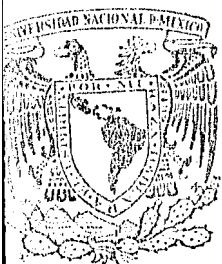


24.31



# Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales

“ZARAGOZA”

EVALUACION Y COMPARACION DE TRES TECNICAS  
PARA LA OBTENCION DE INTERCAMBIO DE  
CROMATIDES HERMANAS (ICH) “IN VIVO”

## T E S I S

Que Para Obtener por el Título de:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A:  
MARCO ANTONIO SANCHEZ SANCHEZ



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.

# C O N T E N I D O :

	PAG.
I.- INTRODUCCION.....	2
I. 1. CONCEPTO DE INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS.	
I. 2. TINCIÓN DIFERENCIAL.	
I. 3. INCORPORACIÓN DE 5-BROMO-2-DEOXIURIDINA A LA - CÉLULA.	
I. 4. APLICACIÓN DEL INTERCAMBIO DE CROMÁTIDES HERMA- NAS EN ESTUDIOS DE MUTÁGENOS QUÍMICOS.	
2.- OBJETIVOS.....	23
3.- MATERIAL Y METODOS.....	25
4.- RESULTADOS.....	40
4. 1. ANÁLISIS DE TABLETAS.	
4. 2. TINCIÓN DIFERENCIAL.	
4. 3. PROLIFERACIÓN CELULAR.	
4. 4. INTERCAMBIO DE CROMÁTIDES HERMANAS.	
4. 5. INTERCAMBIO DE CROMÁTIDES HERMANAS Y PROLIFE- RACIÓN CELULAR EN PRESENCIA DE MITOMICINA C.	
4. 6. UTILIZACIÓN DE OTROS PARÁMETROS PARA LA EVALUA- CIÓN DE CADA TÉCNICA.	
5.- DISCUSION.....	71
6.- RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	87
7.- BIBLIOGRAFIA.....	91

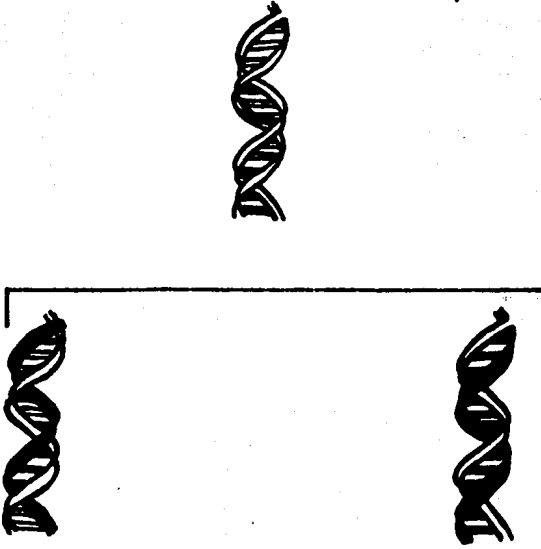
I. INTRODUCCION.

## I. I. CONCEPTO DE INTERCAMBIO DE CROMÁTIDES HERMANAS.

A PARTIR DEL DESCUBRIMIENTO DEL INTERCAMBIO DE CROMÁTIDES HERMANAS (ICH) POR TAYLOR (1958), ESTE ASPECTO HA ALCANZADO UNA GRAN IMPORTANCIA EN EL ESTUDIO GENOTOXICOLÓGICO DEBIDO A SU SENSIBILIDAD Y FÁCIL INTERPRETACIÓN.

AL ICH SE LE DEFINE COMO EL RECAMBIO DE SEGMENTOS DE ADN ENTRE LAS DOS CROMÁTIDES DE UN CROMOSOMA Y DURANTE EL CUAL CADA UNA DE LAS CADENAS DEL SEGMENTO DE ADN INTERCAMBIADO SE UNE A LA CADENA SIMILAR DE LA CROMÁTIDE HERMANA. ESTE EVENTO SE PUEDE VISUALIZAR MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE TIMIDINA TRITIADA, ( $H^3$ )TDR; O CON LA INCORPORACIÓN DE ANÁLOGOS DE TIMIDINA (BROMO-DEOXIURIDINA, BRDÜ), EN POR LO MENOS DOS CICLOS DE REPLICACIÓN DEL ADN, CON EL POSTERIOR TRATAMIENTO DE TÉCNICAS AUTORADIOGRÁFICAS O TINTORIALES (NAKANISHI Y SCHNEIDER, 1979).

LA OBTENCIÓN DEL ICH OBEDECE AL MODELO DE REPLICACIÓN SEMICONSERVATIVA DEL ADN PROPUESTO POR WATSON Y CRICK (1953), EN LA CUAL LAS DOS CADENAS COMPLEMENTARIAS DE LA MOLÉCULA DE ADN SE SEPARAN Y CADA UNA DE ELLAS SIRVE COMO MOLDE PARA LA SÍNTESIS DE UNA NUEVA, SIENDO EL RESULTADO FINAL DEL PROCESO LA PRODUCCIÓN DE DOS MOLÉCULAS IGUALES DE ADN A PARTIR DE LA MOLÉCULA ORIGINAL (FIGURA No. I.)



**FIGURA No1 Replicación Semiconservativa del ADN.**

EN UN PRINCIPIO, SUBSECUENTE AL DESCUBRIMIENTO DEL ICH, NINGÚN INVESTIGADOR PROPUSO UN MECANISMO ADECUADO Y CONVINCENTE PARA EXPLICARSE DICHO EVENTO. ASÍ PUES, KATO (1973) SUGIERE UNA POSIBLE RELACIÓN ENTRE ICH Y REPARACIÓN CELULAR DEBIDO A SUS OBSERVACIONES CON LA CAFEÍNA, LA CUAL ES UN INHIBIDOR DE LOS MECANISMOS DE REPARACIÓN POST-REPLICACIÓN, YA QUE OBSERVÓ QUE SE REDUCÍA EL NÚMERO DE ICH INDUCIDOS POR LA LUZ U.V. Y SE INCREMENTABA LA FRECUENCIA DE RUPTURAS, DELECCIONES E INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDES HOMÓLOGOS.

BENDER Y COLABORADORES (1974) SUGIEREN QUE EL ICH PUEDE ESTAR RELACIONADO A UN MODELO DE REPARACIÓN RECOMBINANTE. ESTE INVESTIGADOR TAMPOCO PROPUSO UN MECANISMO ESPECÍFICO, ÚNICAMENTE ILUSTRÓ GRÁFICAMENTE AL ICH COMO EL ENTRECruzAMIENTO DE UNA HEBRA SENCILLA DE POLARIDAD PARALELA DE CROMÁTIDES OPUESTAS POR ARRIBA Y ABAJO DEL INTERCAMBIO. POR LO TANTO, ESTA ILUSTRACIÓN MARCÓ EL PRIMER ESBOZO PARA FORMULAR EL MECANISMO DEL ICH BASADO EN LA RECOMBINACIÓN DE UNA CADENA SENCILLA, POR LO CUAL SE LE CONSIDERÓ AL INTERCAMBIO DE CROMÁTIDES HERMANAS COMO LA TRANSFERENCIA FÍSICA DE UNA HEBRA SENCILLA DE UNA CADENA DOBLE A OTRA.

MIENTRAS TANTO, KATO (1974c), WOLFF Y PERRY (1975) ELABORARON ESTUDIOS BIOQUÍMICOS DETALLADOS DE REPARACIÓN POST-REPLICACIÓN Y REPARACIÓN EN EL ENTRECruzAMIENTO, INDICADO QUE LOS SEGMENTOS RECOMBINADOS DE HEBRAS SENCILLAS EN ESTOS PROCESOS DE

REPARACIÓN, ESTÁN GENERALMENTE LIMITADOS A PEQUEÑAS SECUENCIAS DE MENOS DE 5000 BASES.

DE WEERD-KASTELEIN Y COLABORADORES (1977), MIDIERON LA INDUCCIÓN DE ICH POR LUZ U.V. EN CÉLULAS NORMALES Y CÉLULAS CON XERODERMA PIGMENTOSUM, ENCONTRANDO QUE NO HABÍA RELACIÓN CONCLUYENTE ENTRE LA HABILIDAD DE LA CÉLULA PARA REALIZAR REPARACIÓN POR ESCISIÓN Y LA PRODUCCIÓN DE INTERCAMBIO DE CROMÁTIDES HERMANAS. EN ESTOS TRABAJOS, ELLOS TAMBIÉN ENCONTRARON QUE LA FRECUENCIA DE ICH NO DIFERÍA ENTRE LAS CÉLULAS NORMALES Y ANORMALES. ESTAS CONCLUSIONES HICIERON OBVIO QUE MANÍFERS CON MECANISMOS DE REPLICACIÓN DEL ADN CONOCIDOS, NO MOSTRARON SER PARTICIPANTES ACTIVOS EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ICH. ASÍMISMO, SE HA OBSERVADO QUE EL NÚMERO DE LESIONES DEL ADN ES MUCHO MAYOR QUE EL NÚMERO DE ICH; DE ACUERDO CON ESTO, EL NÚMERO DE ICH ES CERCA DE 1/20000 CON RESPECTO AL NÚMERO DE DÍMEROS INDUCIDOS POR LUZ U.V. EN EL ADN, ÉSTO SUGIERE QUE EL ICH ES UNA SECUENCIA DE REARREGLOS MOLECULARES QUE INVOLUCRAN REGIONES DE ADN MUCHO MÁS GRANDES QUE EL MISMO SITIO DE DAÑO (REYNOLDS Y COL., 1979).

EN LOS ÚLTIMOS AÑOS SE HAN SUGERIDO MECANISMOS ALTERNOS PARA EXPLICARNOS EL INTERCAMBIO DE CROMÁTIDES HERMANAS, Y FUE PAINTER (1980) QUIEN PROPUSO UNO DE LOS MODELOS QUE ES EN LA



ACTUALIDAD AMPLIAMENTE ACEPTADO.

EL MECANISMO DE PAINTER DESCANSA SOBRE LOS DESCUBRIMIENTOS REALIZADOS POR COOCK Y BRAZELL (1975), QUIENES IDENTIFICARON A LA SUB-UNIDAD SUPERENROLLADA CROMOSÓMICA COMO LA RESPONSABLE DEL CONTROL DE LA REPLICACIÓN DEL ADN, EN ESTA TEORÍA SE INTRODUJO EL TÉRMINO AGRUPAMIENTO DE REPLICACIÓN (CLUSTER), EL CUAL DIRIGE LA REPLICACIÓN DEL ADN.

LA PROPOSICIÓN HECHA POR PAINTER NOS DICE QUE EL ADN CONTIENE AGRUPAMIENTO DE REPLICACIÓN, LOS CUALES SE VAN REPLICANDO ALTERNATIVAMENTE SIGUIENDO LA HORQUILLA DE REPLICACIÓN, ESTE EVENTO SE VE AFECTADO POR AGENTES QUE DAÑAN AL ADN, OCACIONANDO QUE LA REPLICACIÓN SE DETENGA O QUE DISMINUYA SU VELOCIDAD, ÉSTO ORIGINA QUE UN "AGRUPAMIENTO" SE REPLIQUE COMPLETAMENTE Y OTRO LO HAGA DE MANERA INCOMPLETA. DEBIDO A QUE UN AGRUPAMIENTO SE REPLICA COMPLETAMENTE Y EN EL SUBSECUENTE SE DETIENE LA REPLICACIÓN, OCASIONA QUE LA CADENA DOBLE SE ROMPA DESPUÉS DE CONCLUIDA LA REPLICACIÓN. EN ESTE MECANISMO PARTICIPAN TODAS LAS ENZIMAS RESPONSABLES DE LA REPLICACIÓN COMO SON HELICASAS, TOPOISOMERASAS Y PROTEINAS DESESTABILIZADORAS DE LA HÉLICE ENTRE OTRAS.

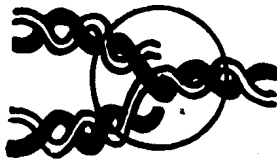
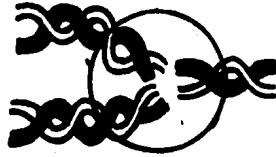
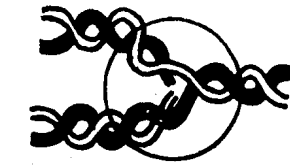
SE SUPONE QUE LA ENZIMA QUE SE VE AFECTADA DIRECTAMENTE

EN LA INDUCCIÓN DE ICH ES LA PRIMASA II.

DESPUÉS QUE LA CADENA DOBLE SE ROMPE, EXISTE UNA UNIÓN ENTRE AMBAS CADENAS, LA HIJA Y LA MADRE, LAS CUALES DEBEN TENER UNA POLARIDAD ADECUADA PARA LA UNIÓN DEL ADN; ES AQUÍ DONDE SE LLEVA A CABO EL ICH, INTERVINIENDO ADN HOMÓLOGO. LA POSTERIOR UNIÓN DE LAS HEBRAS DE ADN POR PROCESOS CONOCIDOS, COMPLETAN LA FORMACIÓN DEL ICH.

CABE MENCIONAR QUE LAS CADENAS QUE SE UNEN SON LA HIJA DE UN AGRUPAMIENTO REPLICADO CON LA QUE TIENE EL AGRUPAMIENTO NO REPLICADO. ESTE MECANISMO EXPLICA LA FORMACIÓN DEL ICH Y A LA VEZ EL PAPEL QUE JUEGAN LOS AGENTES QUE DAÑAN AL ADN, COMO LO SON LOS CARCINÓGENOS Y MUTÁGENOS (FIGURA No. 2).

LA EVIDENCIA DEL ICH SE REALIZA, COMO YA SE MENCIONÓ, MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE ( $H^3$ )TDR O ANÁLOGOS DE TIMINA (BRDÚ O IDU), LOS CUALES SE INTEGRAN EN POR LO MENOS DOS CICLOS CELULARES, OCACIONANDO QUE LAS HEBRAS DE ADN HIJAS SE INCORPORAN EL COMPUESTO, Y LAS HEBRAS DE ADN MADRES CONSERVEN SUS CARACTERÍSTICAS ORIGINALES. ESTO DETERMINA QUE LOS CROMOSOMAS DE SEGUNDA DIVISIÓN CELULAR POSEAN UNA CROMÁTIDE QUE INCORPORA AL ANÁLOGO Y OTRA QUE NO LO HACE (MODELO SEMICONSERVATIVO DEL ADN).



**FIGURA N°11 Recombinación de la doble cadena como una función entre agrupamientos de repli cación.**

PRECISAMENTE DESPUÉS DE OCURRIR EL MECANISMO DEL ICH SE VAN A ENCONTRAR EN LA CROMÁTIDE QUE INCORPORÓ ANÁLOGO, FRAGMENTOS DE ADN QUE PERTENECÍAN A LA OTRA CROMÁTIDE Y VICEVERSA, ESTO OCURRE EN LA MISMA POSICIÓN CROMOSÓMICA Y ENTRE CROMOSOMAS HOMÓLOGOS. SU POSTERIOR TRATAMIENTO CON TÉCNICAS AUTORADIOGRÁFICAS O TINTORIALES, HACE VISIBLE MICROSCÓPICAMENTE DICHO EVENTO.

## 1.2. TINCIÓN DIFERENCIAL.

EL INTERCAMBIO DE CROMÁTIDES HERMANAS SE IDENTIFICA EN EL LABORATORIO MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE ANÁLOGOS DE BASE O TIMIDINA ( $H^3$ )TDR. LOS PRIMEROS ESTUDIOS REALIZADOS PARA LA OBTENCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ICH FUERON ELABORADOS CON LA AYUDA DE TÉCNICAS AUTORADIOGRÁFICAS, DE CROMOSOMAS MARCADOS CON ( $H^3$ )TDR (TAYLOR, 1958), LAS CUALES SE REALIZABAN HACIENDO CORTES DE TEJIDOS DE APROXIMADAMENTE 6 MICRAS DE DIÁMETRO, O MEDIANTE LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS IN VIVO O IN VITRO, EXAMINÁNDOSE LOS NÚCLEOS O LOS CROMOSOMAS DE CÉLULAS METAFÁSICAS RESPECTIVAMENTE.

SIN EMBARGO, CON EL ADVENIMIENTO DE TÉCNICAS PARA LA OBTENCIÓN DE TINCIÓN DIFERENCIAL DE CROMÁTIDES HERMANAS UTILIZANDO LA INCORPORACIÓN DE 5-BROMO-2-DEOXYURIDINA (BRDÚ) COMO UN

ANÁLOGO DE BASE, LAS TÉCNICAS AUTORRADIOGRÁFICAS FUERON RELEGADAS A UN SEGUNDO TÉRMINO,

VARIOS INVESTIGADORES OBSERVARON LA UTILIDAD DE LA BRDÚ PARA DEMOSTRAR LA INDUCCIÓN DE DAÑO GENÉTICO OCASIONADO POR DIFERENTES AGENTES, LO CUAL OCURRÍA MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE BRDÚ EN LA SÍNTESIS DE ADN. SE OBSERVÓ QUE LAS CÉLULAS EXHIBÍAN UN FENÓMENO DESCRITO COMO HETEROPICNOSIS NEGATIVA (HUANG, 1967), EN EL CUAL UNA CROMÁTIDE HERMANA SE TENÍA MENOS INTENSAMENTE QUE LA OTRA.

POSTERIORMENTE, ALGUNOS INVESTIGADORES MOSTRARON EN SUS EXPERIMENTOS EL PAPEL QUE JUEGA LA BRDÚ PARA LA DETECCIÓN DE SÍNTESIS DE ADN, LA CUAL SE BASÓ SOBRE LA PREMISA DE QUE UN ÁTOMO ALTAMENTE POLARIZABLE TAL COMO EL BROMURO, COMO PARTE DE LA BASE ANÁLOGA 5-BROMO-2-DEOXIURIDINA, PUEDE ALTERAR LA FLUORESCENCIA DE COLORANTES UNIDOS AL ADN (LATT, 1973), DANDO LA PROPIEDAD ESTÉRICA Y LAS INTERACCIONES ELECTRÓNICAS, SIENDO POSIBLEMENTE LA CAUSA DE LA DISMINUCIÓN DE LA TINCIÓN EN UNA DE LAS DOS CROMÁTIDES HERMANAS.

GALLEY Y PURKEY (1972) MENCIONARON OTRO EFECTO RELACIONADO CON LA BRDÚ SOBRE LA DISMINUCIÓN DE LA FLUORESCENCIA DE COLORANTES DE ACRIDINA. LATT (1973), ENSAYÓ VARIOS COLORANTES TALES

COMO QUINACRINA, ANARANJADO DE ETIDIO, ANARANJADO DE ACRIDINA, PROFLAVINA Y HOECHST 33258 PARA EVIDENCIAR LA PRESENCIA DE ICH EN CROMOSOMAS. ASÍ TAMBIÉN OTROS INVESTIGADORES UTILIZARON EL HOECHST 33258 PARA TEÑIR CÉLULAS VIVAS (LAMMLER Y SCHUTZE, 1969; HILMING, 1970; HILMING Y GROPP, 1972), DEMONSTRADO QUE SE INCREMENTA LA FLUORESCENCIA DE LA HETEROCROMATINA EN CROMOSOMAS DE ROEDOR, COMPROBANDO QUE LA SUBSTITUCIÓN CON BRDÚ ES LA MÁS SENSIBLE. EFECTOS MENORES FUERON OBSERVADOS CON ANARANJADO DE ACRIDINA Y PROFLAVINA, OBSERVANDO QUE LA QUINACRINA Y EL ANARANJADO DE ETIDIO ERAN RELATIVAMENTE SENSIBLES PARA BRDÚ.

DE ESTA MANERA SE CONSIDERÓ COMO MÁS ADECUADO EL USO DEL COLORANTE HOECHST 33258 PARA OBTENER LA TINCIÓN DIFERENCIAL DE CROMOSOMAS, LA CUAL SE DETECTABA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA (LATT, 1974 A,B) O POR FLUJO CITOMÉTRICO (LATT, 1977A) CON O SIN FIJACIÓN DE CÉLULAS.

SE HA OBSERVADO QUE LA FLUORESCENCIA DEL HOECHST 33258 ES PH DEPENDIENTE, SIENDO 7.0 EL ÓPTIMO, LO CUAL SE REFLEJA EN UNA REDUCCIÓN CUÁNTICA DEL COLORANTE FLUORESCENTE. LA MAYOR DESVENTAJA PARA EL USO DEL HOECHST 33258 ES LA RÁPIDA PÉRDIDA DE LA IMAGEN DE FLUORESCENCIA, LA CUAL PRODUCE PEQUEÑOS CAMBIOS EN LA CROMATINA, TORNÁNDOSE OSCURA.

POSTERIORMENTE OTRAS PERSONAS REALIZARON INVESTIGACIONES

EN LAS CUALES UTILIZABAN DERIVADOS DEL HOECHST 33258 (BISBENCIMIDAZOL), LOEWE Y URBANIETZ (1974); LATT Y STENFTEN (1976), ENCONTRANDO QUE LOS DERIVADOS TAMBIÉN ERAN SENSIBLES A LA BROMODEOXIURIDINA.

ASÍ, LOS DISTINTOS ENSAYOS DEMOSTRARON QUE LA DETECCIÓN DE LA BRDÚ QUE SE ENCONTRABA COMO SUBSTITUYENTE EN CROMOSOMAS METAFÁSICOS MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE HOECHST, PODÍA SER USADO PARA ESTUDIAR REPLICACIÓN DE ADN, CINÉTICA Y PROLIFERACIÓN CELULAR, ASIMETRÍA LATERAL O FORMACIÓN DE ICH (LATT, 1974b; LIN Y COL., 1974; LATT Y COL., 1974; LATT, 1975; LATT, 1976; LATT, 1978).

TAMBIÉN SE UTILIZARON MÉTODOS ALTERNATIVOS DE FLUORESCENCIA PARA DETECTAR LA INCORPORACIÓN DE BRDÚ, LOS CUALES INVOLUCRAN EL USO DE 4,6-DIAMINO-2-FENILINDOL (DAPI), EL CUAL PRESENTA UNA FLUORESCENCIA PARECIDA A LA DEL HOECHST 33258 (LIN Y ALFL, 1976; LIN Y COL., 1977), EXCEPTO QUE LA TRANSICIÓN CUÁNTICA OCURRE EN UN GRAN RANGO DE PH.

EN ESE TIEMPO SE DEMOSTRÓ QUE LOS CROMOSOMAS DE CÉLULAS CULTIVADAS EN PRESENCIA DE BRDÚ O IDÚ EXHIBÍAN DIFERENCIACIÓN DE CROMÁTIDES HERMANAS CUANDO SE TIÑERON CON GIEMSA (IKUSHIMA Y WOLFF, 1974).

PERRY Y WOLFF (1974) OBSERVARON QUE EL CONTRASTE ERA AMPLIAMENTE INCREMENTADO SI LA TINCIÓN CON GIEMSA ERA PRECEDIDA CON

TINCIÓN POR HOECHST 33258, ILUMINANDO CON LUZ AMBIENTAL E -  
INCUBANDO A 65°C EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA SALINA DE CITRATOS.  
EN LA FIGURA No. 3 SE OBSERVA EL ASPECTO DE LOS CROMOSOMAS QUE  
ESTUVIERON EN PRESENCIA DE BRD<sub>U</sub>, SEGUIDAMENTE TRATADOS POR LA  
TINCIÓN DIFERENCIAL DE LOS AUTORES ANTERIORMENTE MENCIONADOS.

UNA EXTENSA VARIEDAD DE EXPERIMENTOS HAN SIDO UTILIZADOS  
PARA INVESTIGAR LAS BASES DE LOS PROCEDIMIENTOS BRD<sub>U</sub>-GIEMSA.

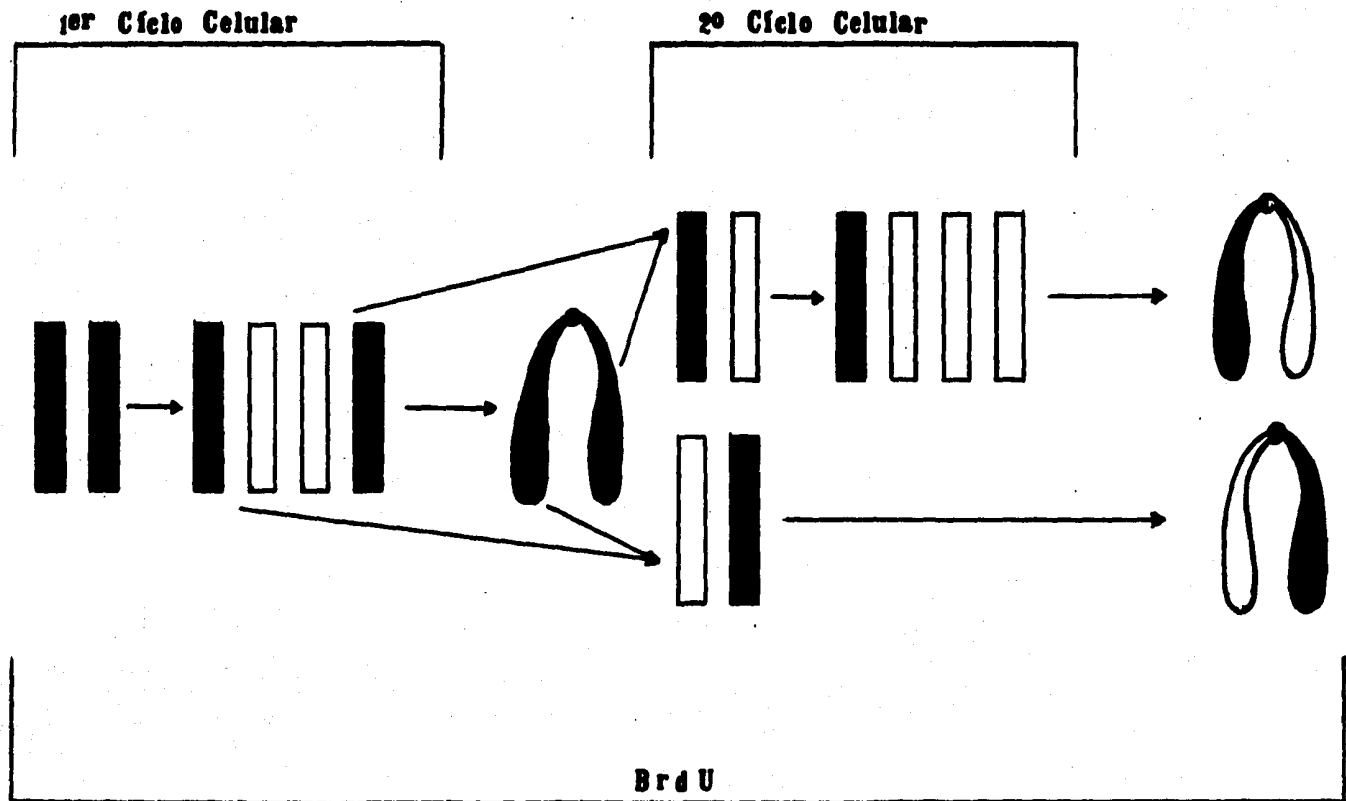
UNA PROPUESTA INDICA QUE LA DEGRADACIÓN FOTOSENSIBILIZADA  
Y LA ELUCIÓN DE ADN SUBSTITUÍDA CON BRD<sub>U</sub> CONTRIBUYE AL CONTRASTE  
DE LA TINCIÓN. UN SEGUNDO ESTUDIO SOBRE LAS PROTEÍNAS CROMOSÓ-  
MICAS INDICÓ QUE PUEDEN SER MODIFICADAS DE MANERA DEPENDIENTE  
DE LA BRD<sub>U</sub> DURANTE LOS PROCEDIMIENTOS CITOLÓGICOS.

GOTO Y COL. (1975 Y 1978), MOSTRARON QUE UNA VARIEDAD DE  
COLORANTES UNIDOS AL ADN SE PODÍAN USAR EN LUGAR DEL HOECHST  
33258 PARA FOTOSENSIBILIZAR LA DIFERENCIACIÓN DE CROMÁTIDES -  
HERMANAS. ASÍ PUÉS, DESDE HACE VARIOS AÑOS SE HA VENIDO USANDO  
LA TÉCNICA HOECHST-GIEMSA, LA CUAL FUÉ MODIFICADA POR GOTO A  
PARTIR DE LA ORIGINAL DE PERRY Y WOLFF.

### 1.3. INCORPORACIÓN DE 5-BROMO-2-DEOXIURIDINA A LA CÉLULA.

LOS SISTEMAS PARA OBTENCIÓN DE ICH TANTO COMO PARA LA  
INCORPORACIÓN BRD<sub>U</sub> SE HAN DIVIDIDO EN DOS GRUPOS: A) TÉCNI-  
CAS INVITRO Y B) TÉCNICAS IN VIVO.





**FIGURA NoIII Incorporación de BrdU y Aspecto de los cromosomas después de la tinción diferencial.**

A) LAS TÉCNICAS IN VITRO SE BASAN EN LA ADMINISTRACIÓN DE BRDÜ A CULTIVOS CELULARES (LATT, 1974; PERRY Y EVANS, 1975; STETKA Y WOLFF, 1976A, 1976B), SIENDO LOS MÁS EMPLEADOS EL CULTIVO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS. OTRO TIPO DE SISTEMAS IN VITRO REQUIEREN ACTIVACIÓN METABÓLICA CON EL FIN DE METABOLIZAR LAS SUSTANCIAS A ENSAYAR Y QUE DE ESTA MANERA SE OBTENGAN LOS METABOLITOS QUE DE ALGUNA MANERA PUDIERAN SER ACTIVOS PARA CAUSAR UN AUMENTO EN EL NÚMERO DE ICH, COMO ES EL CASO DE LA DIETILNITROSAMINA, LA CUAL ES UN COMPUESTO QUE REQUIERE DE ACTIVACIÓN METABÓLICA PARA OCASIONAR UN EFECTO INDUC TOR DE ICH; OTROS SISTEMAS NECESITAN DE PREEXPOSICIÓN DE LOS AGENTES QUÍMICOS A PREPARACIONES MICROSOMALES DE HÍGADO DE RATA (STETKA Y WOLFF, 1976A; NATARAJAN Y TATES, 1976); O POR ADICIÓN DE LOS AGENTES QUÍMICOS A ANÍMALES QUE SIRVEN COMO HUESPED MEDIADOR DE LA ACTIVACIÓN, Y POSTERIORMENTE SE OBTIENEN LOS PRODUCTOS METABÓLICOS DE LAS CÉLULAS HUESPED PARA REALIZAR UN CULTIVO CELULAR EN PRESENCIA DE BRDU (STETKA Y WOLFF, 1976B).

B) EN LOS SISTEMAS IN VIVO, UNA GRAN VARIEDAD DE TEJIDOS PUEDEN SER EXAMINADOS, INCLUYENDO AQUELLOS QUE SON NORMALMENTE ESENCIALES (CÉLULAS DE HÍGADO) Y PRECURSORES DE CÉLULAS GERMINALES.

ASÍ TAMBIÉN, UNA GRAN VARIEDAD DE ALTERNATIVAS PUEDEN

SER EXAMINADAS PARA ENSAYOS DE EXPOSICIÓN A QUÍMICOS. POR OTRA PARTE, ES IMPORTANTE QUE POR LLEVARSE A CABO LOS PROCESOS DE ACTIVACIÓN O INACTIVACIÓN DE MUTÁGENOS Y CARCINÓGENOS IN VIVO, POR TAL MOTIVO SUS EFECTOS PUEDEN SER EXAMINADOS MÁS DETALLADAMENTE QUE IN VITRO.

LAS INVESTIGACIONES INICIALES PARA ESTOS SISTEMAS IN VIVO FUERON REALIZADOS POR BLOOM Y TSU (1975) EN EMBRIONES DE POLLO, INYECTANDO BRDÜ DENTRO DE HUEVOS DE POLLO QUE FUERON INCUBADOS Y A LOS QUE SE INYECTÓ COLCEMIDA ANTES DEL SACRIFICIO. ESTE PROCEDIMIENTO PRODUJO TINCIÓN DIFERENCIAL CONSTANTE A CONCENTRACIONES DE BRDÜ DE CERCA DE 12.5 MG/EMBRIÓN.

LOS SISTEMAS IN VIVO TAMBIÉN HAN SIDO ESTUDIADOS EN PLANTAS, SISTEMAS ACUÁTICOS, CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA, CÉLULAS GERMINALES, CÉLULAS DEL BAZO, MACRÓFAGOS DE PÚLMÓN, MUCOSAS DE POLLO Y CÉLULAS FETALES. LA ADMINISTRACIÓN DE BRDÜ EN SISTEMAS DE MAMÍFEROS HA SIDO OBSTACULIZADA POR LA DESHALOGENACIÓN DE LA BASE ANÁLOGA EN EL HÍGADO. PARA EVITAR ESTA DEGRADACIÓN, SE HAN DESARROLLADO MÉTODOS ESPECIALES PARA MANTENER LA BRDÜ EN EL PERÍODO DE SÍNTESIS DE ADN. ESTOS INCLUYEN PRIMERAMENTE LA INYECCIÓN MÚLTIPLE; LA CUAL SE REALIZA MEDIANTE EL MARCADO DE CROMOSOMAS DE MAMÍFEROS POR INYECCIONES INTRAPERITONEALES DE BRDÜ CADA HORA, SEGUIDO POR UN PERÍODO DE OBSERVACIÓN Y POSTERIORMENTE UNA INYECCIÓN FINAL DE COLCHICINA (ALLEN Y LATT,

1976A,B; VOGEL Y BAUKNECHT, 1976). SIENDO EL NÚMERO TOTAL DE INYECCIONES DE 6 A 14, Y LA OBSERVACIÓN CROMOSÓMICA PRINCIPALMENTE EN CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA Y ESPERMATOGONIA DE RATÓN.

POR ESE TIEMPO TAMBIÉN SE DESARROLLÓ OTRA TÉCNICA, LA CUAL CONSISTE EN UNA INFUSIÓN CONTINUA DE BRDÚ, OBTENIÉNDOSE RESULTADOS MÁS CONSISTENTES. SE REALIZA MEDIANTE LA INFUSIÓN INTRAVENOSA DE BRDÚ A LA COLA DE RATAS O RATONES INMOVILIZADOS POR UN APARATO ESPECIAL LLAMADO RESTRICTOR DE BOLLMAN, DE ESTA MANERA SE EVITA TRAUMATIZAR AL ANIMAL Y SE PERMITE UNA VELOCIDAD CONSTANTE DE FLUJO DE LA BROMODEOXIURIDINA, SE ENCONTRÓ QUE DOSIS DE BRDÚ ENTRE 10 Y 15 MG/HR PRODUCEN RESULTADOS CONSISTENTES PARA ANÁLISIS DE ICH EN AMBAS ESPECIES DE ROEDORES (PERA Y MATTIAS, 1976).

ESTA TÉCNICA SE PUEDE REALIZAR CON INFUSIÓN SUBCUTÁNEA (PERA Y MATTIAS, 1976) O INFUSIÓN INTRAVENOSA (SCHNEIDER, CHAILLET Y TICE, 1976).

LA NECESIDAD DE MANTENER NIVELES APRECIABLES DE 5-BROMO-2-DEOXIURIDINA EN SANGRE PERIFÉRICA, LLEVÓ A DESARROLLAR OTRAS TÉCNICAS QUE CUMPLIERAN CON DICHO FINES. ASÍ, SE ENCONTRÓ QUE LA IMPLANTACIÓN DE TABLETAS DE BRDÚ MANTENÍAN NIVELES SAN-

GUÍNEOS APRECIABLES PARA OBTENER UNA MARCADA DIFERENCIACIÓN DE CROMOSOMAS DE MAMÍFEROS (ALLEN Y COL. 1978).

ESTA TÉCNICA CONSISTE EN LA IMPLANTACIÓN SUBCUTÁNEA DE UNA TABLETA DE BRDÚ EN UN COSTADO DEL CUERPO DEL RATÓN, CON LA POSTERIOR SUTURA O ENGRAPADO DE LA ABERTURA POR LA CUAL SE INTRODUJO LA TABLETA.

ORIGINALMENTE SE UTILIZABA ÚNICAMENTE UNA TABLETA DE 55MG DE BRDÚ, PERO SE OBSERVÓ POSTERIORMENTE, QUE SI SE CUBRÍAN ESTAS TABLETAS CON PARAFINA (MCFEE Y COL., 1983), O BACTO AGAR (KING Y COL., 1982) SE REDUCÍA LA CANTIDAD DE BRDÚ UTILIZADA, COMO TAMBIÉN SE MANTENÍA UNA CONCENTRACIÓN SANGUÍNEA ADECUADA DEBIDO A LA LIBERACIÓN GRADUAL DE BRDÚ PROVOCADA POR LAS DIFERENTES CUBIERTAS UTILIZADAS.

TAMBIÉN SE HA VENIDO DESARROLLANDO OTRA TÉCNICA QUE UTILIZA LA ELABORACIÓN DE TABLETAS DE 5-BROMO-2-DEOXIURIDINA COMBINADA CON COLESTEROL (MORALES, 1984) A DIFERENTES PROPORCIONES.

OTRA TÉCNICA PARA LA INCORPORACIÓN DE BRDÚ IN VIVO, CONSISTE EN LA ELABORACIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE BRDÚ, LA CUAL ES ADSORBIDA A CARBÓN ACTIVADO (MORALES, 1980). ESTA SOLUCIÓN SE ADMINISTRA INTRAPERITONEALMENTE A LOS ANIMALES DE LABORATORIO, PROPORCIONANDO UNA LIBERACIÓN SOSTENIDA DEL ANÁLOGO, LA CUAL PERMITE UNA BUENA DIFERENCIACIÓN DE CROMÁTIDES.

OTRAS TÉCNICAS UTILIZADAS IN VIVO SON: INYECCIÓN DE UNA

SOLUCIÓN DE BRDÜ A PECES (KLIGERMAN Y BLOOM, 1976), CON LA POSTERIOR OBTENCIÓN DE CROMOSOMAS METAFÁSICOS EN UN LAPSO DE 2 A 10 DÍAS DESPUÉS DE HABER SIDO ADMINISTRADA LA SOLUCIÓN, EXAMINÁNDOSE CÉLULAS DE INTESTINO, RIÑÓN, ESCAMAS Y BRÁNQUEAS.

EL DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE TODAS LAS TÉCNICAS MENCIONADAS, SE HAN HECHO CON EL FIN DE LOGRAR UNA MAYOR SENSIBILIDAD DE LA TÉCNICA, Y PARA DAR CONFIABILIDAD A LA LECTURA E IDENTIFICACIÓN DEL ICH Y UTILIZARLO CON LA CERTEZA DE QUE ES UN PARÁMETRO CONFIABLE EN ESTUDIOS DE GENOTOXICIDAD.

#### I.4. APLICACIÓN DEL INTERCAMBIO DE CROMÁTIDES HERMANAS EN ESTUDIOS DE MUTÁGENOS QUÍMICOS.

EL FENÓMENO DEL ICH ES UN EVENTO GENÉTICO INTERESANTE QUE SE OBSERVA EN CROMOSOMAS METAFÁSICOS AÓN CUANDO SU MECANISMO DE ACCIÓN NO ES BIEN CONOCIDO. EL HECHO DE QUE EL ICH SE PRODUZCA, YA SEA ESPONTÁNEAMENTE O POR INDUCCIÓN POR VARIOS AGENTES, ES EN SÍ MISMO IMPORTANTE.

EN TAL FENÓMENO SE VE INVOLUCRADO DAÑO Y/O REPARACIÓN BILATERAL DE ALGUNOS LOCI EN LOS CROMOSOMAS, LO CUAL PRESENTA LA OPORTUNIDAD PARA LA MODIFICACIÓN DE LA ESTRUCTURA CROMOSÓMICA Y/O SU FUNCIÓN.

EL ICH PUEDE SER OCASIONADO POR UN NÚMERO CONSIDERABLE

DE AGENTES QUÍMICOS, VIRALES Y FÍSICOS, LOS CUALES INCREMENTAN SU INCIDENCIA EN CÉLULAS NORMALES.

LAS ASEVERACIONES ANTERIORES DESCANSAN SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS, TANTO EN SISTEMAS IN VIVO COMO IN VITRO, CON EL FIN DE ENCONTRAR UNA CORRELACIÓN ENTRE EL ICH Y LA POTENCIAL MUTAGENO/CARCINOGENICIDAD DE DIVERSOS AGENTES.

SE HAN ENCONTRADO QUE EL ICH ES UN VALOR PREDICTIVO ÚTIL COMO ÍNDICE DE MUTAGENICIDAD Y CARCINOGENICIDAD PARA ESTUDIAR AGENTES QUÍMICOS Y FÍSICOS (ABE Y SASAKI, 1977A,B),

UN EJEMPLO DE LA RELACIÓN EXISTENTE ENTRE EL ICH Y LOS COMPUESTOS CARCINOGENICOS Y MUTAGÉNICOS, ASÍ COMO SU IMPORTANCIA PARA MEDIR DICHOS EFECTOS FUÉ REALIZADO POR KRAM Y COL. (1979), QUIENES OBSERVARON QUE EL INTERCAMBIO DE CROMÁTIDES HERMANAS SE INCREMENTA AL AUMENTAR LA DOSIS DE MITOMICINA C (MMC). EL NÚMERO DE ICH SE VE ALTAMENTE AFECTADO POR EL AGENTE QUÍMICO, YA QUE LA LÍNEA BASAL SE MUESTRA DEPENDIENTE DE LA ADMINISTRACIÓN DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MMC A RATONES DE LABORATORIO (FIGURA No.4).

ESTA CARACTERÍSTICA SE HA OBSERVADO CON VARIOS COMPUESTOS, TALES COMO METIL-METANOSULFONATO (NATARAJAN Y COL., 1983); 7,12-DIMETIL BENC(A)ANTRACENO (SINGH Y COL., 1983); CICLOFOSFAMIDA (MORALES, 1980); LOS CUALES PROBARON SER MUTÁGENOS E

INDUCTORES DE ICH. DEBIDO A LO CUAL SE CONSIDERA AL ICH COMO UNA HERRAMIENTA DE SUMA IMPORTANCIA PARA DETERMINAR EL POTENCIAL MUTAGÉNICO Y CARCINOGÉNICO DE AGENTES AMBIENTALES, ESPECÍFICAMENTE LOS QUÍMICOS YA QUE EL OBJETO DE ESTUDIO ES PRINCIPALMENTE GENOTOXICOLÓGICO.

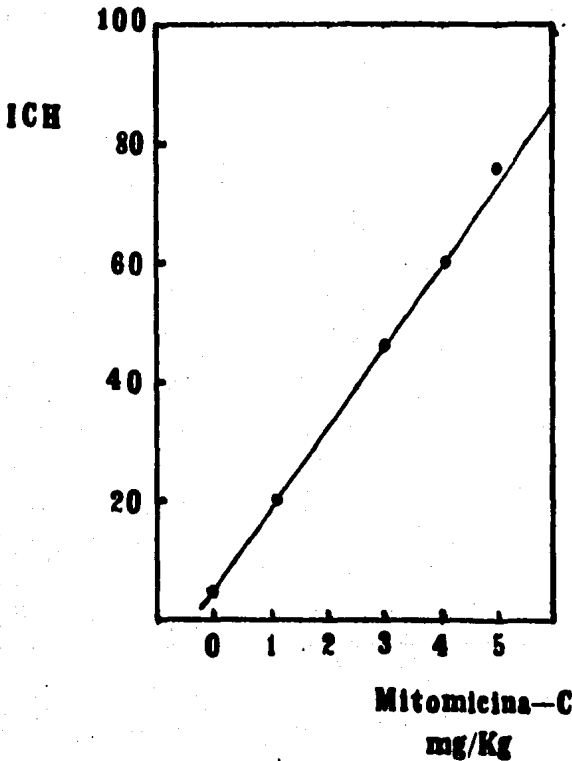


FIGURA No 4



## 2. OBJETIVOS

1.- IMPLEMENTAR TRES TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DEL INTERCAMBIO DE CROMÁTIDES HERMANAS IN VIVO.

DE MANERA PARTICULAR ANALIZAR EL PROCESO PARA INCORPORACIÓN DE 5-BROMO-2-DEOXIURIDINA CON LAS SIGUIENTES VARIANTES.

- A) TABLETAS DE BRDÜ CUBIERTAS PARCIALMENTE CON PARAFINA.
- B) TABLETAS DE BRDÜ EN COMBINACIÓN CON COLESTEROL.
- C) TABLETAS DE BRDÜ CUBIERTAS CON AGAR,

2.- HACER UNA EVALUCIÓN COMPARATIVA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN CADA TÉCNICA.

- A) CALIDAD DE LA TINCIÓN DIFERENCIAL,
- B) FRECUENCIA BASAL DEL ICH.
- C) PROLIFERACIÓN CELULAR.
- D) CARACTERÍSTICAS METODOLÓGICAS Y ECONÓMICAS CORRESPONDIENTES A CADA TÉCNICA.

3.- DE ACUERDO AL RESULTADO DEL ANÁLISIS ANTERIOR SE HARÁ UNA JERARQUIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS, ELIGIÉNDOSE LA MÁS ADECUADA PARA EL TRABAJO DEL LABORATORIO.

4.- VERIFICACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE CADA TÉCNICA USANDO UN MUTÁGENO CONOCIDO COMO ES LA MITOMICINA C,

### 3. MATERIAL Y METODOS.

### 3.1.- MATERIAL BIOLÓGICO:

60 RATONES MACHOS, CEPA NIH (SW), CON UN PESO ENTRE 20 Y 25G. LOS ANIMALES SE MANTUVIERON EN CONDICIONES NORMALES DE AGUA Y ALIMENTO DURANTE EL TIEMPO QUE SE REALIZÓ EL EXPERIMENTO.

#### MATERIAL NO BIOLÓGICO:

#### SUSTANCIAS Y REACTIVOS.-

5-BROMO-2-DEOXIURIDINA (SIGMA)

COLCHICINA (SIGMA)

BACTO AGAR (DIFCO)

PARAFINA PF. 56-58°C (SIGMA)

CARBÓN ACTIVADO (MERCK)

COLESTEROL (SIGMA)

MITOMICINA C (MERCK)

CLORURO DE POTASIO (MERCK)

METANOL (MERCK)

ACIDO ACÉTICO (MERCK)

ETANOL (MERCK)

ETER ETÍLICO (MERCK)

ACIDO CITRICO (MERCK)

FOSFATO DE SODIO (MERCK)

MONOFOSFATO DE SODIO (MERCK)

COLORANTE HOECHST 33258 (RIEDEL-DE-HAËN)

COLORANTE GIEMSA (MERCK)

### 3.2- EQUIPO Y MATERIAL DE VIDRIO.-

EQUIPO DE DISECCIÓN

BALANZA ANALÍTICA (METTLER)

ESTUFA (RIOSÁ)

BAÑO DE AGUA (MAPSA)

CENTRÍFUGA (SOLBAT)

LÁMPARA DE LUZ NEGRA (GENERAL ELECTRIC)

MICROSCOPIO (ZEISS)

PARRILLA DE CALENTAMIENTO (LINDBERG)

ENGRAPADORA PARA PIEL DE RATONES (CLAY ADAMS)

CRONÓMETRO (GENERAL ELECTRIC)

DADO Y PUNZÓN DE ACERO

VERNIER

GRADILLA

JERINGAS CON AGUJAS No. 21 (PLASTIPAC)

JERINGAS PARA INSULINA

CHAROLA DE PLÁSTICO

TAPÓN CÓNCAVO DE HULE

ALGODÓN

TUBOS PARA CENTRÍFUGA (ASSISTENT)

PIPETAS PASTEUR (CURTIN MATHESON SCIENTIFIC, INC)

PIPETAS GRADUADAS, 5ML (PYREX)

VASOS DE COPLIN, 50ML (CORNING)

VASOS DE PRECIPITADOS 100ML, 50ML Y 10ML (PYREX)

EMBUDO DE VIDRIO (PYREX)

PORTAOBJETOS (KIMBLE)

CUBREOBJETOS (INTRAMEDIC)

CAJA PETRI (PYREX)

TUBOS DE ENSAYO (PYREX)

TUBO DE VIDRIO DE 8MM DE DIÁMETRO

### 3.3- MÉTODOS:

A) ELABORACIÓN DE TABLETAS DE BRDÚ CUBIERTAS PARCIALMENTE CON PARAFINA (METODOLOGÍA MODIFICADA DE MCFEE Y COL., 1983).

1.- SE ELABORARON TABLETAS CON 40MG DE BRDÚ Y BAJO PRESIÓN DE 40KG. SE USÓ UN DADO DE ACERO ESMERILADO DE 3.4CM DE ALTURA Y 5.7 CM DE DIÁMETRO, CON UN CONDUCTO CENTRAL DE 0.46CM DE DIÁMETRO Y 3.4CM DE ALTURA.

LA CANTIDAD MENCIONADA SE COLOCÓ EN EL CONDUCTO, EN EL CUAL PENETRÓ UN PUNZÓN DE DIÁMETRO SIMILAR, SOBRE EL CUAL SE COLOCARON 40 KG.

COMO RESULTADO SE OBTUVO UNA TABLETA COMPACTA DE 0.46CM DE DIÁMETRO Y 0.17CM DE ALTURA.

2.- LAS TABLETAS SE SUMERGIERON EN PARAFINA PREVIAMENTE FUNDIDA A 60°C RECUBRIÉNDOLAS APROXIMADAMENTE UN 70% DE SU VOLUMEN TOTAL.

3.- SE DEJARON SOLIDIFICAR COMPLETAMENTE DURANTE UN

DÍA.

**B) ELABORACIÓN DE TABLETAS DE BRDÚ COMBINADAS CON COLESTEROL (METODOLOGÍA MODIFICADA DE MORALES, 1984).**

1.- SE MEZCLARON 30MG DE BRDÚ Y 60MG DE COLESTEROL EN UN TUBO DE ENSAYO HASTA SU HOMEGENIZACIÓN.

2.- SE USÓ UN DADO DE ACERO ESMERILADO DE 2.4CM DE ALTURA Y 5.7CM DE DIÁMETRO, CON UN CONDUCTO CENTRAL DE 0.65CM DE DIÁMETRO Y 2.4CM DE ALTURA.

LA MEZCLA SE COLOCÓ EN EL CONDUCTO, EN EL CUAL - PENETRÓ UN PUNZÓN DE DIÁMETRO SIMILAR, SOBRE EL CUAL SE COLOCARON 40KG.

COMO RESULTADO SE OBTUVO UNA TABLETA COMPACTA DE 0.65CM DE DIÁMETRO Y 0.45CM DE ALTURA.

**C) ELABORACIÓN DE TABLETAS DE BRDÚ CUBIERTA CON AGAR (METODOLOGÍA MODIFICADA DE KING Y COL., 1982).**

1.- SE ELABORARON TABLETAS CON 30MG DE BRDÚ BAJO PRESIÓN DE 40KG. SE USÓ UN DADO DE ACERO ESMERILADO DE 3.4CM DE ALTURA Y 5.7CM DE DIÁMETRO, CON CONDUCTO CENTRAL DE 0.46CM DE DIÁMETRO Y 3.4CM DE ALTURA.

LA BRDÚ SE COLOCÓ EN EL CONDUCTO, EN EL CUAL PENETRÓ



UN PUNZÓN DE DIÁMETRO SIMILAR, SOBRE EL CUAL SE COLOCARON 40 Kg.

COMO RESULTADO SE OBTUVO UNA TABLETA COMPACTA DE 0.46CM DE DIÁMETRO Y 0.12CM DE ALTURA,

2.- SE PREPARÓ BACTO AGAR AL 4.5% EN AGUA DESTILADA, CALENTANDO CUIDADOSAMENTE HASTA DISOLVERLO COMPLETAMENTE, SE UTILIZÓ FUEGO DIRECTO REEMPLAZANDO EL VOLÚMEN DE AGUA PERDIDO POR LA EVAPORACIÓN.

3.- SE CUBRIERON LAS TABLETAS CON TRES GOTAS DE BACTO AGAR A 58°C POR CADA CARA. ESTA OPERACIÓN SE REALIZÓ CON UNA PIPETA PASTEUR Y SOBRE UN SOPORTE CÓNCAVO DE HULE,

4.- DESPUÉS QUE SOLIDIFICÓ EL AGAR (30MIN), SE CORTÓ EL EXCESO Y LAS TABLETAS SE GUARDARON SIN EXPONERLAS A LA LUZ, CON UNA TEMPERATURA Y HUMEDAD AMBIENTE POR DOS DÍAS,

#### D) ADMINISTRACIÓN DE BRDÚ (TABLETAS),

1.- LAS TRES FORMAS DIFERENTES DE TABLETAS SE ADMINISTRARON HACIENDO UN CORTE LATERAL DE APROXIMADAMENTE 1CM, DE LONGITUD CERCA DEL MUSLO DEL RATÓN, EL CUAL SE ANESTESIÓ PREVIAMENTE CON ÉTER ETÍLICO DENTRO DE UNA CÁMARA,

2.- SE INTRODUJO LA TABLETA POR EL CORTE REALIZADO Y LA HERIDA SE CERRÓ CON UNA GRAPA ESPECIAL, POR ÚLTIMO SE REANIMÓ AL ANIMAL.

E) OBTENCIÓN DE METAFASES.

1.- 23 HR. DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE BRDU A LOS RATONES SE LES INYECTÓ INTRAPERITONEALMENTE COLCHICINA (5 MG/KG DE PESO).

2.- 26 HR. DESPUÉS DE ADMINISTRADA LA BRDU Y 3 HR. DESPUÉS DE HABER INYECTADO COLCHICINA, SE SACRIFICÓ AL RATÓN MEDIANTE DISLOCACIÓN CERVICAL.

3.- SE OBTUVIERON AMBOS FÉMURES CORTÁNDOLOS POR LAS EPÍFISIS ELIMINANDO EL TEJIDO MUSCULAR Y CONJUNTIVO QUE LOS CUBRE.

4.- SE OBTUVO LA MÉDULA ÓSEA ATRAVÉS DEL PASO DE SOLUCIÓN DE KCI 0,075M MEDIANTE UNA JERINGA QUE SE INSERTÓ EN LA EPÍFISIS PREVIAMENTE CORTADA.

5.- SE INCUBARON LAS CÉLULAS A 37°C DURANTE 20' EN 8ML DE LA SOLUCIÓN ANTERIOR.

6.- SE CENTRIFUGARON LAS CÉLULAS A 1200RPM POR 10', SE DESECHÓ EL SOBRENADANTE Y SE RESUSPENDIÓ EL BOTÓN CELULAR EN SOLUCIÓN FIJADORA (METANOL-AC. ACÉTICO 3:1). SE DEJARON REPOSAR LAS CÉLULAS POR 20' A TEMPERATURA AMBIENTE.

7.- SE CENTRIFUGARON LAS CÉLULAS A 1200RPM POR 10', SE DESECHO EL SOBRENADANTE Y SE RESUSPENDIÓ EL BOTÓN CELULAR EN SOLUCIÓN FIJADORA. SE DEJARON REPOSAR LAS CÉLULAS POR 10' A TEMPERATURA AMBIENTE.

8.- SE REPITIÓ EL PASO ANTERIOR, PERO EL TIEMPO DE ACCIÓN DEL FIJADOR FUÉ SOLO DE 5'.

9.- EL BOTÓN CELULAR SE RESUSPENDIÓ EN UN VOLÚMEN ADECUADO DE LA SOLUCIÓN FIJADORA, DE MANERA QUE LA MATERIA CELULAR NO SE ENCONTRARA DILUÍDA NI CONCENTRADA.

10.- EN PORTAOBJETOS BIEN LIMPIOS Y DESENGRASADOS EN ETANOL AL 96%, SE DEJARON CAER DOS O TRES GOTAS DE LA SUSPENSIÓN OBTENIDA, DEJÁNDOSE SECAR AL AIRE.

**F) PROCESO DE TINCIÓN.**

1.- LAS LAMINILLAS SE COLOCARON EN UN VASO DE COPLIN CON COLORANTE HOECHST 33258 A UNA CONCENTRACIÓN DE 5MG/50ML DE AGUA DESTILADA, POR UN PERÍODO DE 30'.

2.- SE SACARON DEL COLORANTE HOECHST Y SE LAVARON CON AGUA DESTILADA, SECÁNDOSE EN LA ESTUFA A 60°C POR 30'.

3.- SE COLOCARON LAS LAMINILLAS EN UN AMORTIGUADOR DE CITRATOFOSFATO A PH 7,0 Y SE EXPUSIERON A LA LUZ NEGRA DURANTE 30'.

4.- SE LAVARON CON AGUA DESTILADA Y SE SECARON EN LA ESTUFA A 60°C POR 30'.

5.- SE TIFIERON LAS LAMINILLAS CON GIEMSA AL 4% EN AGUA DESTILADA POR 13', SE LAVARON LAS LAMINILLAS CON AGUA DESTILADA Y SE SECARON AL AIRE.

g) LECTURA AL MICROSCOPIO.

1.- ICH; SE OBTUVO LA FRECUENCIA BASAL AL LEERSE 25 MITOSIS METAFÁSICAS DE SEGUNDA DIVISIÓN CELULAR POR CADA RATÓN.

2.- TINCIÓN DIFERENCIAL; SE OBSERVARON 1000 MITOSIS EN METAFASE DE SEGUNDA DIVISIÓN CELULAR POR ANIMAL CON EL SIGUIENTE CRITERIO:

POSITIVAS VALORABLES. SON AQUELLAS EN LAS CUALES SE OBSERVÓ ADECUADA DIFERENCIACIÓN DE CROMÁTIDES Y EN DONDE SE PUDO CONTAR FÁCILMENTE EL ICH.

POSITIVAS NO VALORABLES. SON AQUELLAS EN LAS CUALES NO EXISTIÓ UNA CLARA DIFERENCIACIÓN DE CROMÁTIDES.

3.- PROLIFERACIÓN CELULAR; SE OBSERVARON 100 MITOSIS EN METAFASE AL AZAR POR ANIMAL, UBICANDO LAS CÉLULAS QUE SE ENCONTRABAN EN LA PRIMERA, SEGUNDA O TERCERA DIVISIÓN CELULAR.

h) TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.

LOS RESULTADOS SE ANALIZARON BAJO LA PRUEBA ESTADÍSTICA LLAMADA ANÁLISIS DE VARIANCIA, LA CUAL SE UTILIZA PARA DETERMINAR SI EXISTEN DIFERENCIAS O VARIACIONES SIGNIFICANTES ENTRE LAS MEDIAS DE LOS GRUPOS O DENTRO DE LOS GRUPOS MISMOS. EN ESTA PRUEBA ESTADÍSTICA SE UTILIZÓ EL ESTADÍGRAFO F DE FISHER Y LA HIPÓTESIS A PROBAR FUE

Y LA HIPÓTESIS A PROBAR FUÉ  $H_0: X_1 = X_2 = \dots = X_N$ , SI LA F DE FISHER CALCULADA ERA MAYOR QUE LA F OBTENIDA DE TABLAS, ENTONCES EXISTIAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LAS MEDIAS, RECHAZÁNDOSE  $H_0$  Y ACEPTÁNDOSE  $H_1: X_1 \neq X_2 \neq \dots \neq X_N$ .

POSTERIORMENTE EN LOS RESULTADOS SIGNIFICATIVOS ENCONTRADOS POR EL ANÁLISIS DE VARIACIA (ANDEVA), SE REALIZÓ LA PRUEBA DE TUKEY, TAMBIÉN CONOCIDA COMO DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA HONESTA, LA CUAL ES UNA PRUEBA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS BASTANTE ESTRICTA. EN ESTE CASO SE USÓ EL ESTADÍGRAFO "Q" OBTENIDO DE LAS TABLAS DE RANGO ESTUDENTIZADO CON UN NIVEL DE SIGNIFICANCIA DADO, "T" TRATAMIENTOS Y GRADOS DE LIBERTAD, CUALQUIER DIFERENCIA ENTRE DOS MEDIAS SE DECLARA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA SI EXCEDE EL VALOR DE LA DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA HONESTA (DMSH) (REMINGTON, 1977; KREYSIG, 1979, HURLEY Y COL., 1981).

EN LA TABLA No. I SE ENLISTAN LAS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS EN LA EXPERIMENTACIÓN CON BASE EN LOS PUNTOS ANTERIORES.

### 1) ADMINISTRACIÓN DE MITOMICINA C,

1.- SE PREPARÓ UNA SOLUCIÓN DE MITOMICINA C (MMC) EN AGUA DESTILADA Y ESTÉRIL, CON UNA CONCENTRACIÓN FINAL DE 400MICROG

**TABLA No 1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS.**

Técnicas.	Via de administración.	Cantidad de BrDU por tableta.	Presión para elaborar 1 tableta.	Número de animales.	Peso de animales.	Número de células para ICH.	Número de células para T. diferen- cia.	Número de células para P. cu- lular.
Tabletas cubiertas con parafina.	Implantación subcutánea.	40mg	40Kg	7	22 ± 2g	175	7000	700
Tabletas cubiertas con agar.	Implantación subcutánea.	30mg	40Kg	7	22 ± 2g	175	7000	700
Tabletas combinadas con colesterol.	Implantación subcutánea.	30mg	40Kg	7	22 ± 2g	175	7000	700

/3ML.

2.- SE ADMINISTRÓ 0.1875ML DE LA SOLUCIÓN ANTERIORMENTE PREPARADA, LO CUAL ES UNA DOSIS DE IMG/KG DE PESO.

ESTA ADMINISTRACIÓN SE LLEVÓ A CABO EN 15 RATONES, UTILIZANDO 5 POR CADA TÉCNICA.

3.- LAS TÉCNICAS VALORADAS POR ESTE MUTÁGENO FUERON LA DE TABLETAS CUBIERTAS PARCIALMENTE CON PARAFINA, TABLETAS COMBINADAS CON COLESTEROL Y TABLETAS CUBIERTAS CON AGAR.

LA APLICACIÓN SE LLEVÓ A CABO MEDIANTE UNA INYECCIÓN ENTRAPERITONEAL UNA HORA DESPUÉS DE ADMINISTRADA LA BRDÜ,

LAS TABLETAS SE HICIERON Y ADMINISTRARON DE ACUERDO A LA METODOLOGÍA ANTERIORMENTE MENCIONADA, EL RESTO DEL PROCESO TAMBIÉN SE REALIZÓ IGUAL A LO INDICADO CUANDO NO SE UTILIZÓ UN MUTÁGENO.

#### J) LECTURA AL MICROSCOPIO.

1.- SE OBTUVO LA FRECUENCIA DE ICH DESPUÉS DE HABER OBSERVADO 25 MITOSIS EN METAFASE DE SEGUNDA DIVISIÓN CELULAR POR RATÓN.

2.- PROLIFERACIÓN CELULAR.- SE OBSERVARON 100 MITOSIS EN METAFASE AL AZAR POR ANIMAL, UBICANDO LAS CÉLULAS DE PRIMERA, SEGUNDA O TERCERA DIVISIÓN CELULAR.

**K) TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.**

SE EMPLEÓ LA PRUEBA "T" DE STUDENT, PARA DETERMINAR SI HABÍA DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN PRESENCIA DE MMC Y LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN AUSENCIA DE MMC EN CADA UNA DE LAS TRES TÉCNICAS (REMINGTON, 1977; - KREYSING, 1979).

EN LA TABLA NO. II SE ENLISTAN LOS ASPECTOS IMPORTANTES DE LA EXPERIMENTACIÓN REALIZADA EN PRESENCIA DE MITOMICINA C.



**TABLA No.11 CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS TÉCNICAS AL EVALUAR MMC.**

Técnicas.	Vía de administración de BrdU.	Cantidad de BrdU por tableta.	Dosis de MMC.	Número de animales.	Peso de animales.	Número de células para ICH.	Número de células para P. celular.
Tabletas cubiertas con parafina.	Implantación subcutánea.	40mg	1mg/Kg	5	22.9±1.7g	125	500
Tabletas cubiertas con agar.	Implantación subcutánea.	30mg	1mg/Kg	5	22.4±1g	125	500
Tabletas combinadas con colesterol.	Implantación subcutánea.	30mg	1mg/Kg	5	21.98±1.3g	125	500

4. RESULTADOS

#### 4.1. ANÁLISIS DE TABLETAS.

LA OBSERVACIÓN DIRECTA DE LAS TABLETAS ELABORADAS DE ACUERDO A CADA METODOLOGÍA, MOSTRÓ QUE LAS CANTIDADES UTILIZADAS DE 5-BROMO-2-DEOXIURIDINA SON IGUALES EN DOS CASOS: EN LAS TABLETAS QUE SE CUBIERON CON AGAR Y EN AQUELLAS COMBINADAS CON COLESTEROL SE UTILIZARON 30MG, SIN EMBARGO EN LAS QUE SE CUBIERON PARCIALMENTE CON PARAFINA SE UTILIZARON 40MG, LO CUAL SE VIÓ CLARAMENTE REFLEJADO EN EL PESO TOTAL ASÍ COMO EN SU DUREZA Y VOLÚMEN (TABLA No. III).

OBSEVAMOS QUE LA TABLETA ELABORADA EN COMBINACIÓN CON COLESTEROL TENÍA UN VOLÚMEN MAYOR ( $0,1493\text{cm}^3$ ) ASÍ COMO UNA MAYOR DUREZA ( $0,333\text{Kg/cm}^2$ ) EN COMPARACIÓN CON LAS OTRAS DOS TABLETAS. EN LA FIGURA No. 5 SE MUESTRAN LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS TABLETAS MEZCLADAS CON COLESTEROL.

LA TABLETA CUBIERTA PARCIALMENTE CON PARAFINA ES LA QUE CONTENÍA LA MAYOR CANTIDAD DE BRDÚ, SIENDO SU VOLÚMEN ( $0,0282\text{cm}^3$ ) MAYOR QUE EL DE LA TABLETA DE 30MG DE BRDÚ ANTES DE CUBRIRLA CON AGAR; SIN EMBARGO LA DUREZA DE LA PRIMERA ES LIGERAMENTE MAYOR ( $0,2083\text{Kg/cm}^2$ ), QUE LA DE LA ÚLTIMA. EN LA FIGURA No. 6 SE OBSERVAN TABLETAS DE BRDÚ ANTES DE CUBRIRLAS CON PARAFINA.

LA TABLETA AÚN NO CUBIERTA CON AGAR PRESENTÓ UN VOLÚMEN MENOR ( $0,0194\text{cm}^3$ ) EN COMPARACIÓN CON LAS OTRAS DOS Y TAMBIÉN UNA

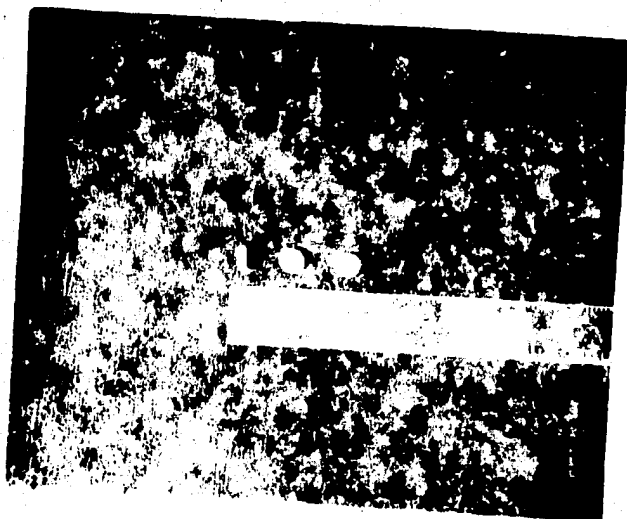
**TABLA No III CUADRO COMPARATIVO DE LAS PRINCIPALES CARACTERISTICAS DE LAS TABLETAS.**

Técnicas.	Cantidad de BrdU	Peso total.	Diámetro.	Altura.	Dureza Kg/cm <sup>2</sup>	Volumen total.
T C P P	40mg	40mg	0.46cm	0.17cm	0.2083	0.028cm <sup>3</sup>
T C T A	30mg	30mg	0.46cm	0.12cm	0.1875	0.019cm <sup>3</sup>
T C C	30mg	90mg	0.65cm	0.45cm	0.3333	0.149cm <sup>3</sup>

T C P P: Tabletas cubiertas parcialmente con parafina.

T C T A: Tabletas cubiertas totalmente con agar.

T C C: Tabletas combinadas con colesterol (2:1).



**FIGURA 5**  
TABLETAS DE Brdu EN COMBINACION CON COLESTEROL.



**FIGURA 6**  
TABLETAS DE Brdu ANTES DE CUBRIR CON PARAFINA.

MENOR DUREZA ( $0,1875\text{Kg/cm}^2$ ), SIN EMBARGO AL AGREGARLE EL AGAR, ÉSTA ADQUIRIÓ UNAS DIMENSIONES AÚN MAYORES (ENTRE 0,7 Y 1CM DE DIÁMETRO) QUE LAS DE LA TABLETA DE BRDÚ EN COMBINACIÓN CON COMBINACIÓN CON COLESTEROL. ESTE ASPECTO SE MUESTRA EN LAS FIGURAS No. 7 Y No. 8 EN LAS QUE OBSERVAMOS TABLETAS ANTES Y DESPUÉS DE CUBRIRLAS EN AGAR, CON LO QUE IDENTIFICAMOS LA MODIFICACIÓN DE SUS DIMENSIONES DURANTE EL PROCESO.

LAS CARACTERÍSTICAS ANTES MENCIONADAS VARIARON TOTALMENTE AL RECUPERAR LAS TABLETAS AL TÉRMINO DEL EXPERIMENTO. POR EJEMPLO LAS DE BRDÚ MEZCLADAS CON COLESTEROL SE HUMEDECIERON, INCREMENTANDO SUS DIMENSIONES (ENTRE 0,55 Y 0,6CM DE DIÁMETRO) Y SU DUREZA DISMINUYÓ CONSIDERABLEMENTE. EN ALGUNOS CASOS SE OBTUVIERON LAS TABLETAS TOTALMENTE FRACTURADAS (FIGURA No. 9),

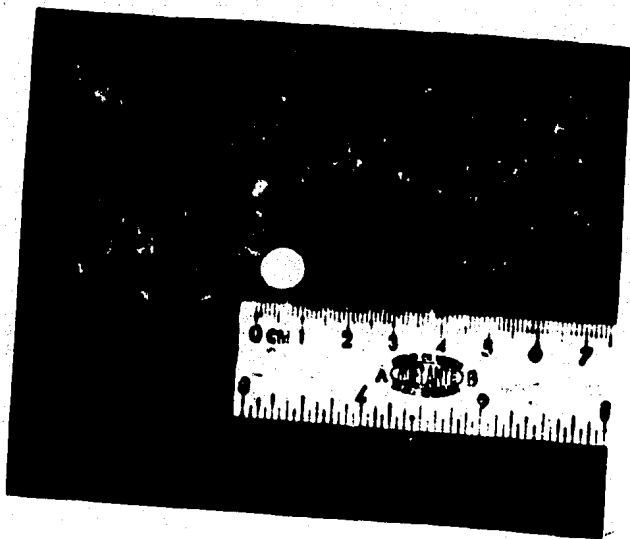
LAS TABLETAS DE BRDÚ CUBIERTAS PARCIALMENTE CON PARAFINA DISMINUYERON NOTABLEMENTE, YA QUE APROXIMADAMENTE EL 70% DE LA CANTIDAD INICIAL DE BRDÚ SE LIBERÓ DENTRO DEL RATÓN, QUEDANDO SÓLO EL 30% (FIGURA No. 10),

LAS TABLETAS CUBIERTAS TOTALMENTE CON AGAR FUERON LAS QUE SUFRIERON MAYOR MODIFICACIÓN, YA QUE EL ANÁLOGO DE TIMIDINA SE LIBERÓ TOTALMENTE, QUEDANDO ÚNICAMENTE EL RECUBRIMIENTO DE AGAR (FIGURA No. 11).

#### 4.2. TINCIÓN DIFERENCIAL.



**FIGURA 7**  
**TABLETAS DE BrdU ANTES DE CUBRIR CON AGAR.**

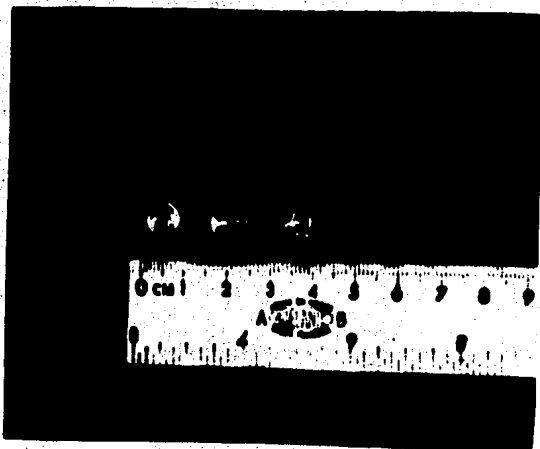
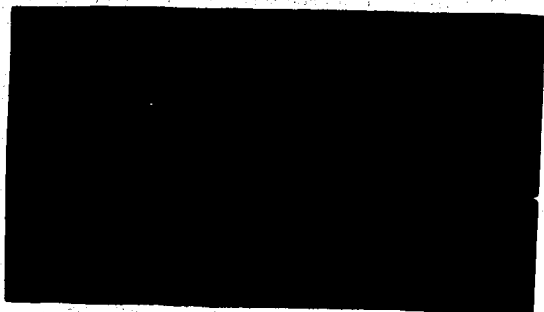


**FIGURA 8**  
**TABLETAS DE BrdU DESPUES DE CUBRIRLAS CON AGAR.**



**FIGURA 9**  
TABLETAS DE BrdU EN COMBINACION  
CON COLESTEROL DESPUES DEL  
EXPERIMENTO.

**FIGURA 10**  
TABLETAS DE BrdU CUBIERTAS  
CON PARAFINA DESPUES DEL  
EXPERIMENTO.



**FIGURA 11**  
TABLETAS DE BrdU CUBIERTAS  
CON AGAR DESPUES DEL  
EXPERIMENTO.



DESPUÉS DE HABER OBSERVADO 7000 CÉLULAS EN SEGUNDA DIVISIÓN CELULAR POR CADA TÉCNICA SE OBTUVIERON LOS RESULTADOS QUE SE MUESTRAN EN LA TABLA No. IV. EN ELLA OBSERVAMOS QUE EXISTIÓ MAYOR VARIACIÓN EN LOS DATOS OBTENIDOS CON LA TÉCNICA QUE UTILIZÓ CUBIERTA DE AGAR EN COMPARACIÓN CON LAS OTRAS DOS, POR EJEMPLO, EN LO QUE RESPECTA A TINCIÓN DIFERENCIAL VALORABLE LA MENCIONADA TÉCNICA SUFRIÓ VARIACIONES CON UN MARGEN QUE VA - DE 49 A 645 CÉLULAS CON TINCIÓN VALORABLE, MIENTRAS QUE LAS OTRAS DOS TÉCNICAS MOSTRARON VALORES MÁS HOMOGÉNEOS QUE VAN DE 682 A 844 CÉLULAS CON TINCIÓN DIFERENCIAL VALORABLE. UN EFECTO PARECIDO SE PRESENTÓ RESPECTO A LA TINCIÓN DIFERENCIAL NO VALORABLE, LA TÉCNICA CON CUBIERTA DE AGAR MOSTRÓ MÁS VARIABILIDAD EN SUS RESULTADOS, CON UNA AMPLITUD DE 355 A 951 CÉLULAS CON ESTE TIPO DE TINCIÓN, MIENTRAS QUE LAS OTRAS DOS TÉCNICAS MOSTRARON MAYOR SIMILITUD CON UN RANGO DE 156 A 258 CÉLULAS CON TINCIÓN DIFERENCIAL NO VALORABLE.

SE REALIZÓ EL ANÁLISIS DE VARIANCIA A LOS DATOS OBTENIDOS COMENZANDO CON EL PARÁMETRO TINCIÓN DIFERENCIAL NO VALORABLE. EL RESULTADO MOSTRÓ UNA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE LAS MEDIAS MUESTRALES DE NUESTROS TRES GRUPOS (TRES TÉCNICAS), DEBIDO A LO ANTERIOR SE REALIZÓ LA PRUEBA DE TUKEY O DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA HONESTA CON LA CUAL SE DETERMINÓ SIGNIFICANCIA EN LAS DIFERENCIAS DE LAS MEDIAS MUESTRALES ENTRE LA TÉCNICA CON CUBIER\_

**TABLA No IV EVALUACIÓN DE LA TINCIÓN DIFERENCIAL.**

Técnicas.	Tinción Diferencial No Valorable. lectura por ratón.	$\bar{x}$	Tinción Diferencial Valorable. lectura por ratón.	$\bar{x}$
T C P P	218,179,258,192,156,174,318	213.57	782,821,742,808,844,826,682	787
T C C A	195,254,236,237,237,217,209	226.42	805,746,764,763,763,783,791	775
T C T A	355,806,331,438,610,672,951	601.85	645,194,619,562,390,328,49	383.85

T C P P: Tabletas cubiertas parcialmente con parafina.

T C T A: Tabletas cubiertas totalmente con agar.

T C C: Tabletas combinadas con colesterol (2:1).

TA DE AGAR (C) Y LA TÉCNICA DE TABLETAS CON COLESTEROL (B), ASÍ COMO ENTRE LA DE AGAR Y LA DE PARAFINA (A). SIN EMBARGO NO SE PRESENTÓ DIFERENCIA ENTRE LAS TÉCNICAS B Y A (TABLA NO. V).

EN LA TABLA NO. VI, SE MUESTRA EL ANÁLISIS DE VARIAN-  
CIA CORRESPONDIENTE A LA TINCIÓN DIFERENCIAL VALORABLE DE LAS  
TRES TÉCNICAS, CON ÉL SE MOSTRÓ LA PRESENCIA DE SIGNIFICACIA ES-  
TADÍSTICA.

PODEMOS OBSERVAR QUE LA MEDIA DE LAS LECTURAS OBTENI-  
DAS EN LA TÉCNICA "C" ES BASTANTE MENOR EN COMPARACIÓN CON LAS  
MEDIAS DELAS OTRAS TÉCNICAS. AL REALIZAR LA PRUEBA DE TUKEY  
DETERMINAMOS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE A-C Y B-C, MIENTRAS  
QUE LA DIFERENCIA A-B NO FUÉ SIGNIFICATIVA. ELABORANDO UNA EVA-  
LUCIÓN GENERAL EN CUANTO A LA TINCIÓN DIFERENCIAL, INDICÓ QUE LA  
TÉCNICA QUE UTILIZÓ CUBIERTA DE AGAR FUÉ LA QUE PRODUJO RESULTADOS  
DEMASIADO VARIABLES, LO CUAL SE MANIFESTÓ EN LAS DIFERENCIAS SIGNI-  
FICATIVAS ENCONTRADAS AL COMPARARLOS CON LOS RESULTADOS DE LAS  
OTRAS DOS TÉCNICAS, LOS CUALES RESULTARON SER MUY HOMOGÉNEOS.

EN LA FIGURA NO. 12 SE MUESTRAN DOS MITOSIS EN LAS  
CUALES SE OBSERVA LA DIFERENCIA ENTRE LA TINCIÓN DIFERENCIAL NO  
VALORABLE Y LA VALORABLE.

#### 4.3. PROLIFERACIÓN CELULAR.

**TABLA No V**

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA TINCIÓN  
DIFERENCIAL NO VALORABLE: ANDEVA.**

Fuente de variación.	suma de cuadrados.	gl.	Cuadrados medios.	F de Fisher
Entre grupos.	681047.99	2	340524	18.7431*
Dentro de grupos.	327022.29	18	18167.905	
Total	1008070.3	20		

\*Significancia con  $P < 0.05$

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA TINCIÓN  
DIFERENCIAL NO VALORABLE: PRUEBA DE  
TUKEY.**

Comparación	Diferencia	Significancia.
C-B	375.42857	C>B
C-A	383.28571	C>A
B-A	12.85714	n.s.

n.s. : No existe significancia.

A: Técnica que utilizó parafina.

B: Técnica que utilizó colesterol.

C: Técnica que utilizó agar.

## TABLA NoVI

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA TINCIÓN DIFERENCIAL VALORABLE: ANDEVA.

Fuente de variación.	Suma de cuadrados.	gl.	Cuadrados medios.	F de Fisher.
Entre grupos.	68107.99	2	340524	18.7431*
Dentro de grupos.	327022.29	18	18167.905	
Total	1008070.3	20		

\*Significancia con  $P < 0,05$

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA TINCIÓN DIFERENCIAL VALORABLE: PRUEBA DE TUKEY.

Comparación	Diferencia	Significancia
A-B	12.85714	n.s.
A-C	388.28571	A>C
B-C	375.42857	B>C

n.s. : No existe significancia.

A: Técnica que utilizó parafina.

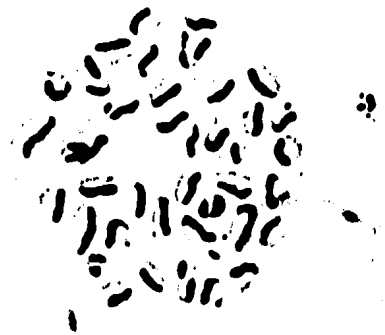
B: Técnica que utilizó colesterol.

C: Técnica que utilizó agar.



**FIGURA 12**  
**CELULA EN METAFASE DE MEDULA**  
**OSEA DE RATON CON TINCION**  
**DIFERENCIAL NO VALORABLE.**

**CELULA EN METAFASE DE MEDULA**  
**OSEA DE RATON CON TINCION**  
**DIFERENCIAL VALORABLE.**



DESPUÉS DE HABER OBSERVADO 700 CÉLULAS AL AZAR POR CADA TÉCNICA, SE OBTUVIERON LOS RESULTADOS QUE APARECEN EN LA TABLA No. VII, EN DONDE SE APRECIA QUE LOS DATOS SON HOMOGÉNEOS APARENTEMENTE Y SIN MARCADAS DIFERENCIAS. SIN EMBARGO EL ANÁLISIS DE VARIANCIA DE LAS CÉLULAS EN PRIMERA DIVISIÓN CELULAR MOSTRÓ QUE LA PRUEBA FUÉ SIGNIFICATIVA, POR LO CUAL SE ELABORÓ LA PRUEBA DE TUKEY, CON LA QUE SE OBTUVIERON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS EN B-C Y A-C, NO OBSTANTE QUE LA RELACIÓN A-B NO FUÉ SIGNIFICATIVA (TABLA No. VIII).

EN LA TABLA No. IX OBSERVAMOS EL ANÁLISIS DE VARIANCIA DE LAS CÉLULAS ENCONTRADAS EN SEGUNDA DIVISIÓN CELULAR, RESULTANDO LA PRUEBA SIGNIFICATIVA. CON LA PRUEBA DE TUKEY, SE DETERMINÓ UNA SIGNIFICANCIA EN LA DIFERENCIA ENTRE C-B, MIENTRAS QUE ENTRE C-A Y A-B NO HUBO TAL RESULTADO. EL PUNTO ANTERIOR, ASÍ COMO ÉSTE - INDICAN QUE NUEVAMENTE LA TÉCNICA QUE UTILIZÓ AGAR ACTUÓ COMO - DETERMINANTE PARA OBTENER TAL SIGNIFICANCIA EN LOS RESULTADOS.

EN LA TABLA No. X SE ENCUENTRA EL ANÁLISIS DE VARIANCIA DE LAS CÉLULAS EN TERCERA DIVISIÓN CELULAR CUYO RESULTADO MOSTRÓ QUE NO HUBO SIGNIFICANCIA, POR TAL MOTIVO NO FUÉ NECESARIO REALIZAR LA PRUEBA DE TUKEY.

EN LA FIGURA No. 13 SE MUESTRAN TRES MITOSIS EN LAS

**TABLA No VII EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.**

Técnicas.	Células en primera división celular. lecturas por retón.	$\bar{x}$	Células en segunda división celular. lecturas por retón.	$\bar{x}$	Células en tercera división celular. lecturas por retón.	$\bar{x}$
T C P P	16,15,13,13,13,14,10	14.14	75,80,77,82,71,75,80	77.14	9,5,10,5,11,11,10	8.71
T C G	17,16,17,19,16,11,15	15.85	76,72,71,73,71,79,74	73.71	7,12,12,8,13,10,11	10.42
T C T A	9,11,14,11,11,9,11	10.85	80,80,78,76,80,84,78	79.42	11,9,8,13,9,7,11	9.71

T C P P: Tabletas cubiertas parcialmente con parafina.

T C G: Tabletas combinadas con colesterol.

T C T A: Tabletas cubiertas totalmente con agar.



## TABLA NoVIII

### CÉLULAS EN PRIMERA DIVISIÓN CELULAR: AN D IVA.

Fuente de variación.	Suma de cuadrados.	gl.	Cuadrados medios.	F de Fisher.
Entre grupos.	90.380958	2	45.19047	8.78703*
Dentro de grupos.	92.571429	18	5.142857	
<b>Total</b>	<b>182.95239</b>	<b>20</b>		

\*Significancia con  $P < 0.05$

### CÉLULAS EN PRIMERA DIVISIÓN CELULAR: PRUEBA DE TUKEY.

Comparación	Diferencia	Significancia
B-A	1.714285	n.s.
B-C	5	B>C
A-C	3.285715	A>C

n.s. : No existe significancia.

A: Técnica que utilizó parafina.

B: Técnica que utilizó colesterol.

C: Técnica que utilizó agar.

## TABLA No IX

### CÉLULAS EN SEGUNDA DIVISIÓN CELULAR: ANDEVA.

Fuente de variación.	Suma de cuadrados.	Gl.	Cuadrados medios.	F de Fisher.
Entre grupos.	115.80954	2	57.90477	5.92205*
Dentro de grupos.	176.0007	18	9.7778167	
Total.	291.81024	20		

\*Significancia con  $P < 0.05$

### CÉLULAS EN SEGUNDA DIVISIÓN CELULAR: PRUEBA DE TUKEY.

Comparación	Diferencia	Significancia
C-A	2.285714	n.s.
C-B	5.714291	C>B
A-B	3.428572	n.s.

n.s. : No existe significancia.

A: Técnica que utilizó parafina.

B: Técnica que utilizó colesterol.

C: Técnica que utilizó agar.

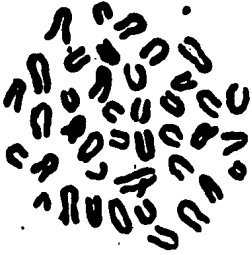
# TABLA NoX

## CÉLULAS EN TERCERA DIVISIÓN CELULAR: ANDEVA.

Fuente de variación.	Suma de cuadrados.	gl.	Cuadrados medios.	F de Fisher.
Entre grupos.	10.380929	2	5.1904645	
Dentro de grupos.	96.571428	18	5.3650793	0.96745*
Total.	106.952357	20		

\*Significancia con  $P < 0.05$

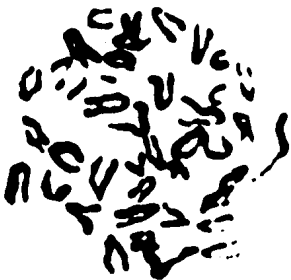
**FIGURA 13**  
**CELULA EN METAFASE DE PRIMERA**  
**DIVISION CELULAR.**



**CELULA EN METAFASE DE SEGUNDA**  
**DIVISION CELULAR.**



**CELULA EN METAFASE DE TERCERA**  
**DIVISION CELULAR.**



CUALES SE PUEDE DIFERENCIAR SU ESTADIO CELULAR MEDIANTE LA TINCIÓN DIFERENCIAL, DE ACUERDO CON ÉLLO PODEMOS UBICARLAS EN PRIMERA, SEGUNDA Y TERCERA DIVISIÓN CELULAR.

#### 4.4. INTERCAMBIO DE CROMÁTIDES HERMANAS.

DESPUÉS DE HABER OBSERVADO 175 MITOSIS METAFÁSICAS EN SEGUNDA DIVISIÓN CELULAR CON TINCIÓN DIFERENCIAL VALORABLE POR CADA TÉCNICA; SE OBTUVIERON LOS DATOS QUE APARECEN EN LA TABLA No. XI, EN DONDE QUEDA CLARO QUE LAS FRECUENCIAS BASALES DE ICH NO PRESENTARON DIFERENCIAS MARCADAS, HECHO QUE SE COMPROBÓ AL APLICAR EL ANÁLISIS DE VARIANCIA MEDIANTE EL CUAL NO SE ENCONTRARON RESULTADOS SIGNIFICATIVOS (TABLA No. XI). EN LA FIGURA No. 14 OBSERVAMOS UNA MITOSIS TÍPICA EN LA CUAL SON EVIDENTES LOS ICH.

#### 4.5. INTERCAMBIO DE CROMÁTIDES HERMANAS Y PROLIFERACIÓN CELULAR EN PRESENCIA DE MITOMICINA C.

DESPUÉS DE HABER OBSERVADO 125 MITOSIS METAFÁSICAS DE SEGUNDA DIVISIÓN CELULAR CON TINCIÓN DIFERENCIAL VALORABLE POR TÉCNICAS, OBSERVAMOS QUE EL ICH SE INCREMENTÓ EN TODAS LAS TÉCNICAS DE MANERA SIMILAR, DE TAL FORMA QUE LAS MEDIAS FUERON 11,76, 12.008 Y 12.408. ESTOS INCREMENTOS FUERON ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVOS CON LA PRUEBA "T"-STUDENT AL COMPARARLOS CON LOS RESULTADOS

# TABLA No XI

## EVALUACION DEL ICH.

Técni- cas.	Intercambio de Cromátidos Hermanas (ICH). lecturas por retón.	$\bar{x}$
T C P P	3.0, 4.16, 2.92, 3.76, 3.8, 4.6, 3.44	3.668
T C C	2.48, 3.84, 3.32, 3.04, 3.76, 3.4, 3.5	3.337
T C T A	3.08, 3.8, 3.72, 4.16, 4.88, 3.72, 3.0	3.771

T C P P: Tabletas cubiertas parcialmente con parafina.

T C C: Tabletas combinadas con colesterol.

T C T A: Tabletas cubiertas totalmente con agar.

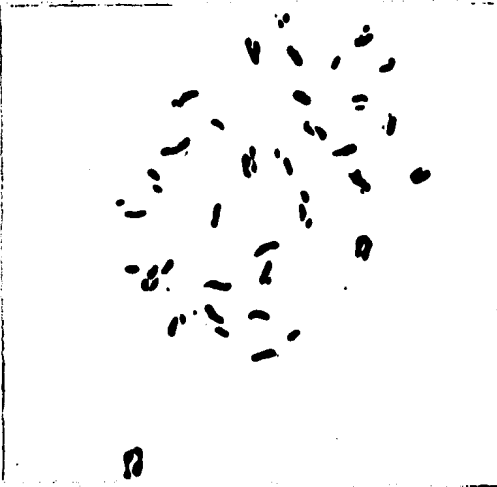
## ICH ANDEVA

Fuente de variación.	Suma de cuadrados.	gl.	Cuadrados medios.	F de Fisher.
Entre grupos.	0.719394	2	0.359947	0.98083*
Dentro de grupos.	5.885718	18	0.3669798	
Total.	6.605612	20		

\*Significancia con  $P < 0.05$



**FIGURA 14**  
CELULA EN METAFASE DE SEGUNDA DIVISION  
CELULAR CON TINCION DIFERENCIAL  
VALORABLE, LA CUAL PRESENTA ICH.



**FIGURA 15**  
CELULA EN METAFASE DE SEGUNDA DIVISION  
CELULAR CON TINCION DIFERENCIAL VALORABLE,  
LA CUAL ESTUVO EN PRESENCIA DE MMC Y  
MOSTRO ICH.

TADOS QUE SE OBTUVIERON SIN EXPONER LAS CÉLULAS A LA MMC (TABLA No. XII). EN LA FIGURA No. 15 SE OBSERVA UNA MITOSIS CON UN INCREMENTO NOTABLE DE ICH, DESPUÉS DE TRATALA CON MMC.

LOS DATOS OBTENIDOS EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR SE MUESTRAN EN LA TABLA... No. XIII, EN DONDE SE OBSERVA QUE LOS RESULTADOS SON SEMEJANTES EN LAS TRES TÉCNICAS, DE TAL MODO QUE AL APLICAR EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO T-STUDENT, CON RESPECTO A LOS DATOS OBTENIDOS EN EL TESTIGO NEGATIVO, ES DECIR SIN EXPOSICIÓN A MMC, SE ENCONTRARON RESULTADOS SIGNIFICATIVOS, O SEA QUE SE OBTUVIERON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LAS MEDIAS (TABLA No. XIV). ESTO FUÉ DEBIDO A QUE LAS CÉLULAS EN PRIMERA DIVISIÓN AUMENTARON APROXIMADAMENTE UN 100% EN GENERAL EN LAS TRES TÉCNICAS, MIENTRAS QUE LAS CÉLULAS EN TERCERA DIVISIÓN DISMINUYERON UN 75% EN LA TÉCNICA QUE UTILIZÓ TABLETAS CON PARAFINA, 91.77% EN LA TÉCNICA QUE UTILIZÓ AGAR Y 80.9% EN LA TÉCNICA QUE USÓ COLESTEROL, TODAS CON RESPECTO A LOS VALORES OBTENIDOS AL EVALUAR LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN AUSENCIA DE MMC.

LAS CÉLULAS EN SEGUNDA DIVISIÓN DISMINUYERON LEVEMENTE, POR EJEMPLO EN LA TÉCNICA QUE UTILIZÓ PARAFINA 10.2%, EN LA TÉCNICA QUE UTILIZÓ AGAR 10.85% Y EN LA TÉCNICA QUE USÓ COLESTEROL 9.91%, CON RESPECTO A LOS TESTIGOS NEGATIVOS.

EN LA TABLA No. XV PODEMOS OBSERVAR EN LA GRÁFICA LAS



## TABLA N.º XII

### EVALUACIÓN DEL ICH EN PRESENCIA DE MMC.

Técnicas.	Intercambio de Cronfidos Hermanas. lecturas por ratón.	$\bar{X}$
T C P P	11.64, 12.8, 12.92, 12.44, 12.24	12.408
T C C	12.76, 11.48, 11.36, 11.2, 12.0	11.76
T C T A	12.16, 11.64, 11.96, 12.2, 12.04	12.008

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ICH EN PRESENCIA DE MMC: T-STUDENT.

Técnicas.	ICH	ICH testigo negativo	Significancia. t-Student
T C P P	12.408	3.668	27.1030*
T C C	11.76	3.337	25.2532*
T C T A	12.008	3.771	31.6095*

\*Significancia con  $P < 0.05$

T C P P: Tabletas cubiertas parcialmente con parafina.

T C C: Tabletas combinadas con colesterol.

T C T A: Tabletas cubiertas totalmente con agar.

# TABLA No XIII

## EVALUACION DE LA PROLIFERACION CELULAR EN PRESENCIA DE MMC.

Técnicas.	Células en 1 <sup>a</sup> división celular. lecturas por ratón.	$\bar{x}$	Células en 2 <sup>a</sup> división celular. lecturas por ratón.	$\bar{x}$	Células en 3 <sup>a</sup> división celular. lecturas por ratón.	$\bar{x}$
T C P P	30,26,30,28,29	28.6	68,72,68,69,69	69.2	2,2,2,3,2	2.2
T C C	36,38,30,26,28	31.6	62,59,68,73,70	66.4	2,3,2,1,2	2
T C T A	32,25,29,32,24	28.4	67,73,70,68,76	70.8	1,2,1,0,0	0.8

T C P P: Tabletas cubiertas parcialmente con parafina.

T C C: Tabletas combinadas con colesterol.

T C T A: Tabletas cubiertas totalmente con agar.

## TABLA No XIV

### ANALISIS ESTADISTICO DE LA PROLIFERACION CELULAR EN PRESENCIA DE MMC: T-STUDENT.

Técnicas.	1 <sup>a</sup> división celular.	2 <sup>a</sup> división celular, testigo.	Significancia t-Student.	2 <sup>a</sup> división celular.	2 <sup>a</sup> división celular, testigo.	Significancia t-Student.	3 <sup>a</sup> división celular.	3 <sup>a</sup> división celular, testigo.	Significancia t-Student.
T C P P	28.6	14.1	11.90*	69.2	77.14	4.91*	2.2	8.71	6.42*
T C C	28.4	10.85	9.72*	70.8	79.42	4.51*	0.8	9.71	10.32*
T C T A	31.6	15.85	6.30*	66.4	73.71	2.60*	2	10.42	9.37*

\*Significancia con P<0.05

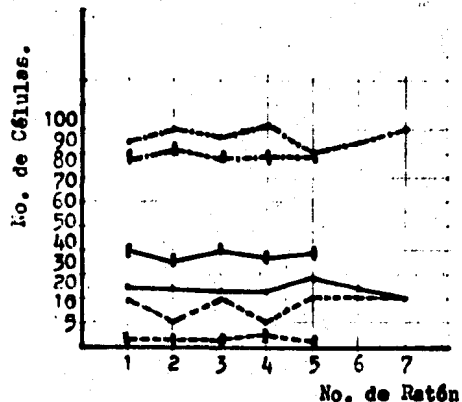
T C P P: Tabletas cubiertas parcialmente con parafina.

T C C: Tabletas combinadas con colesterol.

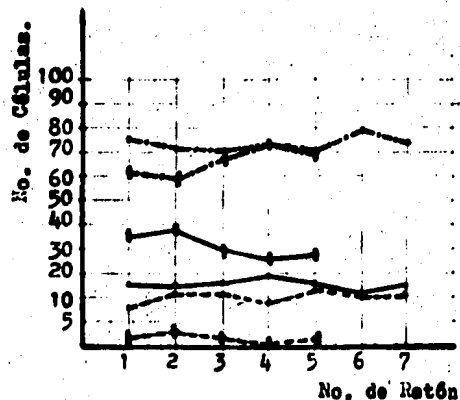
T C T A: Tabletas cubiertas totalmente con agar.

TABLA No XV

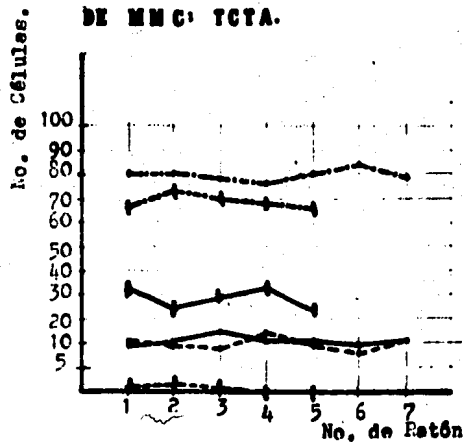
COMPORTAMIENTO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE MMC, TCFP.



COMPORTAMIENTO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE MMC, TCC.



COMPORTAMIENTO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE MMC, TCTA.



- Células 1<sup>a</sup> división celular.
- - -●- - - Células 2<sup>a</sup> división celular.
- ▲— Células 3<sup>a</sup> división celular.
- Células 1<sup>a</sup> división celular en presencia de MMC.
- ▲— Células 2<sup>a</sup> división celular en presencia de MMC.
- ▲— Células 3<sup>a</sup> división celular en presencia de MMC.

VARIACIONES EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR CON RESPECTO A LOS TESTIGOS. ASÍ TAMBIÉN EN LA TABLA No. XVI SE OBSERVA LAS VARIACIONES DE LA FRECUENCIA DEL ICH CON RESPECTO A LOS TESTIGOS.

4.6. UTILIZACIÓN DE OTROS PARÁMETROS PARA LA EVALUACIÓN DE CADA TÉCNICA.

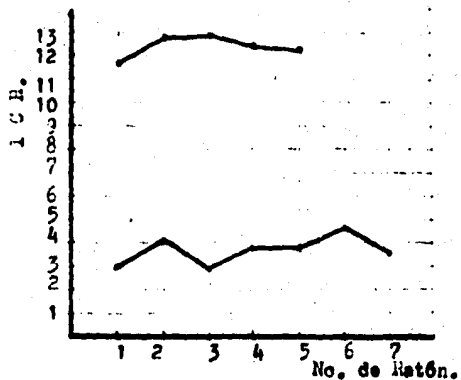
AL TÉRMINO DE LA EXPERIMENTACIÓN Y DESPUÉS DE HABER EVALUADO LAS CARACTERÍSTICAS DE CADA TÉCNICA, SE DETERMINARON 5 PARÁMETROS ADICIONALES QUE SE MUESTRAN EN LA TABLA No. XVII.

ELLOS INDICAN QUE DESDE EL PUNTO DE VISTA ECONÓMICO EXISTEN DIFERENCIAS EVIDENTES ENTRE CADA UNA DE LAS TRES TÉCNICAS. PODEMOS FÁCILMENTE OBSERVAR QUE LAS TABLETAS CUBIERTAS TOTALMENTE CON AGAR ES LA DE COSTO GLOBAL MÁS BAJO (POR TABLETA), APROXIMADAMENTE UN 44.92% MENOS QUE LA TABLETA MEZCLADA CON COLESTEROL QUE FUÉ LA DE COSTO MÁS ELEVADO Y 32.58% MENOS QUE LA RELACIONADA CON PARAFINA. ESTA ÚLTIMA TÉCNICA A SU VEZ PRESENTÓ UN GASTO APROXIMADAMENTE 9.31% MENOR QUE LA TÉCNICA DE TABLETAS MEZCLADAS CON COLESTEROL.

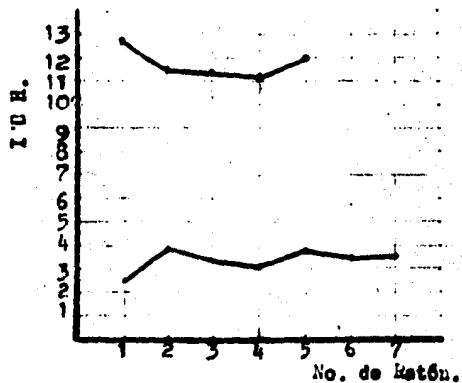
EN LO QUE CONCIERNE A LOS TIEMPOS MÍNIMOS REQUERIBLES PARA ELABORAR, CUBRIR E INTRODUCIR UNA TABLETA; PARA DESARROLLAR LA TÉCNICA QUE OCUPÓ TABLETAS CON COLESTEROL SE EMPLEÓ UN MENOR TIEMPO, APROXIMADAMENTE 33% MENOS DEL REQUERIDO PARA LA TÉCNICA QUE UTILIZÓ CUBIERTA DE AGAR, QUE FUÉ LA QUE REQUIRIÓ MÁS TIEMPO

TABLA No XVI

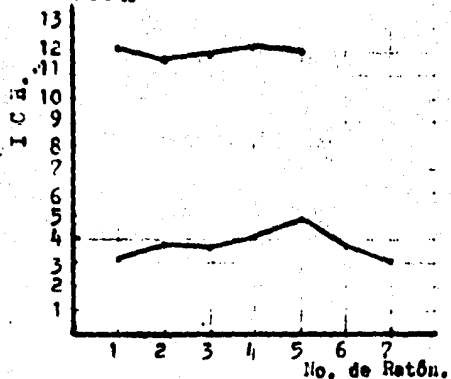
COMPORTAMIENTO DEL ICH EN  
PRESENCIA Y AUSENCIA DE MMC:  
ICPP.



COMPORTAMIENTO DEL ICH EN  
PRESENCIA Y AUSENCIA DE MMC:  
TCC.



COMPORTAMIENTO DEL ICH EN  
PRESENCIA Y AUSENCIA DE MMC:  
TCTA.



— ICH en ausencia de MMC.  
— ICH en presencia de MMC.

**TABLA No XVII**

**EVALUACION DE DIVERSOS PARAMETROS EN EL DESARROLLO DE LAS TECNICAS.**

Parámetros.	T C P P	T C C	T C T A
<b>COSTOS:</b>			
BrdU	\$244.80	\$183.600	\$183.60
Parafina	\$00.0063	-----	-----
Agar	-----	-----	\$1.0453
Coolesterol	-----	\$81.00	-----
<b>TOTAL</b>	<b>\$244.8063</b>	<b>\$267.60</b>	<b>\$184.6453</b>
<b>TIEMPOS:</b>			
Elaboración de tabletas	10min	12min	10min
Recubrimiento de tabletas	2min	-----	5min
Implementación de tabletas	5min	3min	5min
<b>TOTAL</b>	<b>17min</b>	<b>15min</b>	<b>20min</b>
Facilidad metodológica	+	+++	++

T C P P: Tabletás cubiertas parcial-  
mente con parafina.

T C C: Tabletás combinadas con  
colesterol.

T C T A: Tabletás cubiertas total-  
mente con agar.

+ : Proceso lento.

++ : Proceso semilento.

+++ : Proceso rápido.

PARA REALIZAR LAS OPERACIONES MENCIONADAS Y 13% MENOS QUE LA RELACIONADA CON PARAFINA, LA CUAL A SU VEZ NECESITÓ EN DESARROLLO 17% MENOS QUE LA DE AGAR.

EL ASPECTO DE FACILIDAD METODOLÓGICA CONTEMPLÓ LOS PROBLEMAS QUE ENTRAÑÓ CADA TÉCNICA AL MOMENTO DE REALIZARSE, INCLUYENDO AL TIPO Y CARACTERÍSTICAS DEL EQUIPO Y MATERIAL DE LA BORATORIO. AUNQUE SU EVALUACIÓN ES SUBJETICA POR DEPENDER EN GRAN MEDIDA DEL EXPERIMENTADOR, CONSIDERAMOS QUE ES UN PUNTO MÁS PARA HACER EL ANÁLISIS COMPARATIVO. EN ESTE SENTIDO LA TÉCNICA QUE PRESENTÓ MAYORES PROBLEMAS METODOLÓGICOS FUÉ LA QUE USÓ PARAFINA, SEGUIDA POR LA QUE UTILIZÓ AGAR, SIENDO LA QUE EMPLEÓ COLESTEROL LA TÉCNICA QUE PRESENTÓ MENOR O NINGÚNA DIFICULTAD.



5. DISCUSSION

EL DESARROLLO DE TÉCNICAS CITOGÉNÉTICAS PARA EL ESTUDIO DE MUTÁGENOS HA CONDUCIDO A VARIOS INVESTIGADORES A ESTUDIAR LOS PRINCIPALES PARÁMETROS QUE CARACTERIZAN A ÉSTAS (KATO, 1974B; PALITTI Y COL., 1982).

COMO SE HA DEMOSTRADO QUE EL ESTUDIO DEL ICH ES UNO DE LOS MEDIOS MÁS EFICIENTES PARA DETERMINAR MUTAGENICIDAD, SE HAN ESTABLECIDO DIVERSAS TÉCNICAS PARA ANALIZAR DICHO FENÓMENO IN VIVO. LOS DIFERENTES PROCESOS PRESENTAN VENTAJAS Y DESVENTAJAS, SIN EMBARGO, CONSIDERAMOS QUE EL USO DE TABLETAS ES EL MÁS ADECUADO, LA REPRODUCIBILIDAD DE LAS TÉCNICAS QUE UTILIZAN TABLETAS ES ALTA, SE ALCANZA UN NIVEL SANGUÍNEO DE BRDÚ SUFICIENTE PARA CUBRIR POR LO MENOS DOS CICLOS DE REPLICACIÓN DEL ADN, LA ADMINISTRACIÓN DE BRDÚ TAMPOCO ENTRAÑA PROBLEMAS METODOLÓGICOS SERIOS Y SÓLO SE PRODUCE UN LEVE TRAUMA AL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN. OTRAS VENTAJAS SON QUE NO UTILIZAN EQUIPO SOFISTICADO Y QUE LA CANTIDAD DE 5-BROMO-2-DEOXIURIDINA QUE SE USA ES PEQUEÑA.

ENTRE LAS TÉCNICAS QUE UTILIZAN TABLETAS TAMBIÉN EXISTEN DIFERENCIAS QUE PUEDEN DEBERSE AL TIPO DE CUBIERTA, SUS PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y OTRAS INHERENTES DE CADA MÉTODO.

PARA EVALUAR LAS VENTAJAS Y DESVENTAJAS EN CADA TÉCNICA

Y DIVERSOS ASPECTOS METODOLÓGICOS EN SU ELABORACIÓN.

ES CONVENIENTE MENCIONAR QUE EN EL PRESENTE ESTUDIO LA TÉCNICA DE AGAR Y LA DE COLESTEROL USARON 30MG DE BRDU, MIENTRAS QUE EN LA DE PARAFINA SE AGREGARON 10MG MÁS, ESTO PUEDE EXPLICAR PORQUE SE OBTUVO UNA MEJOR Y MÁS CLARA TINCIÓN DIFERENCIAL EN LA TÉCNICA DE PARAFINA, ASÍ COMO TAMBIÉN UN AUMENTO EN LA BASAL DE ICH. ESTE ÚLTIMO RESULTADO SE VE APROYADO POR LOS DATOS OBTENIDOS POR TICE (1976), QUIEN OBSERVÓ QUE EL INCREMENTO DE LA FRECUENCIA DE ICH ES PROPORCIONAL A LA CANTIDAD DE BRDU UTILIZADA (FIGURA No. 16).

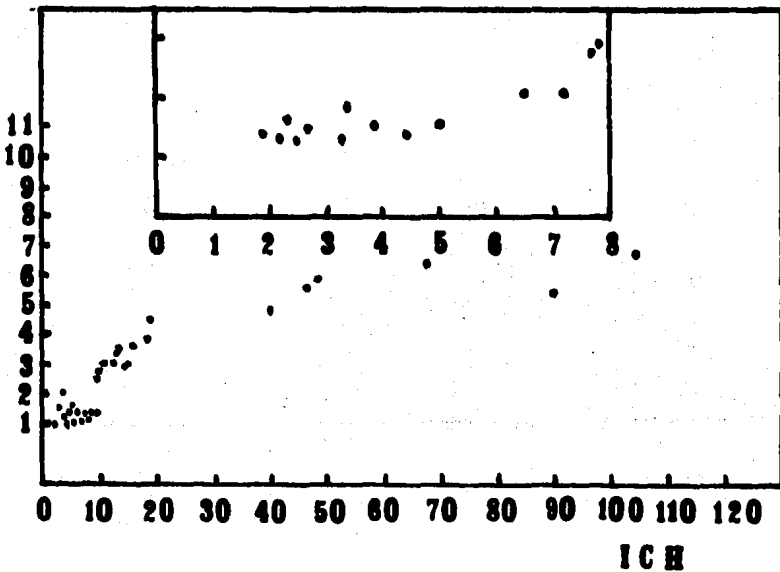


FIGURA No. 16 FRECUENCIA DE ICH EN FUNCIÓN DE LA CANTIDAD DE BRDU ADMINISTRADA, DESPUÉS DE DOS CICLOS DE REPLICACIÓN.

EL ANÁLISIS DE LAS DIFERENTES TABLETAS PROPORCIONÓ DATOS ÚTILES CON LOS CUALES SE DETERMINÓ QUE A MAYOR CANTIDAD DE COMPONENTES SE PRESENTÓ UN MAYOR TAMAÑO Y UNA MEJOR CONSISTENCIA, ES POR ELLO QUE LA TABLETA EN COMBINACIÓN CON COLESTEROL MOSTRÓ MEJORES CARACTERÍSTICAS DE MANEJO Y FACILIDAD DE ADMINISTRACIÓN EN COMPARACIÓN CON LAS OTRAS DOS.

LAS CUBIERTAS, ASÍMISMO, CONFIRIERON OTRAS CARACTERÍSTICAS TALES COMO PROTECCIÓN A LA TABLETA, MANTENIMIENTO DE UNA LIBERACIÓN PROLONGADA Y CONSTANTE, ASÍ COMO UN FÁCIL MANEJO DE LAS MISMAS Y EVITANDO LA DESTRUCCIÓN DE LAS TABLETAS DEBIDO A LA HUMEDAD Y TEMPERATURA CORPORAL DEL RATÓN.

PERO COMO EL RECUBRIMIENTO REQUIRIÓ DE VARIOS PASOS, EL PROCESO SE HIZO MÁS LENTO. EN EL CASO DE LA PARAFINA FUÉ NECESARIO MANTENER UNA TEMPERATURA ADECUADA (60°C), YA QUE EL GROSOR DE LA CUBIERTA VARÍA CON ESTE FACTOR, A MAYOR TEMPERATURA MENOR GROSOR Y FORMACIÓN DE UNA ESTRUCTURA MÁS HOMOGÉNEA.

LAS TABLETAS CUBIERTAS CON AGAR TAMBIÉN NECESITARON UNA TEMPERATURA ESPECÍFICA (58°C) PARA TENER UNA BUENA CONFORMACIÓN, EL TIEMPO DE ELABORACIÓN ES MAYOR YA QUE SE DEBIÓ DEJAR ENFRIAR EL AGAR ENTRE LA COLOCACIÓN DE UNA GOTA Y OTRA, UNA OBSERVACIÓN NECESARIA ES QUE EL TIEMPO A PARTIR DEL CUAL SE ELABORÓ LA CUBIERTA DE LA TABLETA Y SU CORRESPONDIENTE ADMINISTRACIÓN

DEBE SER LARGO, ESTO ES DEBIDO A QUE HEMOS OBSERVADO QUE MIENTRAS MÁS TIEMPO TRANSCURRA ENTRE LA ELABORACIÓN DE LA CUBIERTA Y SU ADMINISTRACIÓN MEJOR INCORPORACIÓN DE BRDÚ SE OBTIENE, LO CUAL SE VE REFLEJADO EN UNA EXCELENTE TINCIÓN DIFERENCIAL DE CROMÁTIDES HERMANAS.

DE TODO LO ANTERIOR SE DESPRENDE QUE LAS TABLETAS COMBINADAS CON COLESTEROL GOZAN DE VARIOS FACTORES FAVORABLES CON RESPECTO A LAS OTRAS DOS TÉCNICAS; POR EJEMPLO EN LAS TABLETAS MEZCLADAS CON COLESTEROL SE EVITAN COMPLETAMENTE LOS PASOS DE RECURRIMIENTO, PESE A LO CUAL LA TABLETA ADQUIERE UNA CONSISTENCIA QUE PERMITE SU ADECUADO MANEJO, ASÍ COMO UNA LIBERACIÓN DE BRDÚ EN EL TIEMPO APROPIADO PARA OBTENER UNA MAGNIFICA INCORPORACIÓN.

CON RESPECTO A LA TINCIÓN DIFERENCIAL, SE TOMÓ EN CUENTA QUE LA BRDÚ PARTICIPÓ DECISIVAMENTE EN LA OBTENCIÓN DE UNA DIFERENCIACIÓN VALORABLE, PUESTO QUE SE UNE AL ADN COMO UN COMPUESTO QUE INTERACTÚA CON EL COLORANTE HOECHST 33258 CON LA POSTERIOR REDUCCIÓN CUÁNTICA DEL MISMO MEDIANTE LUZ NEGRA Y UN PH DE 7.0 (STETKA Y CARRANO, 1977).

SE OBSERVÓ UNA TINCIÓN DIFERENCIAL MÁS CONSISTENTE AL USAR TABLETAS CUBIERTAS PARCIALMENTE CON PARAFINA, NO OBSTANTE, LA TÉCNICA DE COLESTEROL CASI OBTUVO EL MISMO GRADO DE TINCIÓN AÚN CON MENOR CANTIDAD DE BRDÚ, LO CUAL SUGIRIÓ QUE DICHO PROCEDIMIENTO PERMITIÓ UNA LIBERACIÓN GRADUAL Y CONSTANTE DE BRDÚ,

QUIZÁS SUPERIOR A LAS OTRAS TÉCNICAS.

LOS VALORES DE TINCIÓN DIFERENCIAL DE LA TÉCNICA QUE UTILIZA AGAR OBEDECIERON A LA RÁPIDA LIBERACIÓN DEL ANÁLOGO, PRUEBA DE ELLO ES QUE AL TÉRMINO DE LA EXPERIMENTACIÓN SE OBTUVIERON LAS CUBIERTAS DE AGAR COMPLETAMENTE VACÍAS, DE LO CUAL SE DEDUJO QUE ERA DE IMPERIOSA NECESIDAD PARA UN MEJOR RESULTADO DE ESTA METODOLOGÍA AUMENTAR EL TIEMPO DE SECADO DE LA TABLETA YA RECUBIERTA, POR LO MENOS CUATRO DÍAS, ELLO PRESUPONE QUE AL ESTAR MÁS COMPACTA LA ESTRUCTURA POLISACÁRIDA DEL AGAR SE FACILITARÁ UNA LIBERACIÓN MÁS PROLONGADA Y GRADUAL DE LA 5-BROMO-2-DEOXIURIDINA.

TAMBIÉN ES DE GRAN IMPORTANCIA MENCIONAR QUE LA TINCIÓN DIFERENCIAL NO VALORABLE ES UN ÍNDICE QUE NOS PERMITIÓ CONOCER EN QUÉ MEDIDA ESTABA FALLANDO CADA TÉCNICA, YA QUE LA TINCIÓN DÉFICIENTE PUEDE DEBERSE A QUE NO SE INCORPORÓ LA BRDÚ ADECUADAMENTE, PRUEBA DE ELLO ES QUE LA TÉCNICA QUE UTILIZÓ AGAR FUE LA MENOS EFICAZ EN CUANTO A ESTE ASPECTO, LO CUAL COINCIDIÓ CON LA RÁPIDA LIBERACIÓN DE BRDÚ.

EL ANÁLISIS DE VARIANCIA SE ENCARGÓ DE CONTRASTAR LA HIPÓTESIS  $H_0: X_1 = X_2 = X_3$  LAS CUALES FUERON PRECISAMENTE LAS MEDIAS OBTENIDAS POR LOS RESULTADOS ARROJADOS POR CADA TÉCNICA EN CUANTO

A LA TINCIÓN DIFERENCIAL SE REFIERE, CORRESPONDIENDO  $X_1$  A LA TÉCNICA QUE UTILIZÓ PARAFINA  $X_2$  A LA TÉCNICA QUE EMPLEÓ COLESTEROL Y  $X_3$  A LA TÉCNICA QUE UTILIZÓ AGAR. EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LAS DOS DIVISIONES (TINCIÓN DIFERENCIAL VALORABLE Y NO VALORABLE) DEMOSTRÓ QUE NUESTRA HIPÓTESIS  $H_0$  NO ERA ACEPTADA, YA QUE EXISTIERON DIFERENCIAS ENTRE LAS RESPECTIVAS MEDIAS PARA CADA PARÁMETRO Y TÉCNICA, DE AHÍ QUE SE REALIZARA LA PRUEBA DE TUKEY, LA CUAL FUE MÁS EXACTA Y PERMITIÓ DETECTAR DIFERENCIAS MÍNIMAS.

ANALIZANDO CONJUNTAMENTE LAS TABLAS NO. IV, V Y VI OBSERVAMOS QUE LA TÉCNICA QUE UTILIZÓ AGAR FUE SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE A LAS OTRAS DOS, LO CUAL NOS DICE QUE LA BRDÚ NO FUE LIBERADA ADECUADAMENTE Y NO SE INCORPORÓ LO SUFICIENTE PARA PRODUCIR UNA TINCIÓN DIFERENCIAL ADECUADA. COMO EL PROCESO DE TINCIÓN FUE EL MISMO PARA TODAS LAS TÉCNICAS, LA CAPACIDAD TINTORIAL PARECE RELACIONARSE DIRECTAMENTE CON EL TIPO DE CUBIERTA, SIN EMBARGO, ENCONTRAMOS QUE LA TÉCNICA QUE UTILIZÓ COLESTEROL ES IGUAL O MÁS EFICAZ QUE LA QUE EMPLEÓ PARAFINA Y DE HECHO LOS ANÁLISIS ESTADÍSTICOS QUE COMPARARON LOS RESULTADOS ASÍ LO DEMOSTRARON.

SE HA OBSERVADO QUE LA TINCIÓN DIFERENCIAL DE CROMOSOMAS SE PUEDE MEJORAR NOTABLEMENTE SI SE MANTIENEN ÓPTIMOS TANTO LOS VALORES DE PH, TEMPERATURA, PUREZA DE REACTIVOS Y TIEMPOS DE LOS DIFERENTES PASOS DENTRO DE LA TINCIÓN. POR LO TANTO SE REQUIERE

PARA OBTENER UNA EXCELENTE TINCIÓN DIFERENCIAL, VERIFICAR LOS ELEMENTOS ANTES MENCIONADOS PREVIAMENTE A LA TINCIÓN.

LA PROLIFERACIÓN CELULAR ES UN PARÁMETRO DE GRAN IMPORTANCIA CUANTO SE TRABAJA CON UN POSIBLE MUTÁGENO, YA QUE VARIOS COMPUESTOS TIENEN LA FACULTAD DE ACELERAR O RETARDAR EL CICLO CELULAR (PALITTI Y COL., 1983) Y ES POR ELLO QUE SE REQUIERE CONOCER LOS VALORES DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR CON EL OBJETO DE CALCULAR EL TIEMPO DE GENERACIÓN PROMEDIO.

EN ESTE ASPECTO LAS TRES TÉCNICAS PROPORCIONARON UNA PROLIFERACIÓN CELULAR ADECUADA PARA EL OBJETO QUE SE PERSEGUÍA, QUE ERA UN NÚMERO ELEVADO DE CÉLULAS EN SEGUNDA DIVISIÓN CELULAR, NECESARIAS PARA EL ESTUDIO DE LOS INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDES HERMANAS.

SIN EMBARGO CON EL TRATAMIENTO ESTADÍSTICO SE ENCONTRARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS TANTO EN EL ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS DE PRIMERA COMO DE SEGUNDA DIVISIÓN CELULAR, LO CUAL EVIDENTEMENTE NO REPRESENTÓ PARA FINES OBJETIVOS Y PRÁCTICOS ALTERACIÓN ALGUNA, ES DECIR QUE NINGUNA TÉCNICA PROPICIÓ MODIFICACIONES ALARMANTES EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR, POR LO QUE CON TODAS SE LOGRÓ EL OBJETIVO YA MENCIONADO QUE ES OBTENER UN ELEVADO NÚMERO DE CÉLULAS EN SEGUNDA DIVISIÓN. SIN EMBARGO LA DIFERENCIA ESTADÍSTICA SIGNIFICATIVA



FUÉ ENCONTRADA ENTRE LAS TÉCNICAS AL ANALIZAR LAS CÉLULAS DE PRIMERA Y SEGUNDA DIVISIÓN, ELLO MOSTRÓ QUE HUBO FLUCTUACIONES EN LOS RESULTADOS PERO SIN OBSERVAR ALGUNA TENDENCIA HACIA ALGUNA DE LAS TÉCNICAS, DE TAL MODO QUE A PESAR DE HABER EXISTIDO DIFERENCIAS ESTADÍSTICAS LOS RESULTADOS METODOLÓGICOS Y PRÁCTICOS NO SE VIERON AFECTADOS.

DENTRO DE LOS PARÁMETROS PARA EVALUAR LA EFICACIA DE LAS TÉCNICAS, QUIZA EL MÁS IMPORTANTE ES LA FRECUENCIA DE ICH, DADA LA CONVENIENCIA DE TENER LECTURAS BASALES LO MÁS BAJAS POSIBLES, PERO A SU VEZ FACILMENTE IDENTIFICABLES, CON LO CUAL SE PERMITE QUE ESTÍMULOS LEVES DE AGENTES MUTAGÉNICOS INCREMENTEN SU VALOR Y DEN UNA ALTA SENSIBILIDAD AL MÉTODO.

TOMANDO EN CUENTA QUE SE UTILIZARON DIFERENTES CANTIDADES DE BRDU, LO CUAL PUEDO MODIFICAR LOS VALORES BASALES DEL ICH, CONSIDERAMOS QUE EL RESULTADO EXPERIMENTAL COMPARTIÓ SIMILITUD EN LAS TRES TÉCNICAS. LAS TABLETAS CUBIERTAS CON AGAR, QUE TUVIERON EL VALOR MÁS ALTO (3.771), PUDO DEBERSE A QUE PERMITIERON UNA TOTAL LIBERACIÓN DE LA BRDU, POR LO QUE SU NIVEL EN EL RATÓN FUÉ MAYOR QUE EN LOS OTROS DOS CASOS.

EN EL CASO DE LAS TABLETAS CUBIERTAS PARCIALMENTE CON PARAFINA LA LIBERACIÓN DEL ANÁLOGO NO FUÉ TOTAL, QUEDANDO CERCA DEL 30% DEL VOLUMEN INICIAL, LO CUAL CONFIRIÓ UN NIVEL MÁS BAJO DEL ANÁLOGO EN EL RATÓN EN COMPARACIÓN CON LA TÉCNICA QUE UTILIZÓ AGAR, ELLO OCASIONÓ QUE EL VALOR DEL ICH FUERA MENOR (3.668).

EL VALOR BASAL DE ICH OBTENIDO MEDIANTE EL USO DE TABLETAS COMBINADAS CON COLESTEROL (3,333) FUÉ UN FIEL REFLEJO DE QUE LA BRDÚ SE LIBERÓ GRADUALMENTE MANTENIENDO UN MENOR NIVEL EN EL RATÓN EN COMPARACIÓN CON LOS OTROS DOS CASOS, PERO SUFICIENTE PARA PODER OBSERVAR EL ICH, SUPONEMOS QUE EL COLESTEROL SÓLO ACTÚA COMO UN FILTRO FÍSICO, QUE CON LA COMPRENSIÓN ADECUADA PERMITE LOS RESULTADOS QUE SE INDICARON.

LOS MÉTODOS ESTADÍSTICOS COMPROBARON QUE NO HABÍA DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LAS TRES DIFERENTES METODOLOGÍAS CON RESPECTO A LA FRECUENCIA DE ICH, LO CUAL INDICÓ QUE CON ESTE PUNTO DE VISTA CUALQUIERA DE LAS TRES TÉCNICAS ES ÚTIL EN ESTUDIOS CITOGÉNÉTICOS QUE VALOREN EL DAÑO PRODUCIDO POR PRODUCTOS QUÍMICOS Y FÍSICOS.

SE HA HECHO ÉNFASIS EN LA CANTIDAD DE BRDÚ USADA DEBIDO A QUE AFECTA DIRECTAMENTE A LA FORMACIÓN DE ICH, Y A QUE, PRECISAMENTE UNA VENTAJA DE LAS TÉCNICAS, SE REFIERE A UTILIZAR LA MENOR CANTIDAD POSIBLE PARA EVITAR INTERFERENCIAS AL EVALUAR UN MUTÁGENO.

EL SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL ICH AÚN NO ESTÁ CLARO, SIN EMBARGO SE CONOCE QUE VARIOS AGENTES QUE AFECTAN AL ADN INDUCEN SU INCREMENTO (WOLFF, 1979), DE AHÍ LA IMPORTANCIA QUE UNA TÉCNICA PERMITA OBSERVAR LAS MODIFICACIONES A LAS LECTURAS EN RELACION

CIÓN CON UN TESTIGO NEGATIVO.

LA MITOMICINA ES UN COMPUESTO ALGUILANTE CUYAS LESIONES A NIVEL MOLECULAR CORRESPONDEN A ENTRECruzAMIENTOS ADN-ADN, ALQUILACIÓN DE LA GUANINA EN LA POSICIÓN O<sup>6</sup> Y POSIBLEMENTE ENLACES COVALENTES EN BASES NITROGENADAS (ISHII, 1981). COMO ES UN PRODUCTO DE ACCIÓN CONOCIDA SE DECIDIÓ USARLO PARA VALORAR LAS TÉCNICAS ANTE UN MUTÁGENO.

EL EFECTO DE LA MMC SE OBSERVÓ CLARAMENTE SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR, LA CUAL PRESENTÓ UN AUMENTO EN LAS CÉLULAS DE PRIMERA DIVISIÓN CELULAR, UN LIGERO DECREMENTO EN EL NÚMERO DE LAS DE SEGUNDA DIVISIÓN Y UNA MARCADA DISMINUCIÓN EN LA FRECUENCIA DE LAS DE TERCERA.

NOTAMOS QUE LAS TRES TÉCNICAS SE COMPORTARON DE MANERA SEMEJANTE AL ENSAYAR EL MUTÁGENO, Y PRUEBA DE ELLO ES QUE LOS MÉTODOS ESTADÍSTICOS ASÍ LO COMPROBARON AL REALIZAR LA PRUEBA T-STUDENT, SE OBSERVÓ QUE EXISTIERON RESULTADOS SIGNIFICATIVOS EN LAS TRES TÉCNICAS CON RESPECTO A LOS TESTIGOS NEGATIVOS, LOS CUALES FUERON LOS RESULTADOS OBTENIDOS SIN EXPONER A LOS RATONES A LA MMC; ELLO NOS HACE INFERIR QUE CUALQUIERA DE ELLAS ES ALTAMENTE SENSIBLE AL EFECTO OCASIONADO POR LA MMC EN RELACIÓN A LA PROLIFERACIÓN CELULAR,

LA MMC INCREMENTÓ EL VALOR DEL ICH CON LAS TRES TÉCNICAS

EMPLEADAS, Y ESTA ELEVACIÓN FUE PROPORCIONAL A LA CANTIDAD DE MMC UTILIZADA (IMG/KG DE PESO), LO CUAL CONCORDÓ CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR PERRY Y EVANS (1975) QUIENES OBSERVARON QUE MODIFICACIONES SIMILARES SE ENCONTRARON EN EL NÚMERO DE ICH AL ADMINISTRAR MMC Y OTROS TRECE MUTÁGENOS CONOCIDOS.

LOS INCREMENTOS ENCONTRADOS EN LAS TRES TÉCNICAS FUERON SIMILARES Y AL PRACTICAR EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO T-STUDENT, SE OBSERVÓ LA ALTA SENSIBILIDAD QUE TUVIERON ANTE EL ESTÍMULO OCASIONADO POR LA MMC.

UNA VENTAJA MÁS DE LAS TÉCNICAS QUE UTILIZAN TABLETAS EN COMPARACIÓN CON OTRAS PARA ESTUDIOS "IN VIVO", SE REFIERE A LA BAJA CANTIDAD DE BRDU QUE SE USA, YA QUE ESTE COMPUESTO PODRÍA CAUSAR SINERGISMO CON LAS SUSTANCIAS A ENSAYAR, LO CUAL EVIDENTEMENTE AFECTARÍA LA CREDIBILIDAD DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS (MORALES, 1984).

DE ACUERDO A LAS CARACTERÍSTICAS QUE SE DESCRIBIERON ANTERIORMENTE, LA EVALUACIÓN DE LAS TRES TÉCNICAS INDICÓ QUE AUNQUE TODAS SON ÚTILES, QUIZÁ LA MENOS EFICIENTE SEA LA QUE UTILIZÓ AGAR, DE ACUERDO A UNA UBICACIÓN JERÁQUICA, SIGUIÉNDOLE EN FORMA ASCENDENTE LA QUE UTILIZÓ PARAFINA Y SIENDO LA MÁS EFICAZ LA QUE UTILIZÓ COLESTEROL.

SE HA OBSERVADO QUE DE ACUERDO A LOS RESULTADOS HASTA AHORA

EXPUESTOS, QUE LAS DIFERENCIAS SON MÍNIMAS, POR LO CUAL EN LABORATORIOS CON SUFICIENTES RECURSOS PUEDE LLEGAR A ESTABLECERSE CUALQUIERA DE LAS TÉCNICAS AQUÍ EXAMINADAS. SIN EMBARGO, ES CONVENIENTE CONSIDERAR OTROS ASPECTOS FUNDAMENTALES PARA LA APLICACIÓN DEL MÉTODO, QUE SE REFIERE PRECISAMENTE AL COSTO, TIEMPO DE DESARROLLO Y FACILIDAD PARA EFECTUAR DICHO MÉTODO.

EN RELACIÓN AL ASPECTO ECONÓMICO, CONSIDERANDO EL PRECIO DE LOS COMPONENTES MÁS IMPORTANTES, CONCLUIMOS QUE LA TÉCNICA DE COSTO MÁS ELEVADO ES LA QUE UTILIZÓ COLESTEROL, SEGUIDA POR LA QUE USO PARAFINA, SIENDO LA TÉCNICA MÁS ECONÓMICA AQUELLA QUE USÓ AGAR.

AL ANALIZAR LOS DIFERENTES TIEMPOS UTILIZADOS POR CADA TÉCNICA, OBSERVAMOS QUE LA QUE EMPLEÓ COLESTEROL SE EFECTUÓ MÁS RAPIDAMENTE (15MIN) Y QUE EL ENGRAPADO DE SUTURA FUÉ MÁS FÁCIL. LAS OTRAS TÉCNICAS REQUIRIERON DE MAYOR TIEMPO EN LA ELABORACIÓN DE LAS TABLETAS ASÍ COMO EN EL RECUBRIMIENTO DE LAS MISMAS, ESTE ASPECTO ESTÁ DIRECTAMENTE RELACIONADO CON LA FACILIDAD DE REALIZACIÓN DE LAS DIFERENTES METODOLOGÍAS, POR LO QUE SE CONCLUYÓ QUE LA TÉCNICA QUE EMPLEÓ COLESTEROL FUÉ LA MÁS FAVORABLE EN SU MANIPULACIÓN, ADEMÁS LAS OTRAS TÉCNICAS REQUIRIERON DE MAYOR EQUIPO PARA REALIZARLAS, Y NOTANDO QUE LAS TABLETAS SE FRACTURABAN CON MAYOR FACILIDAD.

POR LO QUE RESPECTA A LA TABLETA CUBIERTA CON AGAR, ÉSTA DEBE PERMANECER BAJO CONDICIONES DE TEMPERATURA Y HUMEDAD AMBIENTE POR UN TIEMPO MÍNIMO DE TRES DÍAS, LO CUAL PUDIERA AFECTAR LA EFECTIVIDAD DE LA BRDÚ, MIENTRAS QUE CON COLESTEROL Y PARAFINA SE PUEDEN USAR INMEDIATAMENTE DESPUÉS DE HABER PREPARADO LAS TABLETAS, CON EL FIN DE EVITAR LA ABSORCIÓN DE AGUA, LA CUAL, COMO SE COMENTÓ ANTERIORMENTE PUDIERA AFECTAR A LA BRDÚ Y EN GENERAL CON EL PROCESO.

ESTOS PARÁMETROS FUERON FACTORES DECISIVOS PARA DETERMINAR QUE EL ANÁLISIS FAVORECIÓ A LA TÉCNICA QUE UTILIZÓ TABLETAS DE BRDÚ EN COMBINACIÓN CON COLESTEROL.

ES DE GRAN IMPORTANCIA TENER EN CUENTA QUE NO ESTÁ COMPLETAMENTE CONOCIDO EL PAPEL QUE JUEGA EL COLESTEROL, PERO DE ACUERDO A LA FUNCIÓN QUE EFECTÚA EL COLESTEROL EN LA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA, LA CUAL ES PRINCIPALMENTE LA ESTABILIZACIÓN DE LA FLUIDEZ A TRAVÉS DE DICHA MEMBRANA. LO CUAL SE LOGRA MEDIANTE LA UNIÓN DEL COLESTEROL CON LOS FOSFOLÍPIDOS DE MEMBRANA, ORIENTANDO EL GRUPO HIDROXILO HACIA LA PARTE HIDROFÍLICA DE LOS FOSFOLÍPIDOS Y LA PORCIÓN NO POLAR DEL COLESTEROL HACIA LA PARTE HIDROFÓBICA MÁS CERCANA DE LOS FOSFOLÍPIDOS, LO CUAL OCASIONA QUE LA PARTE DISTAL DE LOS FOSFOLÍPIDOS MANTENGA UNA CIERTA FLEXIBILIDAD Y SE VEA TRADUCIDO EN EL MANTENIMIENTO DE LA FLUIDEZ DE LA BICAPA LIPÍDICA DE LA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA; ASÍ TAMBIÉN EL COLESTEROL A LAS CONCEN

TRACIONES QUE SE ENCUENTRA EN LA MAYORÍA DE LAS MEMBRANAS EN EUCARIOTES, TIENE EL EFECTO DE EVITAR A LAS CADENAS HIDROCARBONADAS DE LOS FOSFOLÍPIDOS DE LLEGAR A JUNTARSE ENTRE ELLAS Y CRISTALIZARSE, Y DE ESTE MODO EL COLESTEROL TAMBIÉN PREVIENE EL DRÁSTICO DECREMENTO EN FLUIDEZ, QUE PUEDE POR OTRO LADO OCURRIR A BAJAS TEMPERATURAS (ALBERTS Y COLABORADORES, 1983).

DE ACUERDO A LO ANTERIORMENTE MENCIONADO, PROPONEMOS QUE EL COLESTEROL PERMITE TANTO UNA LIBERACIÓN GRADUAL DE BRDÚ DE LA TABLETA COMO LA FACILITACIÓN DE ABSORCIÓN CONSTANTE A TRAVÉS DE LA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA, LO CUAL PERMITE UNA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA CONSTANTE DE BRDÚ EN POR LO MENOS DOS CICLOS DE REPLICACIÓN DE ADN.

LA EVALUACIÓN DE NUESTROS RESULTADOS DEMOSTRÓ QUE ES DIFÍCIL ACEPTAR EN PARTICULAR ALGUNA TÉCNICA, YA QUE TODAS MOSTRARON SER IDÓNEAS PARA CUANTIFICAR EL ICH DEBIDO A SU SENSIBILIDAD, REPRODUCIBILIDAD Y CONFIABILIDAD, PERO EL BAJO ÍNDICE BASAL DE ICH, LA ADECUADA PROLIFERACIÓN CELULAR, LA ELEVADA CANTIDAD DE CÉLULAS CON TINCIÓN DIFERENCIAL VALORABLE Y LAS CONSIDERACIONES DE TIPO PRÁCTICO Y ECONÓMICO, NOS HACE COLOCAR EN UN NIVEL SUPERIOR A LA TÉCNICA QUE EMPLEÓ TABLETAS DE 5-BROMO-2-DEOXIURDINA COMBINADAS CON COLESTEROL.

ES CONVENIENTE REFERIRNOS AHORA A UNA TÉCNICA QUE SE BASA

EN LA ADSORCIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE BRDÚ EN CARBÓN ACTIVADO QUE POSTERIORMENTE SE INYECTA INTRAPERITONEALMENTE EN EL RATÓN (MORALES, 1980). AUNQUE ES MÁS TRAUMÁTICA PARA EL ANIMAL POR PRODUCIRLE PERITONITIS, PRESENTA APARENTAMENTE UNA SIMPLIFICACIÓN METODOLÓGICA. NO SE INCLUYÓ EN ESTE TRABAJO POR SER DIFERENTE A LA ELABORACIÓN DE TABLETAS, SIN EMBARGO, SUS CUALIDADES DESDE EL PUNTO DE VISTA ECONÓMICO Y TÉCNICO LA UBICAN COMO OTRA FAVORABLE OPCIÓN DE TRABAJO.



## 6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

EN EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ LA EVALUACIÓN COMPARATIVA DE TRES TÉCNICAS PARA LA OBTENCIÓN DE INTERCAMBIO DE CROMÁTIDES HERMANAS EN CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN (CEPA NIH CON UN PESO ENTRE 20 Y 25GR, MACHOS). TODAS SE BASARON EN LA ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE TABLETAS DE 5-BROMO-2-DEOXYURIDINA A RATONES, Y LAS PRINCIPALES DIFERENCIAS RESIDIERON EN EL TIPO DE CUBIERTA USADA ASÍ COMO EN LOS COMPONENTES DE LA TABLETA.

LAS TÉCNICAS COMPARADAS FUERON: A) TABLETAS DE BRDÚ CUBIERTAS PARCIALMENTE CON PARAFINA; B) TABLETAS DE BRDÚ CUBIERTAS TOTALMENTE CON AGAR Y C) TABLETAS DE BRDÚ CON COLESTEROL.

PARA LLEVAR A CABO LA EVALUACIÓN SE UTILIZARON VARIOS PARÁMETROS: TINCIÓN DIFERENCIAL, PROLIFERACIÓN CELULAR, NÚMERO BASAL DE ICH, ASPECTO ECONÓMICO, TIEMPO NECESARIO PARA LA REALIZACIÓN DEL PROCESO. ESTOS ASPECTOS SE ESTUDIARON EN RATONES NORMALES Y EN OTROS EXPUESTOS A MITOMICINA C. LOS RESULTADOS SE ANALIZARON CON LA AYUDA DEL ANÁLISIS DE VARIAN- CIA, PRUEBA DE TUKEY Y LA PRUEBA T-STUDENT.

EL ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN OBTENIDA PROPORCIONÓ LAS SIGUIENTES CONCLUSIONES:

1) SE DETERMINÓ CLARAMENTE QUE LA TINCIÓN DIFERENCIAL

NO FUE IGUAL EN LOS TRES CASOS. LA TÉCNICA QUE UTILIZÓ PARAFINA MOSTRÓ UNA MÁS NÍTIDA TINCIÓN DIFERENCIAL, SIN EMBARGO LA TÉCNICA QUE USÓ COLESTEROL TUVO CARACTERÍSTICAS CASI SIMILARES A LA ANTERIOR; LA TÉCNICA QUE USÓ AGAR FUE LA MÁS DEFICIENTE AL RESPECTO.

2) LA FRECUENCIA BASAL DE ICH FUE MUY SEMEJANTE EN LAS TRES TÉCNICAS, OBSERVÁNDOSE QUE LA TÉCNICA QUE UTILIZÓ COLESTEROL PRESENTÓ LA BASAL DE ICH MÁS ÓPTIMA PARA TRABAJAR EN ESTUDIOS DE GENOTOXICOLOGÍA IN VIVO.

3) LA PROLIFERACIÓN CELULAR OBTENIDA POR LAS TRES TÉCNICAS MOSTRÓ UNA GRAN SIMILITUD, EN TODOS LOS CASOS SE OBTUVO UN ADECUADO NÚMERO DE CÉLULAS DE SEGUNDA DIVISIÓN PARA EL ESTUDIO DEL ICH.

SE OBSERVÓ ADEMÁS QUE LA PROLIFERACIÓN CELULAR FUE DIRECTAMENTE AFECTADA POR LA CANTIDAD DE BRDÚ Y EL TIEMPO DE EXPOSICIÓN A LA MISMA.

4) SE DETERMINÓ QUE LA TÉCNICA QUE UTILIZÓ CUBIERTA TOTAL DE AGAR FUE LA QUE RESULTÓ ECONÓMICAMENTE MÁS ACCESIBLE, Y LA MÁS COSTOSA FUE LA QUE USÓ COLESTEROL.

5) RESPECTO A LA FACILIDAD PARA DESARROLLAR LA TÉCNICA, EN LA QUE SE UTILIZÓ COLESTEROL, MOSTRÓ MAYOR NÚMERO DE CARACTERÍSTICAS FAVORABLES, LO CUAL SE VIÓ REFLEJADO EN LA RÁPIDEZ Y ACCESIBILIDAD PARA LLEVARLA A CABO.

6) DE ACUERDO A LOS PUNTOS ANTERIORES, LAS TRES TÉCNICAS VALORADAS PRESENTARON CARACTERÍSTICAS ADECUADAS PARA EMPLEARSE EN LOS ESTUDIOS DE GENOTOXICOLOGÍA IN VIVO.

7) EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO, ASÍ COMO EL RELACIONADO A LA FACILIDAD DE MANEJO, INDICARON QUE LA MEJOR OPCIÓN FUE LA TÉCNICA QUE UTILIZÓ UNA MEZCLA DE BRDÚ CON COLESTEROL. AUNQUE EL COSTO PARA DESARROLLAR ESTA TÉCNICA NO FUE EL ÓPTIMO, CONSIDERAMOS QUE PARA FINES DE INVESTIGACIÓN Y CIENTÍFICOS ÉSTE NO ES UN FACTOR EN DECREMENTO A LA ELECCIÓN DE DICHA TÉCNICA.

8) EN LAS TRES TÉCNICAS SE OBSERVÓ QUE LA MITOMICINA C INCREMENTABA EL NÚMERO DE ICH DE MANERA SIMILAR (11.2 A 12.92).

9) DE IGUAL FORMA EN TODAS LAS TÉCNICAS, LA MITOMICINA C OCACIONÓ UN ALARGAMIENTO DEL CICLO CELULAR, LO QUE SE MANIFESTÓ EN LAS MODIFICACIONES DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

10) LAS TRES TÉCNICAS MOSTRARON UNA ALTA SENSIBILIDAD A ESTÍMULOS MUTAGÉNICOS, LOS CUALES INCREMENTARON LA FRECUENCIA DE ICH Y MODIFICARON LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

7. BIBLIOGRAFIA.

- 1) ABE, S. AND SASAKI, M.; STUDIES ON CHROMOSOMAL ABERRATIONS AND SISTER CHROMATID EXCHANGES INDUCED BY CHEMICALS; PROC. JPN. ACAD. 53:46 (1977A).
- 2) 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 (1977B).
- 3) ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. AND WATSON, J.; MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL; 3RD ED.; GARLAND PUBLISHING INC.; NEW YORK (1983); P.P. 356-359.
- 4) ALLEN, J.W. AND LATT, S.A.; ANALYSIS OF SISTER CHROMATID EXCHANGES FORMATION IN VIVO IN MOUSE SPERMATOGONIA AS A NEW TEST SYSTEM FOR ENVIRONMENTAL MUTAGENS; NATURE 260: 449-451 (1976A).
- 5) ALLEN, J.W. AND LATT, S.A.; IN VIVO BRDU-33258 HOECHST ANALYSIS OF DNA REPLICATION KINETICS AND SISTER CHROMATID EXCHANGES FORMATION IN MOUSE SOMATIC AND MEIOTIC CELL; CHROMOSOMA 58:225-240 (1976B).
- 6) ALLEN, J.W., SHULER, C.F., MENDEZ, R.W. AND LATT, S.A.; A SIMPLIFIED TECHNIQUE FOR IN VIVO ANALYSIS OF SISTER CHROMATID EXCHANGES USING 5-BROMODEOXYURIDINE TABLETS; CYTOGENET. CELL GENET. 18:231-237 (1978).
- 7) BENDER, M.A., GRIGGS, H.G., BEDFORD, J.S.; RECOMBINATIONAL DNA REPAIR AND SISTER CHROMATID EXCHANGES; MUTAT. RES. 24:117-123 (1974).

- 8) BLOOM, S.E. AND TSU, T.C.; DIFFERENTIAL FLUORESCENCE OF SISTER CHROMATIDS IN CHICKEN EMBRYOS EXPOSED TO 5-BROMO-DEOXYURIDINE; CHROMOSOMA 51:261-267 (1975).
- 9) COOK, P.R. AND BRAZELL, I.A.; SUPERCOILS IN HUMAN DNA; J. CELL SCI. 19:261-279 (1975).
- 10) DE WEERD-KASTELEIN, E.A., KEIJZER, W., RAINALDI, G. AND BOOTSMA, D.; INDUCTION OF SISTER CHROMATID EXCHANGES IN XERODERMA PIGMENTOSUM CELLS AFTER EXPOSURE TO ULTRAVIOLET LIGHT; MUTAT. RES. 45:253-261 (1977).
- 11) GALLEY, W.C. AND PURKEY, P.M.; SPIN-ORBITAL PROBES OF BIOMOLECULAR STRUCTURE. A MODEL-ACRIDINE SYSTEM.; NATL. SCI. 69:2198-2202 (1972).
- 12) GOTO, K., AKEMATZU, T., SHIMAZU, H. AND SUGIYAMA, T.; SIMPLE DIFFERENTIAL GIEMSA STAINING OF SISTER CHROMATIDS AFTER TREATMENT WITH PHOTOSENSITIVE DYES AND EXPOSURE TO LIGHT AND THE MECHANISM OF STAINING; CHROMOSOMA 53:223-230 (1975).
- 13) GOTO, K., MAEDA, S., KANO, Y. AND SUGIYAMA, T.; FACTORS INVOLVED IN DIFFERENTIAL GIEMSA STAINING OF SISTER CHROMATIDS; CHROMOSOMA 66:351-359 (1978).
- 14) HILMING, I.; ON THE INFLUENCE OF A BENZIMIDAZOL DERIVATE (FLUOROCROME) ON CELL LINES IN TISSUE CULTURE; Z. ZELLFORCH 104:127-137 (1970).

- 15) HILMING, I. AND GROPP, A.; STAINING OF CONSTITUTIVE HETEROCHROMATIN IN MAMMALIAN CHROMOSOMES WITH A NEW FLUOROCROME; EXP. CELL RES. 75:122-126 (1972).
- 16) HUANG, C.C.; INDUCTION OF A HIGH INCIDENCE OF DAMAGE TO THE CHROMOSOMES OF RATUS (MASTOMYA) NATALENSIS BY BASE ANALOGUES, VIRUSES AND CARCINOGENS; CHROMOSOMA 23:162-179 (1967).
- 17) HURLEY, D., AGUILAR, A., GARIBAY, J. Y LANDEROS, J.; TÉCNICAS DE DISEÑO EXPERIMENTAL; CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS; MÉXICO, D.F.; P.P. 37-53 (1981).
- 18) IKUSHIMA, T. AND WOLFF, S.; SISTER CHROMATID EXCHANGES INDUCED BY LIGHT FLASHES TO 5-BROMODEOXYURIDINE AND 5-IODODEOXYURIDINE-SUBSTITUTES CHINESE HAMSTER CHROMOSOMES; EXP. CELL RES. 87:15-19 (1974).
- 19) ISHII, Y.; NATURE OF THE MITOMICIN-C INDUCED LESION CAUSING SISTER-CHROMATID EXCHANGES; MUTAT. RES. 91: 51-55 (1981).
- 20) KATO, H.; INDUCTION OF SISTER CHROMATID EXCHANGES BY U.V. LIGHT AND ITS INHIBITION BY CAFFEINE; EXP. CELL RES. 82: 383-390 (1973).
- 21) KATO, H.; POSSIBLE ROLE OF DNA SYNTHESIS IN FORMATION OF SISTER CHROMATID EXCHANGES; NATURE 252:739-741 (1974A).
- 22) KATO, H.; INDUCTION OF SISTER CHROMATID EXCHANGES BY CHEMICAL MUTAGENS AND ITS POSSIBLE RELEVANCE TO DNA REPAIR; EXP. CELL RES. 85:239-247 (1974B).



- 23) KING, M., WILD, D. AND GOCK, R.; BROMODEOXYURIDINE TABLETS WITH IMPROVED DEPOT EFFECT FOR ANALYSIS OF SISTER CHROMATID EXCHANGES IN BONE-MARROW AND SPERMATOGONIAL CELLS; MUTAT. RES. 97:117-129 (1982).
- 24) KLIGERMAN, A.D. AND BLOOM, S.E.; SISTER CHROMATID EXCHANGES AND DIFFERENTIATION IN ADULT MUDMINNOUS (*UMBRA LIMI*) AFTER IN VIVO EXPOSURE TO 5-BROMODEOXYURIDINE; CHROMOSOMA 56:101-109 (1976).
- 25) KRAM, D., SCHNEIDER, E.L., SENULA, G.C. AND NAKANISHI, Y.; SPONTANEOUS AND MITOMICIN-C INDUCED SISTER-CHROMATID EXCHANGES: COMPARISON OF IN VIVO AND IN VITRO SYSTEMS; MUTAT. RES. 69:339-347 (1979).
- 26) KREYSZING, E.; ESTADÍSTICA MATEMÁTICA; ED. LIMUSA; MÉXICO, D.F. (1979); P.P. 221-300.
- 27) LAMMLER, G.W. AND SCHUTZE, H.R.; VITAL-FLUOROCHROMICRONT FIERISCHER ZELIKENE MIT EINEN NEUNEN FLUROCHROM; NATUR-MISSENCHAFTEN 56:286-290 (1969).
- 28) LATT, S.A.; MICROFLUOROMETRIC DETECTION OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID REPLICATION IN HUMAN METAPHASE CHROMOSOMES; PROC. NATL. SCI. 70:3395-3399 (1973).
- 29) LATT, S.A.; LOCALIZATION OF SISTER CHROMATID EXCHANGES IN HUMAN CHROMOSOMES; SCIENCE 185:74-76 (1974).
- 30) LATT, S.A.; DETECTION OF DNA SYNTHESIS IN INTERPHASE NUCLEI BY FLUORESCENCE MICROSCOPY; J. CELL BIOL. 62:546-550 (1974A).

- 31) LATT, S.A.; MICROFLUOROMETRIC ANALYSIS OF DNA REPLICATION AND SISTER CHROMATID EXCHANGES IN HUMAN CHROMOSOMES; J. HISTOCHEM. CYTOCHEM. 22:478-491 (1974B).
- 32) LATT, S.A.; FLUORESCENCE ANALYSIS OF LATE DNA REPLICATION IN HUMAN METAPHASE CHROMOSOMES; SOMAT. CELL GENET. 1:293-321 (1975).
- 33) LATT, S.A.; LONGITUDINAL AND LATERAL DEFFERENTIATION OF METAPHASE CHROMOSOMES BASED ON THE DETECTION OF DNA SYNTHESIS BY FLUORESCENCE MICROSCOPY. IN CHROMOSOMES TODAY, VOL 5 (P.L. PEARSON AND K.R. LEWIS Eds.), NEW YORK, WILLEY, P.P. 367-394 (1976).
- 34) LATT, S.A.; FLUORESCENT PROBES OF CHROMOSOMES STRUCTURE AND REPLICATION; CAN. J. GENET. CYTOCHEM. 24:24-33 (1977A).
- 35) LATT, S.A.; ANALYSIS OF SISTER CHROMATID EXCHANGES AND CHROMOSOME REPLICATIONS KINETIC USING BrdU-DYE TECHNIQUE; VIRCHOWS ARCH. B. CELL PATHOL. 29:19-27 (1978).
- 36) LATT, S.A., DAVIDSON, R.L., LIN, M.S. AND GERALD, P.S.; LATERAL ASYMETRI IN THE FLUORESCENT OF HUMAN Y CHROMOSOMES STAINED WITH 33258 HOECHST; EXP. CELL RES. 87:425-429 (1974).
- 37) LATT, S.A. AND STENFTEN, G.; SPECIAL STUDIES AN 33258 HOECHST AND RELATED BISBENZIMIDAZOLE DYE, USEFUL FOR FLUORESCENT DETECTION OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID SYNTHESIS; J.

HISTOCHEM. CYTOCHEM. 24:24-33 (1976).

- 38) LIN, M.S. AND ALFL, O.S.; DETECTION OF SISTER CHROMATID EXCHANGES BY 4'-6-DIAMINO-2-PHENYLINDOLE FLUORESCENCE; CHROMOSOMA 57:219-225 (1976).
- 39) LIN, M.S., LATT, S.A. AND DAVIDSON, R.L.; MICROFLUOROMETRIC REGION OF MOUSE CHROMOSOMES; EXP. CELL RES. 86:392-394 (1974).
- 40) LIN, M.S., COMINGS, D.E. AND ALFL, O.S.; OPTICAL STUDIES OF THE INTERACTION OF 4'-6-DIAMIDINO-2-PHENYLINDOLE WITH DNA AND METAPHASE CHROMOSOMES; CHROMOSOMA 60:15-25 (1977).
- 41) LOEWE, H. AND URBANIETZ, J.; BASISCH SUBSTITUTIERTE 2,6-BISBENZIMIDAZOL-DERIVATE, EINE NEUE CHEMOTHERAPEUTISCH ACTIVE KORPERKLASSE; ARZNEIM FORCH. 24:1927-1933 (1974).
- 42) MCFEE, A., LOWE, L. AND SAN SEBASTIAN, J.; IMPROVED SISTER-CHROMATID DIFFERENTIATION USING PARAFIN-COATED BROMODEOXYURIDINE TABLETS IN MICE; MUTAT. RES. 119:83-88 (1983).
- 43) MORALES, R.P.; ANALYSIS IN VIVO OF SISTER-CHROMATID EXCHANGE IN MOUSE BONE-MARROW AND SALIVARY-GLAND CELLS; MUTAT. RES. 74: 61-69 (1980).
- 44) MORALES, R.P., VALLARINO, K.T. AND RODRIGUEZ, R.R.; DETECTION OF SCE IN RODENT CELLS USING THE ACTIVATED CHARCOAL BROMODEOXYURIDINE SYSTEM; SISTER CHROMATID EXCHANGES, EDITED BY TICE, R. AND HOLLANDER, A., PLENUM PUBLISHING CORPORATION; P.P. 599-611 (1984).

- 45) NAKANISHI, Y. AND SCHNEIDER, E.L.; IN VIVO SISTER-CHROMATID EXCHANGE: A SENSITIVE MEASURE OF DNA DAMAGE; MUTAT. RES. 60:329-337 (1979).
- 46) NATARAJAN, A.T., TATES, A.D., VAN BULL, P.P., MEYERS, M. AND DE VOGEL, N.; MUTAT. RES. 37:83-90 (1976).
- 47) NATARAJAN, A.T., TATES, A.D., MEYERS, M., NEUTEBOOM, I. AND VOGEL, N.; INDUCTION OF SISTER-CHROMATID EXCHANGES (SCEs) AND CHROMOSOMAL ABERRATIONS BY MITOMICIN C AND METHYL METHANESULFONATE IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS: AN EVALUATION OF METHODOLOGY FOR DETECTION OF SCEs AND OF PERSISTENT DNA LESIONS TOWARDS THE FRECUENCIES OF OBSERVED SCEs; MUTAT. RES. 121: 211-223 (1980).
- 48) PAINTER, R.; A REPLICATION MODEL FOR SISTER CHROMATID EXCHANGE; MUTAT. RES. 70:337-341 (1980).
- 49) PALITTI, F., TANZARELLA, C., COZZI, R., RICORDY, R., VITAGLIANO, E. AND FIORE, M.; COMPARISON OF THE FREQUENCIES OF SCEs INDUCED BY CHEMICAL MUTAGENS IN BONE-MARROW, SPLEEN AND SPERMATOGONIAL CELLS OF MICE; MUTAT. RES. 103: 191-195 (1982).
- 50) PALITTI, F., TANZARELLA, C., DEGRASSI, F., DE SALVIA, R., FIORE, M. AND NATARAJAN, A.T.; FORMATION OF CHROMATID-TYPE ABERRATIONS IN G2 STAGE OF THE CELL CYCLE, MUTAT. RES. 110:343-350 (1983).

- 51) PERA, F. AND MATTIAS, P.; LABELLING OF DNA AND DIFFERENTIAL SISTER CHROMATID STAINING AFTER BRDÜ TREATMENT IN VIVO; CHROMOSOMA 57: 13-18 (1976).
- 52) PERRY, P. AND EVANS, H.; CYTOLOGICAL DETECTION OF MUTAGEN-CARCINOGEN EXPOSURE BY SISTER CHROMATID EXCHANGE; NATURE 258:121-125 (1975).
- 53) PERRY, P. AND WOLFF, S.; NEW GIEMSA METHOD FOR DIFFERENTIAL STAINING OF SISTER CHROMATIDS; NATURE 261:156-158 (1974).
- 54) REMINGTON, R.D. Y SCHORK, M.A.; BIOESTADÍSTICA BIOMÉTRICA Y SANITARIA; EDITORIAL PRENTICE/HALL INTERNATIONAL; 2A ED.; MADRID, ESPAÑA (1977); P.P. 256-261.
- 55) REYNOLDS, R.J., NATARAJAN, A.T. AND LOHMAN, P.H.M.; MICROCOCCUS LETEUS UV-ENDONUCLEASE SENSITIVE SITES AND SISTER-CHROMATID EXCHANGES IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS; MUTAT. RES. 64:353-356 (1979).
- 56) SINGH, N.P., TURTURRO, A., CHANG, M.J.W. AND HART, R.W.; THE MEASUREMENT OF SISTER CHROMATID EXCHANGES INDUCED IN UTERO UTILIZING INTRAPERITONEAL INFUSION OF BRDÜ: A NOVEL TECHNIQUE; CYTOGENET. CELL GENET. 35: 81-86 (1983).
- 57) SCHNEIDER, E.L., CHAILLET, J. AND TICE, R.; IN VIVO BRDÜ LABELING OF MAMMALIAN CHROMOSOMES; EXP. CELL RES. 100:396-399 (1976).

- 58) STETKA, D.G. AND CARRANO, A.V.; THE INTERACTION OF HOECHST 33258 AND BRDÜ SUBSTITUTED DNA IN THE FORMATION OF SISTER CHROMATID EXCHANGES; CHROMOSOMA 63:21-31 (1977).
- 59) STETKA, D.G. AND WOLFF, S.; SISTER CHROMATID EXCHANGE AS AN ASSAY FOR GENETIC DAMAGE INDUCED BY MUTAGEN-CARCINOGENS, I. IN VITRO TEST FOR COMPOUNDS REQUIRING METABOLIC ACTIVATION; MUTAT. RES. 41:333-342 (1976A).
- 60) 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 (1976B).
- 61) TAYLOR, J.H.; SISTER CHROMATID EXCHANGES IN TRITIUM LABELED CHROMOSOMES; GENETICS 43: 515-529 (1958).
- 62) TICE, R., CHAILLET, J. AND SCHNEIDER, E.L.; DEMONSTRATION OF SPONTANEOUS SISTER CHROMATID EXCHANGES IN VIVO; EXP. CELL RES. 18:13-23 (1976).
- 63) VOGEL, W. AND BAUKNECHT, T.; DIFFERENTIAL CHROMATID STAINING BY TREATMENT AS A MUTAGENICITY TEST SYSTEM; NATURE 260:448-449 (1976).
- 64) WATSON, J.D. AND CRICK, F.H.C.; GENETICAL IMPLICATIONS OF THE STRUCTURE OF THE DEOXYRIBONUCLEIC ACID; NATURE 171: 964-967 (1953).

- 65) WOLFF, S.; SISTER CHROMATID EXCHANGE: THE MOST SENSITIVE MAMMALIAN SYSTEM FOR DETERMINING THE EFFECTS OF MUTAGENIC CARCINOGENS. IN: BERG, K. (ED.) HUMAN DAMAGE IN MEN CAUSED BY ENVIRONMENTAL AGENTS; Ed. ACADEMIC PRESS, NEW YORK (1979); P.P. 229-243.
- 66) WOLFF, S. AND PERRY, P.; INSIGHTS ON CHROMOSOME STRUCTURE FROM SISTER CHROMATID EXCHANGES RATIOS AND THE LACK OF ISOLABELING AND HETEROLABELING AS DETERMINED BY THE FPG TECHNIQUE; EXP. CELL RES. 93:23-30 (1975).