



Universidad Nacional Autónoma de México

**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

**ESTANDARIZACION DE UN METODO DE
ACTIVACION METABOLICA IN VITRO
PARA PRUEBAS DE MUTAGENESIS
EN LINFOCITOS HUMANOS**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

PRESENTA

GLORIA GARCIA ARMENDARIZ

MEXICO, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

I	INTRODUCCION	1
II	EL LINFOCITO HUMANO EN LOS ESTUDIOS DE MUTAGENESIS	3
III	METABOLISMO	6
IV	METABOLISMO <u>IN VITRO</u>	8
V	USO DE TESTIGOS	12
VI	CICLOFOSFAMIDA	15
VII	MATERIALES Y METODOS	22
VIII	RESULTADOS	27
IX	DISCUSION	31
X	BIBLIOGRAFIA	38

ABREVIATURAS

V79-E - Línea celular de fibroblasto de hamster chino
A(T₁)Cl-3 " " " pseudodiplode de hamster sirio
C H O - " " " ovario de hamster chino
C H C - " " " hamster chino
WI-38 - " " " fibroblasto humano
G-6-P - Glucosa -6- Fosfato
NADP - Nicotin-Adenin-Difosfato

INTRODUCCION

Durante las últimas décadas la investigación en genética se ha adentrado en el conocimiento de proceso de mutación, la naturaleza molecular de las alteraciones genéticas, las manifestaciones patológicas de las mutaciones en el hombre y la identificación de agentes capaces de inducir mutaciones en pruebas de laboratorio.

La exposición del hombre a múltiples sustancias químicas es causa de preocupación por el riesgo potencial de que algunas de estas sustancias interactúen con el ADN de células germinales, o de células somáticas, produciendo mutaciones que, en el primer caso incrementen la frecuencia de padecimientos de origen genético y en el segundo influyan en la proporción de ciertos tipos de cáncer.

La existencia de alrededor de 70,000 compuestos químicos a los que podemos estar expuestos, hace evidente la necesidad de contar con métodos sencillos que permitan detectar a los agentes capaces de producir mutaciones.

Se han desarrollado diferentes sistemas de prueba (Tabla I) que utilizan desde el ADN aislado, hasta mamíferos completos para detectar la capacidad de los agentes químicos de inducir daño genético.

TABLA I

CARACTERISTICAS DE LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS
PARA IDENTIFICAR MUTÁGENOS (11)

SISTEMA	ALTERACION IDENTIFICADA	DURACION APROX. DE UNA PRUEBA	FACTORES LIMITANTES
ADN	CAMBIOS DE LA MOLECULA	2 a 3 DIAS	COSTO DEL EQUIPO
VIRUS	MUTACIONES GENICAS INDUCCION DE PROFAGOS	2 a 3 DIAS	MINIMOS
BACTERIAS	MUTACIONES GENICAS	3 a 5 DIAS	MINIMOS
HONGOS	MUTACIONES GENICAS SEGREGACION CROMOSOMICA DEFECTUOSA	1 a 3 SEM.	MINIMOS
ENSAYO VIA HOSPEDERO BACTERIAS, HONGOS Y CULTIVO DE CELULAS DE MAMIFERO	LAS CITADAS EN CADA SISTEMA	1 a 5 SEM.	REQUERIMIENTO DE BIOTERIO
PLANTAS	MUTACIONES GENICAS, REA RREGLOS CROMOSOMICOS, NUMERICOS Y ESTRUCTURA- LES	1 a 5 SEM.	MINIMOS
INSECTOS	MUTACIONES GENICAS, REA RREGLOS CROMOSOMICOS, NUMERICOS Y ESTRUCTURA- LES	2 a 7 SEM.	MINIMOS
CULTIVOS DE CELULAS DE MAMIFERO	MUTACIONES GENICAS, REA RREGLOS CROMOSOMICOS, NUMERICOS Y ESTRUCTURA- LES	2 a 5 SEM.	COSTO DE MATERIAL Y DEL EQUI PO, USO DE TECNICAS LABORA- TIVAS (MUTACIONES GENICAS), IN TERPRETACION CITOGENETICA
MAMIFEROS	MUTACIONES GENICAS, REA RREGLOS CROMOSOMICOS, NUMERICOS Y ESTRUCTURA- LES TRANSMISION DE MUTACIO- NES A LOS DESCENDIENTES	2 a 7 MESES	COSTO DE LA INVESTIGACION EN ALGUNAS PRUEBAS REQUERIMIE- NTO DE BIOTERIO
HUMANOS	C REARREGLOS E SOMATICAS CROMOSOMICOS L NUMERICOS Y U ESTRUCTURALES L GERMINALES CROMOSOMA Y A EN EXCESO S TRANSMISION DE MUTACIONES A LOS DESCEN- DIENTES	6 SEM. 1 a 2 DIAS	CONTROL DE OTRAS VARIABLES, OBTENCION DE DONADORES, PRO BLEMAS ETICOS NECESIDAD DE ESTUDIOS EPIDE MIOLÓGICAS

Las pruebas más sencillas y más económicas, son las que utilizan bacterias, levaduras, hongos, insectos y los cultivos de células de mamíferos. Estos últimos, y en especial los linfocitos humanos, se encuentran entre los sistemas de prueba para la detección de mutágenos, de mayor valor para la evaluación de riesgos.

Uno de los problemas que presentan las pruebas in vitro, que limitan la extrapolación de los datos a situaciones in vivo, es que en su mayoría no llevan a cabo las transformaciones metabólicas de los compuestos que naturalmente ocurren in vivo. Se sabe en efecto que, existen sustancias que son inactivas in vitro y que tienen un efecto positivo in vivo, ésto se debe a que estas sustancias son activadas metabólicamente, convirtiéndose en otros compuestos que son los responsables de los efectos observados in vivo. Por el contrario, existen otros compuestos que producen resultados positivos in vitro aún en dosis pequeñas y que no presentan actividad in vivo.

Se han propuesto diferentes métodos con la finalidad de incorporar la actividad metabólica a los cultivos de linfocitos, como son: los cultivos de células embrionarias irradiadas o con cultivos primarios de células hepáticas (2). Recientemente se ha propuesto el uso de enzimas de función mixta del retículo endoplásmico, obtenidas de la fracción microsomal resultante de la centrifugación de homogenados hepáticos. Este método fue reportado en 1971 tanto por Malling (42) como por Slater y col (59) quienes las utilizaron en cultivos de Salmonella typhimurium y Escherichia coli

Tabla III Efecto de la Ciclofosfamida en linfocitos Humanos con Diferentes Sistemas de Activación Metabólica

ACTIVACION METABOLICA	RESPUESTAS			REFERENCIAS
	Aberraciones	I.C.H.	Proliferación Celular	
Cortes de Hígado	+			30
Hidroxilación no Enzimática	+			39
Perfusión	+			40
"		+		1
"59"	+			38
"		+		70
"		+		32
"		+		18
"		+	+	41
"	+			54
"		+		64

respectivamente

Ames y col. en 1973 (4) acoplaron el uso de las enzimas de función mixta al sistema de Salmonella, nombrando a la fracción metabolizante fracción microsomal "S9", por ser recuperada en el sobrenadante que se obtiene al centrifugar a 9,000 g un homogenado de células de hígado de rata, inducidas con Aroclor 1254.

La fracción microsomal ha sido ampliamente utilizada en los estudios realizados en células en cultivo (Tabla II). En 1976 Bimboes y Greim (10) reportaron el uso de la mezcla "S9" en el cultivo de linfocitos, en los que se observó que ejercía efectos citotóxicos. Por ello se han planteado diversas estrategias tendientes a disminuir la citotoxicidad de la mezcla "S9" como son: la preincubación del compuesto con la mezcla "S9" (54) y el uso de bolsas de diálisis para contener la mezcla "S9" y el compuesto (38). Pocos grupos han utilizado éste sistema y algunos consideran que es poco práctico (51) y que la concentración es crítica para cada compuesto (36).

EL LINFOCITO HUMANO EN LOS ESTUDIOS DE MUTAGENESIS

El cultivo de linfocitos humanos como sistemas de prueba para evaluar la actividad mutagénica de sustancias químicas ha sido ampliamente utilizado (35,51,60), se ha mostrado que es un sistema adecuado para detectar aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas (I.C.H.) (22,50,57). Los estudios realizados en los últimos años por Albertini y col.

(3), indican que pronto podrá ser utilizado en la evaluación de mutaciones génicas. Además en el cultivo de linfocitos pueden también determinarse los efectos de las sustancias sobre la proliferación celular (15, 41).

La gran aplicabilidad del cultivo de linfocitos como sistema de prueba en la detección de mutágenos se debe a:

1) La facilidad con la que se pueden obtener un gran número de células humanas, ya que cada mililitro de sangre contiene de 1 a 3×10^6 linfocitos .

2) La sencillez de la técnica de cultivo, fijación y obtención de mitosis para análisis.

3) El hecho de que el cultivo de linfocitos constituya un cultivo primario de células humanas, con características similares a las de las células normales del organismo. A diferencia de lo que ocurre con los cultivos de líneas celulares permanentes que adoptan comportamientos de células transformadas.

4) La mayor parte de la población de linfocitos en la sangre se encuentra sincronizada en G_0 y en cultivo entran en división ante el estímulo de agentes mitogénicos.

5) La frecuencia basal de aberraciones e intercambio de cromátidas

hermanas en los cultivos de linfocitos es relativamente baja.

6) Que ofrece la posibilidad de realizar estudios, en condiciones controladas , en los que se valora el efecto de las sustancias en función de la dosis y del tiempo de exposición.

7) Puede utilizarse para determinar aspectos cualitativos y cuantitativos de la interacción del mutágeno con la célula.

El cultivo de linfocitos para la detección de mutágenos presenta también algunas desventajas como son:

1) Una vez en cultivo, la población de linfocitos pierde su sincronización y las diferentes subpoblaciones de células pueden presentar una respuesta variable a los mutágenos.

2) Las células pueden ser dañadas y no dividirse, por lo que no podrán ser detectadas las anomalías genéticas.

3) A pesar de ser células humanas las condiciones en cultivo no reproducen fielmente las condiciones in vivo . Por ejemplo: el linfocito estimulado tiene una mayor capacidad de reparación (58) y la exposición a la sustancia in vitro es casi directa, mientras que in vivo los procesos farmacocinéticos como la absorción, distribución, metabolismo y eliminación, influyen en la biodisponibilidad de la sustancia (9).

METABOLISMO

Las sustancias que entran al organismo pueden ser eliminadas sin sufrir cambios o pueden sufrir transformaciones metabólicas denominadas biotransformaciones, que las convierten en compuestos que difieren de la sustancia original .

Las biotransformaciones de estos compuestos generalmente las realizan enzimas localizadas en el retículo endoplásmico hepático, que como ya se dijo por efecto de homogeneizar el tejido es roto en partículas llamadas microsomas . Estas biotransformaciones pueden realizarse en otros órganos como son el pulmón, la piel y el riñón. Asimismo, se han encontrado algunas enzimas con actividad metabolizante en el plasma sanguíneo y en la flora bacteriana del tracto gastrointestinal.

Las reacciones más comunes para la biotransformación de una sustancia son: oxidación, reducción, hidrólisis y conjugación (Tabla IV). Comúnmente una sustancia es objeto de varias reacciones secuenciales que involucran diversas transformaciones que terminan generalmente con una conjugación .

El cuerpo tiende a convertir los compuestos en metabolitos polares o hidrosolubles, los cuales poseen más grupos hidrofílicos funcionales y pierden así su capacidad para penetrar en la membrana celular.

Tabla IV.- REACCIONES QUIMICAS QUE SUFREN LAS SUSTANCIAS EN EL
ORGANISMO (25)

I.-OXIDACION

- a) Oxidación de la cadena lateral
- b) Hidroxilación aromática
- c) N-desalquilación
- d) O-desalquilación
- e) S-desmetilación
- f) Desaminación oxidativa
- g) Formación de sulfóxidos
- h) Desulfuración
- i) N-oxidación
- j) N-hidroxilación

II.-REDUCCION

- a) Azo-reducción
- b) Nitro-reducción
- c) Carbonil-reducción

III.- HIDROLISIS

- a) De-esterificación
- b) De-aminación

IV .- CONJUGACION

- a) Formación de glucorénidos
- b) Metilación
- c) Acilación
 - 1.-acetato
 - 2.-ácido amínico
- d) Acido mercaptúrico
- e) Conjugación de sulfatos
- f) Formación de hidrodicloro

De esta manera, se dificulta su reabsorción tubular y facilita su eliminación a través del riñón.

Las enzimas microsomales son capaces de metabolizar una gran cantidad de compuestos como son: hidrocarburos, insecticidas, ingredientes de jabones, desodorantes, tinturas aminoazo, aminas aromáticas, epóxidos, carbonatos, ciertas toxinas de hongos, antibióticos, esteroides sintéticos etc. Las enzimas microsomales pueden transformar un compuesto inerte en un intermediario reactivo o pueden detoxificar un compuesto reactivo.

Las sustancias que son convertidas en metabolitos químicamente activos pueden reaccionar con los componentes celulares incluyendo pequeñas moléculas de lípidos, proteínas, ADN y ARN y causar diversos efectos tóxicos como son: necrosis celular, reacciones hipersensitivas, fetotoxicidad, discracia celular, cáncer y mutagénesis (25).

METABOLISMO IN VITRO

La incorporación de enzimas matabólicas contenidas en la fracción "S9", a las pruebas in vitro, ha sido estudiada por diversos autores, quienes han señalado los factores que influyen en su actividad como son:

- a) Inductores enzimáticos
- b) Origen de la fracción "S9"
- c) Cantidad de "S9"
- d) Pre-incubación
- e) Cofactores

a) Inductores Enzimáticos- La inducción de la actividad de las enzimas microsomales es producida diferencialmente por hidrocarburos policíclicos, el fenobarbital y los bifenilos policlorinados. Se ha demostrado que los bifenilos policlorinados reúne propiedades inductoras del tipo tanto fenobarbital, como de hidrocarburos policlorinados . Dentro de los bifenilos policlorinados, el Aroclor 1254 es el que produce mayor estimulación enzimática en los animales tratados (4, 20).

En células de ovario de hamster se evaluó el efecto del 2-acetilaminofluoreno en presencia de tres tipos de homogenados hepáticos y se encontró una doble producción de I.C.H. en las células tratadas con homogenado proveniente de ratas tratadas con Aroclor 1254 mientras que las células tratadas con los homogenados proveniente de ratas no tratadas y de ratas tratadas con fenobarbital mostraron poco incremento en la producción de I.C.H. comparadas con las células sin tratamiento con homogenado, se

demonstró así la eficiencia de los bifenilos policlorinados como inductores enzimáticos . (63).

b) Origen de la Fracción "S9"- La biotransformación de una sustancia se puede llevar a cabo en la mayoría de los órganos, pero principalmente en el hígado, el pulmón y el riñón, es el hígado el sitio más activo (37).

Stich y Laisher (62) reportan que la capacidad de metabolizar aflatoxinas y esterigmatocistina in vitro por la fracción "S9" proveniente de hígado, riñón y pulmón de hamster, ratón, conejo, pato y trucha, es mayor en el hígado de todos los animales que en los otros órganos y es la de hígado de pato la de mayor actividad.

Weekes y Brusick (69) también encontraron diferencias cuantitativas en la capacidad metabolizadora de órganos y especies de ratones con los que trabajaron, inclusive reportan diferencias en la fracción "S9" proveniente de machos y hembras. Por otro lado Thust y Kneist (65), utilizando una fracción "S9" proveniente de hígado de humano y de rata, así como de riñón de rata para activar citrinina, encontraron que: la fracción "S9" de hígado de rata y de humano activaron de la misma manera la citrinina, mientras que el "S9" proveniente de riñón de rata fué tóxico para las células y tuvo una baja activación de la citrinina. La combinación del "S9" de riñón de rata, con el "S9" de hígado de rata, mostró resultados semejantes a los obtenidos con el "S9" de hígado. Por lo que los autores concluyen que los metabolitos producidos por "S9" de hígado y el "S9" de riñón son cualitativa y posible

mente cuantitativamente diferentes.

c) Cantidad de "S9"- Ames y col. (4) han reportado que la cantidad de "S9" que debe utilizarse depende de la especie de animal del que haya sido preparado, del pretratamiento usado para la inducción enzimática y de la concentración de cofactores en la mezcla "S9" .

La cantidad de "S9" también depende de la sustancia que requiera activación. Wolff y Takehisa (73), reportan que tanto la aflatoxina B₁ como el benzo-a-pireno, requieren de tan sólo un 2% de la fracción microsomal para ser activadas y producir un incremento de I.C.H. El uso de un 100% de la fracción no altera los resultados, en cambio el acetoxiacetilamino-fluoreno es inactivado por la fracción microsomal y a mayor concentración de ésta, mayor es la inactivación. White y Hesketh (71) trabajando con ciclofosfamida señalan que la utilización de la "S9" diluída en medio 1:1 es muy tóxica, mientras que la dilución 1:4 produce un incremento de I.C.H.; Csukas y col. (18) reportan, sin embargo, que conforme se diluye la mezcla "S9", se produce un decremento gradual en la inducción de I.C.H. por ciclofosfamida y vinil carbamato mientras que el uretano provoca un incremento gradual. Wojciechowski y col. (72) señalan que la dilución de la mezcla "S9" (1/200) reduce su toxicidad sin alterar el índice mitótico ni su capacidad metabolizante, mientras que la dilución de la mezcla "S9" (1/20) reduce el índice mitótico a la mitad en los testigos y sin embargo en los cultivos tratados con 3-metilcolantreno y 7-12 dimetilbenzo(a)antraceno y la fracción microsomal diluída (1/20) observan un incremento en el índice

mitótico el cual no pueden explicar.

d) Preincubación- Los estudios en sistemas bacterianos han mostrado que la preincubación de las sustancias con el "S9" en muchos casos incrementa su mutagenicidad. En cultivos de linfocitos, White y Hesketh (71) reportan que no hay diferencia en sus resultados cuando preincuban la mezcla, o al adicionarla directamente a los cultivos. Además señalan que la preincubación es más complicada, menos consistente e igualmente citotóxica.

e) Cofactores- La mezcla "S9" está constituida por la fracción "S9" NADP, MgCl y G-6-P. Los trabajos de Bimboes y Greim (10), Madle y Obe (38) y Czukas y col. (18), muestran que los preparados hepáticos sin cofactores son activadores débiles.

USO DE TESTIGOS

Como todas las pruebas toxicológicas, el sistema de prueba de linfocitos requiere del uso de diferentes tipos de testigos:

- a) Testigo negativo
- b) Testigo del vehículo o solvente
- c) Testigo histórico negativo
- d) Testigo positivo.

a) Testigo Negativo- Consiste en cultivos a los que no se adiciona ningún agente, ni vehículo. Los resultados que se obtienen definen la frecuencia basal, ya sea de aberraciones cromosómicas, de I.C.H. o de proliferación celular y representa un valor del cual partir para interpretar los datos que se obtienen con una sustancia a prueba. Se considera que su inclusión no es indispensable en cada una de las pruebas que se lleven a cabo, a condición de que se incluya el testigo con solvente. En pruebas en las que no se usa solvente si se requiere testigo negativo.

b) Testigo del vehículo o solvente- Se trata de cultivos a los que se expone al vehículo o solvente que se utiliza en la preparación y administración de la sustancia de prueba. Este testigo provee los datos basales con los cuales se van a comparar los datos obtenidos con la sustancia a prueba. Cualquier efecto del solvente ó vehículo se supone será corregido utilizando este tipo de testigo.

c) Testigo Histórico Negativo- Lo constituyen testigos previos utilizados en estudios similares. El testigo histórico es valioso para poner los datos dentro de una perspectiva, especialmente cuando el tamaño de la muestra para el testigo es relativamente pequeño. Este testigo permite compensar en el análisis de los datos, variaciones en los niveles basales debidos a cambios ambientales o movimientos ciclicos temporales.

El testigo histórico tiene un valor especial cuando se estandariza una prueba y nos informa de la variabilidad expontánea de I.C.H. y de aberraciones cromosómicas en las diferentes poblaciones de linfocitos con las que se trabaja bajo las condiciones de cada laboratorio.

d) Testigo Positivo- Consiste en la utilización de una sustancia que por experiencias previas se sabe produce un efecto genotóxico. No es considerado esencial en las pruebas de toxicidad en las que un testigo de solvente o vehículo ha sido incluido, sin embargo, este tipo de testigo es importante y permite:

- 1.- Verificar que el sistema de prueba funciona adecuadamente y responde a los agentes que previamente han mostrado efecto.
- 2.- Evaluar la capacidad del investigador para identificar y cuantificar los parámetros incluidos en la evaluación.
- 3.- Determinar la reproducibilidad del sistema en un período extendido del tiempo. Las variaciones temporales y significativas en la respues

ta a una concentración dada de un testigo conocido, pueden significar problemas con el sistema de prueba o respuestas cíclicas.

4.- Comparar la potencia de la sustancia en estudio a la del mutágeno conocido.

El testigo positivo se vuelve un requerimiento cuando se utilizan sistemas de activación metabólica como es la fracción "S9". El funcionamiento apropiado de estos sistemas de activación puede ser medido mediante el uso de un testigo positivo.

De hecho cuando se evalúan sustancias con y sin activación "S9" es necesario incluir solamente el testigo positivo de activación para satisfacer todas las funciones de los testigos positivos, la información del testigo positivo de no activación es superflua (11).

La selección de la concentración del testigo positivo es importante. La mejor concentración es aquella suficientemente alta para indicar una respuesta significativa consistente, pero suficientemente baja como para que las condiciones de prueba subóptimas puedan ser detectadas por la pérdida o reducción de la actividad.

La selección del compuesto a utilizar como testigo positivo es también importante. La similitud en la estructura de la sustancia a estudiar es ventajosa, aunque no siempre es posible.

CICLOFOSFAMIDA

Datos Históricos

La ciclofosfamida se sintetizó cuando se intentaba modificar la estructura de la mecloretamina, con objeto de lograr una mayor selectividad para los tejidos neoplásicos. Diversos grupos europeos (5) demostraron su efectividad en ciertos neoplasmas malignos.

Características Fisicoquímicas

Es un polvo amarillo de peso molecular 261.10; soluble en agua, ligeramente soluble en alcohol, benceno, etilglicol y tetracloruro de carbono, es poco soluble en eter y acetona.

La ciclofosfamida es una mostaza nitrogenada y como tal es un agente alquilante capaz de formar uniones covalentes con sustancias nucleofílicas como son los grupos fosfato, amino, sulfhidrilo, hidroxilo, carboxilo e imidazol. Es capaz de alquilar al ADN, donde es particularmente sensible el nitrógeno 7 de la guanina. También son sensibles, aunque en menor grado, los nitrógenos 1 y 3 de la adenina, el nitrógeno 3 de la citocina, el oxígeno 6 de la guanina, los átomos fosfato del ADN, así como las proteínas asociadas al mismo (12).

Farmacocinética

La ciclofosfamida es metabolizada en el hígado por el sistemas de oxidasas de función mixta del retículo endoplásmico (12). Se han identificado varios metabolitos (31) y en la actualidad se considera que primero es hidroxilada por el citocromo P_{450} convirtiéndose en 4-hidroxiciclofosfamida, la cual está en equilibrio con su tautómero en anillo abierto la aldofosfamida. Estos compuestos pueden ser oxidados por la aldehoxidasa hepática dando origen a los metabolitos carboxifosfamida y 4-ketociclofosfamida de los cuales ninguno de los dos parecen tener actividad biológica. Por reacciones no enzimáticas pueden formarse los derivados citotóxicos; Mostaza fosforamida y Acroleina (Fig. 1).

Usos Terapéuticos

Se han observados buenos resultados en la enfermedad de Hodgkin, linfomas, leucemias, hemoblastosis, neuroblastomas, glomerulonefritis, reticulosarcoma, tumores ginecológicos, carcinomas de útero, ovario y broncogénicos. La ciclofosfamida presentó también propiedades inmunosupresivas por lo que se utiliza, en el control del rechazo inmunológico en transplantes y en desórdenes asociados con una reactividad inmune alterada como son la artritis reumatoide, el síndrome nefrótico en niños, la granulomatosis de Wegener y los padecimientos alérgicos oculares.

Rutas de Administración y Dosificación

La ciclofosfamida puede ser administrada por vía oral, intravenosa

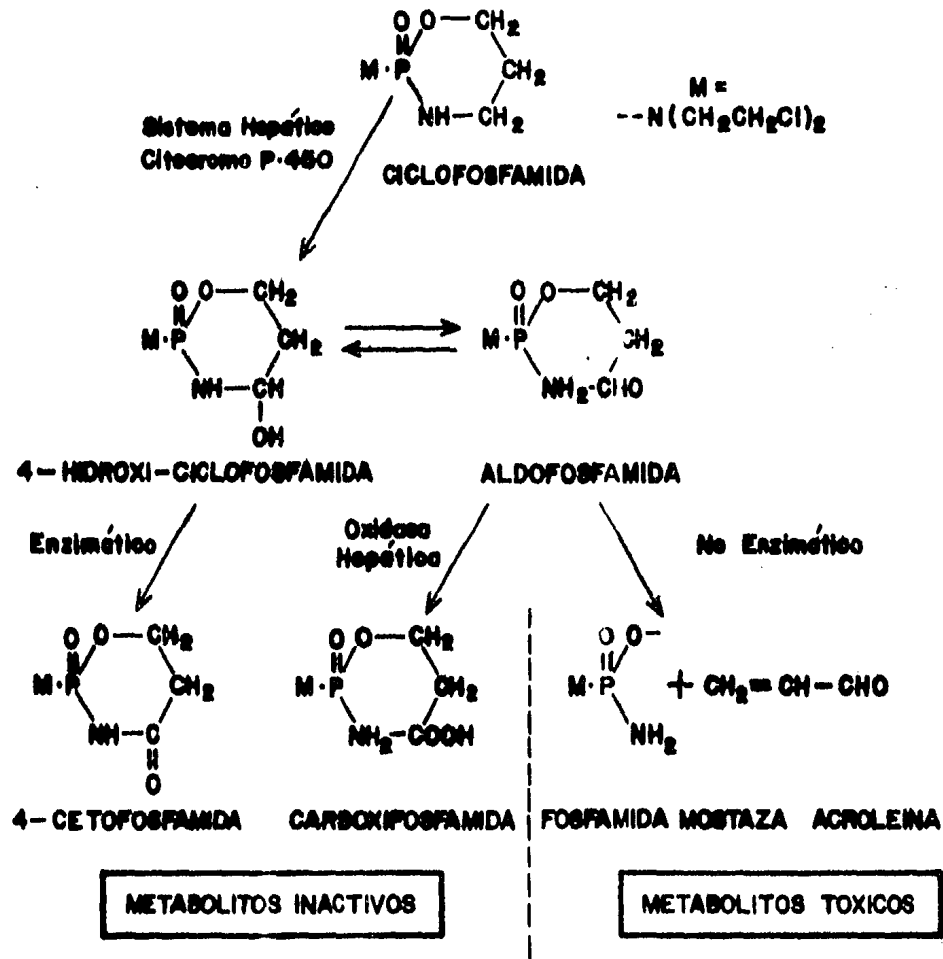


Fig. 1 - Metabolismo de la ciclofosfamida (tomada de 12)

intrapleural e intraperitoneal. Una dosis diaria de 2 a 3 mg/Kg ha sido recomendada para pacientes con neoplasias como linfomas y leucemias. Las administraciones únicas de 30 mg/Kg también han mostrado ser útiles en tratamientos de linfomas.

Efectos Adversos

Los efectos inmediatos más comunes, son náuseas, vértigos de corta duración, hematuria y trombocitopenia.

a) Mutagénesis

En la mayoría de los sistemas biológicos que se utilizan para identificar mutágenos ha sido evaluada la ciclofosfamida (Tabla II) y en todos ellos ya sea in vivo o in vitro con activación metabólica, la ciclofosfamida ha mostrado su efecto mutagénico.

Se han llevado a cabo diversos estudios en linfocitos humanos evaluando diferentes parámetros experimentales (Tabla III):

1.- Aberraciones Cromosómicas- En 1962 Arrighi y col. (6) reportan una alta incidencia de daño cromosómico en pacientes tratados con ciclofosfamida. A partir de entonces han sido estudiados diversos grupos de pacientes tratados con ciclofosfamida (Tabla VII). Las investigaciones de Schmid y Bauchinger (56) mostraron que existe una relación dosis-respuesta y que la ciclofosfamida produce un incremento de 6 a 8 veces el porcentaje de aberraciones cromosómicas encontradas en individuos testigo. Dobos y col.(19) en un grupo de niños tratados de 4 a 6 semanas con ciclofosfamida, reportaron un incremento del 15% al 18% de aberraciones cromosómicas.

Tabla VII .- Efecto Mutagénico en Individuos en Terapia con Ciclofosfamida

PADECIMIENTO	RESPUESTA		REFERENCIA
	Aberraciones	I.C.H.	
Tumores Malignos	+		6
Tumores Ginecológicos	+		56
Síndrome Nefrótico	+		19
Tumores Malignos	+		26
Carcinoma de Ovario y Utero	+		46
Hemoblastosis		+	53
Glomerulonefritis	+	+	47

La inducción de aberraciones por la ciclofosfamida adicionada a cultivos de linfocitos ha sido poco evaluada. Hampel y col. en 1966 (29) y Morad y Zawahri en 1977 (46) mostraron que la ciclofosfamida per se no produce aberraciones, sin embargo Hampel y col (30) muestran que el plasma sanguíneo de ratas tratadas con ciclofosfamida, y los metabolitos producidos al tratar la ciclofosfamida con cortes de hígado, si son capaces de inducir aberraciones en cultivos de linfocitos humanos.

Madle y Obe (38,39,40) han evaluado el efecto mutagénico de la ciclofosfamida acoplado a los cultivos de linfocitos diferentes sistemas de activación metabólica, incluyendo entre estos la fracción "S9" y demostraron la capacidad de la ciclofosfamida para inducir rearrreglos cromatídicos.

Richardson en 1982 (54) reporta el uso de la ciclofosfamida como testigo positivo en presencia de activación metabólica, sólo menciona que causó un efecto clastogénico produciendo diversos tipos de aberraciones como brechas, rompimientos, fragmentos y translocaciones, sin presentar datos acerca de dicha actividad.

2.- Intercambio de Cromátidas Hermanas- En 1978 Raposa (53) evaluó el efecto de la adición de la ciclofosfamida a los linfocitos humanos sin activación metabólica y no encontró un incremento significativo de I.C.H., mientras que en pacientes en tratamiento con ciclofosfamida encontró que la frecuencia de I.C.H. se eleva hasta 2.5 veces el valor de los testigos. Musilova y col. (47) realizaron un trabajo semejante en pacientes con glomerulonefritis y observaron el mismo efecto. White y Hesketh en 1980 (71) u

tilizando la técnica de incorporación de activación metabólica a los linfocitos humanos de Bimboes y Greim (10) para evaluar el efecto producido por la ciclofosfamida, encontraron que una vez activada puede producir un incremento significativo de I.C.H. hasta de 7 veces el valor basal; incremento que no se encontró sin la activación metabólica de la droga.

Diversos investigadores han reportado resultados semejantes (1,18, 32,41 y 64) ya sea evaluando el efecto mutagénico de la ciclofosfamida o empleandola como testigo positivo y señalan un efecto notorio en la producción de I.C.H.

3.- Proliferación Celular - Este parámetro sólo ha sido evaluado por Madle (41) que reportó que al aumentar la concentración de ciclofosfamida la proliferación celular decae; o sea se incrementa el número de metafases en primera división y disminuye el número de metafases en segunda división.

b) Teratogénesis

Durante la gestación se ha reportado que tanto en rata (28) como en ratones es teratogénica (24), afecta principalmente el esqueleto aunque también se ha señalado que es capaz de dañar el cerebro, produciendo desde alteraciones en las membranas nucleares de las células cerebrales, hasta excencefalia e hidrocefalia (35). Otros efectos que se han asociado con la exposición de ratas a la ciclofosfamida son: meningocele, branquignatia, desviación en las proporciones fetales (28) y alteraciones en la conducta (21). Greenberg y Tanaka (27) reportan el caso de una mujer con la enfermedad de Hodgkin a quien se le administró la droga durante el período de la

da a l1va semana de embarazo, al nacer su hijo present6 multiples anormalidades; entre ellas ectrodactilia de los pies.

c) Carcinog6nesis

Su empleo terap6utico ha demostrado que provoca la aparici6n de diversos tipos de c6ncer, la mayor1a de ellos leucemias, linfomas y carcinomas de pecho, ovario y 6tero. (52).

El objetivo principal de 6ste trabajo es estandarizar el uso de la fracci6n microsomal "S9", obtenida del homogenado de h1gado de rata, en el cultivo de linfocitos humanos que se utiliza como un sistema de prueba para la detecci6n de sustancias genot6xicas.

Los Objetivos Espec1ficos son:

- 1) Encontrar una sustancia que pueda ser utilizada como control positivo, en el estudio de sustancias que requieren activaci6n metab6lica.
- 2) Estudiar la reproducibilidad del sistema en:
 - a) funci6n del tiempo
 - b) cultivos de linfocitos de diferentes individuos
- 3) Establecer un control hist6rico que permita detectar variaciones en el sistema debido a los agentes externos.

Elección de un Testigo Positivo que Requiere Activación Metabólica- Después de revisar los trabajos sobre sustancias que muestran actividad mutagénica al ser metabolizadas con la fracción microsomal "S9" en el sistema de linfocitos humanos in vitro, nos encontramos con que sólo 11 sustancias han sido evaluadas (Tabla V). Entre ellas la ciclofosfamida que ha sido valorada por varios autores (1,64) con respecto a su actividad inductora de I.C.H.. Sin embargo, con respecto a aberraciones cromosómicas tan solo encontramos estudios del grupo de Madle y Obe (38,39,40) en el que terminan su capacidad de inducir rearrreglos cromatídicos; Madle (41) también ha sido el único que ha evaluado el efecto de la ciclofosfamida en la proliferación celular .

Se eligió por lo tanto a la ciclofosfamida para estandarizar el uso de la **fracción "S9"** en el cultivo de linfocitos humanos. Los valores acerca de la proliferación celular, aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas resultantes de éste estudio nos permitiran comparar nuestros datos con los obtenidos por otros autores.

Tabla V .- Sustancias Que Han Sido Evaluadas en Linfocitos Humanos en Presencia de Activación Metabólica "S9".

SUSTANCIA	RESPUESTA		REFERENCIAS
	Aberraciones	I.C.H.	
Dimetilnitrosamina	+		10
Aflatoxina B N-metil-N-nitrosourea		+ +	67
Carbamato de Etilo Carbamato de Vinilo		+ +	18
4-Clorometil bifenilo	+		54
Mitomicina C Anilina P-Aminofenol Norharman		+ - + +	64
Ciclofosfamida	+	+	Ver tabla No. VI

Tabla VI .- Estudios Sobre la Inducción de Intercambios de Cromátidas

Hermanas por Ciclofosfamida en Cultivos de Linfocitos Humanos con Activación Metabólica.

REFERENCIAS	DOSIS (M)	X I. C. H.		INCREMENTO SOBRE EL TESTIGO (veces)	TRATAMIENTO		INDUCTOR ENZIMÁTICO	ACTIVACION METABOLICA	CONCENTRACION "S9" (g)
		Controles	Tratados		Tiempo de adición (hrs.)	Duración (hrs.)			
70	10^{-5}	8.2	44.0	5.4					10
	2×10^{-5}	8.2	58.8	7.2	48	2	Fenobarbitúrico	"S9"	
32	10^{-5}	7.8	11.6	1.48			*	"S9"	30
	10^{-4}	7.8	48.7	6.24	0	1			
1	10^{-5}	8.0	12	1.5			--	Perfusión	--
	10^{-4}	8.0	48	6.0	0	*			
41	5×10^{-5}	6.0	17	2.8					27.8
	1.7×10^{-5}	6.0	28	4.7	46	1	Aroclor	"S9" por diálisis	
64	10^{-5}	8.0	29.6	3.7	48	2	Fenobarbitúrico	"S9"	10
Presente Estudio	1.3×10^{-5}	5.9	28.4	4.8	22	2	Aroclor	"S9"	10

MATERIALES Y METODOS

SISTEMA DE TRANSFORMACION METABOLICA

El homogenado hepático que contiene las enzimas microsomales, o fracción "S9" (sobrenadante de la centrifugación a 9,000 x g), fué preparado siguiendo el método de Ames y col. (4). La preparación de la mezcla "S9" se modificó posteriormente, de acuerdo a White y Hesketh (71), para su empleo en cultivos de linfocitos.

Obtención de la mezcla "S9"

Se trataron ratas machos de la cepa Sprague-Dawley, con un peso aproximado de 200 gr, por vía intraperitoneal, con 500 mg/Kg de Aroclor 1254 diluído en aceite de maíz a una concentración de 200 mg/ml. Los animales fueron mantenidos tomando agua y alimento ad libitum hasta 12 hrs antes de sacrificarlos. El quinto día después de la inyección, las ratas se sacrifican por decapitación después de aturdir las con un golpe en la cabeza. Se les extrajeron los hígados asepticamente y se colocaron en vasos previamente pesados que contenían 15 ml de solución fría de KCl 0.15 M, de aquí en adelante el proceso se realizó a 4°C para conservar la actividad enzimática, los hígados se pesaron y colocaron en recipientes con aproximadamente 3 ml de KCl por gramo de hígado. Se cortaron en pedazos pequeños con ayuda de tijeras y se homogenizaron con un aparato Potter-Elvehjem. El

homogenado se centrifugó a 9,000 x g durante 10 min y el sobrenadante (fracción "S9") se distribuyó en viales con tapón de rosca a razón de 1 ml, congelándose rápidamente sobre hielo seco, para conservarse a -80°C.

Preparación de la Mezcla "S9"

La mezcla "S9" debe prepararse antes de cada experimento de la siguiente manera: La G-6-P y el NADP se disuelven en el amortiguador fosfatos, MgCl y agua destilada. La solución resultante se filtra utilizando la unidad swinex (Millipore Corp. Redfor Mass.) equipada con una membrana de 0.2 micras de poro y por último se agraga la fracción "S9" esterilmente.

Contenido de la mezcla "S9"

Fracción "S9"	1.0 ml	Agua destilada	3.35 ml
Solución de MgCl ₂ 0.4 M	0.02 ml	G-6-P	0.0013 g
Amortiguador de fosfatos	5.0 ml	NADP	0.0030 g

Cultivo de Celulas

El cultivo de linfocitos se hizo de acuerdo a la técnica de Moorhead y col. (45) modificada de la siguiente manera: Se sembró sangre heparinizada (0.4 ml) de 5 donadores sanos (Tabla VIII) en 5 ml de medio de cultivo McKoy 5A modificado (Microlab). A cada cultivo se le adicionó 50 U. I. de penicilina y 50 ug de estreptomocina (Gibco), 0.2 ml de fitohemaglutinina (Gibco o Microlab) y 30 ug de 5-bromodeoxiuridina (Sigma). No se

Tabla VIII Características Individuales y Fechas Experimentales

Individuo	Sexo	Edad (años)	FECHAS EXPERIMENTALES	
			Experimento I	Experimento II
1	Masc.	45	20/X/81 *	-----
2	Masc.	26	18/V/82 *	-----
3	Fem.	32	28/VI/82 *	10/IX/82 **
4	Fem.	35	28/VI/82 *	13/IX/82 **
5	Fem.	24	28/VI/82 *	16/IX/82 **

---- = No se realizó

* = Fracción microsomal diferente a **

agregó suero al medio de cultivo. Se incubaron a 37°C en la oscuridad durante 72 hrs. Dos horas antes de la cosecha se adicionó 2 ug de colcemid (Gibco).

Exposición a Ciclofosfamida

Después de 22 horas de incubados los cultivos, se expusieron las células durante 2 hrs a 4 ug/ml de ciclofosfamida diluída en medio de cultivo en presencia de 0.5 ml de la mezcla "S9". Después el medio que contiene al mutágeno se removió por centrifugación y las células se lavaron 2 veces con medio fresco para resuspenderse nuevamente en 5 ml de medio que contenía 15 ug de bromodeoxiuridina y 0.1 ml de fitohemaglutinina. Se incuban a 37°C hasta completar 72 hrs.

Cosecha

Los cultivos se centrifugaron durante 8 min a 1000 rpm, eliminandose el sobrenadante y dejando un volumen de éste igual al del paquete o botón; se agitó suavemente y se agregó 5 ml de KCl (0.075M) resuspendiendose con ayuda de un agitador vortex. Tras 20 min de incubación a 37°C, se centrifugó 8 min a 1,000 rpm y se descartó el sobrenadante dejando un volumen igual al del botón para resuspender las células antes de agregar 5 ml de fijador formado por ácido acético - metanol 1:3 . Después de resuspender nuevamente en el fijador se dejaron reposar las células durante 20 min. Se repitió esta operación hasta observar que el botón se encontrara limpio, lo que generalmente ocurrió en el tercer cambio. La fijación se mantuvo durante

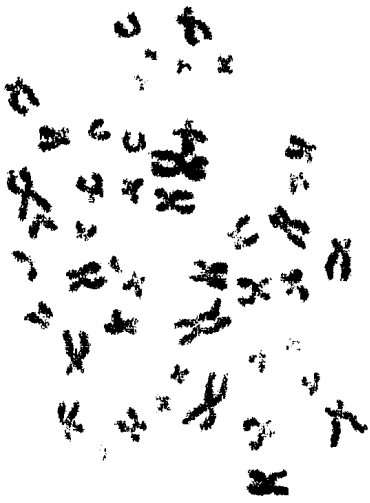
24 hrs a 4°C. Al día siguiente se hicieron las preparaciones después de: centrifugar 8 min a 1,000 rpm, eliminar el sobrenadante, adicionar 0.4 ml defijador gotear en un portaobjetos la suspensión celular. Una vez hechas las laminillas se pasaron por la flama.

Proceso de Tinción

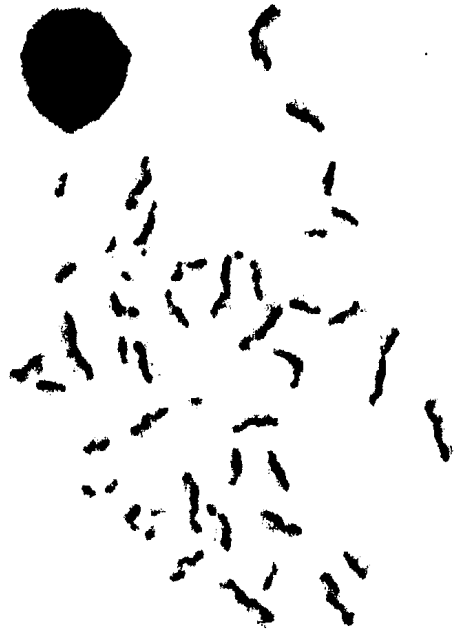
A las 24 hrs de elaboradas las laminillas se procedió a teñir usando la técnica de fluorescencia + giemsa derivada de la descrita por Perry y Wolff (49). Esta consiste en introducir las laminillas en una caja de Köplin que contiene 50 ml de agua destilada y 0.3ml de tintura de Hoechst 33258 durante 30 min, después se lavan con agua corriente y se secan al aire, se cubren con amortiguador de fosfato pH 6.8 y cubreobjetos; se exponen a luz negra 65 a 75 min y finalmente se tiñen con una solución al 2% de Giemsa-Amortiguador fosfatos durante 4 a 8 min eliminando el exceso de colorante con agua corriente.

Análisis de Metafases

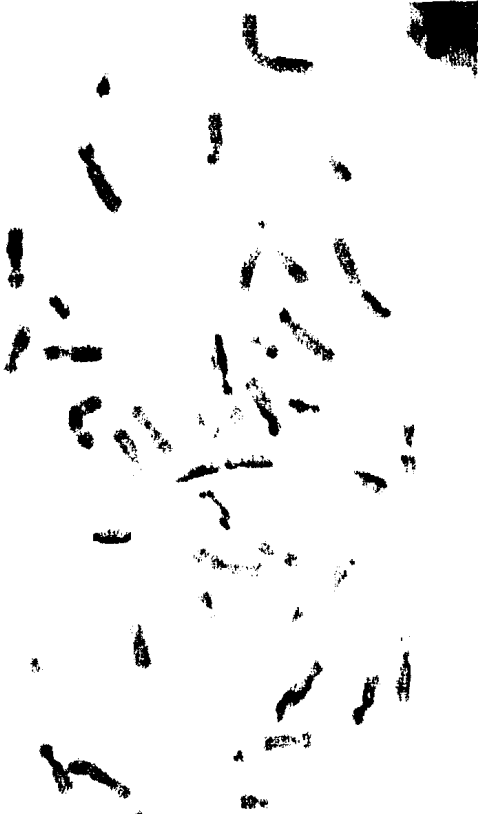
La cinética de la proliferación celular se cuantificó en las 100 primeras células, determinando el número de metafases en primera, segunda y tercera o sucesiva división (Fig. 2). El número de aberraciones se determinó a su vez, en 100 metafases provenientes de células en primera división, con cromosomas bien esparcidos, y la media de intercambio de cromátidas hermanas se evaluó en 25 metafases de células en segunda división.



A



B



C

A.-CELULA EN PRIMERA

B.-CELULA EN SEGUNDA

C.-CELULA EN TERCERA O
MAS DIVISIONES

Análisis Estadístico

Para determinar el efecto de la ciclofosfamida fueron aplicadas la prueba de χ^2 para el índice de proliferación celular; la prueba de t-Student para aberraciones cromosómicas e I.C.H. y una prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett (44) para determinar la variabilidad de los resultados de los individuos 3, 4 y 5 para el experimento I y II y variabilidad para cada individuo.

RESULTADOS

En el presente estudio se llevaron a cabo diversos experimentos preliminares con objeto de estandarizar el uso de la fracción microsomal. Cuando una sustancia es estable y no es tóxica, la determinación de su actividad mutagénica puede hacerse adicionando la sustancia al inicio del cultivo y dejándose en él hasta la fijación de las células, sin embargo la fracción microsomal mostró ser por sí misma tóxica para las células por lo que se requiere de pulsos de tratamiento. Debido a ésto fué necesario determinar a que tiempo aplicar el tratamiento y puesto que Zhurkov y Yocovenko (74) que muestran que la mayor sensibilidad de los linfocitos a la acción clastogénica de varios agentes químicos se presenta a las 22 hrs de iniciado el cultivo, se utilizó este tiempo para iniciar los pulsos de tratamiento de ciclofosfamida con la fracción "S9". Los pulsos de tratamiento de más de dos horas resultaron ser tóxicos mientras que con los pulsos de dos horas se obtiene una buena proliferación celular.

Una vez estandarizadas las variables técnicas, se procedió a evaluar la proliferación celular, el daño cromosómico y el promedio de intercambio de cromátidas hermanas en los diferentes individuos. En la tabla IX se presentan los datos de la cinética de proliferación celular la cual evalúa el porcentaje de células en primera, segunda y sucesivas divisiones. En el grupo I se incluyen todos los experimentos en los que se empleó el mismo lote de homogenado hepático realizandose los dos primeros en diferente fecha de los tres últimos; el grupo II presenta la repetición experimental con muestras de sangre de tres de los cinco individuos empleados para

Tabla IX Cinética de la Proliferación Celular de Linfocitos Humanos
 Expuestos a Ciclofosfamida en Presencia de
 Enzimas Metabólicas (S9)

% de Células en 1a, 2a o 3a División

Individuo	Tratamiento	Grupo Exp. I			Grupo Exp. II			$\bar{X} \pm D. E.$		
		1era	2das	3ras	1era	2das	3ras	1eras	2das	3ras
1	Testigo	24	38	38	-	-	-	-	-	-
	CF	27	27	46	-	-	-	-	-	-
2	Testigo	21	18	62	-	-	-	-	-	-
	CF	32	18	50	-	-	-	-	-	-
3	Testigo	21	30	49	29	26	45	25 \pm 4	28 \pm 2	47 \pm 2
	CF	30	36	34	22	30	48	26 \pm 4	33 \pm 3	41 \pm 7
4	Testigo	30	22	48	20	22	58	25 \pm 5	22 \pm 0	53 \pm 5
	CF	23	24	53	33	15	52	23 \pm 5	19.5 \pm 4.5	52.5 \pm 0.5
5	Testigo	23	25	52	35	34	31	29 \pm 6	29.5 \pm 4.5	41.5 \pm 10.5
	CF	23	26	51	22	16	62	22.5 \pm 0.5	21 \pm 5	56.5 \pm 5.5

- = No realizó

el grupo I, en los que se utilizó un lote diferente de homogenado hepático (ver materiales y métodos).

Con la dosis de ciclofosfamida que se utilizó no se observó ningún efecto significativo según la prueba de X^2 que dio un valor de p 0.001 sobre la cinética de proliferación celular. (Fig. 3)

En los individuos a los que se les tomó muestra de sangre en dos ocasiones diferentes, la cinética de proliferación celular fué similar; ciertos puntos se desvían de la tendencia, sin embargo la prueba de Bartlett confirmó la homogeneidad de los resultados.

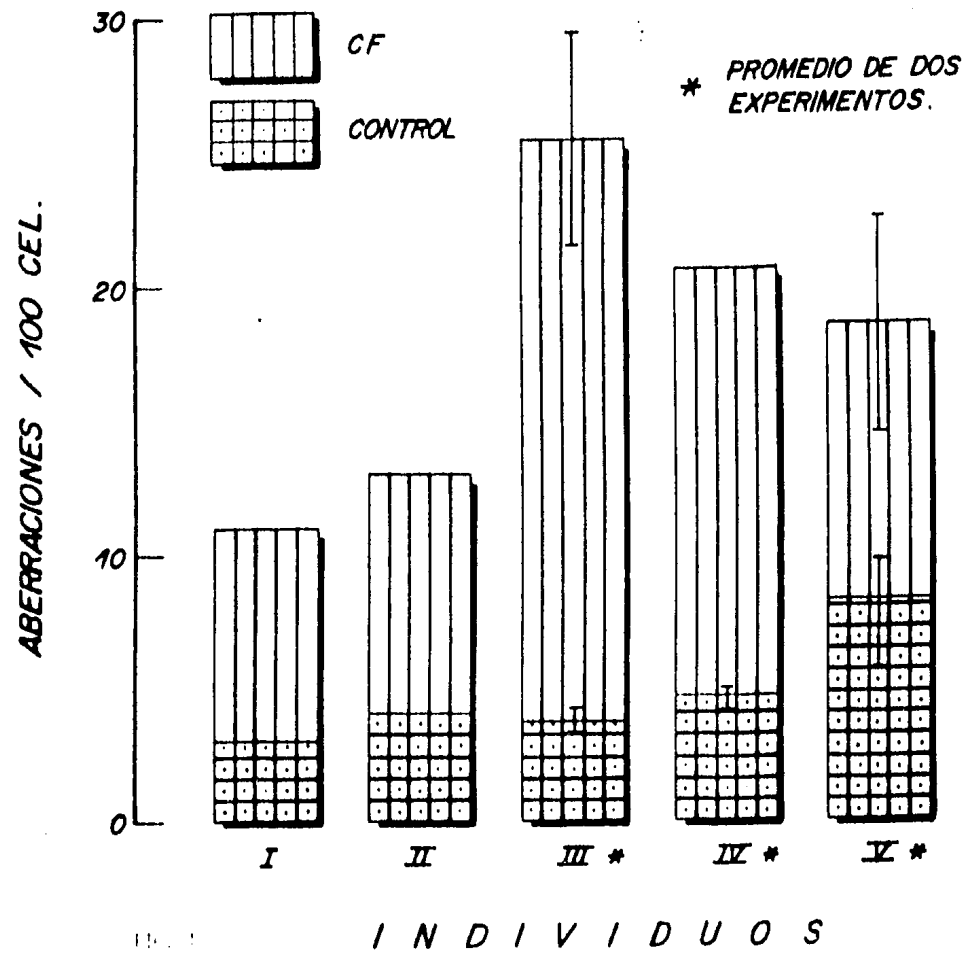
En la tabla X se presenta el porcentaje de células con aberraciones cromosómicas. Las características experimentales son las mismas de la Tabla IX. La dosis de ciclofosfamida utilizada mostró ser clastogénica, observándose una diferencia estadísticamente significativa entre los datos obtenidos en los cultivos testigos y los obtenidos en los cultivos en los que se les administró el fármaco (prueba de t-Student). La frecuencia de aberraciones observada en los testigos fué de 3% a 8% mientras que en las muestras tratadas el rango fué del 9% al 24% (Fig. 4). La respuesta de cada individuo a los efectos clastogénicos de la ciclofosfamida mostró cierta variabilidad incrementándose el daño producido desde 2.1 veces hasta 5.7 veces el valor basal.

En los individuos estudiados en dos ocasiones se observa que aunque no se repiten exactamente los valores individuales, la clastogenicidad de la ciclofosfamida para cada individuo es similar. La media y la desviación

Tabla X Aberraciones Cromosómicas inducidas en Linfocitos Humanos
por Ciclofosfamida en Presencia de Enzimas
Metabólicas (S9)

Individuo	* Células con Aberraciones Cromosómicas				INCREMENTO SOBRE EL TESTIGO
	Tratamiento	Grupo Exp. I	Grupo Exp. II	$\bar{X} \pm$ D. E.	
1	Testigo	3	-	-	3
	CF	9	-	-	
2	Testigo	4	-	-	2.75
	CF	11	-	-	
3	Testigo	4	3	3.5 ± 0.5	5.7
	CF	24	16	20 ± 4	
4	Testigo	5	4	4.5 ± 0.5	3.1
	CF	14	14	14 ± 0	
5	Testigo	8	5	6.5 ± 1.5	2.1
	CF	18	10	14 ± 4	

- = No se realizó



estandar de los dos grupos indican la escasa variabilidad entre ambos experimentos confirmándose la homogeneidad de los datos mediante la prueba de Bartlett.

En la tabla XI se presenta el promedio de los intercambios de cromátidas hermanas. Las características experimentales son las mismas de la tabla IX. Los valores basales de I.C.H. varían de 4 a 7.8. La variación que se observa entre individuo es similar a la que se obtiene en muestras sanguíneas del mismo individuo en dos experimentos (veasé ind. 3 grupo I y II). En presencia de ciclofosfamida se observa un aumento notorio de I.C.H. , los valores numéricos de la media de I.C.H. para todas las muestras tratadas son muy similares llenando de 26.5 a 37.2, excepto para el individuo 2 que fué de 13.6 (Fig. 5). Al igual que en el caso de las células dañadas se observa una variabilidad individual en la respuesta, encontrándose desde 3.6 hasta 6.4 veces el valor basal. Cuando se aplicó la prueba de Bartlett a la varianza de I.C.H. en todos los individuos se encontró heterogeneidad en los datos, sin embargo, si sólo se incluyen los 3 individuos a los que se les tomó muestra en dos ocasiones, la prueba de Bartlett indica homogeneidad intra e interexperimentos.

La tabla XII especifica el tipo de aberraciones que se detectaron. Las características experimentales son las mismas de la tabla IX. Los tipos de aberraciones que fueron considerados son: a) Rompimientos, b) Rearreglos, c) Aberraciones múltiples.

Tabla XI Intercambio de Cromátidas Hermanas Producidas en Linfocitos Humanos por Ciclofosfamida en Presencia de Enzimas Metabólicas (89)

Individuo	\bar{X} de Intercambio de Cromátidas Hermanas				INCREMENTO SOBRE EL TESTIGO
	Tratamiento	Grupo Exp. I	Grupo Exp. II	$\bar{X} \pm$ D. E.	
1	Testigo	5.4	-	-	6.4
	CF	34.6	-	-	
2	Testigo	4	-	-	3.3
	CF	13.4	-	-	
3	Testigo	6.9	4.4	5.65 ± 1.24	4.4
	CF	30.6	26.5	28.55 ± 2.05	
4	Testigo	7.6	6.4	7 ± 0.6	4.8
	CF	37.2	29.8	33.5 ± 3.7	
5	Testigo	7	7.8	7.4 ± 0.4	4.5
	CF	32.1	27.8	29.95 ± 2.15	

- = No se realizó

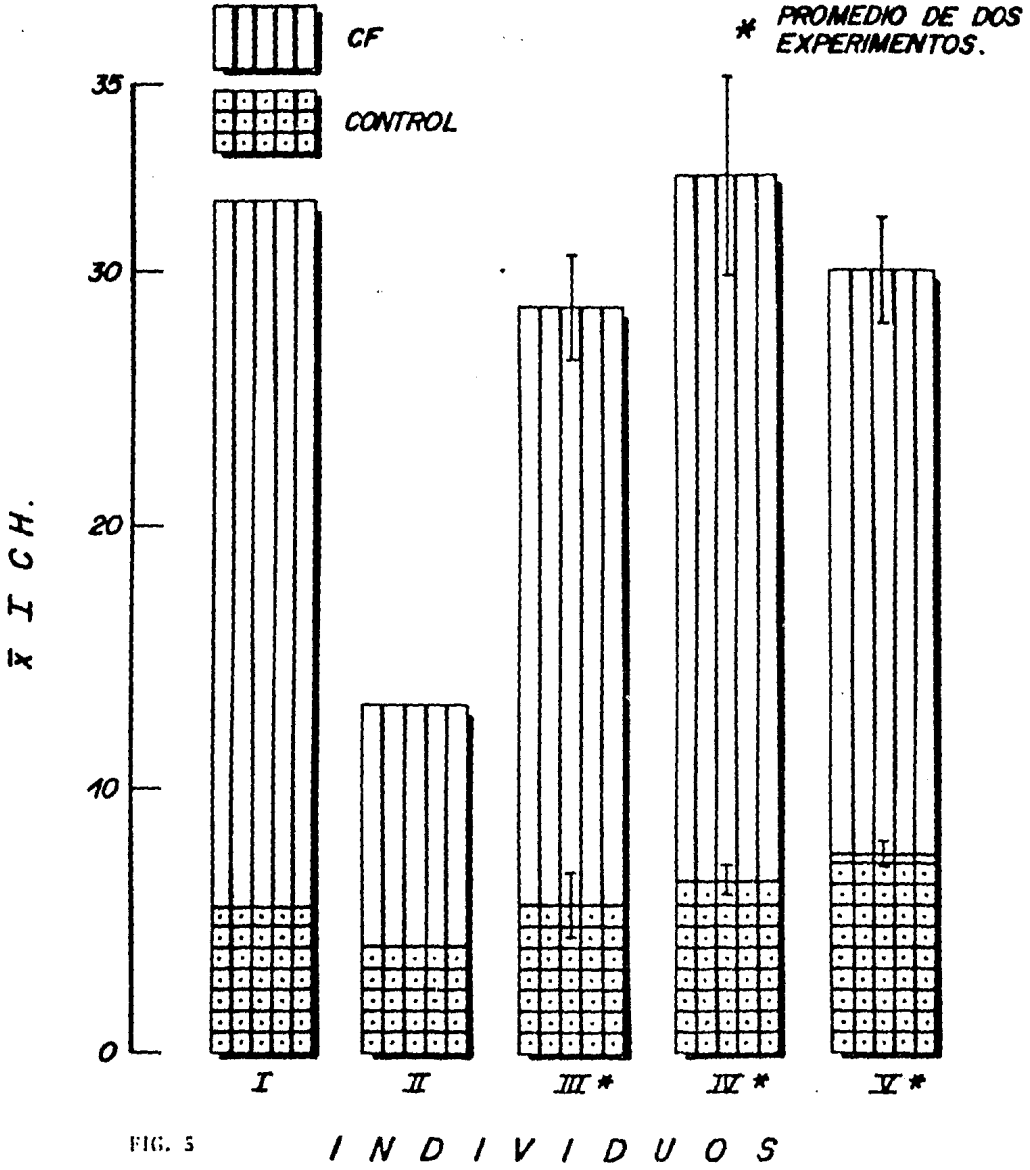


FIG. 5

Tabla XII Tipos de Aberraciones inducidas en Linfocitos Humanos por
Ciclofosfamida en presencia de Enzimas Metabólicas
(59)

Tipos de Aberraciones/100 Células

Individuo	Tratamiento	Grupo Exp. I			Grupo Exp. II			$\bar{X} \pm$ D.E.		
		Rompimien- tos	Rearre- glos	Múltiples	Rompimien- tos	Rearre- glos	Múltiples	Rompimientos	Rearreglos	Múltiples
1	Testigo	3	-	-	+	+	+	*	*	*
	CF	10	1	-	+	+	+	*	*	*
2	Testigo	4	-	-	+	+	+	*	*	*
	CF	13	-	-	+	+	+	*	*	*
3	Testigo	4	-	-	3	-	-	3.5 ± 0.5	*	*
	CF	23	1	11	11	1	4	17 ± 6	1 ± 0	7.5 ± 3.5
4	Testigo	5	-	-	4	-	-	4.5 ± 0.5	*	*
	CF	15	2	-	24	1	-	19.5 ± 4.5	1.5 ± 0.5	*
5	Testigo	8	2	-	6	2	-	7 ± 1	2 ± 0	*
	CF	22	-	1	12	2	-	17 ± 5	*	*

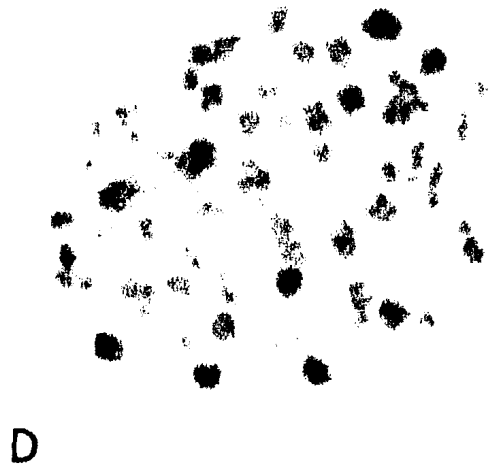
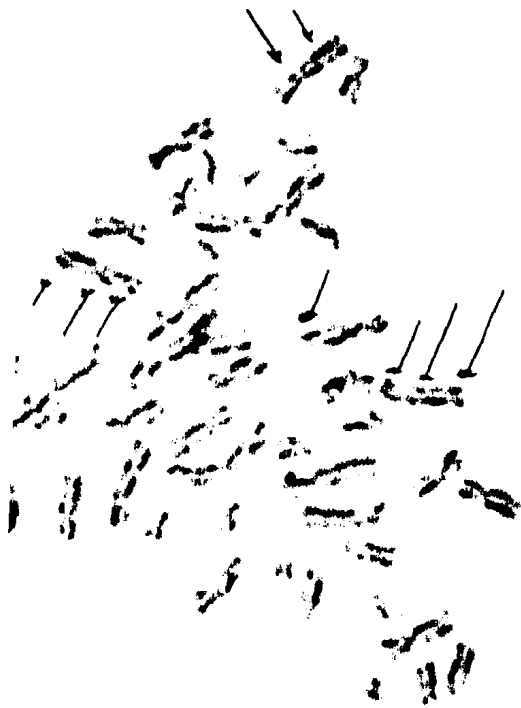
- = No se encontró

+ = No se realizó

* = No se determinó

- a) Rompimientos.- Se consideran rompimientos a las discontinuidades presentadas en la cadena de ADN, incluyéndose bajo esta clasificación también las brechas. El daño fundamentalmente es del tipo cromatídico, los escasos rompimientos del tipo isocromatídico fueron incluidos en este grupo.
- b) Rearreglos.- La única clase de rearrreglos que se encontró fue de tipo cromatídico observándose tan solo algunas figuras tetrarradiadas, caracterizadas por el acomodamiento anormal de un par de cromosomas lo que se traduce en una configuración de 4 brazos. No se observaron rearrreglos cromosómicos como son los anillos y dicéntricos.
- c) Aberraciones múltiples.- En este grupo se incluyeron las células en las que varios o todos los cromosomas se observaron fragmentados.

En todos los individuos estudiados el daño observado se debió principalmente al incremento en el número de rompimientos cromatídicos. En uno de los individuos, el número 3, se encontró en las dos ocasiones en las que se estudió, un incremento notorio en el número de células con aberraciones múltiples. (Fig. 6).



A.- AUMENTO DE I. C . H .

B.- ROMPIMIENTOS

C.- TETRARRADIADO

D.- MULTI DAÑADA

DISCUSION

La utilización del cultivo de linfocitos humanos para la evaluación del riesgo mutagénico para el hombre, derivado de la exposición a agentes químicos, requiere de la adición de sistemas enzimáticos capaces de llevar a cabo su transformación metabólica en forma similar a como ocurre en el organismo. La fracción microsomal, derivada de la centrifugación de homogenados hepáticos de rata "S9", ha sido ampliamente utilizada en las pruebas de genotoxicidad realizadas con sistemas bacterianos y aún líneas celulares de fibroblastos en cultivo (Tabla II); sin embargo son escasos los reportes de su empleo en el cultivo de linfocitos (Tabla III). La ciclofosfamida es el fármaco que más ha sido evaluado en este sistema: de los 11 trabajos - (1,18,30,32,38,39,40,41,54,64 y 70) en que se estudian sus efectos in vitro solamente 1 señala que influye sobre la proliferación celular; 6 indican capacidad de inducir I.C.H. y 4 mencionan actividad clastogénica. La información que se obtiene en estos trabajos acerca de la actividad clastogénica es parcial; sólo 2 de ellos utilizan la fracción "S9", uno de ellos (54) en el que se emplea como testigo positivo, menciona que produce diferentes tipos de aberraciones como brechas, rompimientos, fragmentos y translocaciones, sin dar datos numéricos al respecto, el otro trabajo (38), como discutiremos más adelante, tan solo evalúa rearrreglos cromatídicos, los cuales representan un solo tipo de daño. Los estudios acerca de la actividad inductora de I.C.H. aunque más completos, en su mayoría incluyen a un solo individuo y - llevan a cabo una determinación única en un sólo cultivo de linfocitos.

El objetivo principal de este trabajo consistió en estandarizar el uso de la fracción microsomal "S9" para pruebas de mutagénesis química en cultivos de linfocitos; al mismo tiempo, ante el hecho de que la información existente sobre la acción de la ciclofosfamida en este sistema es incompleta, consideramos de interés evaluar los efectos genotóxicos de dicho fármaco en presencia de la fracción microsomal "S9", con el propósito de estudiar la reproducibilidad del sistema en función del tiempo y de la respuesta de los linfocitos de diferentes individuos, así como de establecer un control histórico que permita detectar variaciones en el sistema debido a agentes externos. Debe entenderse que individuos con una sensibilidad particular a los fármacos pueden mostrar mayor o menor efecto a la ciclofosfamida que los establecidos durante la estandarización de su empleo como control positivo.

En lo que se refiere a los datos acerca de la proliferación celular de linfocitos en presencia de ciclofosfamida, nos encontramos con un solo estudio de Madle (41) que reporta una relación dosis-respuesta, en la que al aumentar la dosis de la droga se incrementa el número de células en primera división; en dicho trabajo se incorporó al cultivo el sistema de transformación metabólica dentro de una bolsa de diálisis. En el presente estudio no se encontró que la concentración de ciclofosfamida utilizada alterara la proliferación celular. Esta aparente incongruencia puede deberse a las diferencias metodológicas ya que Madle (41) reporta que la concentración de la fracción microsomal, así como de los cofactores, influyen en la proliferación celular. Así con una concentración de 0.5 mg de pro -

teínas microsomales por mililitro de cultivo, que es la concentración de "S9" más cercana a la empleada en el presente trabajo (0.473), Madle (41) señala que la proliferación celular no se vió afectada a pesar de usar con centraciones de ciclofosfamida mayores a las nuestras. Cabe mencionar que es recomendable el uso de concentraciones de la fracción "S9" y de cofacto res en las que, aún con la droga no se altere la proliferación celular, para que el efecto que se evalúa no se vea enmascarado por la inhibición de la división celular.

La evaluación de la proliferación celular como un índice más en las pruebas de mutagenicidad en los cultivos de linfocitos, ha sido introduci do muy recientemente y se ha reportado que puede variar en función de: las condiciones del cultivo (14,16), la edad de los donadores (66) y la adi - ción de ciertos agentes químicos (15).

No encontramos ninguna evaluación acerca de la reproducibilidad de los datos sobre la cinética de proliferación celular a través del tiempo, mientras que los nuestros indican que, no obstante que los datos obtenidos en el individuo 5 se presentaron discrepancias, no hay variación estadísti ca mente significativa entre los resultados de los experimentos del grupo I y los obtenidos durante la repetición de dichos experimentos por lo tanto tal discrepancia puede ser consecuencia de problemas técnicos.

Con respecto a la inducción de aberraciones cromosómicas con ciclofosfamida in vitro el grupo de Madle y Obe (38,39,40) ha reportado la utili

zación de diferentes sistemas de activación metabólica adicionados a los cultivos de linfocitos humanos, de éstos el uso de la fracción "S9" es el que ha dado los mejores resultados. Los datos obtenidos en el presente estudio son poco comparables con los datos obtenidos en el trabajo en el que Madle y Obe utilizan la fracción "S9" (39), fundamentalmente porque la concentración menor de ciclofosfamida que utilizan (2×10^{-4} M) es mayor a la utilizada en el presente trabajo (1.3×10^{-5} M). Además, en el trabajo de Madle y Obe solo evalúan la inducción de rearrreglos cromatídicos que es uno de los tipos de daño cromosómico que en el presente estudio se encontró en una frecuencia muy baja. El número reducido de reportes acerca de la actividad clastogénica de la ciclofosfamida en linfocitos en cultivo se debe posiblemente al hecho de que en otros sistemas de prueba (8,48,61) la ciclofosfamida ha mostrado, como muchos otros agentes alquilantes, ser muy buen inductor de I.C.H. y es más fácil evaluar I.C.H. que aberraciones cromosómicas, lo que posiblemente influyó en que se estudiara preferentemente éste efecto.

Los datos obtenidos en el presente estudio indican que la ciclofosfamida en presencia de "S9", en el sistema de linfocitos humanos, se comporta como un agente clastogénico. Como la mayoría de los agentes químicos, la ciclofosfamida produjo un incremento principalmente en rompimientos de tipo cromatídico (Tabla XII), lo que indica que es un agente dependiente de la fase S del ciclo celular, es decir que requiere que el ADN se duplique para que pueda fijarse el daño (51).

En la Tabla VI se presentan los estudios que se han reportado acerca de la actividad inductora de I.C.H. de la ciclofosfamida en el cultivo de linfocitos con activación metabólica. El análisis de los datos resumidos en esta tabla indica que, a pesar de la utilización de concentraciones similares de ciclofosfamida, se encuentran grandes variaciones en la capacidad inductora de I.C.H. Ahora bien, los trabajos de White y Hesketh (71), muestran que el tiempo en el cual se administra la droga es importante y que existen diferencias cuando dicha administración se lleva a cabo al inicio del cultivo ó 46 horas después de iniciado éste. En efecto, en el primer caso la frecuencia de I.C.H. no se altera significativamente, mientras que en el segundo se observa un claro incremento que alcanza su máximo tras dos horas de exposición; y al aumentar el tiempo de exposición se traduce en un efecto tóxico que se manifiesta como una disminución en el número de células en división. Estos hallazgos aunque no son discutidos por los autores podrían explicar los valores tan bajos de I.C.H. obtenidos por Inoue y col. (32) y por Abe y col. (1), ya que ambos administran la ciclofosfamida al iniciarse el cultivo.

Con base en el trabajo de Zhurkov y Yokovenko (74), en el que la administración de diferentes agentes químicos a cultivos de linfocitos de 22 hs produjo el mayor efecto, en nuestro estudio optamos por agregar la ciclofosfamida siguiendo un esquema similar. Como resultado se obtuvo un promedio de 28.4 I.C.H. y un incremento en su frecuencia de 4.8 veces con respecto a los cultivos testigo.

Estos resultados coinciden con los de Madle (41) y Takehisa y Kanaya (64) quienes al administrar ciclofosfamida a las 46 y 48 horas de cultivo en concentraciones de 1.7×10^{-5} y 10^{-5} M respectivamente (muy cercanas a la empleada en el presente trabajo 1.3×10^{-5} M), reportan un promedio de I.C.H. de 26 y 29.6 respectivamente. Por lo tanto puede concluirse que no hay diferencias en los efectos resultantes de la acción de la ciclofosfamida cuando esta se agrega entre las 22 y 48 hrs de cultivo.

Consideramos que los efectos en función del tiempo en que se lleve a cabo la adición de la ciclofosfamida a los cultivos, pudiera estar relacionado, como lo ha señalado Sasaki (55) con el hecho, de que la célula es capaz de reparar el daño a los cromosomas si este ocurre antes de la fase de duplicación, mientras que, si el daño se produce muy cerca de la fase S la célula no tiene suficiente tiempo para llevar a cabo dicha reparación. Ahora bien, cuando se agrega la droga a las 22 o a las 46 y 48 horas, las células se encuentran alrededor de la fase S de duplicación del ADN, por lo tanto no son capaces de reparar con éxito el daño provocado por ellas. Por el contrario cuando se adiciona al inicio del cultivo las células están en G_0 o en todo caso en G_1 y por ello reparan mejor las lesiones.

Cabe señalar que los valores de I.C.H. mencionados (29.6 y 29.4) no son únicamente valores individuales sino valores promedio de 2 y 3 individuos respectivamente, muestreados en una y en dos ocasiones respectivamente. Si se consideran los valores obtenidos para cada individuo en cada

ocasión, se encuentra que tanto en nuestro estudio (I.C.H. y aberraciones) como en otros reportes (34,54), se presenten variaciones en la respuesta individual a las drogas. Recientemente Gebhart y col. (23) y Crossen (17), han reportado que determinados individuos son más susceptibles a la acción de agentes mutagénicos y se ha planteado la posibilidad de que estos individuos pudieran tener un riesgo mayor de desarrollar un cáncer.

La susceptibilidad individual además adquiere especial importancia en el diseño de estudios de mutagenicidad, ya que es probable que si se utilizan donadores de baja sensibilidad los mutágenos débiles pudieran no ser detectados. Ante estos hechos es recomendable la utilización cuando menos de tres donadores para los ensayos de mutagenicidad in vitro.

Con respecto a la reproducibilidad de los datos nos encontramos que los tre individuos estudiados en dos ocasiones muestran una respuesta homogénea tanto para aberraciones como para I.C.H.. Estos hechos indican que:

- 1) Se logró estandarizar el uso de la fracción microsomal acoplada al cultivo de linfocitos humanos.
- 2) Que la ciclofosfamida es un buen control positivo.
- 3) Que puede ser utilizada como control histórico y sirve para verificar el funcionamiento de las diferentes fracciones "S9" que se utilizan.
- 4) Que puede servir como referencia para determinar la actividad mutagénica de otras drogas que requieran de la activación metabólica para mostrar sus efectos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abe, T., Ide, T., Tosa, M., Takahashi, T. y Takino, T. (1981) Activation of Cyclophosphamide Using Per-fused Rat Liver System and Induction of SCE in vitro. *Hum. Genet.* 58: 349.
- 2.- Abe, S. y Sasaki, M. (1982) Induction of Sister Chromatid Exchanges by Indirect Mutagens/Carcinogens in Cultured Rat Hepatoma and Esophageal Tumor Cells and in Chinese Hamster Don Cells co-cultivated with Rat Cells. *Mutat Res* 93: 409-418.
- 3.- Albertini, R. (1980) Drug-Resistant Lymphocytes in Man as Indicator of Somatic Cell Mutation. *Teratog. Carcinog. and Mutagen.* I : 25-48.
- 4.- Ames, B.N., Lee, F.D. y Durston, W. (1973) An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 70: 782-786.
- 5.- Arnold, H., Bourseaux, F., y Brock, N. (1958) Neuartige Krebs-Chemotherapeutika aus der Gruppe der Zyklischen N-Lox Phosphamidester *Naturwissenschaften* 45: 64-66.
- 6.- Arrighi, F., Hsu, T. y Bergsagel, D. (1962) Chromosome Damage in Murine and Human Cells Following Cytosan Therapy. *Tex. Rep. Biol. Med.* 20: 545-549.
- 7.- Au, W., Johnston, A., Collie-Bruyere, C. y Hsu, T. (1980) Short-Term Cytogenetic Assays of Nine Cancer Chemotherapeutic Drugs with Metabolic Activation. *Environ. Mutat.* 2: 455-464.

- 8.- Benedict, W., Banerjee, A. y Veenkatesan, N. (1978) Cyclophosphamide Induced Oncogenic Transformation Chromosomal Breakage and Sister Chromatid Exchange Following Microsomal Activation. *Cancer Res.* 38: 2922-2924.
- 9.- Berkow, R. (1978) Farmacología Clínica. En Manual Merck de Diagnóstico y Terapia. Merck Sharp & Dohme Research Laboratory. p. 2298.
- 10.- Binboes, D. y Greim, H. (1976) Human Lymphocytes as Target Cells in a Metabolizing Test System in vitro for Detecting Potential Mutagens *Mutat Res.* 35: 155-160.
- 11.- Brusick, D. (1980) Principles of Genetic Toxicology. Plenum Press. N.Y. p.p. 90-94.
- 12.- Calabresi, P. y Parks, R. (1983) Antiproliferative Agents and Drugs Used for Immunosuppression. En Pharmacological Basis of Therapeutics de Goodman L. and Gilman A. McMillan p.o. 1256-1265.
- 13.- Cortinas de Nava, C., Ostrosky, P. y Galván, S. (1979) Principios de Mitogénesis y su Relación con Carcinogénesis y Teratogénesis. Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.
- 14.- Craig-Holmes, A. y Shaw, M. (1976) Cell Cycle Analysis in Asynchronous Cultures Using the BrdU-Hoechst Technique. *Exp. Cell. Res.* 99: 79-87.
- 15.- Craig-Holmes, A. y Shaw, M. (1977) Effects of Six Carcinogens on SCE Frequency and Cell Kinetics in Cultured Human Lymphocytes. *Mutat. Res.* 46: 375-384.

- 16.- Crossen, P. y Morgan, W. (1977) Analysis of Human Lymphocyte Cell Cycle Time in Culture Measured by Sister Chromatid Differential Staining. *Exp. Cell. Res.* 104: 453-457.
- 17.- Crossen, P. (1982) Variation in the Sensitivity of Human Lymphocytes to DNA-damaging Agents Measured by Sister Chromatid Exchange Frequency. *Hum. Genet.* 60: 19-23.
- 18.- Csukas, I., Gungl, E., Antoni, E., Vida, G. y Solymosy, F. (1981) Role of Metabolic Activation in the SCE-inducing Activity of Ethyl Carbamate (Urethane) and Vinyl Carbamate. *Mutat. Res.* 89: 75-82.
- 19.- Dobos, M., Schuler, D. y Fekete, G. (1974). Cyclophosphamide-induced Chromosomal Aberrations in Man-Tumours Patients. *Humangenetik*, 22: 221-227.
- 20.- Espinosa, A. (1981) Mutagenicidad de Hidroxinaftoato de Befenio, Difosfato de Cloroquina, Dehidroemetina y Pamoato de Pirvinio en Salmonella Typhimurium. Tesis Profesional Q.F.B. Facultad de Química, UNAM.
- 21.- Fabricant, J., Legator, M. y Adams, P. (1985) Post-meiotic Cell Mediation of Behaviour in Progeny of Male Rats Treated with Cyclophosphamide. *Mutat. Res.* 119: 185-190.
- 22.- Gebhart, E., Windolph, B. y Wopfner, F. (1980) Chromosome Studies on Lymphocytes of Patients Under Cytostatic Therapy. *Hum. Genet.* 56: 156-167.
- 23.- Gebhart, E., Losing, J., Mueller, R. y Windolph, B (1982) Interindividual Variation of Cytogenetic Damage by Cytostatic Therapy. *Mutagens in Our Environment* 1:89-98.

- 24.- Gibson,J. and Becker,B. (1968) Teratogenicity of Cyclophosphamide in Mice. *Cancer Res.* 28: 475-480.
- 25.- Gillette,J. (1976) Pharmacokinetic of Absortion, Distribution Metabolism and Excretion of Foreign Compounds. En: In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F., North Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- 26.- Goetz,P., Sram,R. y Dohnalowa,J. (1975) Relationship between Experimental Results in Mammals and Man. I Citogenetic Analysis of Bone Marrow Injury Induced by a Single Dose of CO. *Mutat. Res.* 31: 247-254.
- 27.- Greenberg,L. y Tanaka,K. (1964) Congenital Anormalies Probably Induced by Cyclophosphamide. *J.A.M.A.* 188: 423-426.
- 28.- Halles,B. (1982) Comparison of Mutagenicity and Teratogenicity of CP and its Active Metabolites 4-hidroxicyclophosphamide, Phosphamide Mustard and Acrolein. *Cancer Res.* 42: 3016-3021.
- 29.- Hampel,K., Kober,D., Rosch,H., Gerhartz,H. y Meining,K. (1966). The Action of Cytostatic Agents on the Chromosomes of Human Leukocytes in vitro. *Bood*, 27: 816-823.
- 30.- Hampel,K., Stopik,D. y Fritzsche,M. (1968) Cytogenetische Untersuchungen mit zwei N-substituierten Endoxana-brommlingen an menschlichen Leukocyten in vitro. I Dosis-wirkungs-Beziehungen. *Humangenetik*, 5: 321-334.
- 31.- Hill,D., Laster,Jr. y Struck,R. (1972) Enzymatic Metabolism of CP and Nicotine and Production of a Toxic CP-metabolite. *Cancer Res.* 32: 658-665.

- 32.- Inoue, K., Shibata, T., Misawa, S., Abe, T. y Kawai, K. (1980) Induction of SCE by Cyclophosphamide in Human Lymphocytes with Metabolic Activation. Proc. Japan Acad. 56: Ser. B 568-572.
- 33.- Iskandar, O. y Vijayalaxmi, E. (1980) The Enhancement of the Effect of AFB₁ by Metabolic Activation with Rat-Liver Microsomes on Human Lymphocytes Assayed with the Micronucleus Test. Mutat. Res. 91: 63-68.
- 34.- Jaju, M., Jaju, M. y Ahuja, Y. (1982) Effect of Cephaloridine on Human Chromosomes in vitro in Lymphocyte Cultures. Mutat. Res. 101: 57-66.
- 35.- Kreybig, T. (1965) The Action of Carcinogenic Dose of Methylnitrosourea on Embryonic Development of Rat. Z Krebsforsch. 67: 46-50.
- 36.- Kuroki, T., Malaveille, C., Devon, C., Piccolo, C., Maleod, M. y Selkirk, J. (1979) Critical Importance of Microsome Concentration in Mutagenic Assay with V79 Chinese Hamster Cells. Mutat. Res. 63: 259-272.
- 37.- La Du, B., Mandel, H. y Way, H. (1972) Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition. Williams & Wilkins Company. USA. P. 615.
- 38.- Madle, S. y Obe, G. (1977) In Vitro Testing of Indirect Mutagen (CP) with Human Leukocytes Culture. Activation with Liver Microsomes and Use of Dialysis Bag. Mutat. Res. 56: 101-104.
- 39.- Madle, S. y Obe, G. (1978) In Vitro Testing of an Indirect Mutagen (CP) with Human Leukocyte Culture. Activation by Non-Enzymatic Hydroxylation System (Uderfriend System). Mutat. Res. 49: 149-151.
- 40.- Madle, S., Westphal, D., Hilbig, V. y Obe, G. (1978) Testing in vitro of an Indirect Mutagen (CP) with Human Leukocyte Culture. Activation by Liver Perfusion and by Incubation with Crude Liver Homogenate. Mutat. Res. 51: 95-99.

- 41.- Madle, S. (1981) Evaluation of Experimental Parameters in an S9/human Leukocyte SCE Test with Cyclophosphamide. *Mutat. Res.* 85: 347-356.
- 42.- Malling, H. (1971) Dimethylnitrosamine; Formation of Mutagenic Compounds by Interaction with Mouse Liver Microsomes. *Mutat. Res.* 13: 425-429.
- 43.- Matsuoka, A., Hayashi, A. y Ishidate, M. (1979) Chromosomal Aberration Test on 29 Chemicals Combined with S9 Mix in vitro. *Mutat. Res.* 66: 277-290.
- 44.- Mills, F. (1955). The analysis of Variance. In *Statistical Methods*. Sir Isaac. Pitman & Sons. Ltd: 575-578.
- 45.- Moorhead, P., Nowel, P., Mellman, W., Battips, M. y Hungerford, D. (1960) Chromosome Preparations of Leukocytes Cultured from Human Peripheral Blood. *Exp. Cell. Res.* 20: 615-616.
- 46.- Morad, M y Zawahri, M. (1977) Non Random Distribution of Cyclophosphamide-induced Chromosome Brecks. *Mutat. Res.* 42: 125-130.
- 47.- Musilova, J., Michalova, K. y Urban, J. (1979) Sister Chromatid Exchange and Chromosomal Breakage in Patients Treated with Cytostatics. *Mutat. Res.* 67: 289-294.
- 48.- Nau, H., Spielmann, H., Lo Turco Mortler, C., Winkler, K., Riedel, L. y Obe, G. (1982) Mutagenic, Teratogenic and Pharmacokinetic Properties of Cyclophosphamide and some of its Deuterated Derivatives. *Mutat. Res.* 95: 105-118.
- 49.- Perry, P. y Wolff, S. (1974) New Giemsa Method for Differential Staining of Sister Chromatids. *Nature (London)* 261: 156-168.

- 50.- Perry, P. y Evans, H. (1975) Cytological Detection of Mutagen-Carcinogen Exposure by SCE. *Nature (London)* 258: 121-125.
- 51.- Preston, J., Au, W., Bender, M., Brewen, J., Carrano, A., Heddle, J., McFree, A., Wolff, S. y Wasson, S. (1981) *Mammalian in vivo and in vitro*. Cytogenetic Assays: A Report of the Gen Tox Program. *Mutat. Res.* 87: 143-188.
- 52.- Puri, H. y Cambell, R. (1977) Cyclophosphamide and Malignancy. *Lancet*, 18: 1306.
- 53.- Raposa, T. (1978) Sister Chromatid Exchange Studies for Monitoring DNA Damage and Repair Capacity After Cytostatic. *In Vitro and In Vivo* Lymphocytes of Leukaemic Patients Under Cytostatic Terapy. *Mutat. Res.* 57: 241-251.
- 54.- Richardson, C. y Wildgoose, J. (1982) An Assessment of Clastogenic Potential of 4-chloromethylbinhenyl in Human Lymphocytes *in vitro*. *Mutat. Res.* 100: 287-293.
- 55.- Sasaki, M. (1975) Is Fanconi's Anaemia Defective in a Process Essential to the Repair of DNA Cross Links. *Nature (London)*, 257: 501-503.
- 56.- Schmid, E. y Bauchinger, R. (1970) Inter und Intrachromosomale Verteilung von Cyclophosphamid-induzierten Chromosomendefekten Beim Menschen. *Mutat. Res.* 9: 417-424.
- 57.- Schuartzman, J., Postigo, P. y Gutierrez, C. (1979) Analysis of Visible Light-Induced SCE in BrdU-Substituted Chromosomes. *Chromosoma (Berl)*, 74: 317-328.

- 58.- Scudiero,D., Norin,A., Karran,P. y Strauss,B. (1976) DNA Excision Repair Deficiency of Human Peripheral Blood Lymphocytes Treated with Chemical Carcinogens. *Cancer Res.* 36: 1397-1403.
- 59.- Slater,E., Anderson,M. y Rosenkranz,S. (1971) Rapid Detection of Mutagens and Carcinogens. Diethylnitrosamine and Dimethylnitrosamine. *Cancer Res.* 31: 970-973.
- 60.- Stella,M., Montaldi,A., Rossi,R., Rossi,G. y Lewis,A. (1982) Clastogenic Effects of Chromium on Human Lymphocytes in vitro and in vivo. *Mutat. Res.* 101: 151-164.
- 61.- Stetka,D. y Wolff,S. (1976) SCE as an Assay for Genetic Damage Induced by Mutagen-Carcinogens. II in vitro test for Compounds Requiring Metabolic Activation. *Mutat. Res.* 41: 343-350.
- 62.- Stich,H. y Laisher,B. (1975) The Response of XP-cells and Controls to the Activated Mycotoxins, Aflatoxins and Sterigmatocystin. *Intl. J. Cancer* 16: 266-274.
- 63.- Takehisa,S. y Wolff,S. (1978) The Induction of SCE in Chinese Hamster Ovary Cells by Prolonged Exposure to 2-acetylaminofluorene and S9 Mix. *Mutat. Res.* 58: 103-106.
- 64.- Takehisa,S. y Kanaya,N. (1982) SCE Induction in Human Lymphocytes by Combined Treatment with Aniline and Norharman. *Mutat. Res.* 101: 165-172.
- 65.- Thust,R. y Kneist,S. (1979) Activity of Citrinin Metabolized by Rat and Human Microsome Fractions in Clastogenicity and SCE Assay on Chinese Hamster V79-E Cells. *Mutat. Res.* 67: 321-330.

- 66.- Tice, R., Schneider, E., Kram, D. y Thorne, P. (1979) Cytokinetic Analysis of the Impaired Proliferative Response of Peripheral Lymphocytes from Aged Humans to PHA. *J. Exp. Med.* 151: 1029-1041.
- 67.- Vijayalaxmie, E. y Evans, H. (1979) Induction of SCE in Human Lymphocytes and Chinese Hamster Cells Exposed to AFB₁ and N-methyl-N-nitrosourea. *Mutat. Res.* 67: 47-53.
- 68.- Vogel, E. (1975) Mutagenic Activity of CP, Trophosphamide and Isophosphamide in Drosophila melanogaster. Especific Induction of Recessive Lethals in the Absence of Detectable Chromosome. *Mutat. Res.* 33: 221-228.
- 69.- Weekes, U. y Brusick, D. (1975) In vitro Metabolic Activation of Chemical Mutagens. II The Relationships among Mutagen Formation, Metabolism and Carcinogenicity for Dimethylnitrosamine and Diethylnitrosamine in Liver, Kidneys and Lungs of BALB. c₁, C₅₇ BL/6J and RF/J mice. *Mutat. Res.* 31: 175-183.
- 70.- Weinstein, D., Katz, M. y Kazmer, S. (1977) Chromosomal Effects of Carcinogens on WI-38 After Short Term Exposures with and without Metabolic Activation. *Mutat. Res.* 46: 297-304.
- 71.- White, A. y Hesketh, L. (1980) A Method Utilizing Human Lymphocytes with in vitro Metabolic Activation for Assessing Chemical Mutagenicity by SCE Analysis. *Mutat. Res.* 69: 283-291.
- 72.- Wojciechowski, J., Kaur, P. y Sabharwal, P. (1981) Comparison of Metabolic Systems Required to Activate Pro-mutagens/carcinogens in vitro for SCE Studies. *Mutat. Res.* 88: 89-97.

- 73.- Wolff, S. y Takehisa, S. (1977) Induction of SCE in Mammalian Cells by Low Concentrations of Mutagenic Carcinogens that Require Metabolic Activation as well as those that do not. Progress in Genetic Toxicology. 193-200.
- 74.- Zhurkov, S. and Yakovenko, K. (1976) The Culture of Human Lymphocytes as a Test Subject for Evaluation of Mutagenic Activity of Chemicals. Mutat. Res. 41: 107-112.