$ ) y de 150  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.0005$ ). La figura 2 muestra el análisis de las relaciones dosis-respuesta, con o sin la presencia de la mezcla S9, por medio de los coeficientes de regresión y de las rectas de regresión correspondientes. El incremento de la frecuencia de ICH aparece directamente relacionado con las dosis de Aldicarb empleadas a niveles significativos ( $p < 0.05$  sin S9 y  $p < 0.01$  con S9).

La CP se usa para comparar los efectos cromosómicos del Aldicarb con un agente genotóxico conocido. Sin un sistema metabólico exógeno, la CP indujo una respuesta significativa ( $p < 0.005$ ) con la concentración más alta ( $2.0 \times 10^{-5}$  M). Esta misma dosis usada junto con la mezcla S9

inhibió totalmente la mitosis. Cuando los tratamientos se realizan con dosis menores de CP ( $0.5$  y  $1.0 \times 10^{-5}$  M) y la mezcla S9, se observa un incremento de 4 veces en el valor de ICH por célula sin efectos citotóxicos aparentes.

El IR refleja el número promedio de ciclos de replicación completados por los linfocitos durante el período de cultivo. Los datos correspondientes a este parámetro se muestran en la tabla 15.

Tabla 15: Cinética de la replicación celular de linfocitos humanos tratados con Aldicarb.

Concentración	Mezcla S9	Porcentaje de células en			IR
		M1	M2	M3+	
Control		18	28	54	2.36
	+	45	34	21	1.76
Aldicarb		28	54	18	1.90
10 $\mu\text{g/ml}$	+	40	42	18	1.78
40 $\mu\text{g/ml}$		39	41	20	1.81
	+	44	41	15	1.71
75 $\mu\text{g/ml}$		50	39	11	1.61
		51	35	14	1.63
150 $\mu\text{g/ml}$		36	39	25	1.89
	+	51	36	13	1.62
250 $\mu\text{g/ml}$		crecimiento pobre*			
		sin mitosis			

\* Insuficiente para el recuento de metafases.

Los valores del IR de los cultivos tratados con Aldicarb solo o de los cultivos tratados con Aldicarb y la mezcla S9 fueron similares al valor del IR de los tratados con la mezcla S9.

El cultivo control que no recibió ningún tratamiento, presentó el valor de IR más elevado.

Los linfocitos tratados con la concentración más alta de Aldicarb crecieron escasamente y por lo tanto, no se obtuvo el número de metafases suficientes como para determinar el IR.

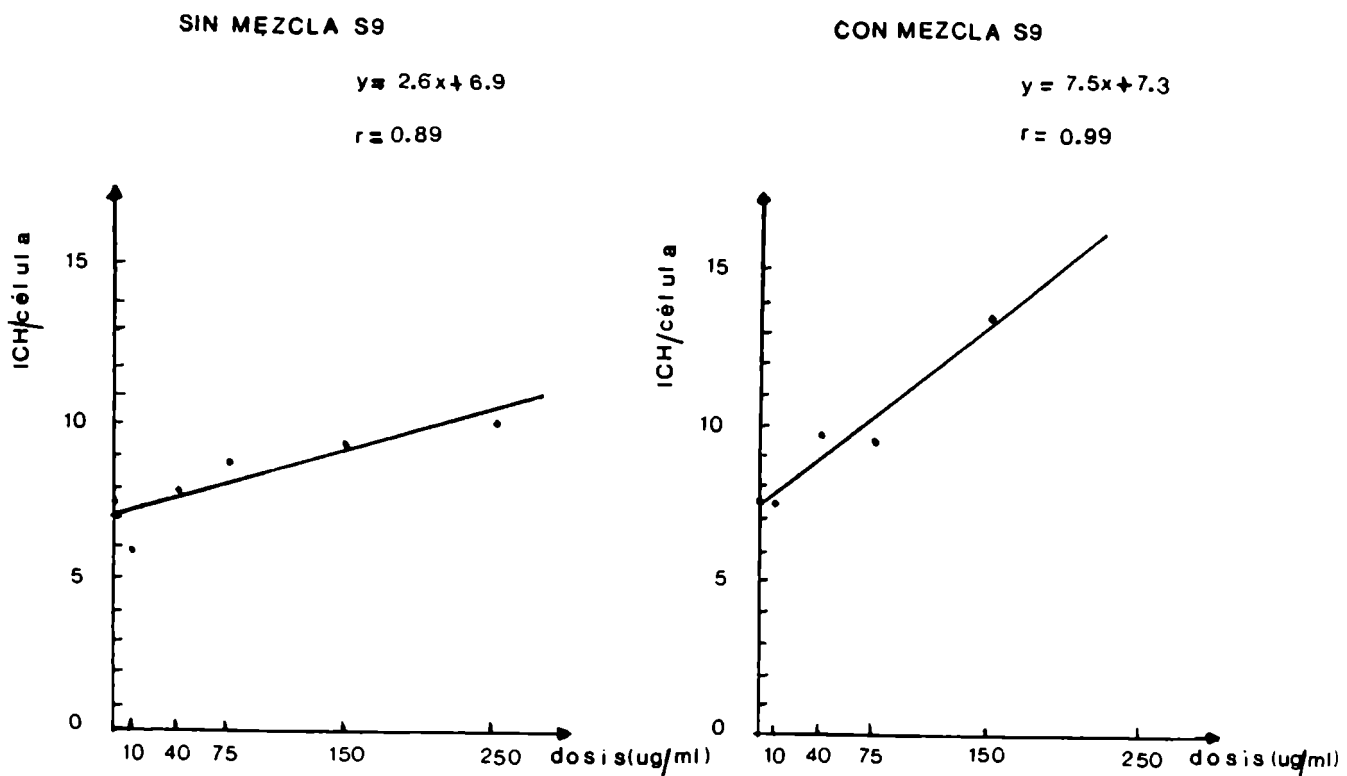


Figura 2: Coeficientes de regresión y rectas de regresión para las frecuencias de ICH en relación a las dosis de Aldicarb.

## Discusión

Los resultados obtenidos de estos experimentos muestran que tanto el Aldicarb como la CP inducen un aumento significativo en los valores de ICH en ausencia de la mezcla S9. Estos resultados sugieren que la activación metabólica de los dos compuestos ocurriría en los cultivos de sangre humana. Mehnert y col. (1984), Norppa y col. (1983) y Waalkens y col. (1981) han obtenido resultados similares para CP.

La activación metabólica "in vitro" de la CP incrementa enormemente los valores de ICH por célula; fenómeno ya documentado por otros autores (Madle y Obe, 1977; White y Hesketh, 1980).

El tratamiento de los cultivos con Aldicarb en presencia de la mezcla S9 induce valores de ICH por célula ligeramente superiores a los obtenidos con el pesticida solo. Este resultado podría indicar una activación débil del Aldicarb por el sistema metabólico exógeno. Además, la mezcla S9 parece potenciar los efectos citotóxicos del Aldicarb ya que se encuentran muy pocas metafases en los cultivos tratados con la concentración más alta de Aldicarb solo y no se observan metafases en los tratados con esta misma dosis y la mezcla S9.

El índice de replicación (IR) se determina como una medida indirecta de la cinética de división celular y junto con la inducción de ICH, podría evidenciar la existencia de daño provocado por los compuestos estudiados. Sin embargo, los cultivos de linfocitos tratados con Aldicarb o Aldicarb y la mezcla S9 muestran valores de IR similares a los hallados en los cultivos tratados solamente con la mezcla S9. Este hecho indica que tanto el sistema de activación metabólica como el pesticida deprimen ligeramente la progresión mitótica de las células en cultivo en relación al cultivo control.

Como ya se ha mencionado, el Aldicarb no produjo daño sobre el ADN de fibroblastos humanos (Blevins y col.; 1977), no indujo micronúcleos en ratón (Seiler, 1977) y no fue mutagénico en el test de Ames aún cuando se agregó la mezcla S9 como sistema de activación metabólico (Dunkel y Simmon, 1980). Sin embargo, indujo un incremento en la frecuencia de ICH en linfocitos humanos "in vitro".

Para completar el análisis citogenético ya comenzado se decidió investigar el efecto del Aldicarb sobre linfocitos por medio del análisis de AC, pues ambas técnicas tienden a complementarse.

#### II.2.3.2. Análisis de AC en linfocitos humanos tratados con Aldicarb.

##### Cultivo de linfocitos periféricos.

Cada frasco de cultivo contiene: 0.45 ml de sangre entera heparinizada de un dador sano, 10 ml de medio MEM (Gibco, Cat. N°410-1500), 13% de suero fetal bovino (Gibco), 0.5% de PHA P y 80 µg/ml de gentamicina (Biocrom).

Los cultivos se incuban a 37°C. A las 24 hs de iniciado el período de incubación se realiza el tratamiento con el Aldicarb y la CP en presencia o ausencia de la mezcla S9.

El Aldicarb se disuelve en acetona inmediatamente antes de su uso, siendo el volumen del solvente de 5 µl/ml de medio de cultivo (0,5%). Los cultivos de linfocitos se tratan con las siguientes concentraciones de Aldicarb: 40, 75, 150, 250 y 350 µg/ml de medio de cultivo (aproximadamente 20, 40, 80, 130 y 185 x 10<sup>-5</sup> M).

La CP se usa a la concentración de 2.0 x 10<sup>-5</sup> M.

Los cultivos controles se procesan de la misma forma, agregándose 0.5% de acetona.

Luego de dos horas de tratamiento los cultivos se centrifugan y las células se lavan con medio precalentado. Los linfocitos se cultivan durante 24 hs más con medio condicionado obtenido de cultivos realizados al mismo tiempo.

Se agrega colchicina (0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante los últimos 90 min. del período de cultivo. Luego de hipotonía (ClK 0.075 M) y fijación (metanol 3: ácido acético 1), los preparados obtenidos se colorean con Giemsa 4% durante 7 a 8 min.

#### Preparación de la mezcla S9.

La técnica detallada se ha descrito anteriormente. Se sigue el procedimiento de Madle (1981).

La siguiente mezcla S9 se agrega a cada mililitro de medio de cultivo: 143  $\mu\text{l}$  de fracción S9 (equivalente a 4 mg de proteínas hepáticas), 1.4  $\mu\text{mol}$  de NADP (Sigma) y 2.8  $\mu\text{mol}$  de glucosa 6-fosfato (Sigma).

#### Análisis de AC.

Se examina un total de 150 a 200 metafases por dosis para la presencia de los diferentes tipos de aberraciones citogenéticas estructurales. Cada concentración se testea en por lo menos 2 experimentos separados.

Las metafases que poseen solamente lesiones acromáticas (gaps) no se consideran como anormales.

Los preparados codificados fueron analizados por una persona. Los resultados fueron analizados estadísticamente por la prueba de  $\chi^2$ . La relación dosis-respuesta fue determinada por medio de las rectas y de los coeficientes de regresión.

## Resultados.

La tabla 16 muestra los tipos y frecuencias de AC estructurales. Los cultivos de linfocitos muestran un incremento en el número de células anormales que está en relación con las dosis crecientes de Aldicarb (coeficiente de regresión  $byx= 12$ , recta de regresión  $yx= 1.3 x + 1.2$ ). Sin embargo, sólo aquellos cultivos tratados con la dosis de  $350 \mu\text{g/ml}$  de Aldicarb muestran diferencias significativas con respecto a los cultivos controles tratados con el solvente solo ( $p < 0.05$ ). Esta misma dosis produce también un aumento significativo en la frecuencia de lesiones acromáticas (gaps) cromatídicas y cromosómicas ( $p < 0.001$ ).

La adición de la mezcla S9 a los cultivos tratados con Aldicarb induce valores más elevados de células anormales, que también dependen de las concentraciones empleadas (coeficiente de regresión  $byx= 2.8$ , recta de regresión  $yx= 2.8 x + 2.8$ ). Con relación a los controles, nuevamente se obtienen diferencias significativas en la frecuencia de células anormales ( $p < 0.01$ ) y de lesiones acromáticas (gaps) ( $p < 0.02$ ) con la dosis de  $350 \mu\text{g/ml}$ .

La mezcla S9 "per se" produce un incremento de células anormales de más de 2 veces. Mientras que con la concentración de Aldicarb de  $350 \mu\text{g/ml}$  se observa una ligera inhibición de las mitosis, la adición de la mezcla S9 provoca el mismo efecto a partir de la dosis de  $250 \mu\text{g/ml}$  (Datos no mostrados).

El análisis de las relaciones dosis-respuesta, en presencia a ausencia de la mezcla S9, por medio de los coeficientes de regresión y de las rectas de regresión se muestra en la figura 3. El aumento de células con aberraciones citogenéticas aparece relacionado significativamente con las dosis de Aldicarb empleadas ( $p < 0.05$ ).

Tabla 16: Frecuencia de AC en linfocitos humanos tratados con Aldicarb o con Ciclofosfamida.

Tratamiento	Dosis	N° de céls. contadas	Células anormales (*)		AC por 100 células			
			Número	% ± ESM	gaps cromatídicos	gaps cromosómicos	roturas cromatídicas	roturas cromosómicas
SIN MEZCLA S9								
control		400	6	1.73 ± 0.02	1.53 ± 0.03	1.33 ± 0.06	0.47 ± 0.03	1.53 ± 0.03
ciclofosfamida	2 x 10 <sup>-5</sup> M	350	8	2.50 ± 0.04	2.90 ± 0.01	0.70 ± 0.02	1.50 ± 0.09	1.20 ± 0.09
Aldicarb	40 µg/ml	300	6	1.20 ± 0.10	3.20 ± 0.10	0.00	0.60 ± 0.05	0.60 ± 0.05
	75 µg/ml	300	6	1.20 ± 0.10	4.60 ± 0.05	0.00	1.00 ± 0.08	0.40 ± 0.03
	150 µg/ml	350	9	3.00 ± 0.08	3.30 ± 0.13	1.40 ± 0.05	0.70 ± 0.02	2.30 ± 0.05
	250 µg/ml	500	11	2.20 ± 0.01	1.20 ± 0.05	0.60 ± 0.04	1.20 ± 0.00	1.00 ± 0.01
	350 µg/ml	415	17	3.90 ± 0.06	3.30 ± 0.10	2.70 ± 0.15	1.60 ± 0.03	2.50 ± 0.04
CON MEZCLA S9								
control		350	14	4.00 ± 0.00	2.10 ± 0.07	0.60 ± 0.05	1.90 ± 0.07	2.30 ± 0.05
ciclofosfamida	2 x 10 <sup>-5</sup> M	400	66	17.13 ± 0.13	5.33 ± 0.12	2.73 ± 0.08	8.00 ± 0.10	11.53 ± 0.09
Aldicarb	40 µg/ml	300	10	4.40 ± 0.11	3.00 ± 0.08	1.60 ± 0.03	3.20 ± 0.07	1.20 ± 0.07
	75 µg/ml	300	8	2.40 ± 0.03	6.20 ± 0.31	0.60 ± 0.05	1.80 ± 0.02	0.80 ± 0.07
	150 µg/ml	350	12	3.30 ± 0.02	3.00 ± 0.08	0.90 ± 0.01	2.70 ± 0.02	0.60 ± 0.05
	250 µg/ml	330	21	6.20 ± 0.06	2.15 ± 0.11	0.40 ± 0.03	1.90 ± 0.03	5.05 ± 0.15
	350 µg/ml	287	26	8.80 ± 0.06	4.70 ± 0.14	2.00 ± 0.17	3.65 ± 0.05	5.45 ± 0.04

(\*) Células que poseen por lo menos una aberración cromosómica estructural; no incluyen a las lesiones acromáticas (gaps).



Por otro lado, la concentración utilizada de CP más la mezcla S9, (control positivo) producen un incremento de más de 4 veces en la frecuencia de células anormales cuando se la compara con los cultivos tratados sólo con la mezcla S9. Este tratamiento induce figuras de intercambio cromatídico y cromosómico ( $0.40 \pm 0.03$  y  $0.47 \pm 0.03$ , respectivamente) que no se obtienen en los cultivos de linfocitos tratados con el Aldicarb. Sin la adición de mezcla S9 no se observan efectos en presencia de la CP.

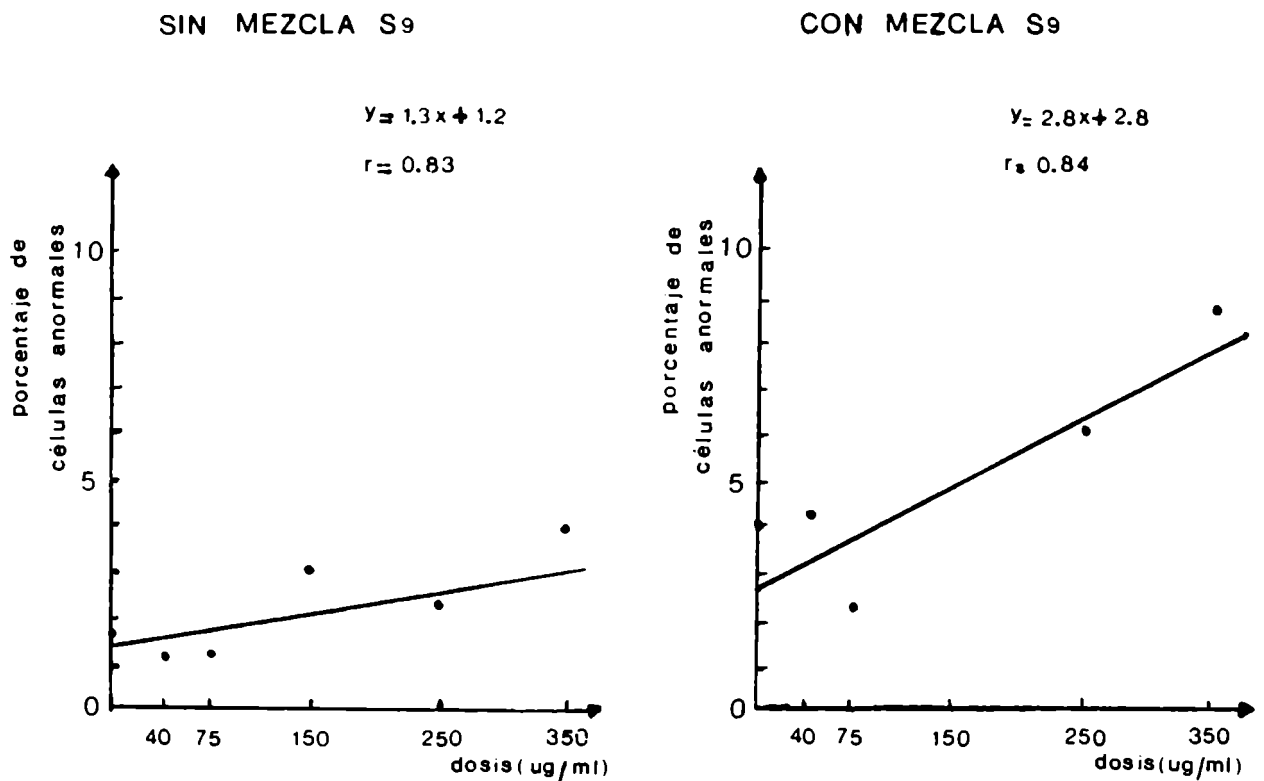


Figura 3: Coeficientes de regresión y rectas de regresión de células anormales en relación a las dosis de Aldicarb.

## Discusión

Los datos obtenidos de estos experimentos muestran el efecto clastogénico del Aldicarb manifestado en la inducción de lesiones acromáticas cromatídicas y cromosómicas y de roturas cromatídicas y cromosómicas en relación a las dosis empleadas.

La observación de células anormales en ausencia de la mezcla S9 podría indicar que la activación metabólica del Aldicarb ocurriría en cultivos de sangre humana, como fue ya informado (en el punto anterior sobre inducción de ICH por el Aldicarb; Norppa y col., 1985).

El tratamiento con el Aldicarb en presencia de la mezcla S9 induce frecuencias de AC más elevadas que aquellas obtenidas con el Aldicarb solo. Este resultado podría considerarse como una activación débil del pesticida por el sistema metabólico exógeno.

La mezcla S9 muestra un efecto genotóxico "per se", produciendo un incremento de más del doble en el valor de células anormales; además parece potenciar el efecto citotóxico del Aldicarb; se obtienen menos metafases con 250  $\mu\text{g/ml}$  de Aldicarb y la mezcla S9 que con la dosis de 350  $\mu\text{g/ml}$  del pesticida solo. La citotoxicidad de la mezcla S9 sobre el cultivo de leucocitos humanos ha sido ya descrita por otros autores (Madle y Obe, 1977; Madle, 1981).

El funcionamiento correcto de la capacidad metabólica de la mezcla S9 se demuestra con ciclofosfamida. El tratamiento de los linfocitos con esta droga en presencia de la mezcla S9 no sólo aumenta 4 veces la frecuencia de células anormales, sino que también induce translocaciones cromatídicas y cromosomas dicéntricos.

En la parte anterior se informó que el Aldicarb fue tóxico a dosis más bajas (250  $\mu\text{g/ml}$ ) y que no se observaron mitosis cuando se agre-

ga el sistema de activación metabólico. La diferencia existente entre ambos estudios podría atribuirse a las <sup>^</sup>sangres empleadas: mientras en el primer caso el dador era un fumador, en los experimentos presentes el dador es un no-fumador. Esto explicaría la menor toxicidad observada a la misma dosis, ya que ha sido demostrado que el fumar puede potenciar la respuesta celular a un tratamiento químico (Morimoto y col., 1984; Lundgren y Lucier, 1985).

Los datos obtenidos muestran que el Aldicarb, como otros compuestos relacionados, es capaz de inducir AC en un sistema celular de mamíferos. Ishidate encontró que dos homólogos de Landrin (3-metilfenil y 3, 4-dimetilfenil del N-metilcarbamato), el Carbaryl, el Maneb, el M-tolil-metil carbamato y el metil propil trimetileno carbamato, fueron capaces de producir AC en células de hamster Chino "in vitro" (Ishidate y Odashima, 1977; Ishidate y Yoshikawa, 1980).

En conclusión, los experimentos realizados permiten establecer que el pesticida Aldicarb induce un aumento en los valores de ICH y en las frecuencias de AC estructurales de linfocitos humanos cultivados, siendo estos incrementos superiores cuando se agrega la mezcla S9 como sistema de activación metabólica exógeno.

#### II.2.3.3. Nitroso-Aldicarb: Análisis del ICH y del ciclo celular en linfocitos humanos "in vitro".

El Nitroso-Aldicarb es un derivado del éster carbámico Aldicarb, que como fue mencionado, es un pesticida usado para el control de insectos y nematodos en floricultura y horticultura.

El Nitroso-Aldicarb es mutagénico es Salmonella typhimurium his G46 (Seiler, 1977) y en Escherichia coli (Lijinsky y Elespuru, 1976), induce roturas de cadena simple en el ADN de células de piel humana (Blevins y col., 1977) y es carcinogénico en ratas. (Lijinsky y Schmeahl, 1978).

Los compuestos nitrosados podrían formarse "in vivo" a partir de residuos de pesticidas bajo condiciones particulares (IARC, 1983, a). En base a esto se decidió investigar si el Nitroso-Aldicarb era capaz de modificar la frecuencia de ICH y la cinética del ciclo celular de linfocitos periféricos humanos "in vitro".

#### Materiales y Métodos.

##### Preparación del Nitroso-Aldicarb.

El Nitroso-Aldicarb se obtuvo en nuestro laboratorio a partir del Aldicarb de acuerdo con la técnica de Blevins y col. (1977).

El residuo sólido obtenido tuvo un espectro típico de un éster carbámico nitrosado con un grupo de picos máximos de similar intensidad a 385, 400 y 420 nm.

La espectrometría de masa se usó para acceder cualitativamente a la presencia del Nitroso-Aldicarb.

Tanto el Aldicarb como el Nitroso-Aldicarb se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) inmediatamente antes de su uso.

### Efectos sobre el crecimiento celular.

Se utilizó la línea celular humana Hep II; para acceder al crecimiento celular se determinó la proteína celular (Oyama y Eagle, 1956) luego de 48 y 72 hs a partir del comienzo del tratamiento con 50, 150 y 300  $\mu\text{g/ml}$  de Nitroso-Aldicarb (0.23, 0.69 y 1.38 mM) y 150  $\mu\text{g/ml}$  de Aldicarb (0.80 mM).

### Efectos citogenéticos.

#### Cultivo de linfocitos humanos.

Sangre entera (0.20 ml) de un dador sano no-fumador se agrega a 5 ml de medio MEM (Gibco, Cat. N°410-1500) suplementado con 15% de suero fetal bovino (Gibco), 0.5% de PHA P (Difco), 10  $\mu\text{g/ml}$  de bromodeoxiuridina (Sigma) y 80  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina (Biocrom).

Los cultivos se incuban a 37°C en total oscuridad.

Se realizan 2 experiencias por separado (I y II) utilizándose el mismo tipo de medio, suero, mitógeno, bromodeoxiuridina y antibiótico en todo el estudio.

Los linfocitos se tratan luego de 24 hs. de cultivo con las mismas concentraciones de Nitroso-Aldicarb y de Aldicarb que en el ensayo sobre crecimiento celular. El volumen del DMSO fue de 5  $\mu\text{l/ml}$  de medio de cultivo (0.5%).

Las células se incuban luego por 48hs. más.

Durante los últimos 90 min. del período de cultivo se agregan 0.2  $\mu\text{g/ml}$  de colchicina. Luego de hipotonía (ClK 0.075 M) y fijación (metanol 3: ácido acético 1), los preparados cromosómicos obtenidos se procesan de acuerdo a la técnica modificada de Perry y Wolff (1974) para conseguir la diferenciación de las cromátidas hermanas.

### Análisis del ICH y del ciclo celular.

El valor de ICH por célula se obtiene del análisis de 50 metafases ( $2n= 46$ ) durante el segundo ciclo de división por experiencia.

Cada metafase se clasifica en primera (M1), segunda (M2) o tercera o más (M3+) mitosis según el patrón de coloración. Para el análisis del ciclo celular se examinan 200 metafases por experiencia y se calcula un índice de replicación celular (IR) de acuerdo a Schneider y col. (1981).

Las observaciones se realizan en preparados codificados por una sola persona.

El valor de ICH y la cinética de división celular se analizan estadísticamente por el test "t" de Student y la prueba de  $\chi^2$  respectivamente.

### Resultados.

#### Ensayo de citotoxicidad.

Se estudió el efecto del Nitroso-Aldicarb sobre el crecimiento de células Hep. II con el objeto de encontrar la dosis no tóxica para la realización de los estudios posteriores.

Si bien no se observaron efectos sobre el crecimiento celular ni una morfología alterada con las dosis de 50 y 150  $\mu\text{g/ml}$  de Nitroso-Aldicarb, luego de 48 y 72 hs de tratamiento la concentración de 300  $\mu\text{g/ml}$  de Nitroso-Aldicarb inhibió ligeramente el crecimiento celular.

#### Análisis citogenético.

La tabla 17 muestra las frecuencias de ICH en linfocitos humanos tratados con Nitroso-Aldicarb y con Aldicarb.

Para todos los tratamientos no se observaron diferencias significativas entre los resultados de las experiencias I y II realizadas en dos días distintos, excepto para la dosis de 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Nitroso-Aldicarb ( $p < 0.001$ ).

Los cultivos de linfocitos tratados con las distintas dosis de Nitroso-Aldicarb mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los cultivos controles tratados con el solvente solo. Además se observó un incremento en el valor de ICH/célula en relación a las concentraciones crecientes de Nitroso-Aldicarb, siendo este aumento dependiente de la dosis significativo sólo para la experiencia II (coeficiente de regresión  $b_{yx} = 0.02$ ; recta de regresión  $y = 0.02x + 8.27$ ).

Por otra parte, el tratamiento con 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Aldicarb no produjo diferencias significativas en el valor de ICH/célula al compararlo con los cultivos no tratados.

Luego de 72 hs de cultivo muchas de las células en los cultivos controles se encuentran en M2. La exposición al Nitroso-Aldicarb durante 48 hs produjo una depresión del ciclo celular evidenciada por un aumento del número de células en M1 y una reducción de células en M3+ (Tabla 18).

En este caso, ambas experiencias (I y II) dieron resultados homogéneos, de modo tal que se pudieron reunir los datos.

Al comparar el número de células en M1 y en M2 entre los cultivos controles no tratados y los cultivos tratados con el pesticida y su derivado nitrosado, sólo se observaron diferencias significativas con 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Nitroso-Aldicarb ( $p < 0.02$ ).

Los IR más altos se hallaron en los controles y en los cultivos tratados con Aldicarb. Cualquier concentración utilizada de Nitroso-Aldicarb redujo este valor.

Tabla 17. Frecuencias de ICH en linfocitos humanos tratados con Nitroso-Aldicarb o con Aldicarb.

Tratamiento	Número de células contadas	ICH total	ICH/célula	ESM	rango
<b>Control</b>					
I	50	417	8.34 <sup>b</sup>	0.52	2-19
II	50	442	8.84 <sup>c</sup>	0.54	2-16
Total	100	859	8.59 <sup>a</sup>	0.37	2-19
<b>Nitroso-Aldicarb 50 µg/ml</b>					
I	50	489	9.78	0.57	3-20
II	50	480	9.60	0.49	4-21
Total	100	969	9.69 <sup>a'</sup>	0.37	3-21
<b>Nitroso-Aldicarb 150 µg/ml</b>					
I	50	519	10.38	0.44	4-18
II	50	573	11.46	0.42	6-18
Total	100	1092	10.92 <sup>a''</sup>	0.30	4-18
<b>Nitroso-Aldicarb 300 µg/ml</b>					
I	50	618	12.36 <sup>b'</sup>	0.61	6-24
II	50	787	15.74 <sup>c'</sup>	0.78	8-29
<b>Aldicarb 150 µg/ml</b>					
I	50	459	9.18	0.66	2-24
II	50	497	9.94	0.55	3-24
Total	100	956	9.56	0.43	2-24

ESM: Error estandar de la media.

a,a'  $p < 0.05$

a,a''  $p < 0.001$

b,b'  $p < 0.001$

c,c'  $p < 0.001$

b',c'  $p < 0.001$



Tabla 18. Cinética de la replicación celular de linfocitos humanos  
tratados con Nitroso- Aldicarb o con Aldicarb.

Tratamiento	Número de células contadas	Porcentaje de células en			IR
		M1	M2	M3+	
Control					
I	200	33.5	47.5	19.0	1.86
II	200	30.5	45.5	24.0	1.94
Total	400	32.0	46.5	21.5	1.90
Nitroso-Aldicarb 50 µg/ml					
I	200	44.0	46.0	10.0	1.66
II	200	45.0	45.5	9.5	1.65
Total	400	44.5	45.75	9.75	1.655
Nitroso-Aldicarb 150 µg/ml					
I	200	46.0	44.0	10.0	1.64
II	200	38.0	50.0	12.0	1.74
Total	400	42.0	47.0	11.0	1.69
Nitroso-Aldicarb 300 µg/ml					
I	200	63.5	34.0	2.5	1.39
II	200	59.5	37.0	3.5	1.44
Total	400	61.5	35.5	3.0	1.415
Aldicarb 150 µg/ml					
I	200	37.0	47.5	15.5	1.79
II	200	33.5	43.0	23.5	1.90
Total	400	35.25	45.25	19.5	1.845

## Discusión.

El incremento de la frecuencia de ICH observado confirmó la habilidad del Nitroso-Aldicarb de actuar sobre el ADN como fuera demostrado en trabajos anteriores. Blevins y col. (1977) observaron roturas de cadena simple en fibroblastos humanos tratados durante 1 hora con  $0.01 \times 10^{-3} \text{M}$  de Nitroso-Aldicarb. Lijinsky y Elespuru (1976) indujeron mutaciones en bacterias con  $0.1 \times 10^{-3} \text{M}$  de Nitroso-Aldicarb. En la presente investigación el efecto del Nitroso-Aldicarb sobre el valor de ICH/célula se observó a partir de la dosis de  $0.23 \times 10^{-3} \text{M}$  con una exposición de 48 hs. Al mismo tiempo, la presencia del nitroso derivado del Aldicarb en el cultivo de linfocitos produjo enlentecimiento del ciclo celular con acumulación de metafases en primera división; esto podría ser una evidencia más de daño biológico provocado por este compuesto.

En dos experiencias (I y II) realizadas en días distintos con sangre de la misma persona, sin bien los niveles basales de ICH y la respuesta a las dosis menores no mostraron diferencias entre experiencias, se observaron diferencias significativas en el tratamiento con la dosis mayor.

Speit y col. (1986) han encontrado que cultivos repetidos de linfocitos del mismo individuo bajo las mismas condiciones experimentales presentaban diferencias significativas en la frecuencia de ICH.

Esta variación fue vista con la concentración de  $300 \mu\text{g/ml}$  lo cual podría quizás indicar, cambios a través del tiempo en la sensibilidad celular que sólo sería manifestada con esta dosis.

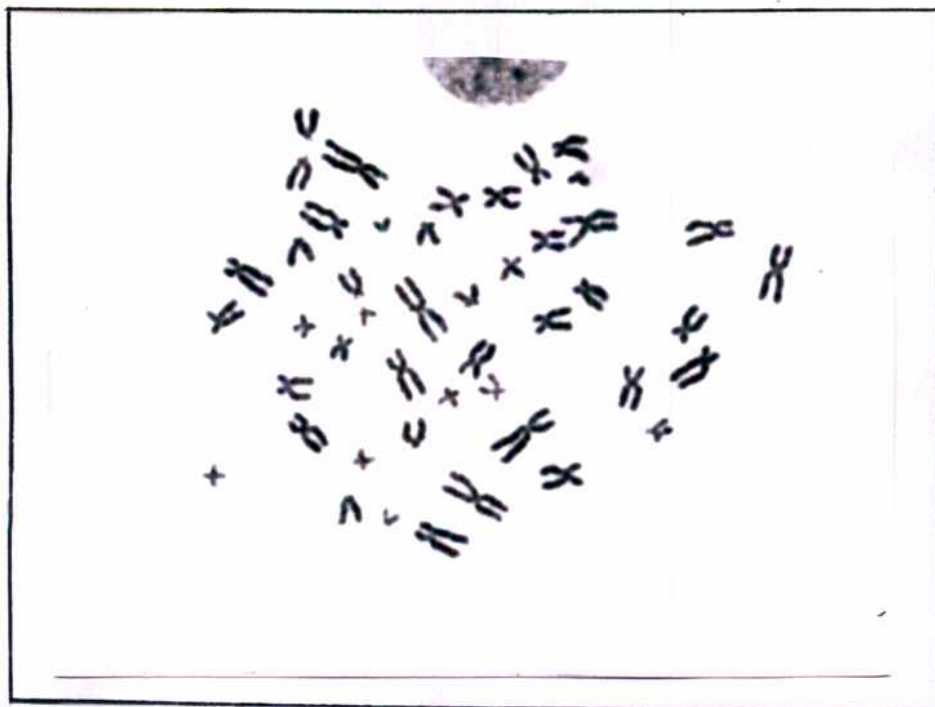
El tratamiento de 48 hs con  $150 \mu\text{g/ml}$  de Aldicarb no mostró diferencias significativas con respecto al control ni en la frecuencia

de ICH ni en el ciclo celular.

Previamente fue mencionado que con una exposición de 2 hs. y con sangre de un dador fumador, el Aldicarb a la misma concentración produjo depresión del ciclo celular y un aumento en el valor de ICH que fue estadísticamente significativo al compararlo con el cultivo control.

Aquí nuevamente se plantea el hecho de las sangres empleadas, fumador versus no-fumador, ya que como fue comunicado por otros autores (Morimoto y col., 1984; Lundgren y Lucier, 1985) "el fumar puede potenciar la respuesta celular al tratamiento químico".

Estos resultados sobre el material genético sugieren que la exposición al pesticida Aldicarb podría afectar la salud genética de la población humana a través de la formación de derivados nitrosados.



Fotografía donde se muestra una célula en primera mitosis o M1.



Fotografías donde se observan células en segunda  
división o M2: a) sin tratamiento ( 9 ICH/célula )

b) tratada con 150  $\mu\text{g/ml}$  de Aldicarb  
( 20 ICH/célula )



Fotografía donde se muestra una célula en  
tercera división o M3.

### III. RESUMEN

Cuando una célula está expuesta a un agente físico o químico mutagénico, carcinogénico y/o teratogénico existe la posibilidad que ese agente pueda causar algún daño sobre su material genético ya sea directa o indirectamente.

Si el daño se produce en células germinales, podría provocar esterilidad en los mismos individuos expuestos o mutaciones perjudiciales que se expresan en sus descendientes (Archer y col. 1981). Si el daño ocurre en células somáticas puede conducir a cambios neoplásicos o a envejecimiento prematuro (Sorsa, 1984). Estas mutaciones en células somáticas pueden ir desde simples cambios de pares de bases hasta cambios cromosómicos numéricos o estructurales. Este daño en la estructura del cromosoma se manifiesta como incrementos en los valores de aberraciones cromosómicas (AC) estructurales en relación a la exposición.

La exposición a agentes genotóxicos puede producir también, un aumento en la frecuencia del intercambio de cromátidas hermanas (ICH). El ICH involucra un intercambio simétrico entre cromátidas hermanas que no da origen a una alteración de la morfología cromosómica.

El análisis de AC estructurales y del ICH constituyen hasta ahora, los únicos métodos útiles para acceder al daño sobre el material genético humano provocado por agentes exógenos.

Estos ensayos capaces de detectar efectos biológicos en respuesta a una exposición ambiental, son esenciales para determinar el peligro potencial de una exposición y tomar las medidas preventivas necesarias para la protección de la salud humana.

La detección de ese daño "in vivo" puede ser realizada solamente con muestras de células humanas en división, como médula ósea o teji

do testicular. Debido a la dificultad en obtener estas muestras, tales técnicas no pueden usarse para un monitoreo biológico rutinario. En base a esto, el sistema frecuentemente usado es el de linfocitos sanguíneos estimulados con mitógenos en cultivo.

Existiría una correlación entre el daño cromosómico ocurrido en los linfocitos con el presente en otras células somáticas y por lo tanto, los linfocitos serían útiles células indicadoras (Nordenson y col., 1984).

En esta Tesis se utilizaron las técnicas citogenéticas mencionadas para detectar los posibles efectos genotóxicos en sangre y orina de dos poblaciones expuestas ocupacionalmente.

Una de estas poblaciones está constituida por trabajadores de una industria química de Buenos Aires donde se producen taninos sintéticos, EDTA y blanqueadores estilbénicos y se formulan los pesticidas malatión, diazinón y heptacloro.

El valor medio de ICH en los linfocitos periféricos de 22 trabajadores ( $7.85 \pm 0.26$ ) no fue estadísticamente diferente del valor medio del grupo control ( $8.52 \pm 0.34$ ). Además no se observaron efectos de los concentrados de orina de 9 trabajadores sobre la frecuencia de ICH de los linfocitos de un único dador.

Estos resultados confirman hallazgos anteriores (Hansteen y col., 1978; Anderson y col., 1981; Lambert, 1984) donde se demuestra que el ensayo de ICH puede no dar una respuesta satisfactoria en el caso de exposiciones crónicas de bajo nivel.

La otra población estudiada está localizada en José C. Paz, Provincia de Buenos Aires, y su principal actividad es el cultivo de plantas ornamentales en macetas. Bajo las condiciones de trabajo empleadas, se puede considerar que los integrantes de esta población están expuestos a una mezcla compleja de pesticidas.



A pesar de esta exposición, no se halló un incremento en la frecuencia de AC estructurales en el grupo expuesto en relación al grupo control (porcentaje de células anormales:  $1.25 \pm 0.21$  en los cultivadores de plantas y  $1.10 \pm 0.35$  en los controles).

Nuevamente es evidente que, mientras exposiciones intensas a pesticidas pueden producir daño cromosómico (Yoder y col., 1973; Dulout y col., 1985), no existe un aumento significativo en el nivel de AC en trabajadores expuestos crónicamente a bajos niveles (Stocco y col., 1982).

Finalmente, el daño cromosómico detectado "in vivo" por medio del sistema de linfocitos periféricos dependerá del grado de exposición.

Por otro lado, el pesticida carbámico Aldicarb fue probado por su habilidad para inducir ICH y AC y para alterar la cinética de división celular en linfocitos periféricos humanos "in vitro", en presencia de un sistema de activación metabólica exógeno.

El Aldicarb es un pesticida muy utilizado en nuestro país y del que se conoce poco acerca de sus efectos genotóxicos.

Los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo en la frecuencia de ICH y de roturas cromatídicas y cromosómicas, siendo este aumento superior en presencia de la mezcla S9.

El agregado de este sistema metabólico disminuyó ligeramente la sucesiva progresión mitótica de las células en cultivo.

El Nitroso-Aldicarb es un derivado altamente tóxico del Aldicarb y puede formarse en presencia de nitrito de sodio a pH ácidos como los hallados en el estómago de mamíferos.

Se analizó si el Nitroso-Aldicarb era capaz de modificar la frecuencia de ICH y la cinética de división celular de linfocitos periféricos.

Los cultivos de linfocitos mostraron un incremento en el valor

de ICH por célula en relación a las dosis crecientes de Nitroso-Aldicarb. La presencia de esta sustancia en el medio de cultivo produjo además en lentecimiento del ciclo celular.

El uso de estos ensayos a corto plazo "in vitro" con células de mamíferos como los linfocitos ofrece la posibilidad de analizar el efecto de un agente químico en particular sobre células humanas y establecer si este agente podría ser considerado como potencialmente mutagénico, carcinogénico y/o teratogénico.

Los efectos genotóxicos producidos "in vitro" por el Aldicarb y su derivado nitrosado sugieren que la exposición a estas sustancias podría tener consecuencias para la salud genética humana.

Marcela Beatriz González Lina

8 de Agosto

#### IV. BIBLIOGRAFIA

- Abbondandolo, A. (1984). Chromosome-aberration tests. Food Addit Contam 1: 165-172.
- Allen, J.W.; K.Brock, J. Campbell y Y. Sharief (1984). Sister chromatid exchange analysis in lymphocytes. Single Cell Mutation Monitoring Systems. A.A. Ansari y F. J. De Serres(Eds). Plenum Publishing Corporation. pag. 145-163.
- Allen, J.W. y C. W. Gwaltney (1984). Sister chromatid exchanges in mammalian meiotic chromosomes. Basic Life Sci. 29: 629-645.
- Allen, J.W.; C.F. Shuler, R. W. Mendes y S. A. Latt (1977). A simplified technique for in vivo analysis of sister chromatid exchanges using 5-bromodeoxyuridine tablets. Cytogenet Cell Genet 18: 231-237.
- Ames, B.N.; W.E. Durston, E. Yamasaki y F. D. Lee (1973). Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 2281-2285.
- Ames, B.N.; J. Mc Cann y E. Yamasaki (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation Res. 31: 347-364.
- Anderson, D.; C.R. Richardson, I.F. Purchase, H.J. Evans y M.L. O'Riordan (1981). Chromosomal analysis in vinyl chloride exposed workers: Comparison of the standard technique with the sister-chromatid exchange technique. Mutation Res. 83: 137-144.
- Andersson, H. C.; E.A. Tranberg, A.H. Uggla y G. Zetterberg (1980). Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in lymphocytes of men occupationally exposed to styrene in a plastic-boat factory. Mutation Res. 73: 387-401.

- Archer, P.G.; M. Bender, A.D. Bloom, J.G. Brewen, A.V. Carrano y R.J. Preston (1981). Guidelines for cytogenetic studies in mutagen-exposed human populations. Guidelines for Studies of Human Populations Exposed to Mutagenic and Reproductive Hazards. A.D. Bloom y N.W. Paul (Eds.) March of Dimes Birth Defects Foundation. pag. 1-35.
- Ardito, G.; L. Lamberti, E. Ansaldi y P. Ponzetto (1980). Sister chromatid exchanges in cigarette-smoking human females and their newborns. Mutation Res. 78: 209-212.
- Barrett, J.C.; M. Oshimura y T.W. Hesterberg (1984). Mechanism of cell transformation by chemical carcinogens (meeting abstract) Thirty-second Annual Meeting of the Radiation Research Society. March 25-29, 1984, Orlando, Florida, pag. 58.
- Bartsch, H.; T. Kuroki, M. Roberfroid y C. Malaveille (1982). Metabolic activation systems "in vitro" for carcinogen/mutagen screening tests. Chemical Mutagens. F.J. de Serres y A. Hollaender (Eds). Plenum Publishing Corporation. Vol 7 pag. 95-161.
- Bauchinger M. y E. Schmid (1985) Cytogenetic effects in lymphocytes of formaldehyde workers of a paper factory. Mutation Res 158: 195-199.
- Becher, G.; A. Haugen y A. Bjrseth (1984). Multimethod determination of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in an aluminum plant, Carcinogenesis 5: 647-651.
- Beek, B.; I. Aranda y E. Thomson (1982). Induction of sister chromatid exchange, cell cycle delay and chromosomal aberrations by human urine concentrates. Mutation Res. 92: 333-360.
- Bender, M.A. (1984). Significance of chromosome abnormalities. Radiation Carcinogenesis: Epidemiology and Biological Significance, J.D. Boice, Jr y J. F. Fraumeni, Jr (Eds) Raven Press, New York. pag. 281-289.

- Blevins, R.D.; W. Lijinsky y J.D. Regan (1977). Nitrosated methylcarbamate insecticides: Effect on the DNA of human cells. *Mutation Res.* 44: 1-7.
- Bowden, G.T.; I.C. Hsu y C.C. Harris (1979). The effect of caffeine on cytotoxicity, mutagenesis and SCE in Chinese hamster cells treated with dihydrodiol epoxide derivatives of benzo (a) pyrene. *Mutation Res.* 63: 361-370.
- Brandom, W.F.; G. Saccomanno, V.E. Archer, P.G. Archer y A.D. Bloom (1978). C.A. as a biological dose-response indicator of radiation exposure in uranium miners. *Radiat. Res.* 76: 159-171.
- Brogger, A. (1975). Is the chromatid gap a folding defect due to protein change?. Evidence from mercaptoethanol treatment of human lymphocyte chromosomes. *Hereditas* 88: 131.
- Butler M.G. y W.G. Sanger (1981). Increased frequency of sister chromatid exchange in alcoholics. *Mutation Res.* 85: 71-76.
- Carrano, A.V., L.H. Thompson, P.A. Lindl y J.L. Minkler (1978). Sister chromatid exchange as indicator of mutagenesis. *Nature* 271: 551-555
- Chen, H.H.; J.L. Hsueh, S.R. Sirianni y C.C. Huang (1981). Induction of sister chromatid exchanges and cell cycle delay in cultured mammalian cells treated with eight organophosphorus pesticides. *Mutation Res.* 88: 307-316.
- Chorazy, M. (1985). Sequence rearrangements and genome instability. A possible step in carcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin Oncol.* 109: 159-172.
- Cleaver, J.E. (1981). Correlations between sister chromatid exchange frequencies and replicon sizes. A model for the mechanism of SCE production. *Exp. Cell Res.* 136: 27-30.
- Conner, M.K.; Y. Alarie y R.L. Dombroske (1980). Sister chromatid exchange in murine alveolar macrophages, bone marrow and regenerating liver cells induced by styrene inhalation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55: 37-42.

- Conner, M.K.; M. Cheng y J.A. Biegel (1984). A path probability model for sister-chromatid exchanges induced by alkylating agents. *Mutation Res.* 126: 35-46.
- Conner, M.K. y N. Wald (1981). Chromosomal methods in population studies. *Environ Health Perspect* 42: 107-113.
- Craig-Holmes, A.P. y M.W. Shaw (1977). Effects of six carcinogens on sister chromatid exchange frequency and cell kinetics in cultured human lymphocytes. *Mutation Res.* 46: 375-384.
- Crossen, P.E. y W.F. Morgan (1979). Proliferation of PHA-stimulated lymphocytes measured by combined autoradiography and sister chromatid differential staining. *Exp. Cell Res.* 118: 423-427.
- Davidson, R.L.; E.R. Kaufman, C.P. Dougherty, A.M. Ouellette, C.M. Di Folco y S.A. Latt (1980). Induction of sister chromatid exchanges by BUdR is largely independent of the BUdR content of DNA. *Nature* 284: 74-76.
- Deknuddt, G. (1982). Cell kinetics and radiosensitivity of human lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin, Wistaria floribunda or lentil lectin. *Can J. Genet. Cytol.* 24: 761-769.
- Deknuddt, G. y O. Kamra (1983). Influence of various mitogens on the yield of sister-chromatid exchanges, induced by chemicals, in human lymphocytes. *Mutation Res.* 111: 161-170.
- Dellarco, V.L.; K. H. Mavournin y M.D. Waters (1986). Aneuploidy Data Review Committee: Summary compilation of chemical data base and evaluation of test methodology. *Mutation Res.* 167: 149-169.
- Dulout, F.N.; O.A. Olivero y M.C. Pastori (1982, a). The mutagenic effect of Thiram analysed by the micronucleus test and the anaphase telophase test. *Mutation Res.* 105: 409-412.

- Dulout, F.N.; O.A. Olivero, H. von Guradze y M.C. Pastori (1982, b).  
Cytogenetic effect of malathion assessed by the micronucleus test.  
Mutation Res. 105: 413-416.
- Dulout, F.N.; M.C. Pastori, O. A. Olivero, M.González Cid, D. Loria,  
E. Matos, N. Sobel, E.C. de Bujan y N. Albiano (1985). Sister-  
chromatid exchanges and chromosomal aberrations in population exposed  
to pesticides. Mutation Res. 143: 237-244.
- Dunkel, V.C. y V.F. Simmon (1980). Mutagenic activity of chemicals  
previously tested for carcinogenicity in the National Cancer Institute  
bioassay program. R. Montesano, H. Bartsch y L. Tomatis (Eds).  
Molecular and Cellular Aspects of Carcinogen Screening test. IARC  
Scientific Publications N° 27. IARC.pág. 283-301.
- Dzwonkowska, A. y H. Hubner (1986). Induction of chromosomal aberrations  
in the Syrian hamster by insecticides tested "in vivo". Arch. Toxicol.  
58: 152-156.
- Epstein, S.S. (1974).Environmental determinants of human cancer. Cancer  
Res. 34: 2425-2435.
- Evans, H.J. (1983). Cytogenetic methods for detecting effects of  
chemical mutagens. Annals of the New York Academy of Sciences, Cellular  
Systems for Toxicity Testing 407: 131-141.
- Evans, H.J.; K.E. Buckton, G.E. Hamilton y A. Carothers. (1979).  
Radiation-induced chromosome aberrations in nuclear dockyard workers.  
Nature 277: 531-534.
- Evans, H.J.; M. Ishidate, Jr., M. Leng, C.T. Miller, F. Mitelman y E.  
Vogel (1980). Cytogenetic damage as an endpoint in short-term assay  
systems for detecting environmental carcinogens. Long-term and short-  
term screening assay for carcinogens. R. Montesano, H. Bartsch y L.  
Tomatis (Eds). IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic

Risk of Chemicals to Humans, Suppl 2, pag. 227-244.

- Evans, H. J. y M.I. O'Riordan (1975). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Mutation Res.* 31: 135-148.
- Evans, H.J. y Vijayalaxmi (1980). Storage enhances chromosome damage after exposure of human leukocytes to mitomycin C. *Nature* 284: 370-372.
- Fonatsch, C.; M. Schaatt, H. Kirchner y V. Diell (1980). A possible correlation between the degree of karyotype aberrations and the rate of sister chromatid exchanges in lymphoma lines. *Int. J. Cancer* 26: 749-756.
- Fujiwara, Y.; Y. Kano y Y. Yamamoto (1984). DNA interstrand cross-linking repair, and SCE mechanism in human cells in special reference to Facioni anemia. *Basic Life Sci.* 29: 787-800.
- Fujiwara, Y.; M. Tatsumi, Y. Kano, K. Yamamoto, N. Miyazaki, P. Paul, K. Goto y M. Ichihashi (1981). Sister chromatid exchanges are not directly related to 6-thioguanine-resistant mutations induced by U.V. radiation in V79 Chinese hamster cells. *Gann* 72: 145-150.
- Funes-Cravioto, F.; B. Kolmodin-Hedman, J. Lindsten, M. Nordenskjöld, C. Zapata-Gayon, B. Lambert, E. Norberg, R. Olin y A. Swensson (1977) Chromosome aberrations and sister-chromatid exchange in workers in chemical laboratories and a rototyping factory and in children of women laboratory workers. *Lancet* ii: 322-325.
- Galloway, S.M.; P.K. Berry, W.W. Nichols, S.R. Wolman, K.A. Soper, P.D. Stolley P. Archer (1986). Chromosome aberrations in individuals occupationally exposed to ethylene oxide and in a large control population. *Mutation Res.* 170: 55-74.



- Galloway, S.M. y H.J. Evans (1975). Sister chromatid exchange in human chromosomes from normal individuals and patients with ataxia telangiectasia. *Cytogenet Cell Genet.* 15: 17-29.
- Gebhart, E. (1981). Sister chromatid exchange (SCE) and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. *Hum. Genet.* 58:235-254.
- Gentile, J.M.; G.J. Gentile, J. Bultman, R. Sechriest, E.D. Wagner y M.J. Plewa (1982). An evaluation of the genotoxic properties of insecticides following plant and animal activation. *Mutation Res.* 101: 19-29.
- Giulotto, E.; A. Mottura, R. Giorgi, L. Carli y F. Nuzzo (1980). Frequencies of sister chromatid exchange in relation to cell kinetics in lymphocyte culture. *Mutation Res.* 70: 343-350.
- Guerrero, R.R.; D.E. Rounds y T.C. Hall (1979). Bioassay procedure for the detection of mutagenic metabolites in human urine with the use of SCE analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* 62: 805-809.
- Gundy, S.; L. Varga y M.A. Bender (1984). Sister chromatid exchange frequency in human lymphocytes exposed to ionizing radiation "in vivo" and "in vitro". *Radiat. Res.* 100: 47-54.
- Hansteen, I.L.; L. Hillestad, E. Thüs-Evensen y S.S. Heldeas (1978). Effects of vinyl chloride in man. A cytogenetic follow-up study. *Mutation Res.* 51: 271-278.
- Heartlein, M.W. (1985). Mechanisms of induction of SCE and mutations by BrdU and CldU and the use of inhibitors of DNA repair to study mechanisms of radiation-induced chromosome aberrations. *Diss. Abstr. Int.* 45: 3159.
- Heddle, J.A.; M. Hite, B. Kirkhart, K. Mavournin, J.T. Mac Gregor, G.W. Nerwelly M.F. Salamone (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.

- Hedner, K.; B. Högstedt, A.M. Kolnig, E. Mark-Vendel, B. Strömbeck y F. Mitelman (1982). Sister chromatid exchanges and structural chromosome aberrations in relation to age sex. Hum. Genet. 62:305-309.
- Hedner, K.; L Iselius, F. Mitelman, A. Nordén y R.W. Pero (1984, a). A twin study of sister chromatid exchanges in human lymphocytes following carcinogen exposure and DNA repair incubation. Cytogenet Cell. Genet. 38: 189-191.
- Hedner, K.; J. Wadstein y F. Mitelman (1984, b). Increased sister chromatid exchange frequency in chronic alcoholic users. Hereditas 101: 265-266.
- Hemminki, K., M. Sorsa y H. Vainio (1979). Genetic risks caused by occupational chemicals. Use of experimental methods and occupational risk group monitoring in the detection of environmental chemicals causing mutations, cancer and malformations. Scand. J. work environ & health 5: 307-327.
- Hollander, D.H.; M.S. Tockman, Y.W. Liang, D.S. Borgaonkar y J.K. Frost (1978). Sister chromatid exchanges in the peripheral blood of cigarette smokers and in lung cancer patients; and the effect of chemotherapy. Hum. Genet. 44: 165-171.
- Hook, E.B. (1981). Human teratogenic and mutagenic markers in monitoring about point sources of pollution. Environm Res. 25: 178-203.
- Hopkin, J.M. y H.J. Evans (1980). Cigarette smoke-induced DNA damage and lung cancer risks. Nature. 283: 388-390.
- Hsu, I.C.; G.T. Bowden y C.C. Harris (1979). A comparison of cytotoxicity ouabain-resistant mutation, SCE and nascent DNA synthesis in Chinese hamster cells treated with dihydrodiol epoxide derivatives of benzo (a)

- Kato, H. (1974, a). Spontaneous sister chromatid exchange detected by a BUdR-labelling method. *Nature* 251: 70-72.
- Kato, H. (1974, b). Induction of sister chromatid exchanges by chemical mutagens and its possible relevance to DNA repair. *Exp. Cell Res.* 85: 239-247.
- Kligerman, A.D., J.L. Wilmer y G.L. Erexson (1981). Characterization of a rat lymphocyte culture system for assessing sister chromatid exchanges after in vivo exposure to genotoxic agents. *Environ Mutagen* 3: 531-543.
- Korenberg, J.R. y E.F. Freedlender (1974). Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchange. *Chrom.* 48: 355-360.
- Kram, D.; G.D. Bynum, G.C. Senula, C.K. Bickings y E.L. Schneider (1980) In utero analysis of sister chromatid exchange: Alterations in susceptibility to mutagenic damage as a function of fetal cell type and gestational age. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4784-4787.
- Lambert, B. (1984). Sister chromatid exchanges in human lymphocytes *Biological Monitoring and Surveillance of Workers Exposed to Chemicals.* A. Aiho, V. Rühimaki y M. Vainio (Eds) Hemisphere. Publishing Corporation, New York, pag. 339-355.
- Lambert, B.; I. Berndtsson, J. Lindsten, M. Nordenskjöld, S. Söderhäll, B. Holmstedt, L. Palmer, B. Jernström y L. Marsk (1982). Smoking and sister chromatid exchange. *Mutagens in Our Environment.* A.R. Liss (Eds). pag. 401-414.
- Lambert, B. y A. Lindblad (1980). Sister chromatid exchanges and chromosome aberration in lymphocytes of laboratory personnel. *J. Toxicol. Environ. Health* 6: 1237-1243.
- Lambert, B.; A. Lindblad, M. Nordenskjöld y B. Werelius (1978). Increased frequency of sister chromatid exchanges in cigarette smokers.

Hereditas 88: 147-149.

- Lambert, B.; M. Sten y D. Hellgren (1984). Removal and persistence of SCE-inducing damage in human lymphocytes in vitro. Sister Chromatid Exchanges. R.R. Tice y A. Hollaender (Eds) Plenum Publishing Corporation pag 647-662.
- Langenbach, R.; H.J. Freed y E. Huberman (1978). Liver cell-mediated mutagenesis of mammalian cells by liver carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2864-2867.
- Larramendy, M.L.; N.C. Popescu y J.A. Di Paolo (1981). Induction by inorganic metal salts of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in human and syrian hamster cell strains. Environ Mutagen 3: 597-606.
- Lasne, C.; Z.W. Gu, W. Venegas y I. Chouroulinkov (1984). The in vitro micronucleus assay for detection of cytogenetic effects induced by mutagen-carcinogens: comparison with the in vitro sister-chromatid exchange assay. Mutation Res. 130: 273-282.
- Latt, S.A. (1973). Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 3395-3399.
- Latt, S.A. (1974, a). Localization of sister chromatid exchange in human chromosomes. Science 185: 74-76.
- Latt, S.A. (1974, b). Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: Detection by fluorescence and induction by mitomycin C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 3162-3166.
- Léonard, A.; Gh. Deknudt, E.D. Léonard y G. Decat (1984). Chromosome aberrations in employees from fossil-fueled and nuclear power plants. Mutation Res. 138: 205-212.

- Lijinsky, W. y R.K. Elespuru (1976). Mutagenicity and carcinogenicity of N-nitroso derivatives of carbamate insecticides. IARC Sci. Publ. 14: 425-428.
- Lijinsky, W. y D. Schmeahl (1978). Carcinogenicity of N-nitroso derivatives of N-methylcarbamate insecticides in rats. Ecotoxicol environ Saf. 2: 413-429.
- Lindblad, A. y B. Lambert (1981). Relation between sister chromatid exchange, cell proliferation and proportion of B and T cells in human lymphocyte cultures. Hum. Genet. 57: 31-34.
- Linnainmaa, K. (1983). Sister chromatid exchanges among workers occupationally exposed to phenoxy acid herbicides 2,4-D and MCPA, Teratogen, Carcinogen and Mutagen 3: 269-279.
- Lundgren, K. y G.W. Lucier (1985). Differential enhancement of sister chromatid exchange frequencies by  $\alpha$ -naphthoflavone in cultured lymphocytes from smokers and non-smokers. Mutation Res. 143: 131-135.
- Madle, S. (1981). Evaluation of experimental parameters in an S9/human leukocyte SCE test with cyclophosphamide. Mutation Res. 85: 347-356.
- Madle, S. y G. Obe (1977). In vitro testing of and indirect mutagen (cyclophosphamide) with human leukocyte cultures: activation with liver microsomes and use of a dialysis bag. Mutation Res. 56: 101-104.
- Maier, P.; B. Weibel y G. Zbinden (1983). The mutagenic activity of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) in vivo in rats. Environ Mutagen 5: 695-703.
- Mäki-Paakkanen, J.; M. Sorsa y H. Vainio (1981). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in lead-exposed workers. Hereditas 94: 269-275.

- Mäki-Paakkanen, J.; M. Sorsa y H. Vainio (1984). Sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in rubber workers. *Teratogen, Carcinogen y Mutagen*. 4: 189-200.
- Margolin, B.H. y M.D. Shelby (1985). Sister chromatid exchanges: A reexamination of the evidence for sex and race differences in humans. *Environ Mutagen*. 7: 63-72.
- Marshall, E. (1985). The rise and decline of Temik. *Science* 229: 1369-1371.
- Matos, E.L. y Lustig, E. S. de (1978). Rol de los carcinógenos químicos en la contaminación ambiental. *Medicina* 38: 200-203.
- Matsuoka, A.; M. Hayashi y M. Ishidate (1979). Chromosome aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro. *Mutation Res*. 66: 277-290.
- Maugh, T.H. (1982). Biological markers for chemical exposure. *Science* 215: 643-647.
- Mc Cann, J.; E. Choi, E. Yamasaki y E. Ames (1975). Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 5135-5139.
- Mc Carroll, N.E.; C.E. Piper y B.H. Keech (1981). An E. coli microsuspension assay for the detection of DNA damage induced by direct-acting agents and promutagens. *Environ Mutagen* 3: 429-444.
- Mc Fee, A.F. y M.N. Sherrill (1981). Mitotic response and sister chromatid exchange in lymphocytes cultured in sera from different sources. *Experientia* 37: 27-28.
- Mc Nally, A. y M. Ray (1983). Sister chromatid exchange response of various human and mouse tissues to MMC and BrdU. *Cytobios* 38: 159-166.

- Mehnert, K.; R. Düring, W. Vogel y G. Speit (1984). Differences in the induction of SCEs between human whole blood cultures and purified lymphocyte cultures and the effect of an S9 mix. *Mutation Res.* 130: 403-410.
- Meretoja, T.; H. Vainio, M. Sorsa y H. Härkönen (1977). Occupational styrene exposure and chromosomal aberrations. *Mutation Res.* 56: 193-197.
- Miller, E.C. (1978). Some current perspectives on chemical carcinogenesis in human and experimental animals: Presidential address. *Cancer Res.* 38: 1479-1496.
- Miller, K. (1986). Sister chromatid exchange in highly purified human B and T lymphocytes. *Hum. Genet.* 72: 160-163.
- Miller, E.C. y J.A. Miller (1981). Mechanisms of chemical carcinogenesis *Cancer* 47: 1055-1064.
- Mitelman, F.; S. Fregert, K. Hedner, K. Hillbertz-Nilsson (1980). Occupational exposure to epoxy resins has no cytogenetic effect. *Mutation Res* 77:345-348.
- Moorhead, P.S.; P.C. Nowell, W. J. Mellman, D.M. Battips y D.A. Hungerford (1960). Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20:613-616.
- Morgan, W.F. y P.E. Crossen (1977). The incidence of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Mutation Res.* 42: 305-312.
- Morgan, W.F. y P.E. Crossen (1981). Factors influencing sister chromatid exchange in cultured human lymphocytes. *Mutation Res.* 81: 395-402.
- Morgan, W.F. y P.E. Crossen (1982). A comparison of induced sister chromatid exchange levels in Chinese hamster ovary cells and cultured human lymphocytes. *Environ Mutagen* 4: 65-71.

- Morimoto, K. (1984). Proliferative kinetics and chemical induced sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Sister Chromatid Exchanges*. R.R. Tice y A. Hollaender. Plenum Publishing Corporation. pag. 677-693.
- Morimoto, K. y A. Koizumi (1983). Trihalomethanes induce sister chromatid exchanges in human lymphocytes in vitro and mouse bone marrow cells in vivo. *Environm. Res.* 32: 72-79.
- Morimoto, K.; K. Miura, T. Kaneko, K. Iijima, M. Sato y A Koizumi (1984). Human health situation and chromosome alterations: Sister chromatid exchange frequency in lymphocytes from passive smokers and patients with hereditary diseases. *Basic Life Sci.* 29 PtB: 801-811.
- Morimoto, K.; M. Sato-Mizuno y A. Koizumi (1986). Adaptation-like response to the chemical induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes. *Hum. Genet.* 73: 81-85.
- Morimoto, K. y S. Wolff (1980). Increase of sister chromatid exchanges and perturbations of cell division kinetics in human lymphocytes by benzene metabolites. *Cancer Res.* 40: 1189-1193.
- Morris, S. M.; D.T. Beranek y R.H. Heflich (1983). The relationship between sister chromatid exchange induction and the formation of specific methylated DNA adducts in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Res.* 121: 261-266.
- Morris, S.M.; R.H. Heflich, D.T. Beranek y F.A. Beland (1984). Relationships between specific DNA adducts, mutation, cell survival, and SCE formation. *Basic Life Sci.* 29: 353-360.
- Morris, S.M.; R. H. Heflich, D.T. Beranek y R.L. Kodell (1982). Alkylation-induced sister-chromatid exchanges correlate with reduced cell survival, not mutations. *Mutation Res.* 105: 163-168.



- Morris, S.M.; R.H. Heflich y R. L. Kodell (1985). Correlation of sister chromatid exchange frequency with mutation induction and cell survival in Chinese hamster ovary cells exposed to N-oxidized arylamines. *Cancer Res.* 45: 5461-5465.
- Natarajan, A.T. y G. Obe (1980). Screening of human populations for mutations induced by environmental pollutants: Use of human lymphocyte system. *Ecotoxicol & Environ Safety* 4: 468-481.
- Natarajan, A.T.; J.W.I.M. Simons, E.W. Vogel y A.A. van Zeeland (1984). Relationship between cell killing, chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges and point mutations induced by monofunctional alkylating agents in Chinese hamster cells. A correlation with different ethylation products in DNA. *Mutation Res* 128: 31-40.
- Natarajan, A.T.; A.D. Tates, P.P.W. van Buul, M. Meijers y N. de Vogel (1976). Cytogenetic effects of mutagens/carcinogens after activation in a microsomal system in vitro. I. Induction of chromosome aberrations and sister chromatid exchanges by diethylnitrosamine (DEN) and dimethylnitrosamine (DMN) in CHO cells in the presence of rat-liver microsomes. *Mutation Res.* 37: 83-90.
- Nayak, B.N.; C. Héroux-Metcalf y C.G. Rogers (1985). In vitro short-term testing systems as prescreens for potential carcinogens: Simultaneous detection of sister chromatid exchanges and mutation response in a cell-mediated assay with V79 cells. *Cancer Letters* 27: 71-79.
- Nicholas, A.H.; M. Vienne y H. Van Den Berghe (1979). Induction of sister chromatid exchanges in cultured human cells by an organophosphorous insecticide: Malathion. *Mutation Res.* 67: 167-172.
- Nishio, A. y E.M. Uyeki (1981). Induction of sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells by organophosphate insecticides and

- their oxygen analogs. *J. Toxicol Environ. Health* 8: 939-946.
- Norderson, I.; L. Beckman, S. Lidén y N. Stjernberg (1984) Chromosomal aberrations and cancer risk. *Hum. Hered.* 34: 76-81.
  - Norppa, H. y F. Tursi (1984). Erythrocyte-mediated metabolic activation detected by SCE. Sister Chromatid Exchanges. R.R. Tice y A. Hollaender(Eds) Plenum Publishing Corporation. pag. 547-559.
  - Norppa, H.; F. Tursi, P. Pfaffli, J. Mäki-Paakkanen y H. Jarventaus (1985). Chromosome damage induced by vinyl acetate through in vitro formation of acetaldehyde in human lymphocytes and Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 45: 4816-4821.
  - Norppa, H.; H. Vainio y M. Sorsa (1983). Metabolic activation of styrene by erythrocytes detected as increased sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Cancer Res.* 43: 3579-3582.
  - Okinaka, R.T.; B.J. Barnhart y D.J. Chen (1981). Comparison between sister-chromatid exchange and mutagenicity following exogenous metabolic activation of promutagens. *Mutation Res.* 91: 57-61.
  - Olivieri, G.; J. Bodycote y S. Wolff (1984). Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* 223: 594-597.
  - Oyama, V. y H. Eagle (1956). Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol reagent (Folin-Ciocalteu). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 91: 305-307.
  - Painter, R.B. (1980). A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutation Res.* 70: 337-341.
  - Palitti, F. y A. Becchetti (1977). Effect of caffeine on sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations induced by mutagens in Chinese hamster cells. *Mutation Res.* 45: 157-159.

- Parkes, D.J.; D. Scott y A. Stewart (1985). Changes in spontaneous SCE frequencies as a function of sampling time in lymphocytes from normal donors and cancer patients. *Mutation Res.* 147: 113-122.
- Paschin, Y. y L.M. Bakhitova (1985). Mutagenic effects of Thiram in mammalian somatic cells. *Food Chem. Toxicol.* 23: 373-375.
- Perry, P. y H. J. Evans (1975). Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 258: 121-125.
- Perry, P. y S. Wolff (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251: 156-158.
- Picciano, D. (1979). Cytogenetic investigation of occupational exposure to epichlorohydrin. *Mutation Res.* 66: 169-173.
- Pilinskaia, M.A. (1985). Use of a culture of human peripheral blood lymphocytes for determining the mutagenic activity of urine. *Tsitol. Genet.* 19: 183-187.
- Pohl-Rüling, J. y P. Fischer (1979). The dose-effect relationship of chromosome aberrations to  $\alpha$  and  $\gamma$  irradiation in a population subjected to an increased burden of natural radioactivity. *Radiat. Res.* 80: 61-81.
- Poiley, J.A. y R. Raineri (1984). Species specificity affects the choice of S9 preparations for use in the hamster embryo cell transformation system. *In Vitro* 20: 602-606.
- Poirier, M.C. (1984). The use of carcinogen-DNA adduct antisera for quantitation and localization of genomic damage in animal models and the human population. *Environ. Mutagen* 6:879-887.
- Popescu, N.C.; S.C. Amsbaugh, y J.A. Di Paolo (1983). Human and rodent transformed cells are more sensitive to in vitro induction of SCE by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) than normal cells. *Hum. Genet.*

63: 53-57.

- Popescu, N.C.; S.C. Amsbaugh y J.A. Di Paolo (1985). Persistence of sister chromatid exchanges and "in vitro" morphological transformation of Syrian hamster fetal cells by chemical and physical carcinogens. *Carcinogenesis* 6: 1627-1630.
- Popescu, N.C. y J.A. Di Paolo (1984). Quantitative comparison between SCE and transformation frequencies induced by chemical carcinogens in Syrian hamster cells. *Sister Chromatid Exchanges*. R.R. Tice y A. Hollaender (Eds.) Plenum Publishing Corporation pag. 397-407.
- Popescu, N.C.; D. Turnbull y J. A. Di Paolo (1977). Sister chromatid exchange and chromosome aberration analysis with the use of several carcinogens and noncarcinogens: Brief communication. *J. Natl. Cancer Inst.* 59: 289-292.
- Preston, R. J. (1985). Use of cytogenetic endpoints in human lymphocytes as indicators of exposure to genotoxicants. *New Approaches in Toxicity Testing and their Application in Human Risk Assessment*. A.P. Li. (Eds) Raven Press, New York. pag. 41-50.
- Purchase, I.F.H.; E. Longstaff, J. Ashby, J.A. Styles, D. Anderson, P.A. Lefevre y F.R. Westwood (1978). An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens. *Br. J. Cancer* 37: 873-959.
- Putman, D.L.; R.M. David, J.M. Melhorn, D.R. Dansie, C.J. Stone y C.J. Henry (1985). Dose-responsive increase in sister-chromatid exchanges in bone-marrow cells of mice exposed nose-only to whole cigarette smoke. *Mutation Res.* 156: 181-186.
- Qin, S. y C.C. Huang (1984). A new method for sister-chromatid exchange studies in vivo, a single injection of BrdU in melted agar. *Mutation Res.* 141: 189-193.

- Rogers, C.G.; B.N. Nayak y C. Héroux-Metcalf (1985). Lack of induction of sister chromatid exchanges and of mutation to 6-thioguanine resistance in V79 cells by butylated hydroxyanisole with and without activation by rat or hamster hepatocytes. *Cancer Letters* 27: 61-69.
- Rom, W.N.; G.K. Livingston, K.R. Casey, S.D. Wood, M.J. Egger, G.L. Chiu y L. Jerominski (1983). Sister chromatid exchange frequency in asbestos workers. *J. Natl. Cancer Inst.* 70: 45-48.
- Sarto, F.; I. Cominato, A.M. Pinton, P.G. Brovedani, E. Merler, M. Peruzzi, V. Bianchi y A. G. Levis (1984). A cytogenetic study on workers exposed to low concentrations of benzene. *Carcinogenesis* 5: 827-832.
- Schmid, E.; M. Bauchinger y R. Hauf (1985). Chromosome changes with time in lymphocytes after occupational exposure to toluene. *Mutation Res.* 142: 37-39.
- Schmidt, M.A. y W. G. Sanger (1981). Sister chromatid exchange in aged human lymphocytes. A brief note. *Mec. Age Dev.* 16: 67-70.
- Schneider, E.L.; Y. Nakanishi, J. Lewis y H. Sternberg (1981). Simultaneous examination of sister chromatid exchanges and cell replication kinetics in tumor and normal cells in vivo. *Cancer Res.* 41: 4973-4975.
- Seiler, J.P. (1977). Nitrosation in vitro and in vivo by sodium nitrite, and mutagenicity of nitrogenous pesticides. *Mutation Res.* 48: 225-236.
- Sharma, T. y B.C. Das (1981). Culture media and species-related variations in the requirement of 5-BrUdR for differential sister-chromatid staining. *Mutation Res.* 81: 357-364.
- Shibuya, T. y T. Murota (1984). Mouse spot tests with dimethylbenz (a) anthracene with and without phenobarbital pretreatment. *Mutation Res.* 141: 105-108.

- Shiraishi, Y.; J. Minowada y A.A. Sandberg (1979). Differential response of sister chromatid exchange and chromosome aberrations to mitomycin C of normal and abnormal human lymphocytic cell lines. *Oncology* 36: 76-83.
- Shuler, C.F. y S.A. Latt (1979). Sister chromatid exchange induction resulting from systemic, topical and systemic-topical presentations of carcinogens. *Cancer Res.* 39: 2510-2514.
- Sinha, A.K.; B.B. Gollapudi, V.A. Linscombe, R.J. Bruce y M.L. Mc. Clintock (1985). Analyses for in vitro growth conditions, cytokinetics, and sister chromatid exchanges in lymphocytes cultured from the Sprague-Dawley rat. *In vitro cel & Develop.* 21: 583-587.
- Sinha, A.K.; V.A. Linscombe, B.B. Gollapudi, G.C. Jersey y C.N. Park (1985). Analysis of sister chromatid exchanges in lymphocytes cultured from 71 healthy men. *Cell Biol. Toxicol.* 1: 333-342.
- Sinha, A.K.; V.A. Linscombe, B.B. Gollapudi, G.C. Jersey, R.E. Flake y C.N. Park (1986). Cytogenetic variability of lymphocytes from phenotypically normal men: influence of age, smoking, season, and sample storage. *J. Toxicol and Environ Health* 17: 327-345.
- Sinha, A.K.; V.A. Linscombe, B.B. Gollapudi, M. Mc. Clintock, R.E. Flake y K. M. Bodner (1984). The incidence of spontaneous cytogenetic aberrations in lymphocytes cultured from normal humans for 48 and 72 hs. *Can. J. Genet. Cytol.* 26: 528-531.
- Snope, A.J. y J. M. Rary (1979). Cell-cycle duration and sister chromatid exchange frequency in cultured human lymphocytes. *Mutation Res.* 63: 345-349.
- Sobti, R.C., A. Krishan y C.D. Pfaffenberger (1982). Cytokinetic and cytogenetic effects of some agriculture chemicals on human lymphoid cells in vitro organophosphates. *Mutation Res.* 102: 89-102.

- Soper, K.A.; P.D. Stolley, S.M. Galloway, J.G. Smith, W.W. Nichols y S.R. Wolman (1984). Sister chromatid exchange (SCE) report on control subjects in a study of occupationally exposed workers. *Mutation Res.* 129: 77-88.
- Sorsa, M. (1984). Chromosomal aberrations as a monitoring method for possible genotoxic risks. *Biological Monitoring and Surveillance of Workers Exposed to Chemicals*. A. Aitio, V. R uhimaki y H. Vainio (Eds). Washington, Hemisphere Publishing Corporation pag. 357-370.
- Sorsa, M.; K. Falck, H. Norppa y H. Vainio (1981). Monitoring genotoxicity in the occupational environment. *Scand J work environ health* 7: 61-65.
- Speit, G.; R. D uring y K. Mehnert (1986). Variation in the frequency of sister chromatid exchanges in repeated human lymphocytes cultures. *Hum. Genet.* 72: 179-181.
- Stetka, D.G. y S. Wolff (1976,a). Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens. I. In vivo test for compounds requiring metabolic activation. *Mutation Res.* 41: 333-342.
- Stetka, D.G. y S. Wolff (1976,b). Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens. II. In vitro test for compounds requiring metabolic activation. *Mutation Res.* 41: 343-350.
- Stich, H.F.; R.H.C. San y M.P. Rosin (1983). Adaptation of the DNA repair and micronucleus tests to human cell suspensions and exfoliated cells. *Cellular Systems for Toxicity Testing*. Annals of the New York Academy of Sciences. 407: 93-105.
- Stocco, R. de C.; W. Becak, R. Gaeta y M.N. Rabello-Gay (1982). Cytogenetic study of workers exposed to methyl-parathion. *Mutation Res.* 103: 71-76.

- Stolley, P.D.; K.A. Soper, S.M. Galloway, W.W. Nichols, S.A. Norman y S.R. Wolman (1984). Sister chromatid exchanges in association with occupational exposure to ethylene oxide. *Mutation Res.* 129: 89-102.
- Stucker, I.; A. Hirsch, T. Doloy, I. Bastie-Sigeac y D. Hemon (1986). Urine mutagenicity, chromosomal abnormalities and sister chromatid exchanges in lymphocytes of nurses handling cytostatic drugs. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 57: 195-205.
- Sugujama, T.; N. Ueda, S. Maeda, N. Shiraishi, K. Goto-Mimura, S. Murao y S.C. Chattopadhyay (1981). Chemical carcinogenesis in the rat: common mode of action of carcinogens at the chromosome level. *J. Nat. Cancer Inst.* 67: 831-839.
- Suzuki, H. y T.H. Yosida (1983). Frequency of sister chromatid exchanges on the amount of 5-bromodeoxyuridine incorporated into parental DNA. *Mutation Res.* 111: 277-282.
- Swenson, D.H.; P.R. Harbach y R.J. Trzos (1980). The relationship between alkylation of specific DNA bases and induction of sister chromatid exchange. *Carcinogenesis* 1: 931-936.
- Taylor, J.H. (1958). Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes. *Genetics* 43: 515-529.
- Taylor, J.H.; P.S. Woods y W.L. Hughes (1957). The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 43: 122-128.
- Tice, R.R.; D.L. Costa y R.T. Drew (1980). Cytogenetic effects of inhaled benzene in murine bone marrow: induction of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and cellular proliferation inhibition in DBA/2 mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2148-2152.



- Tice. R.R.; B. Lambert, K. Morimoto y A. Hollaender (1984). A review of the International Symposium of Sister Chromatid Exchanges: Twenty-five years of experimental research. *Environ Mutagen* 6: 737-752.
- Tice, R.; E.L. Schneider y J.M. Rary (1976). The utilization of bromodeoxy-uridine incorporation into DNA for the analysis of cellular kinetics. *Exp. Cell Res.* 102: 232-236.
- Tsongas, T.A. (1984). The relevance of sister chromatid exchange studies to public health: prevention and intervention. Introduction to a general discussion on the interpretation of sister chromatid exchange data. *Sister Chromatid Exchanges*. R.R.Tice y A. Hollaender (Eds) Plenum Publishing Corporation. pág. 987-990.
- Tu, A.S.; P.A. Breen y A. Sivak (1984). Comparison of primary hepatocytes and S9 metabolic activation systems for the C3H-10T1/2 cell transformation assay. *Carcinogenesis* 5: 1431-1436.
- Tucker, J.D. y T. Ong (1984). Induction of sister-chromatid exchanges and chromosome aberrations in human peripheral lymphocytes by 2,4,7-trinitro-9-fluorenone. *Mutation Res.* 138: 181-184.
- Vainio, H.; K. Falck, J. Mäki-Paakkanen y M. Sorsa (1982). Possibilities for identifying genotoxic risks in the rubber industry: Use of the urinary mutagenicity assay and sister chromatid exchange. *IARC Sci. Publ.* 32: 571-577.
- Vainio, H. y M. Sorsa (1983). Application of cytogenetic methods for biological monitoring. *Ann Rev. Public. Health* 4:403-407.
- Vainio, H.; M. Sorsa y K. Hemminki (1983). Biological monitoring in surveillance of exposure to genotoxicants. *Am. J. Ind. Med.* 4: 87-103.
- Van Bao, T.; I. Szabó, P. Ruzicska y A. Czeizel (1974). Chromosome aberrations in patients suffering acute organic phosphate insecticide intoxication. *Humangenetik* 24: 33-57.

- Van Sittert, N.J. y G. de Jong (1985). Biomonitoring of exposure to potential mutagens and carcinogens in industrial populations. *Fd. Chem. Toxic.* 23: 23-31.
- Waalkens, D.H.; H.F. Joosten, R.D. Taalman, J.M. Scheres, T.D. Yih y A. Hoekstra (1981). Sister chromatid exchanges induced in vitro by cyclophosphamide without exogenous metabolic activation in lymphocytes from three mammalian species. *Toxicol. Lett.* 7: 229-232.
- Waksvik, H.; M. Boysen y A.C. Hogetveit (1984). Increased incidence of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of retired Nickel workers. *Carcinogenesis* 5: 1525-1527.
- White, A.D. y L. C. Hesketh (1980). A method utilizing human lymphocytes with in vitro metabolic activation for assessing chemical mutagenicity by SCE analysis. *Mutation Res.* 69: 283-291.
- Wilmer, J.L.; A.D. Kligerman y G.L. Erexson (1981). Sister chromatid exchange induction and cell cycle inhibition by aniline and its metabolites in human fibroblasts. *Environ Mutagen.* 3: 627-638.
- Winckler, K.; G. Obe, S. Madle y H. Nau (1984). Mutagenic activities of CP (NSC-26271) and its main metabolites in Salmonella typhimurium, human peripheral lymphocytes and CHO cells. *Mutation Res.* 129: 47-55.
- Wojciechowski, J.P.; P. Kaur y P.S. Sabharwal (1981). Comparison of metabolic systems required to activate pro-mutagens/carcinogens in vitro for sister-chromatid exchange studies. *Mutation Res.* 88: 89-97.
- Wolff, S. (1977). The lesions that lead to sister chromatid exchanges are different from those that lead to chromosome aberrations. *Mutation Res.* 46: 164.
- Wolff, S. (1979). The utility of sister chromatid exchange. *Mutation Res.* 64: 53-56.

- Wolff, S. (1981). Sister chromatid exchanges and mutagenic carcinogens  
Gann Monograph on Cancer Research 27: 109-124.
- Wolff, S. (1983). Problems and prospects in the utilization of  
cytogenetics to estimate exposure at toxic chemical waste dumps.  
Environ Health Perspect 48: 25-27.
- Wolff, S. (1984). Use of sister chromatid exchanges (SCEs) to determine  
possible genetic predisposition in the response to chemical exposure.  
Genetic Variability in Responses to Chemical Exposure. Cold Spring  
Harbor Laboratory 16: 333-341.
- Woo, Y.T. (1983). Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of  
carbarnates, thiocarbarnates and related compounds: an overview of  
structure-activity relationships and environmental concerns. J.  
Environ Sci. Health CI (1): 97-133.
- Wyrobek, A.J.; L.A. Gordon, J.G. Burkhardt, M.W. Francis, R.W. Kapp, G.  
Letz, H.V. Malling, J.C. Topham y M.D. Whorton (1983). An evaluation  
of human sperm as indicators of chemically induced alterations of  
spermatogenic function. A report of the U.S. Environmental Protection  
Agency Gene-Tox Program. Mutation Res. 115: 73-148.
- Yamasaki, E. y B. Ames (1977). Concentration of mutagens from urine by  
adsorption with the nonpolar resin XAD-2: Cigarette smokers have  
mutagenic urine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 3555-3559.
- Yoder, J.; M. Watson y W.W. Benson (1973). Lymphocyte chromosome  
analysis of agricultural workers during extensive occupational exposure  
to pesticides. Mutation Res. 21: 335-340.
- Yu, Y.D.; Y.C. Jia, C.F. Hong, Y.H. Yang, Y.H. Luo y J.Y. Le (1984).  
Studies on the mutagenicity and teratogenicity of methylparathion.  
Environ Sci. Res. 31: 842-843.

- Zaki, M.H.; D. Moran y D. Harris (1982). Pesticides in ground-water:  
The Aldicarb Story in Suffolk County, N.Y. Amer. J. Public. Health  
72: 1391-1395.