

27

2 Ejm



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN**

**“ESTUDIO COMPARATIVO DE LA FRECUENCIA DE  
INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS EN  
LINFOCITOS HUMANOS Y DE BOS TAURUS  
EXPUESTOS A SUBSTANCIAS DE  
RECONOCIDA ACCION  
MUTAGENICA”**

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A N :

**EVA RAMIREZ ARROYO  
ANA ROSA RINCON SANCHEZ**

Director de la Tesis  
DR. OSVALDO M. MUTCHINICK B.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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>Página</i>
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
III. OBJETIVOS	7
IV. GENERALIDADES	8
V. MATERIAL Y METODOS	14
VI. RESULTADOS	24
VII. DISCUSION	39
VIII. CONCLUSIONES	41
IX. BIBLIOGRAFIA	42

## RESUMEN

La contaminación ambiental en áreas urbanas y rurales representa en la actualidad uno de los mayores riesgos para la salud del hombre. Ciertos estudios han demostrado el efecto mutagénico de diferentes sustancias químicas.

Con el propósito de investigar el efecto mutagénico en un mamífero y compararlo con el hombre, se decidió estudiar la respuesta de los linfocitos de bovino y de humano expuestos *in vitro* a diferentes dosis de Etil Metano Sulfonato (EMS) y Mitomicina C (MMC), por medio del análisis de la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH).

Los resultados muestran una respuesta similar en ambas especies, siendo más marcada para la MMC que para el EMS; encontrándose también en ambas especies y para cada droga una clara relación dosis-respuesta.

## INTRODUCCION

En la actualidad la contaminación ambiental representa un problema creciente para la salud del hombre, debido a la producción y utilización masivas de sustancias químicas que se han creado para mejorar las condiciones de vida(1). Dentro de éstas, los pesticidas representan un grupo de sustancias químicas de reconocido riesgo potencial para la salud humana.

Se define como pesticida a "cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a preservar, destruir, rechazar o mitigar cualquier plaga (insecto, roedor, nemátodo, hongo, maleza u otra forma de planta terrestre o acuática o vida animal o virus, bacteria u otro microorganismo, excepto los que estén sobre o en el hombre) y cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas para un uso regulador de la planta" (2). Estas reciben diferentes nombres genéricos, dependiendo de la variedad sobre la cual actúan: plaguicidas, herbicidas, insecticidas, fungicidas y fertilizantes.

Estos productos químicos no presentan una acción selectiva sobre la especie que afectan sino al contrario, son sustancias con un espectro de acción muy amplio que

provocan cambios sobre todos los componentes del ecosistema en el que son aplicados, afectando también al hombre, ya que forma parte del mismo (3). Las sustancias empleadas en la agricultura pueden provocar diferentes tipos de daño: para el DDT se encontró un incremento de dominantes letales sobre los estados de espermatida temprana y espermatocito, no disyunción de los cromosomas X y Y en espermatocitos de ratón (4), rupturas de cromosomas en raíces de Allium cepa (5), inhibición de la proliferación y aberraciones cromosómicas estructurales (ACE) en cultivos de hamster chino (6). El ácido arsénico utilizado como defoliante, muestra un efecto mutagénico en líneas celulares humanas (7). Ciertos pesticidas del tipo de los organomercuriales como el etil mercurio induce un marcado incremento de recesivos letales en Drosophila (8); el metil mercurio interfiere en la formación del huso mitótico causando defectos en la distribución cromosómica de plantas (9,10), linfocitos humanos (11) y otros cultivos de tejido humano tratados *in vitro* (12). En linfocitos de sujetos con altas concentraciones de mercurio en la sangre, se encontró una correlación entre el número de rupturas cromosómicas y la concentración de mercurio (13).

Los compuestos organofosforados no son mutagénicos en sistemas de prueba bacterianos como los de E. coli (14-18), Bacillus subtilis (17,18), Salmonella typhimu -

rium [17,18] y Saccharomyces cerevisiae [16,17]; pero producen rupturas en plásmidos de E. coli [19,20] e inducen dominantes letales solo a concentraciones altas, sin encontrarse intervalo de esterilidad en los machos [21, 22]. El Diclorvos actúa como agente alquilante del DNA *in vitro*, comportándose del mismo modo que el Metil Meta no Sulfonato [23]. El Malatión produce micronúcleos [27] y aberraciones cromosómicas en ratón [25], y muestra un incremento en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en fibroblastos humanos fetales [26]. Los fungicidas Captan y Folpet son mutagénicos en sistemas de prueba bacterianos [17,18,27,28], pero no son en *Drosophila* [29,30]; tampoco probaron ser teratogénicos en diferentes especies como ratones [22,31], ratas albinas [32] hamster [32,33] y conejos [32,34,35]. aunque es esta última especie Captan a dosis mayores causó malformaciones - en la cría [35]; también fué mutagénico en células de hamster chino [36], e incrementó la frecuencia de ICH en linfocitos humanos *in vitro* [37].

Los estudios epidemiológicos sobre los efectos tóxicos son también de gran utilidad, pero desafortunadamente son casos y limitados, requiriendo mucho tiempo para ver resultados en la descendencia [38]. Sin embargo hay algunos casos reportados de intoxicaciones accidentales de individuos [39-44] y por exposición ocupacional [45, 46].

No obstante que se sabe que son tóxicos y que algunos de ellos han mostrado ser mutagénicos en más de un sistema, solo algunos se han prohibido, los demás se siguen usando indiscriminadamente, incluyendo los nuevos productos con diversas combinaciones de los mismos para abarcar un espectro más amplio. Por todo lo anterior es importante establecer sistemas de monitoreo para la detección de sustancias que puedan representar un riesgo biológico directo para el hombre e indirecto a través de aquellos organismos que forman parte de su ecosistema y que a la vez pertenecen a su cadena alimenticia.

Tomando en consideración lo expresado previamente se decidió realizar el presente estudio, que tiene como finalidad investigar si ciertos mamíferos que comparten determinados hábitats con el hombre, y que al mismo tiempo pueden acumular niveles tóxicos de estas sustancias en sus productos derivados, podrían ser utilizados como "organismos centinela" para detectar el posible daño biológico capaz de ser inducido por agentes químicos. A tal efecto, se seleccionaron a los bovinos (Bos taurus) como especie a estudiar.

Si bien el estudio más apropiado hubiera sido comparar directamente in vivo, en el hombre y en el bovino, el efecto mutagénico de compuestos utilizados usualmente



en la agricultura, como los plaguicidas, herbicidas, insecticidas, fungicidas y fertilizantes; se considera que previamente debe conocerse la respuesta *in vitro* de las células del animal seleccionado expuestas a sustancias de reconocido efecto mutagénico y comparar ésta con células humanas.

## OBJETIVOS

*Determinar el efecto mutagénico inducido por el Etil Metano Sulfonato (EMS) y la Mitomicina C (MMC) en linfocitos de bovino y humano por medio del análisis de las frecuencias de intercambios de cromátidas hermanas.*

*Comparar el efecto producido por estas sustancias - en los linfocitos de ambas especies.*

## GENERALIDADES

### INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (ICH)

Los sistemas de prueba que más se utilizan para estudiar efecto mutagénico en el hombre son: el análisis de ACE y la frecuencia de ICH; el primero es un método sensible para medir el efecto de radiaciones ionizantes y el segundo, en general más sensible para medir el daño inducido por sustancias químicas.

El primero en describir los ICH fue Taylor (47), qui en por medio de la técnica de autorradiografía estudiaba la organización y duplicación de los cromosomas de plantas (48). El detectó una marcación diferente de las cromátidas hermanas cuyas células habían crecido en presencia de timidina tritiada por un ciclo de replicación, incorporando el isótopo en su DNA, seguido por un ciclo en ausencia del mismo. Las autorradiografías mostraban que una cromátida estaba marcada, propio de una replicación semiconservativa del DNA, pero ocasionalmente intercambios simétricos entre las cromátidas fueron observados y Taylor llamó a éstos "Intercambios de Cromátidas Hermanas" (ICH) (47).

La técnica autorradiográfica empezó a ser utilizada para detectar ICH en cromosomas de animales (49-51), sin

embargo, muchos investigadores reportaron que la frecuencia de ICH era incrementada por la propia radiación del isótopo usado (52-56); por otro lado, la técnica empleaba mucho tiempo y su resolución no era muy buena ni permanente, desventajas que la convirtieron en una técnica poco confiable. Más tarde se utilizó un análogo de la timidina, la 5-Bromodeoxiuridina (BrdU) (57,58), probándose además otros análogos halogenados como la 5-Iododeoxiuridina (IdU) (57,58), la 5-Fluorodeoxiuridina (FdU) (58) y la 5-Clorodeoxiuridina (ClDU) (58,59) de los cuales el átomo de bromo se acerca más al radio de Van der Waals que ocupa el grupo metilo en la posición 5 de la timidina (58). El análogo se incorpora en el DNA y después de dos ciclos de replicación, la diferencia de contenido de BrdU entre las dos cromátidas podía ser detectada al teñirse con Giemsa (54), sin embargo, esta diferenciación no era suficiente para una cuenta exacta de los intercambios. Mas adelante se encontró que después de la incorporación de BrdU, se podía observar una gran diferencia en intensidad de la fluorescencia entre las cromátidas hermanas, si las preparaciones eran teñidas con un colorante fluorescente empleándose la Bisbenzimidida o Hoechst 33258 (60-67), o Naranja de Acridina (66-69), teniendo que ser examinadas en un microscopio de fluorescencia. Posteriormente, Perry y Wolff (70) desarrollaron un nuevo método con una muy buena resolución, que consistía en colorear las láminas con un fluo

rocromo Hoechst 33258, incubar las mismas en un buffer - neutro o en agua, exponer a continuaci3n a la excitaci3n de la luz UV y finalmente teñir con Giemsa. Con esta t3c - nica la crom3tida que incorpor3 en ambas hebras de la ca - dena de DNA el an3logo fluoresce m3s p3lido y se tiñe tam - bi3n m3s p3lido con Giemsa, mientras que la otra crom3ti - da en la cual solo una hebra ha incorporado la BrdU fluo - resce m3s intensamente y tambi3n se tiñe m3s intensamente con Giemsa. Este m3todo tiene la ventaja de producir pre - paraciones citol3gicas permanentes que pueden ser vistas en el microscopio de luz ordinaria.

La tinci3n diferencial tambi3n puede ser producida - por colorantes fluorescentes como naranja de acridina (71) y 4'6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (72), y por m3todos alternativos que usan 3cidos (73) bases (74) y calor (75); as3 como por t3cnicas inmunol3gicas que utilizan anticuer - pos contra la BrdU (76).

Se ha observado que la BrdU induce ICH (77,78) aun - que este efecto puede ser minimizado si se trabaja con - concentraciones bajas (79-83). As3 mismo si el DNA que - ha incorporado BrdU es expuesto a la luz, 3ste puede foto - activarse e incrementar la frecuencia de ICH (70,80), por - lo que se recomienda mantener los cultivos todo el tiempo de su crecimiento en la obscuridad.

Se ha observado que los ICH son inducidos por una gran variedad de productos químicos a dosis subtóxicas (79, 81, 84-87), constatándose así mismo una clara relación dosis-respuesta tanto *in vivo* (88-92) como *in vitro* (93, 94). Estos hallazgos llevaron a ciertos autores a proponer esta prueba para la detección de mutágenos y carcinógenos ambientales (79, 86, 93, 95). Si bien no se conoce claramente un modelo comprensible que describa el mecanismo de producción de ICH, existen trabajos que muestran que los mismos son indicadores de daño al DNA (79, 86, 93). Carrano (96) encuentra un paralelismo entre la frecuencia de mutaciones puntuales e ICH en células de hamster chino, y a su vez una relación lineal dosis-respuesta en ambas pruebas. Trabajos posteriores confirmaron los resultados de Carrano (97-99). Y otros investigadores demostraron una relación lineal entre la alquilación de bases específicas de DNA y la inducción de ICH en células de hamster chino (100); la misma correlación se observó entre alquilación y mutaciones puntuales en la misma línea celular (101).

### MITOMICINA C (MMC) Y ETIL METANO SULFONATO (EMS)

La MMC y el EMS son inductores de ICH y difieren en su modo de interacción con el DNA.

La MMC es un antibiótico aislado de Streptomyces - caesпитosus, y es un poderoso agente alquilante bifuncional que alquila la Guanina (102, 103) probablemente en la posición del O<sup>6</sup> (104). Este compuesto se une al DNA produciendo uniones cruzadas (cross-links) entre las hebras del mismo, a través de un enlace covalente, siendo esta unión dependiente de la composición de las bases del DNA (105, 106). Se demostró también que es un tóxico selectivo en la proliferación de células intactas, efecto que es mediado por la inhibición de la síntesis de DNA (107, 110).

El EMS es un agente alquilante monofuncional que etila la Guanina en el N<sup>7</sup> (111, 112) y el O<sup>6</sup> (111-113), con una relación entre los dos mecanismos de 33 a 1 (114, 115).

Ambas drogas son mutagénicas en diferentes sistemas de prueba (97, 98, 116, 128), inducen un marcado incremento en la frecuencia de ICH en células de animales tratadas *in vivo* e *in vitro* (77, 79, 84, 129-139) y a concentraciones mayores inducen ACE en los mismos sistemas de prueba (79,

130, 136, 139-143) produciendo ambas substancias un marcado efecto en las regiones heterocromáticas (138, 144-147).

Ciertos autores observaron que la frecuencia de ICH inducida por la MMC es más elevada en las regiones de heterocromatina constitutiva de Microtus agrestis (148), la heterocromatina facultativa humana (149), así como en las uniones de las regiones eucromáticas y heterocromáticas de Indian muntjac (150). En cambio, en relación con el EMS las opiniones son contradictorias, una distribución al azar de los ICH (151) y una alta frecuencia en las regiones eucromáticas en cromosomas de hamster chino (138).

Cabe mencionar que la diferencia en el sitio de alquilación al DNA que muestran ambas drogas es un factor importante, ya que se ha mostrado que la alquilación en el  $O^6$  es un evento mutagénico (152-155), mientras que cambios en la posición del  $N^7$  no son mutagénicos a nivel de transcripción (156).



## MATERIAL

Los grupos que se seleccionaron para el estudio estuvieron integrados por 5 humanos, todos ellos varones con edades entre los 20 y 60 años, y por 5 bovinos, todos ellos hembras pertenecientes a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Los individuos seleccionados además de estar clínicamente sanos, tenían que cumplir con los siguientes requisitos: no haber tomado medicamentos, padecido alguna enfermedad viral, ni haber estado expuesto a algún tipo de radiación por lo menos durante los tres meses anteriores a la toma de la muestra. Para la selección de los bovinos se trataron de seguir similares criterios.

De cada individuo se obtuvo una muestra de 10 ml de sangre periférica en jeringas heparinizadas, de las personas por punción de la vena antecubital y de las vacas de la vena yugular o caudal. La obtención de las muestras se realizó con los máximos cuidados para preservar la esterilidad de las mismas y de inmediato fueron trasladadas al laboratorio para la siembra de los cultivos de linfocitos de ambas especies.

## METODOS

## I. CULTIVO DE LINFOCITOS

En cada frasco de cultivo se colocó:

- a. 4.25 ml de medio cultivo RPMI 1640
- b. 0.2 ml de fitohemaglutinina M
- c. 5-bromodeoxiuridina (BrdU) a razón de 5 microgramos por mililitro de cultivo.
- d. 0.3 ml de sangre total.

Se mezcló suavemente y se incubó a 37°C por 48 hrs. - noventa minutos antes de cumplido este tiempo se colocó en cada frasco colchicina, para una concentración final de 0.02 mg/ml.

Todos los cultivos se realizaron por duplicado y bajo condiciones de esterilidad; durante el periodo de incubación los frascos estuvieron siempre protegidos de la exposición a la luz, para evitar la inducción de ICH que la misma produce.

Los linfocitos de ambas especies fueron expuestos a diferentes concentraciones de Mitomicina C (MMC) y Etil-Metano-Sulfonato (EMS) durante las últimas 24 hrs, del cultivo.

Para cada una de las muestras se realizaron nueve cultivos diferentes:

- a. Un cultivo testigo ( sin droga )
- b. Cuatro cultivos con diferentes concentraciones de MMC (2.5; 5.0; 7.5 y  $10 \times 10^{-8} M$ )
- c. Cuatro cultivos con diferentes concentraciones de EMS (0.5; 1.0; 1.5 y  $2.0 \times 10^{-3} M$ )

NOTA: Como se desconocía la duración del ciclo celular de los linfocitos de bovino, se efectuaron cultivos preliminares para optimizar las condiciones de los mismos, encontrándose que al igual que el humano, el mejor tiempo de incubación para obtener un mayor número de metafases de segunda división *in vitro* era de 48 hrs.

Los rangos de las dosis utilizadas para las drogas, - se establecieron en base a los datos comunicados en la literatura (85, 63, 133, 134) y en experimentos realizados - previamente en el laboratorio con el propósito de verificar las dosis tóxicas que inhibían el crecimiento apropiado de los cultivos.

## II. COSECHA.

1. El contenido de los frascos se pasó a tubos de centrífuga cónicos de 15 ml.
2. Se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min.
3. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 5 ml. de solución hipotónica de KCl 0.075 M.
4. Se incubó a 37°C por 30 min. en baño maría.
5. Se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min.
6. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 5 ml. de fijador.
7. Se dejó reposar 20 min. a temperatura ambiente.
8. Se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min.
9. Se desechó el sobrenadante y se lavó 2 veces con fijador.
10. Después de retirarse el sobrenadante del último lavado, se adicionaron 0.5 ml. de fijador y se hicieron las laminillas de prueba.
11. Estas se analizaron al microscopio en contraste de fases, con un objetivo de 16x, para observar el crecimiento celular y la dispersión de los cromosomas.

Los cultivos seleccionados se codificaron antes del análisis, con la finalidad de realizar un estudio ciego de las diferentes preparaciones.

### III. TINCIÓN DIFERENCIAL

1. Las preparaciones se tiñeron con una solución de Hoechst 33258 a una concentración de 0.5 microgramos por mililitro de agua destilada durante 20 min.
2. Se lavaron en agua corriente, se secaron y se montaron en buffer de Sorensen a pH 6.8, colocándose un cubreobjetos evitando hacer presión sobre el portaobjetos.
3. Se expusieron durante 1.5 a 2 hrs. a una fuente de luz negra, quedando las preparaciones a una distancia de 3 cm. de la fuente.
4. Se desmontaron con agua corriente y se secaron.
5. Se tiñeron con Giemsa 1:10 a pH 7 durante 1 a 3 min.

#### IV. ANALISIS CITOGENETICO

El análisis de la frecuencia de ICH en los cultivos - testigo y en los cultivos expuestos a las diferentes concentraciones de MMC y EMS, se realizó en 25 metafases correspondientes a segundas divisiones *in vitro*.

#### V. CRITERIOS DE SELECCION DE METAFASES

1. Que presentaran una buena tinción diferencial de cromátidas.
2. Que tuvieran el número completo de cromosomas; 46 para el humano y 60 para el bovino.
3. Que presentaran una buena dispersión cromosómica para facilitar el análisis de los ICH.

#### VI. RECUENTO DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS

De acuerdo con los criterios aceptados para el análisis de ICH se consideró como 1 ICH aquel que involucra una sola rotura y como 2 ICH el de tipo intersticial, que implica dos roturas.

## SOLUCIONES Y REACTIVOS UTILIZADOS

### MEDIO DE CULTIVO

Medio RPMI 1640 con L-Glutamina, marca GIBCO.

### ANTIBIOTICOS

Se adicionan 10,000 UI de penicilina y 20 mg de estreptomina por cada 100 ml de medio de cultivo.

### SOLUCION DE 5-BROMODEOXIURIDINA

Se prepara una solución de 5-bromodeoxiuridina a una concentración de 0.1 mg/ml en agua destilada, la cual se esteriliza por filtración o autoclave. Esta solución debe mantenerse protegida de la luz.

### SOLUCION DE COLCHICINA

Se prepara una solución de colchicina a una concentración de 0.2 mg/ml en agua destilada, esterilizándose por filtración.

### SOLUCION HIPOTONICA

Se prepara una solución de cloruro de potasio (KCl) - 0.075 M, la cual se obtiene al disolver 5.5917 g de KCl en un litro de agua destilada.

### FIJADOR

Se utiliza una solución de Carnoy, que se prepara con metanol y ácido acético glacial en una relación de 3:1.

### SOLUCION DE BISBENZIMIDA (HOECHST 33258).

Se prepara una solución madre de Hoechst 33258 a una concentración de 0.1 mg/ml en agua destilada. La solución de tinción se prepara a partir de la solución madre hasta obtener una concentración de 0.5 microgramos por ml. La solución madre se conserva refrigerada y protegida de la exposición a la luz.



### BUFFER DE SORENSEN

Se preparan dos soluciones: solución A y solución B.

#### Solución A

Se disuelven 9.47 g de fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) en un litro de agua destilada.

#### Solución B

Se disuelve 9.08 g de fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) en un litro de agua destilada.

Se mezclan volúmenes iguales de las soluciones A y B para obtener el pH de 6.8.

### ETIL METANO SULFONATO (EMS)

P.M. = 124.2

Se preparan dos soluciones de EMS a diferentes concentraciones,  $10^{-1}$  M y  $10^{-2}$  M en agua destilada, las cuales se esterilizan por filtración.

Volúmenes variables de estas soluciones se adicionan a los cultivos para obtener las concentraciones deseadas de la droga, siendo los volúmenes de 0.25, 0.5 y 0.75 ml de EMS  $10^{-2}$  M y 0.1 ml de EMS  $10^{-1}$  M.

## MITOMICINA C (MMC)

P.M. = 334.184

Se prepara una solución de MMC  $10^{-6}$  M en agua destilada, la cual se esteriliza por filtración.

Volúmenes variables de esta solución se adicionan a los cultivos para obtener las concentraciones deseadas de la droga, siendo los volúmenes de 0.125, 0.25, 0.375 y 0.5 ml.

## RESULTADOS

El tamaño de la muestra que se propuso inicialmente de 5 individuos, se redujo a 4 en algunos casos, debido a la dificultad que se tuvo para obtener un buen crecimiento en todos los cultivos de una misma muestra. La causa principal fué la inhibición del crecimiento provocada por las drogas a las concentraciones más altas. Aún con esta reducción, el número de muestras analizadas excede el número mínimo recomendado (157). Las muestras de sangre utilizadas, a excepción del caso 1 que se usó tanto con el EMS como con la MMC, fueron de individuos diferentes.

En las tablas 3 y 6 se muestran los promedios de las frecuencias de ICH inducidos con el EMS y la MMC respectivamente, así como la desviación estandar de los promedios de los individuos analizados. Los datos correspondientes al promedio y desvío estandar de cada una de las muestras de los individuos estudiados en relación a la exposición a ambas drogas se presentan en las tablas 1, 2, 4, 5.

La tabla 3 muestra las frecuencias de ICH a las diferentes concentraciones de EMS utilizadas. La frecuencia

de 6.6 ICH/metáfase (ICH/m) observada en los cultivos testigos de linfocitos humanos se incrementó a 44.7 en los cultivos expuestos a la dosis más alta. Mientras que la frecuencia en los linfocitos de bovino aumentó de 6.8 a 39.6 ICH/m.

En la tabla 6 se puede observar la frecuencia de ICH a las dosis empleadas de MMC. La frecuencia de ICH/m en linfocitos humanos se incrementó de 7.1 ICH observados - en los cultivos testigo a 29.4 en aquellos expuestos a la dosis más alta de esta droga. La respuesta observada en los cultivos de linfocitos de bovino mostró, un aumento de 6.8 ICH/m en los cultivos testigo a 27.6 en los cultivos expuestos a la dosis más alta.

Una visualización más gráfica de los datos que aparecen en las tablas se muestra en las figuras 1 y 2, elaboradas con los datos de las mismas. Las curvas ponen en evidencia un marcado paralelismo en el incremento de la frecuencia de ICH/m entre ambas especies.

Las figuras 3 y 4, muestran una metafase de linfocitos humanos y otra de bovino correspondientes a cultivos no expuestos, siendo el número de ICH en cada una de ellas - de 5 y 6 respectivamente. En las figuras 5 y 6, se muestran dos metafases correspondientes a cultivos expuestos a las drogas utilizadas observándose de 20 ICH en la -

metafase correspondiente al linfocito humano y de 56 ICH en la metafase del linfocito de bovino.

Otro hallazgo que llamó la atención fué el tamaño y la localización de los ICH. Los ICH de tipo intersticial observados en presencia de EMS en los cromosomas de bovino, fueron de un tamaño mucho menor que los que se observaron en los cromosomas humanos. En relación a la localización los ICH inducidos con MMC en los cromosomas de bovino ocurrieron muy cercanos al centrómero y muy distales al mismo, en cambio en los cromosomas humanos estaban homogéneamente distribuidos.

Por último, también se observó que el EMS y la MMC, indujeron aberraciones cromosómicas estructurales simples y complejas, siendo su número mayor en los cultivos expuestos a las concentraciones más altas de estas drogas.

TABLA 1. PROMEDIOS Y DESVIOS ESTANDAR DE LAS FRECUENCIAS DE ICH EN LINFOCITOS HUMANOS EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EMS.

HUMANO	TESTIGO	$0.5 \times 10^{-3}M$	$1.0 \times 10^{-3}M$	$1.5 \times 10^{-3}M$	$2.0 \times 10^{-3}M$
1	8.0 (2.9)	16.7 (3.1)	19.5 (3.8)	26.2 (5.6)	28.4 (4.8)
6	7.4 (3.1)	19.8 (3.9)	27.9 (5.5)	36.1 (9.3)	54.5 (7.0)
7	5.8 (2.4)	18.7 (3.8)	32.2 (4.0)	46.7 (10.3)	53.0 (11.2)
8	5.3 (2.0)	16.4 (3.6)	29.2 (5.0)	35.4 (7.8)	42.7 (4.8)

ENTRE PARENTESIS DESVIO ESTANDAR

TABLA 2. PROMEDIOS Y DESVIOS ESTANDAR DE LAS FRECUENCIAS DE ICH EN LINFOCITOS DE BOVINOS EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EMS.

BOVINO	TESTIGO	$0.5 \times 10^{-3}M$	$1.0 \times 10^{-3}M$	$1.5 \times 10^{-3}M$	$2.0 \times 10^{-3}M$
1	5.0 (2.0)	15.0 (3.3)	26.4 (5.4)	37.6 (7.8)	46.4 (5.0)
2	7.8 (3.7)	10.0 (3.8)	9.4 (3.5)	35.1 (7.7)	38.7 (8.6)
3	5.8 (2.0)	7.0 (2.6)	19.0 (5.1)	30.5 (5.4)	35.5 (5.8)
4	8.6 (2.9)	9.8 (2.9)	26.1 (4.6)	31.8 (6.2)	38.9 (6.2)

ENTRE PARENTESIS DESVIO ESTANDAR

TABLA 3. PROMEDIOS Y DESVIOS ESTANDAR DE LAS FRECUENCIAS DE ICH EN CULTIVOS DE LINFOCITOS EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETIL METANO SULFONATO.

ESPECIE	TESTIGO	$0.5 \times 10^{-3}M$	$1.0 \times 10^{-3}M$	$1.5 \times 10^{-3}M$	$2.0 \times 10^{-3}M$
HUMANA	6.6	17.9	27.2	36.1 **	44.7 ***
N=4	(1.3)	(1.6)	(5.4)	(8.4)	(12.0)
BOVINA	6.8	10.4	20.2 ****	33.8	39.6
N=4	(1.7)	(3.4)	(8.0)	(3.2)	(4.8)

\*\*92, \*\*\*73, \*\*\*\*94 CELULAS ANALIZADAS RESPECTIVAMENTE  
 ENTRE PARENTESIS DESVIO ESTANDAR



TABLA 4. PROMEDIOS Y DESVIOS ESTANDAR DE LAS FRECUENCIAS DE ICH EN LINFOCITOS HUMANOS EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MMC.

HUMANO	TESTIGO	$2.5 \times 10^{-8}M$	$5.0 \times 10^{-8}M$	$7.5 \times 10^{-8}M$	$1.0 \times 10^{-7}M$
1	8.0 (2.9)	12.5 (3.3)	21.8 (5.2)	23.2 (6.2)	35.5 (8.5)
2	5.0 (2.1)	12.4 (3.2)	15.8 (3.4)	22.2 (4.8)	28.2 (4.2)
3	7.8 (2.8)	10.8 (3.7)	19.2 (4.8)	26.2 (5.7)	27.8 (6.4)
4	7.6 (3.1)	16.0 (5.1)	19.5 (5.6)	26.6 (4.4)	24.4 (5.4)
5	7.2 (2.5)	15.0 (2.3)	20.2 (4.2)	23.8 (4.7)	31.0 (4.8)

ENTRE PARENTESIS DESVIO ESTANDAR

TABLA 5. PROMEDIOS Y DESVIOS ESTANDAR DE LAS FRECUENCIAS DE IGH EN LINFOCITOS DE BOVINOS EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MMC.

BOVINO	TESTIGO	$2.5 \times 10^{-8}M$	$5.0 \times 10^{-8}M$	$7.5 \times 10^{-8}M$	$1.0 \times 10^{-7}M$
1	5.0 (2.0)	14.5 (3.4)	21.5 (6.3)	33.6 (5.8)	33.6 (7.3)
2	7.8 (3.4)	12.8 (4.6)	16.0 (3.6)	20.7 (8.0)	19.4 (5.0)
3	5.8 (2.0)	13.5 (2.5)	15.4 (3.2)	16.2 (4.7)	22.9 (5.1)
4	8.6 (2.9)	17.7 (3.7)	26.6 (6.1)	33.1 (8.2)	34.6 (13.1)

ENTRE PARENTESIS DESVIO ESTANDAR

TABLA 6. PROMEDIOS Y DESVIOS ESTANDAR DE LAS FRECUENCIAS DE ICH EN CULTIVOS DE LINFOCITOS EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MITOMICINA C.

ESPECIE	TESTIGO	$2.5 \times 10^{-8} M$	$5.0 \times 10^{-8} M$	$7.5 \times 10^{-8} M$	$1.0 \times 10^{-7} M$
HUMANA	7.1	13.3	19.3	24.4	29.4
N=4	(1.2)	(2.1)	(2.2)	(1.9)	(4.1)
BOVINA	6.8	14.6	19.9	25.7	27.6
N=4	(1.7)	(2.2)	(5.3)	(8.9)	(7.6)

ENTRE PARENTESIS DESVIO ESTANDAR

FIG. I FRECUENCIA DE ICH A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETIL-METANO - SULFONATO

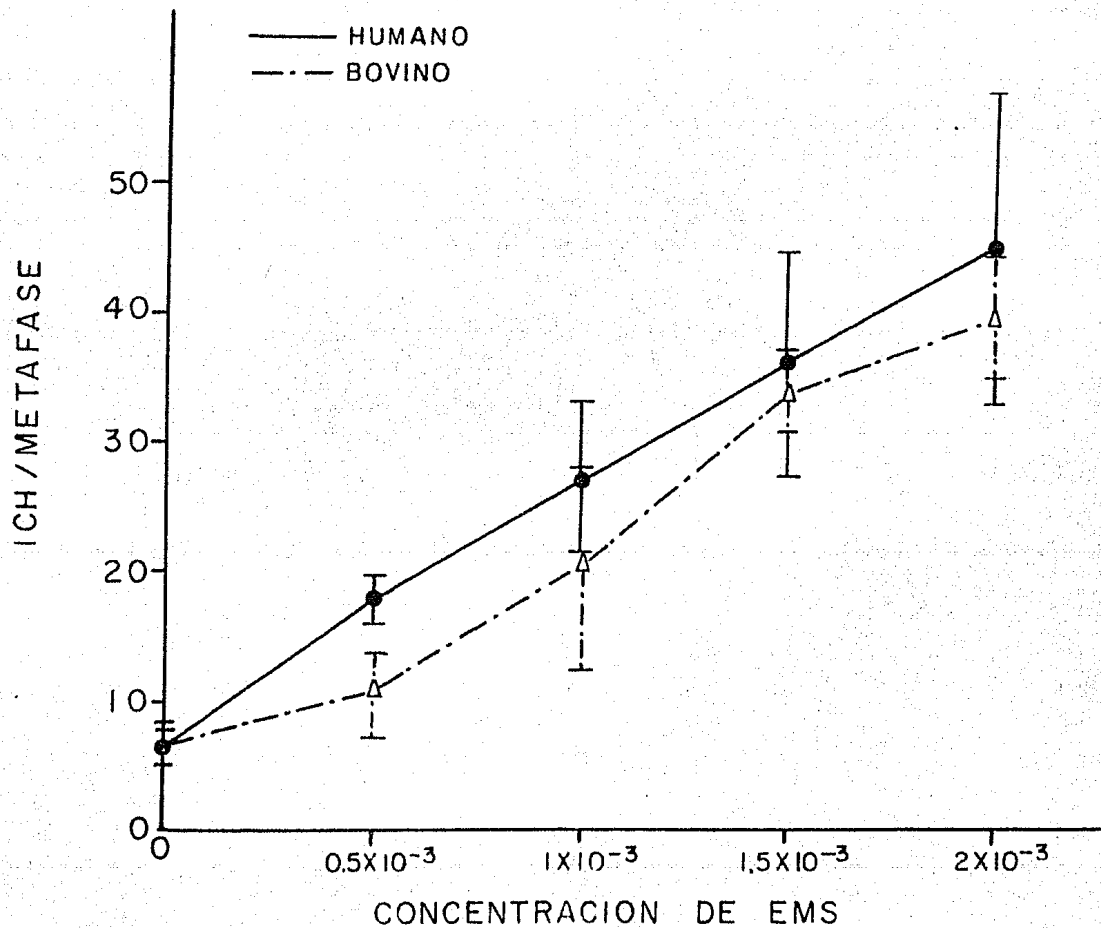
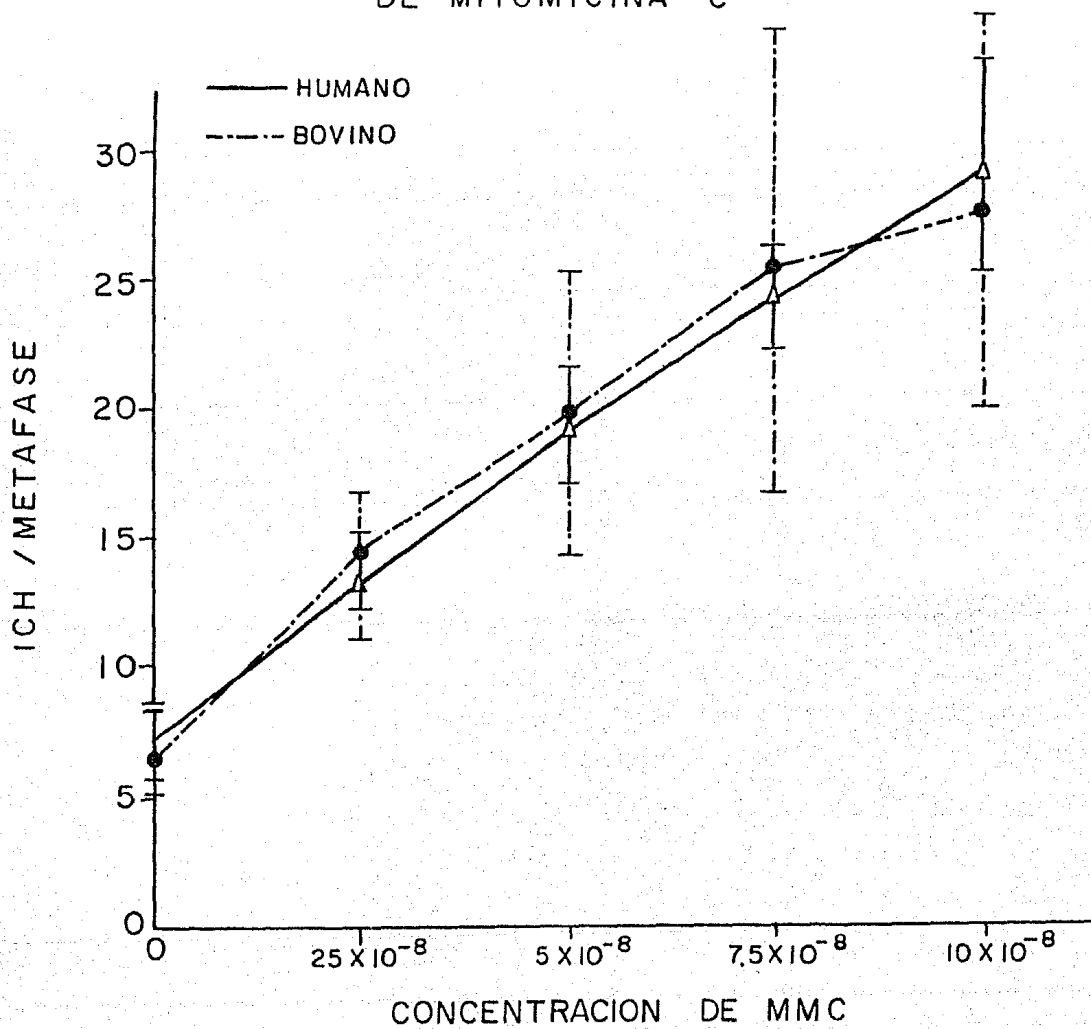


FIG. 2 FRECUENCIA DE ICH A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MITOMICINA C





*Figura 3. Metafase correspondiente a un cultivo de linfocitos humanos no expuesto, en la misma se observan 5 ICH.*

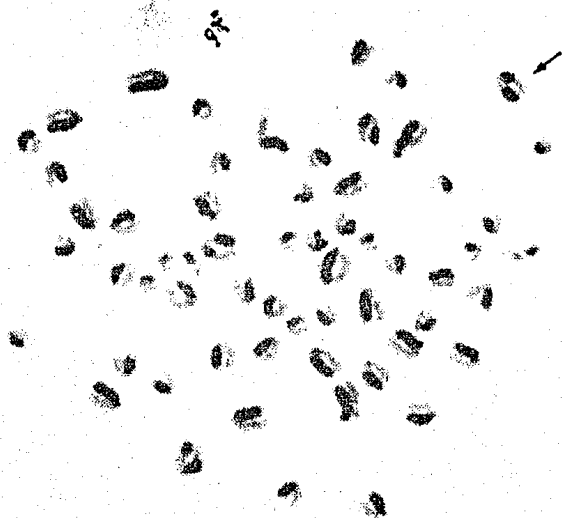


Figura 4. Metafase correspondiente a un cultivo de linfocitos de bovino no expuesto, en la misma se observan 6 ICH. La flecha marca un ICH sencillo.



Figura 5. Metafase correspondiente a un cultivo de linfocitos humanos expuesto a MMC a la concentración de  $7.5 \times 10^{-8} M$ , en la misma se observan 20 ICH. La flecha marca un ICH intersticial.



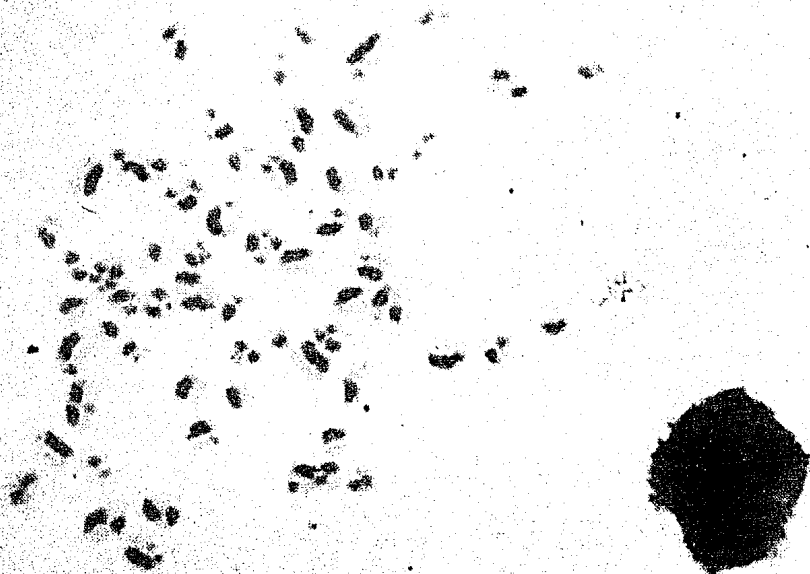


Figura 6. Metafase correspondiente a un cultivo de linfocitos de bovino expuestos a EMS a la concentración de  $1.5 \times 10^{-3} M$ , en la misma se observan 56 ICH.

## DISCUSION

Los resultados obtenidos concuerdan con la respuesta lineal observada previamente en otros sistemas de prueba usando EMS (96,127) y MMC (96,129); respuesta que fué muy similar para ambas especies, lo cual se puede observar desde las frecuencias obtenidas en los cultivos testigo, que corresponden a las frecuencias basales, y las frecuencias de los cultivos a las concentraciones más altas de las drogas empleadas.

A pesar de que el número y la forma de los cromosomas en ambas especies es diferente, las frecuencias basales obtenidas fueron muy similares, de 6.6-7.1 ICH/m promedio en linfocitos de bovino (tablas 1-6). Esta observación estaría de acuerdo con el hecho de que la frecuencia basal de ICH/m está en parte relacionada con la cantidad de DNA presente, siendo en este caso muy semejante en ambas especies (158).

El paralelismo observado en la frecuencia de ICH/m para el EMS, figura 1, es menos evidente que el que se encontró con la MMC, figura 2, debido probablemente a la inestabilidad que presenta el EMS en soluciones acuosas diluidas, resultando en una vida media menor (99,120,159)

que la que posee la MMC (160). Este factor tuvo una mayor influencia en los cultivos de linfocitos de bovino, ya que la dificultad en la obtención de las muestras provocó un retraso en la utilización de las soluciones de EMS.

Si bien se tiene un número semejante de ICH/m en ambas especies para una misma droga, las características de tamaño y localización de los mismos difiere. En cuanto al tamaño de los ICH observados de manera general, son más pequeños en los cultivos de linfocitos expuestos a EMS que a MMC, debido probablemente, tanto a la diferencia en el tamaño de las moléculas, como en el mecanismo de acción de ambas drogas. Con respecto a la distribución se encontró una mayor cantidad de ICH en las zonas centroméricas de los cromosomas de bovino expuestos a MMC, hecho que no se observó en los cromosomas humanos, Estos hallazgos estarían de acuerdo con el hecho de que la MMC produce una mayor frecuencia de ICH en las zonas de heterocromatina (145) y que además, los cromosomas de bovino presentan una mayor cantidad de heterocromatina en las zonas centroméricas (161).

Las pequeñas diferencias que se encontraron, así como su posible explicación, no interfieren en la respuesta final que se buscaba, la cual mostró ser semejante en ambas especies frente a las dos sustancias mutagénicas probadas, las cuales poseen mecanismos de acción sobre el DNA diferentes, dándonos así una visión más amplia de la respuesta buscada.

## CONCLUSIONES

Las frecuencias de ICH inducidas *in vitro* por EMS y MMC en los linfocitos humanos y de bovino fueron similares.

La relación dosis-respuesta encontrada en los linfocitos de las especies utilizadas, concuerda con la respuesta lineal observada en otros sistemas de prueba que usan EMS (96,127) y MMC (96,129).

La distribución y el tamaño de los ICH en los cromosomas humanos y de bovino fué dependiente de las drogas utilizadas para inducirlos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Márquez, M.E. Los plaguicidas agrícolas y la contaminación ambiental. *Sal Púb Méx* 17:829-834, 1975.
2. Hayes, W.J.Jr. *Toxicology of pesticides*. Ed. by The Williams & Wilkins Company, Cap. 1, pp 9, 1975.
3. Brooks, G.T. *The future for insecticides: Needs and prospects*. Ed. by Metcalf R.L. and McKelvey J.J.Jr. A Wiley-Interscience Publication. Vol VI, cap 2, pp 97,98, 1976, New York.
4. Clack, J.M. Mutagenicity of DDT in mice, *Drosophila melanogaster* and *Neurospora crassa*. *Aust J Biol Sci* 27:427-440, 1974.
5. Vaarama, A. Experimental studies on the influence of DDT pesticide upon plant mitosis. *Hereditas* 33:191-219, 1947.
6. Mahr, U. and Miltenburger, H.C. The effect of insecticides on chinese hamster cells cultures. *Mutat Res* 40:107-118, 1976.
7. Paton, G.R. and Allison, A.C. Chromosome damage in human cell cultures induced by metal salts. *Mutat Res* 16:332-336, 1972.
8. Mathew, C. and Zainab, A.-D. The mutagenic effect of the mercury fungicide Ceresan M in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 40:31-36, 1976.
9. Ramel, C. Genetic effects of organic mercury compounds. I. Cytological investigation on *Allium* roots. *Hereditas* 61:208-230, 1969.
10. Fiskesjö, G. Some results from *Allium*s test with organic mercury halogenides. *Hereditas* 62:314-322, 1969.
11. Fiskesjö, G. The effect of two organic compounds on human leukocytes in vitro. *Hereditas* 64:142-146, 1970.
12. Umeda, M., Saito, K., Hiroje, K. and Saito, M. Cytotoxic effects of inorganic phenyl and alkyl mercuric compounds on HeLa cells. *J Exp Med* 39:47-58, 1969.

13. Skerfving, S., Hanson, K. and Stockholm, J.L. chromosome breakage in humans exposed to methyl mercury through fish consumption. *Arch Environ Health* 21:133-139, 1970.
14. Mohn, G. 5-Methyltryptophan resistance mutations in *Escherichia coli* K-12. *Mutat Res* 20:7-15, 1973.
15. Mohn, G. Comparison of the mutagenic activity of eight organophosphorus insecticides in *Escherichia coli*. *Mutat Res* 21:196, 1973.
16. Dean, B.J. The mutagenic effects of organophosphorus pesticides on micro-organisms. *Arch Tox* 30:67-74, 1972.
17. Simmon, V.F., Poole, D.C. and Newell, G.W. *In vitro* mutagenic studies of twenty pesticides. *Tox Appl Phar* 37:109, 1976.
18. Shirasu, Y., Moriya, M., Kato, K., Furuhashi, A. and Kada, T. Mutagenicity screening of pesticides in the microbial system. *Mutat Res* 40:19-30, 1976.
19. Griffin, D.E. and Hill, W.E. *In vitro* plasmid DNA breakage by mutagens and pesticides. *Mutat Res* 53:87, 1978.
20. Griffin, D.E. and Hill, W.E. *In vitro* breakage of plasmid DNA by mutagens and pesticides. *Mutat Res* 52:161-169, 1978.
21. Deagrave, N.J., Moutschen, J., Moutschen-Dahmen, M., Gilot-Del-halle, J., Colizzi, A., Houbrechts, N. and Cholett, M.C. Genetic effects of organophosphate insecticides in mouse. *Mutat Res* 64:131, 1979.
22. Jorgenson, T.A., Rushbrook, C.J. and Newell, G.W. *In vitro* mutagenesis investigations of ten commercial pesticides. *Tox Appl Phar* 37:109, 1976.
23. Wild, D. Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides. *Mutat Res* 32:133-150, 1975.
24. Syllianco, C.Y.I. Some interactions affecting the mutagenicity potential of dipyrrone, hexachlorophene, thiodan and malathion. *Mutat Res* 53:271, 1978.
25. Dulout, F.N., Pastori, M.C. and Olivero, O.A. Malathion-induced chromosomal aberrations in bone marrow cells of mice: dose-response relationships. *Mutat Res* 122:163-167, 1983.

26. Nicholas, A.H., Vienne, M. and Van Den Berghe, H. Induction of sister-chromatid exchanges in cultured human cells by an organo phosphorus insecticide: Malathion. *Mutat Res* 67:167-172, 1979.
27. Clarke, C.H. The mutagenic specificities of pentachloronitrobenzene and captan, two environmental mutagens. *Mutat Res* 11: 247-278, 1971.
28. De Bertoldi, M., Barale, R. and Giovannetti, M. Mutagenicity of pesticides evaluated by means of gene conversion in *S. cerevisiae* and *A. nidulans*. *Mutat Res* 53:174, 1978.
29. Mollet, P. Untersuchungen über mutagenität and toxizität von Captan bei *Drosophila*. *Mutat Res* 21:137-148, 1973.
30. Pieter, G., Kramers, N. and Knaap, A.G. Mutagenicity tests with captan and folpet in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 21:149-154, 1973.
31. Kennedy, G.L.Jr., Arnold, D.W. and Keplinger, M.L. Mutagenicity studies with captan, captofol, folpet and thalidomide. *Food & Cosmet Tox* 13:55-61, 1975.
32. Kennedy, G., Fancher, O.E. and Calandra, J.A. An investigation of the teratogenic potential of captan, folpet and difolatan. *Tox Appl Phar* 13:420-430, 1968.
33. Robens, J.F. Teratogenic activity of several phthalimide derivatives in the golden hamster. *Tox Appl Phar* 16:24-34, 1970.
34. Fabro, S., Smith, R.L. and Williams, R.T. Embriotoxic activity of some pesticides and drugs related to phthalimide. *Food & Cosmet Tox* 3:587-590, 1966.
35. McLaughlin, J.Jr., Reynaldo, E.F., Lamar, J.K. and Marliac, J.-P. Teratology studies rabbits with captan, folpet, and thalidomide. *Tox Appl Phar* 14:641, 1969.
36. Arlett, C.F., Turnbull, D., Harcourt, S.A., Lehmann, A.R. and Co lella, C.M. A comrarison of the 8-azaguanine and ovabain-resistance systems for the selection of induces mutant chinese hamster cells. *Mutat Res* 33:261-278, 1975.

37. Vigfusson, N.V. and Vyse, E.R. The effect of the pesticides, dioxin, captan and roundup, on sister-chromatid exchanges in human lymphocytes in vitro. *Mutat Res* 79:53-57, 1980.
38. Alácević, M. *Progress in environmental mutagenesis*. Ed. by Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Czeizel, A. Complex epidemiological approach to human mutagenesis. pp 33-46, 1980, USA.
39. Márquez, M.E., Fujigaki, L.A., Moguel C.A. y Aranda, R.B. Problemas de contaminación de alimentos con pesticidas. Caso Tijuana (1967). *Sal Páb Méx* 10:293-300, 1968.
40. Reyeo, N.R. y Sánchez, F.E. Intoxicación por plaguicidas en la Comarca Lagunera durante el ciclo agrícola de 1974. *Sal Pub Mex* 17: 687-698, 1975.
41. González, C.A. y Vargas, M.R. Rastreo de un tóxico químico en un envenenamiento familiar ocurrido en Tamaulipas, México en 1975. *Rev Inst Nal Neu* 11:43-48, 1977.
42. Neri, R. La contaminación y sus repercusiones en la salud. *Sal Páb Méx* 20:287-295, 1978.
43. Albert, L., Méndez, F., Cebrián, M.E. and Portales, A. Organichlorine pesticide residue in human adipose tissue in Mexico: Results of a preliminary study in three mexican cities. *Arch Environ Health* 35:262-269, 1980.
44. Albert, L. y Roera, R. Plaguicidas organoclorados VII Residuos - de plaguicidas organoclorados en huevo de gallina procedentes de Monterrey, N.L. *Rev Soc Quim Mex* 27:12-17, 1983.
45. Romero, A. Vigilancia y estudios epidemiológicos de las intoxicaciones por plaguicidas. *Bol Of Sanit Panam* 84:43-49, 1978.
46. López, R.F. y Marroquín, M.M. Intoxicaciones por plaguicidas en Mexicali. *Sal Páb Méx* 12:199-206, 1970.
47. Taylor, H.J. Sister chromatid exchanges in tritiumlabelled chromosomes. *Genetic* 43:515-529, 1958.



48. Taylor, H.J., Woods, P.S. and Hughes, W.L. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labelled thymidine. *Proc Natl Acad Sci* 43: 122-128, 1957.
49. Marin, G. and Prescott, D.M. The frequency of sister chromatid exchanges following exposure to varying doses of <sup>3</sup>H-thymidine or X-rays. *J. Cell Biol* 21 159-167, 1964.
50. Deaven, L.L. and Stubblefield, E. Segregation of chromosomal DNA in chinese hamster fibroblast *in vitro*. *Exp Cell Res* 55:132-135, 1969.
51. Gibson, D.A. and Prescott, D.M. Sister chromatid exchanges in isolabeling. *Exp Cell Res* 83:445-447, 1973.
52. Wolff, S. Are sister chromatid exchanges sister strand crosses or radiation-induced exchanges? *Mutat Res* 1:337-343, 1964.
53. Brewen, J.G. and Peacock, W.T. The effect of tritiated thymidine on sister-chromatid exchanges in a ring chromosome. *Mutat Res* 7:433-440, 1969.
54. Gibson, D.A. and Prescott, D.M. Induction of sister chromatid exchanges in chromosomes of rat kangaroo. *Exp Cell Res* 74:397-402, 1972.
55. Kato, H. Induction of sister chromatid exchanges by UV light and its inhibition by caffeine. *Exp Cell Res* 82:383, 390, 1973.
56. Rommelaere, J., Susskind, M. and Errera, M. Chromosome and chromatid exchanges in chinese hamster cells. *Chromosoma* 41:243-257, 1973.
57. Thushima, T. and Wolff, S. Sister chromatid exchanges induced by light flashes to 5-bromodeoxyuridine and 5-iododeoxyuridine substituted chinese hamster chromosomes. *Exp Cell Res* 87:15-19, 1974.
58. Du Frain, R.J. and Garrard, T.J. The influence of incorporated halogenated analogues of thymidine on sister-chromatid exchange frequency in human lymphocytes. *Mutat Res* 91:233-238, 1981.

59. Du Fraín, R.J., McFee, A.F., Linkous, S., Jennings, C.J. and Lowe, K.W. *In vivo* SCE analyses using bromodeoxyridine, iododeoxyuridine. *Mutat Res* 139:57-60, 1984.
60. Latt, S.A. Localization of sister chromatid exchanges in human chromosomes. *Science* 185:74-76, 1974.
61. Kim, M.A. Chromatid austausch and heterochromatin veränderungen menschlicher chromosomen nach BUdR-markierung. Nachweis mit Benzimidazol fluorochrom und Giemsa farbstoff. *Huma Genet* 25:179-188, 1974.
62. Latt, S.A. Microfluorometric analysis of DNA replication kinetics and sister chromatid exchanges in human chromosomes. *J Histochem Cytochem* 22:478-491, 1974.
63. Latt, S.A. Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *Proc Natl Acad Sci* 71:3162-3166, 1974.
64. Bloom, S.E. and Hsu, T.C. Differential fluorescence of sister chromatids in chicken embryos exposed to 5 bromodeoxyuridine. *Chromosoma* 51:261-267, 1975.
65. Latt, S.A. and Wohlleb, J.C. Optical studies of the interaction of 33258 Hoechst with DNA, chromatin, and metaphase chromosomes. *Chromosoma* 52:297-316, 1975.
66. Latt, S.A. Microfluorometric detection of DNA replication in human metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci* 70:3395-3399, 1973.
67. Kato, H. Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BUdR-labelling method. *Nature* 251:70-72, 1974.
68. Franceschini, P. Semiconservative DNA duplication in human chromosomes treated with BUdR and stained with acridine orange. *Exp Cell Res* 89:420-421, 1974.
69. Dutrillaux, B., Fosse, A.M., Prieur, M. et Lejeune, J. Analyse des échanges de chromatides dans les cellules somatiques humaines. Traitement au BUdR (5-bromodéoxyuridine) et fluorescence bicolore par l'acridine orange. *Chromosoma* 48:327-340, 1974.

70. Perry, P. and Wolff, S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251:156-158, 1974.
71. Kato, H. Possible role of DNA synthesis in formation of sister chromatids exchange. *Nature* 252:739-741, 1974.
72. Lin, M.S. and Alfi, O.S. Detection of sister chromatid exchanges by 4'-6-diamidino-2phenylindole fluorescence. *Chromosome* 57:219-225, 1976.
73. Takayama, S. and Sakanishi, S. Differential Giemsa staining of sister chromatids after extraction with acids. *Chromosoma* 64:109-115, 1977.
74. Schere, J.M.J.C., Hustinx, T.W.J., Ruttern, F.J. and Merlx, G.F. M. "Reverse" differential staining of sister chromatids. *Exp Cell Res* 109:466-468, 1977.
75. Korenberg, J.R. and Freedlender, E.F. Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. *Chromosoma* 48:355-360, 1974.
76. Gratzner, H.G., Pollack, A., Ingram, D.J. and Leif, R.C. Deoxy ribonucleic acid replication in single cells and chromosomes by immunogenetic techniques. *J Histochem* 24:34-39, 1976.
77. Kato, H. Sister chromatid exchanges in ageing and repair-deficient human fibroblasts. *Nature* 260:447-448, 1976.
78. San Sebastian, J.R., O'Neill, J.P. and Hsie, A.W. Induction of chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, and specific locus mutations in chinese hamster ovary cells by 5-bromo-deoxyuridine. *Cytogenet Cell Genet* 28:47-54, 1980.
79. Kato, H. and Shimada, H. Sister chromatid exchanges induced by mitomycin C: a new method of detecting DNA damage at chromosomal level. *Mutat Res* 28:459-464, 1975.
80. Wolff, S. and Perry, P. Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography. *Chromosoma* 48:341-353, 1974.

81. Chaganti, R.S.K., Schonberg, S. and German, J. A manifold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci* 71:4508-4512, 1974.
82. Beek, B. and Obe, G. The human leukocyte test system. VI The use of sister chromatid exchanges as possible indicators for mutagenic activities. *Human Genet* 29:127-134, 1975.
83. Tice, R., Chaillet, J. and Schneider, E.L. Demonstration of spontaneous sister chromatid exchanges in vivo. *Exp Cell Res* 102:426-429, 1976.
84. Kato, H. Induction of sister chromatid exchanges by chemical mutagens and its possible relevance to DNA repair. *Exp Cell Res* 85:239-247, 1974.
85. Latt, S.A., Stetten, G., Juergens, L.A., Buchanan, G.R. and Gerald P. S. Induction by alkylating agents of sister chromatid exchanges and chromatid breaks in Fanconi's anemia. *Proc Natl Acad Sci* 72:4066-4070, 1975.
86. Solomon, E. and Bobrow, M. Sister chromatid exchanges-a sensitive assay of agents damaging human chromosomes. *Mutat Res* 30:273-278, 1975.
87. Abe, S. and Sasaki, M. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in chinese hamster cells exposed to various chemicals. *J. Natl Cancer Inst* 58:1635-1641, 1977.
88. Stetka, D.G. and Wolff, S. Sister Chromatid Exchanges as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens. I In vivo test for compounds requiring metabolic activation. *Mutat Res* 41:333-342, 1976.
89. Vogel, W. and Bauknecht, T. Differential chromatid staining by in vivo treatment use mutagenicity test systems. *Nature* 260:448-449, 1976.
90. Pera, F. and Mattias, P. Labelling of DNA and differential sister chromatid staining after BrdU treatment in vivo. *Chromosoma* 57:13-18, 1976.

91. Allen, J.W. and Latt, S.A. Analysis of sister chromatid exchange formation *in vivo* mouse spermatogonia as a new test system for environmental mutagens. *Nature* 260:449-451, 1976.
92. Nakanishi, Y. and Schneider, E.L. *In vivo* sister chromatid exchange: a sensitive measure of DNA damage. *Mutat Res* 60:329-337, 1979.
93. Perry, P. and Evans, H.J. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 258:121-125, 1975.
94. Stetka, D.G. and Wolff, S. Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens. II *In vitro* test for compounds requiring metabolic activation. *Mutat Res* 41:343-350, 1976.
95. Sobels, F.H. Some problems associated with the testing for environmental mutagens and a perspective for studies in "comparative mutagenesis". *Mutat Res* 46:245-260, 1977.
96. Carrano, A.V., Thompson, L.H., Lindl, P.A. and Minkler, J.L. Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature* 271:551-553, 1978.
97. Carrano, A.V., Thompson, L.H., Stetka, D.G., Minkler, J.L., Mazrimas, J.A. and Fong, S. DNA crosslinks, sister-chromatid exchanges and specific-locus mutations. *Mutat Res* 63:175-188, 1979.
98. Evans, H.J. and Vijayalaxmi. Induction of 8-azaguanine resistance and sister chromatid exchange in human lymphocytes exposed to mitomycin C and X rays *in vitro*. *Nature* 292:601-605, 1981.
99. Jostes, R., Samson, L. and Schwartz, J.L. Kinetics of mutation and sister-chromatid exchange induction by ethyl methanesulfonate in chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 91:255-258, 1981.
100. Swenson, D.H., Harbacj, P.R. and Trzos, R.J. The relationships between alkylation of specific DNA bases and induction of sister chromatid exchange. *Carcinogenesis* 1:931-936, 1980.

101. Newbold, R.F., Warren, W., Medcalf, A.C.S. and Amos, J. Mutagenicity of carcinogenic methylating agents is associated with a specific DNA modification. *Nature* 283:596-599, 1980.
102. Lipsett, M.N. and Weissbach, A. The site of alkylation of nucleic by mitomycin. *Biochemistry* 4:206-211, 1965.
103. Hsiung, H., Lown, J.W. and Johnson, D. Effects of alkylation by dimethyl sulfate, nitrogen mustard and mitomycin C on DNA structure as studied by the ethidium binding assay. *Can J Biochem* 54:1047-1054, 1976.
104. Towasz, M., Mercado, C.M., Olson, J. and Chatterjee, N. The mode of interaction of mitomycin C with deoxyribonucleic acid and other polynucleotides in vitro. *Biochemistry* 13:4878-4887, 1974.
105. Iyer, V.N. and Szybalski, W. A molecular mechanism of mitomycin action: linking of complementary DNA strands. *Proc Natl Acad Sci* 50:355-362, 1963.
106. Lown, J.W., Begleiter, A., Johnson, D. and Morgan, A.R. Studies related to antitumor antibiotics. Part V. Reactions of mitomycin C with DNA examined by ethidium fluorescence assay. *Can J Biochem* 54:110-119, 1976.
107. Schwartz, H.S., Sternberg, S.S. and Philips, F.S. Pharmacology of mitomycin C. IV. Effects in vivo on nucleic acid synthesis: comparison with actinomycin D. *Cancer Res* 23:1125-1136, 1963.
108. Nowell, P.C. Mitotic inhibition and chromosome damage by mitomycin C in human leukocyte cultures. *Exp Cell Res* 33:445-449, 1964.
109. Pricer, W.E. and Weissbach, A. Enzymatic utilization and degradation of DNA treated with mitomycin C or ultraviolet light. *Biochemistry* 4:200-206, 1965.
110. Shatkin, A.J., E., Franklin, R.M. and Tatum, E.L. Effect of mitomycin C on mammalian cells in culture. *Biochem & Biophys Acta* 61:277-289, 1962.

111. Singer, B. Reaction of guanosine with ethylating agents. *Biochemistry* 11:3939-3947, 1972.
112. Brookes, P. and Lawley, P.D. The reaction of mono and di-functional alkylating agents with nucleic acids. *Biochem J* 80:494-503, 1961.
113. Heddle, J.A. and Arlett, C.F. Untransformed Xeroderma pigmentosum cells are not hypersensitive to sister-chromatid exchange productions by ethyl methanesulphonate-implications for the use of transformed cell lines and for the mechanism by which SCE arise. *Mutat Res* 72:119-125, 1980.
114. Lawley, P.D. Some chemical aspects of dose-response relationship in alkylation mutagenesis. *Mutat Res* 23:283-295, 1974.
115. Bartsch, H., Terracini, B., Malaveille, C., Tomatis, L., Wahrendorf, J., Burn, G. and Dodel, B. Quantitative comparison of 10 direct-acting alkylating agents and the initial 06:7-alkylguanine ratio in DNA with carcinogens potency in rodents. *Mutat Res* 110:181-219, 1983.
116. Chu, E.H.V. and Malling, R.V. Mammalian cell genetics, 11. Chemical induction of specific locus mutation in chinese hamster cells *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci* 61:1306-1312, 1968.
117. Hsie, A.W., Brimer, P.A., Mitchell, T.J. and Gosslee, D.G. The dose-response relationship for ethyl methanesulphonate-induced mutations at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus in chinese hamster ovary cells. *Somat Cell Genet* 1:247-261, 1975.
118. McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B.N. Detection of carcinogens as mutagenesis in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc Natl Acad Sci* 72:5135-5139, 1975.
119. Hsie, A.W., Brimer, P.A., Machanoff, R. and Hsie, M.H. Further evidence for the genetic origin of mutations in mammalian somatic cells: the effects of ploidy level and selection stringency on dose-dependent chemical mutagenesis to purine analogue resistance in chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 45:271-282, 1977.

120. O'Neill, J.P. and Hsie, A.W. Chemical mutagenesis of mammalian cells can be quantified. *Nature* 269:815-817, 1977.
121. Hsie, A.W., Machanoff, R., Couch, D.B. and Holland, J.M. Mutagenicity of dimethyl nitrosamine and ethyl methanesulfonate as determined by the host-mediated CHO/HGPRT ASSAY. *Mutat Res* 51: 77-84, 1978.
122. Schalet, AP. Interspecific comparison of ethyl methanesulfonate-induced mutation rates in relation to genome size. *Mutat Res* 49:313-340, 1978.
123. Couch, D.B., Forbes, N.L. and Hsie, A.W. Comparative mutagenicity of alkylsulfate and alkanesulfonate. *Mutat Res* 57:217-224, 1978.
124. Gupta, R.S. Repeated mutagenesis and the selection of recessive and dominant mutations in cultured mammalian cells. *Mutat - Res* 74:503-508, 1980.
125. Evans, H.H., Wilkins, L., Horng, A.-F., Santoro, C. Evans, T.E. and Glazier, K.G. Mutagenesis and transformation of C3H10T 1/2 cells treated with ethyl methane sulphonate. *Mutat Res* 84:203-219, 1981.
126. Hsie, A.W., Casciano, D.A., Coucef, D.B., Krahn, D.F. O'Neill, J.P. and Whitfield, B.L. The use of chinese hamster ovary cells to quantify specific locus mutations and to determine mutagenicity of chemicals. *Mutat Res* 86:193-214, 1981.
127. Heflich, R.H., Beranek, D.T., Kodell, R.L. and Morris S.M. Induction of mutation and sister-chromatid exchanges in chinese hamster ovary cells by ethylating agents. Relationship to specific DNA adducts. *Mutat Res* 106:147-161, 1982.
128. Bishop, J.B. and Feuers, R.J. Development of a new biochemical mutation test in mice based upon measurement of enzyme activities. II Test results with ethyl methanesulfonate (EMS). *Mutat Res* 95:273-285, 1982.



129. Carrano, A.V. and Johnston, G.R. The distribution of mitomycin C-induced sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of the Indian muntjac. *Chromosoma* 64:97-107, 1977.
130. Shiraishi, Y. and Sandberg, A.A. Effects of mitomycin C on sister chromatid exchange in normal and Bloom's syndrome cells. *Mutat Res* 49:233-238, 1978.
131. Stetka, D.G., Minkler, J. and Carrano, A.V. Induction of long-lived chromosome damage, as manifested by sister-chromatid exchange, in lymphocytes of animals exposed to mitomycin C. *Mutat Res* 51:383-396, 1978.
132. Kram, D., Schneider, E.L., Senula, G.C. and Nakanishi, Y. Spontaneous and mitomycin-C induced sister-chromatid exchanges, Comparison of *in vivo* and *in vitro* systems. *Mutat Res* 60:339-347, 1979.
133. Galloway, S.M. Ataxia telangiectasia: the effects of chemical mutagens and X-rays on sister chromatid exchanges in blood lymphocytes. *Mutat Res* 46:343-349, 1977.
134. Craig-Holmes, A.P. and Shaw, M.W. Effects of six carcinogens on SCE frequency and cell kinetics in cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 46:375-384, 1977.
135. Wolff, S., Rodin, B. and Cleaver, J.E. Sister chromatid exchanges induced by mutagenic carcinogens in normal and Xeroderma pigmentosum cells. *Nature* 265:347-349, 1977.
136. Sono, A., Matsumoto, K., Hayano, K. and Sakaguchi, K. Sister chromatid exchanges and chromosome aberrations induced by chemical agents in L5178Y cells. *Cell Struct Funct* 3:249-254, 1978.
137. Gebhart, E. Sister chromatid exchange (SCE) and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. *Human Genet* 58:235-254, 1981.
138. Sono, A. and Sakaguchi, K. The distribution of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations induced by 5-fluorodeoxyuridine and ethyl methanesulfonate in the euchromatin and heterochromatin of chinese hamster cells. *Cell Struct Funct* 5:175-182, 1980.

139. Gebrart, E. Sister chromatid exchange (SCE) and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. *Human Genet* 58:235-254, 1981.
140. Cohen, M.M. and Shaw, M.W. Effects of mitomycin C on human chromosomes. *J Cell Biol* 23:386-395, 1964.
141. Shaw, M.W. and Cohen, M.M. Chromosome exchanges in human leukocytes induced by mitomycin C. *Genetics* 51:181-190, 1965.
142. Michelmann, H.W., Maier, P., Ficsor, G. and Feldman, D.B. Bone marrow and lymphocyte cytogenetics of Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) treated with the clastogen mitomycin C. *Mutat Res* 57:77-84, 1978.
143. Hooftman, R.N. The induction of chromosome aberrations in *Noto-branchius rachavi* (Pisces: Cyprinodontidae) after treatment with ethyl methanesulphonate or benzo(a) pyrene. *Mutat Res* 91:347-352, 1981.
144. Natarajan, A.T. and Schmid, W. Differential response of constitutive and facultative heterochromatin in the manifestation of mitomycin induced chromosome aberrations in chinese hamster cells in vitro. *Chromosoma* 33:48-62, 1971.
145. Bourgeois, C.A. Distribution of mitomycin C-induced damage in human chromosome with special reference to regions of repetitive DNA. *Chromosoma* 48:203-211, 1974.
146. Natarajan, A.T., Ahnström, G. and Sharma, R.P. Heterochromatin and chromosomal aberrations in *Microtus agrestis*: role of chromosomal association. *Mutat Res* 22:73-79, 1974.
147. Natarajan, A.T. and Raposa, T. Heterochromatin and chromosome aberrations. A comparative study of three mouse cell lines with different karyotypes and heterochromatin distribution. *Hereditas* 80:83-90, 1975.

148. Carrano, A.V. and Johnston, G.R. The distribution of mitomycin C-induced sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of Indian muntjac. *Chromosoma* 64:97-197, 1977.
149. Hoo, J.J. and Parslow, M.I. Relation between the SCE points and DNA replication bands. *Chromosoma* 73:67-74, 1979.
150. Gupta, P. and Sharma, T. Preferential effect of mitomycin C on constitutive heterochromatin of the Indian muntjac. *Muntiacus - muntjak. Mutat Res* 72:335-339, 1980.
151. Rainaldi, R. and Mariani, T. The distribution of induced sister-chromatid exchanges: a tool for identifying agents directly interacting with DNA. *Mutat Res* 103:333-337, 1982.
152. Gerchman, L.L. and Ludlum, D.B. The properties of O6-methylguanine in templates for RNA polymerase. *Biochem & Biophys Acta* - 308:310-316, 1973.
153. Singer, B. All oxygens in nucleic acids react with carcinogenic ethylating agents. *Nature* 264:333-339, 1976.
154. Abbott, P.J. and Saffhill, R. DNA synthesis with methylated poly (dC-dC) templates, evidence for a comparative nature to mis coding by O6-methylguanine. *Biochem & Biophys Acta* 362:51-61, 1979.
155. Swenberg, J.A., Bedell, M.A., Billings, K.C., Ueberhauer, D.R. and Pegg, A.E. Cell-specific differences in O6-alkylguanine DNA repair activity during continuous exposure to carcinogen. *Proc Natl Acad Sci* 79:5499-5502, 1982.
156. Ludlum, D.B. The properties of 7-methylguanine-containing templates for ribonucleic acid polymerase. *J Biol Chem* 245:477-482, 1970.
157. Matt, S.A., Allen, J., Bloom, S.E., Carrano, A.V., Falke, E., Kram, D., Schneider, E., Schreck, R., Tice, R., Whitfield, B. and Wolff, S. Sister chromatid exchanges: a report of the Genotox program. *Mutat Res* 87:17-62, 1981.
158. Bachmann, K. Genome size in mammals. *Chromosome* 37:85-93, 1972.

159. Jensen, E.M., La Polla, R.J., Kirby, P.E. and Haworth, S.R. *In vitro* studies of chemical mutagens and carcinogens. I Stability studies in cell culture medium. *J Natl Cancer Inst* 59: 941-944, 1977.
160. Ishii, Y. and Bender, M.A. Factors influencing the frequency of mitomycin C-induced sister-chromatid exchanges in 5-bromodeoxyuridine-substituted human lymphocytes in culture. *Mutat Res* 51: 411-418, 1978.
161. Hansen, K.M. Heterochromatin (Cbands) in bovine chromosomes. - *Hereditas* 73:65-69, 1973.