

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LA CUMARINA (BENZOPIRONA,
ANHIDRIDO ORTO HIDROXI CUMARICO) SOBRE
LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

DOLORES RENE GRAÑA RAAB

México, D. F.

1974



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 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.

A mis padres

A mis hermanos

A la memoria de mis abuelos

A Rurico.

Con mi más sincero agradecimiento
al Dr. Jesús Manuel León Cázares,
por su asesoría como director del
presente trabajo.

Con gratitud al M. en C.
Javier Taboada por haber
proporcionado amablemente
la cumarina.

Con mi profundo agradecimiento a
la Dra. Guillermina Yankelevich -
por su valiosa colaboración en la
parte estadística de esta tesis.

C O N T E N I D O

	Pág.
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
III. MATERIAL Y METODO	12
IV. RESULTADOS	16
V. DISCUSION	32
VI. BIBLIOGRAFIA	37

RESUMEN

Se procesaron cultivos de linfocitos humanos según la técnica de Arakaki y colaboradores (1963). Se incubaron por 71 hrs. 45 minutos a 37°C., al cabo de las cuales se adicionó cumarina con el objeto de probar su efecto clastogénico, dejándose actuar por 15 minutos, completándose de esta manera las 72 hrs. de incubación.

Los resultados obtenidos indican que la cumarina, que es la benzopirona (anhídrido orto hidroxí cumárico), actúa como mitostático y como inductor de aberraciones cromosómicas sobre linfocitos humanos in vitro.

Las aberraciones cromosómicas inducidas por esta sustancia se manifiestan principalmente como rompimientos y aberturas; entendiéndose por éstos la discontinuidad morfológica que involucra tanto a los ácidos nucleicos como a las proteínas de cada cromátida; siendo en

el primer caso total y en el segundo parcial.

Dichas aberraciones fueron más frecuentes a la altura del centrómero, enseguida en los brazos largos, y finalmente en los brazos cortos en los que fueron muy poco frecuentes. Se observó que el número de aberturas fue mayor que el de rompimientos.

Las pruebas estadísticas indican que los rompimientos y aberturas inducidos por la sustancia mencionada no son selectivos, sino -- que pueden presentarse al azar en cualquier grupo cromosómico.

INTRODUCCION

Las aberraciones cromosómicas son todas aquellas alteraciones que sufren los cromosomas tanto en su número como en su estructura. Las primeras se refieren a la desviación que ocurre en el número normal característico de una especie, como son las aneuploidias y poliploidias; de éstas son importantes en el ser humano, desde el punto de vista patológico, las monosomías y trisomías principalmente.

Las alteraciones estructurales se refieren a los rearrreglos no estables y estables morfológicos en los cromosomas, y entre los principales tipos de éstas aberraciones se encuentran las deleciones, las translocaciones y las inversiones peri y paracéntricas.

Todas estas aberraciones son precedidas de uno o más rompimientos en el cromosoma o cromosomas involucrados, y su efecto depende del momento en el cual tuvo lugar la alteración. Estas aberraciones pueden originarse en cualquier etapa del ciclo de vida del individuo;

mientras más temprano ocurra la alteración en dicho ciclo más claramente se manifestará su efecto; por el contrario si la alteración ocurre en una etapa avanzada en el desarrollo, tendrá menos influencia sobre el individuo, debido a que pocas células descenderán de la anormal. -- (Mc. Feely, 1969).

Dichas aberraciones cromosómicas pueden ser producidas por factores biológicos, físicos o químicos; todos estos agentes producen daños en los cromosomas y han sido denominados por Shaw (1970) como clastógenos.

Entre los clastógenos biológicos se encuentran ciertos virus como el SV 40 que causa aberraciones cromosómicas en células humanas (Moorhead y Saksela, 1963), y el Adenovirus 12, que causa rompimientos en las cromátidas de cromosomas de células diploides humanas en cultivo (Aula y Nichols, 1968).

Los clastógenos físicos incluyen los rayos X, la luz ultravioleta, los campos magnéticos, las ondas sonoras y el choque frío. -- Todos estos rompen a los cromosomas humanos in vitro (Shaw, 1970).

Los clastógenos químicos son muy diversos y todos ellos han sido probados in vitro, adicionando el agente en diversas concentraciones y tiempos de exposición, a cultivos de linfocitos o fibroblastos.

Los resultados de esas pruebas no se pueden extrapolar al -- sistema in vivo; sin embargo el usarlas in vitro es útil, ya que así - pueden determinarse los niveles de concentración que son tóxicos y tra-- tar de interpretar los mecanismos que causan tales aberraciones.

Muchos clastógenos químicos pueden ser mutagénicos; es decir además de producir rompimientos y aberturas visibles, pueden originar- cambios en la codificación génica del organismo que no son observables en los cromosomas, pero sí pueden manifestarse en el fenotipo; otros - además de clastogénicos pueden ser teratogénicos o carcinogénicos.

Shaw (1970) ha reportado cerca de 200 agentes tanto químicos como físicos que son clastogénicos y los ha colocado en diversos gru-- pos:

A.- Antibióticos. Dentro de este grupo se mencionan los de-- rivados de Streptomices sp. que pueden actuar como inhibidores de la - síntesis del ADN, del ARN y de las proteínas.

Entre los inhibidores tanto de la síntesis como de la trans- cripción del ADN se encuentran la azaserina, la mitomicina C, la fleo- micina y la estreptonigrina. Todos éstos han sido probados para eva-- luar su clastogenicidad y todos son extremadamente activos a concentra-- ciones muy bajas. Los tres últimos además inducen rompimientos que -- presentan una distribución no al azar entre cromosomas, teniendo afini

dad por el centrómetro y las regiones heterocromáticas.

La actinomicina D y la daunomicina, que son inhibidores de la síntesis del ARN, actúan como clastógenos efectivos sobre cromosomas humanos. La actinomicina D a concentraciones altas inhibe la división de las células, y causa alteraciones morfológicas en los cromosomas en metafase en células que están en división. (Arrighi y Asu, - - 1965).

Un mecanismo que trata de explicar la inhibición de la síntesis del ADN y ARN, por estos antibióticos indica que probablemente se deba a la formación de una unión covalente con las bases, causando inserción permanente del compuesto dentro de las moléculas del ácido - - nucléico.

B.- Agentes mitostáticos e inhibidores de la profase. Una sustancia muy importante por su utilidad para inhibir mitosis en metafase es la colchicina, que es un alcaloide extraído de la planta Colchicum autumnale. Antes de que cualquier agente químico mutagénico -- fuera descubierto, se sabía que la poliploidía podía ser inducida en plantas tratadas con colchicina. Dicha sustancia utilizada a concentraciones de 5 a 15 microgramos por ml. y administrada por 1 a 6 hrs., causa depresión en la síntesis del ADN y en el índice mitótico en linfocitos humanos en cultivo estimulados con fitohemaglutinina. (Fitzgerald y Brehaut, 1970).

En adición a los efectos celulares ya mencionados, la colchicina y su derivado sintético, demecolcina (Colcemid) producen anomalías en los cromosomas, incluyendo desespiralización, división longitudinal del centrómero, rompimientos y aberturas.

Existen otros inhibidores de mitosis en estadios tempranos de la división celular que son clastogénicos en cromosomas de plantas. Estos son la actidiona y el gamexano.

C.- Compuestos relacionados con los ácidos nucleicos. Entre éstos se encuentran la adenina, la timidina, la mercaptopurina y muchos otros. Todos éstos son fuertes inhibidores de la síntesis del ADN y ARN.

D.- Drogas que actúan sobre el sistema nervioso central. Dichas drogas se han clasificado según su uso en analgésicos, sedantes, tranquilizantes, sustancias contra las náuseas y alucinógenos. Algunas son clastogénicas en plantas, otras rompen cromosomas de linfocitos humanos in vitro.

E.- Contaminantes del aire y del agua. Se conocen principalmente el hipoclorito de sodio y la cloramina T, ambos son clastogénicos de cromosomas de linfocitos humanos in vitro.

F.- Insecticidas e inhibidores del crecimiento de las plan-

tas. Estos agentes alquilantes son derivados sustituidos de la melamina y fosforamida principalmente. Son altamente mutagénicos en virus, bacterias, hongos y clastogénicos en linfocitos humanos en cultivo.

G.- Acridinas y otros colorantes fotodinámicos. El naranja y el amarillo de acridina son compuestos mutagénicos en microorganismos, así como también en Drosophila y plantas superiores. Rompen cromosomas de fibroblastos humanos in vitro.

H.- Compuestos antifólicos. Se refieren a los antagonistas del ácido fólico. Algunos causan rompimiento de los cromosomas en linfocitos humanos en cultivo; otros son teratogénicos en aves y mamíferos.

I.- Alcoholes y otros solventes orgánicos. Se menciona - - principalmente al etanol; tiene efectos mutagénicos, rompe los cromosomas de las raíces del haba, y al cromosoma X del grillo.

J.- Compuestos inorgánicos. Los cationes divalentes: calcio y magnesio, son importantes para la integridad del cromosoma. Si las células crecen en medios deficientes de calcio y magnesio los cromosomas tenderán a desespiralizarse y a alargarse, serán más frágiles y más fácilmente se romperán.

K.- Ingredientes de alimentos, aditivos y preservadores. -

Entre éstos la cafeína, la teofilina y la teobromina son clastógenos - comprobados. Dichas sustancias se encuentran en el café, el té, la - cocoa, y las bebidas que tienen cola. Los ciclamatos tienen propiedades clastogénicas. Sustancias como el glutamato monosódico, que es un saborizante, no han sido evaluadas como clastogénicas, pero de ésta se ha sospechado porque causa daños cerebrales en ratones recién nacidos.

Entre los aditivos de alimentos, se encuentra la cumarina, - que además de ser utilizada como conservador, es usada como fijador en perfumería, y en preparaciones farmacéuticas. Se caracteriza por tener un punto de fusión de 69°C, un punto de ebullición de 290°C. Es - soluble en 10 vols. de alcohol de 95%, en éter, cloroformo y aceites - volátiles fijantes. Es ligeramente soluble en agua.

Otros usos importantes que tiene la cumarina son: como herbida, inhibidor de la germinación y saborizante artificial. (Liendergardh, 1966).

Los trabajos que tratan de la biosíntesis de las cumarinas - incluyen aquellos de Reznik (1960) y Neish (1964).

Estos trabajos están basados en estudios llevados a cabo con Hierochloe odorata (Brown et al. 1960, Brown, 1962), y en estudios enzimáticos con Melilotus alba por Kosuge y Conn (1959, 1961). Esas plan-

tas contienen el glucósido del ácido o -cumárico y el glucósido del ácido cumarínico. En M. alba no existe mucha cumarina libre, la mayoría ha sido aislada por hidrólisis de esos glucósidos. La fenilalanina y la tirosina son fácilmente convertidas en los tejidos vivos a cumarina, y aún más rápidamente en el glucósido del ácido o - cumárico. La biosíntesis de la cumarina está basada principalmente en esos hechos. - - (Diagrama 1).

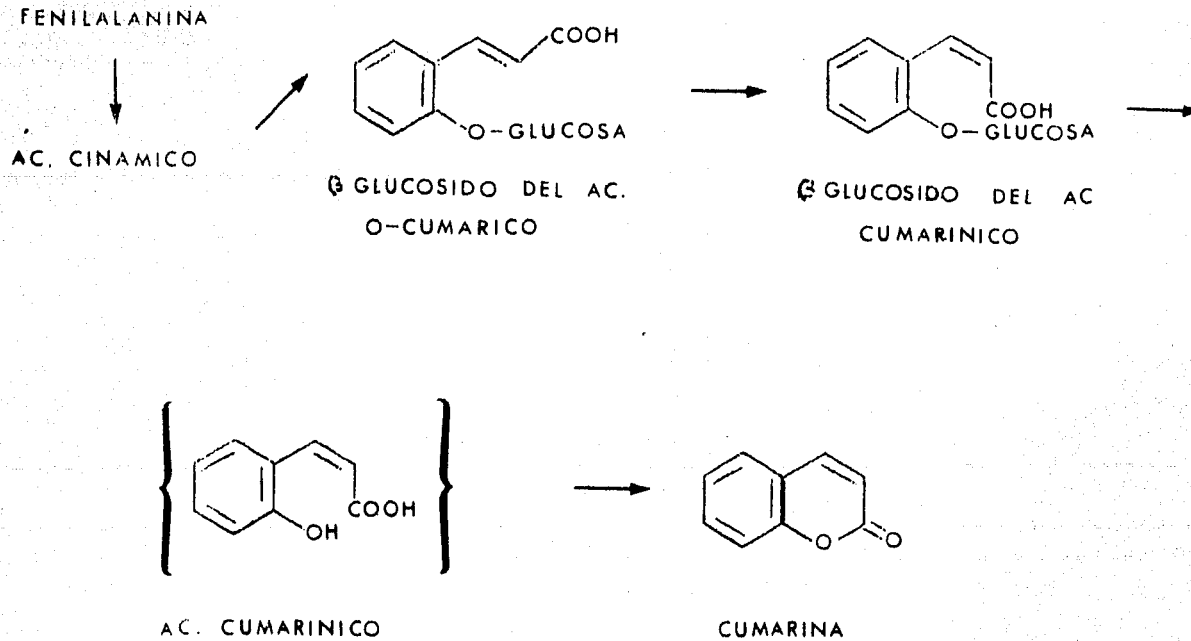
La hidroxilación del ácido cinámico en la posición orto, acoplado con la glucosilación, probablemente sea responsable de la formación del glucósido del ácido o - cumárico. Este glucósido entonces sufre una conversión trans - cis, posiblemente debida a la acción de la luz solar, dando el glucósido del ácido cumarínico, que rápida y espontáneamente forma cumarina.

Las cumarinas como la umbelliferona, la esculetina y la escopoletina se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas superiores. Estas pudieran originarse de los ácidos: p-cumárico, cafeico y ferúlico respectivamente. (Diagrama 2).

Uno de los métodos más convenientes para sintetizar cumarinas es la reacción de Pechmann, 1883 (Finar, 1959), la cual es la condensación de un fenol con un beta ceto ester. Los reactivos condensantes usuales son el ácido sulfúrico y el pentóxido de fósforo, pero Koo demostró que el ácido polifosfórico es muy efectivo.

DIAGRAMA 1

BIOSINTESIS DE LAS CUMARINAS



Al revisar la bibliografía se encontró que la cumarina ha sido poco estudiada como inductor de aberraciones cromosómicas. Sarma- (1968), con raíces de Ephedra foliata Boiss var. ciliata ($2N = 14$) demostró el efecto de una solución de cumarina, dejándola actuar por diferentes tiempos y observó profases, metafases y anafases, en las que reporta rompimientos y fragmentos. En dicho trabajo no se utilizó ningún mitostático, ya que la cumarina actúa como tal.

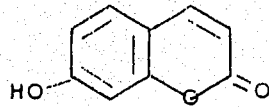
Considerando lo anterior y teniendo en cuenta la importancia de la cumarina, principalmente como un aditivo de alimentos, se pensó utilizar ésta en cultivo de linfocitos humanos, esperándose obtener los siguientes resultados:

- A.- Producción de efectos clastogénicos.
- B.- Cambios en la morfología de los cromosomas.
- C.- Que la cumarina actuara probablemente como mitostático.

DIAGRAMA 2

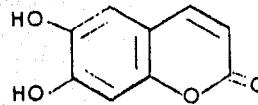
BIOSINTESIS DE LAS CUMARINAS

AC P CUMARICO



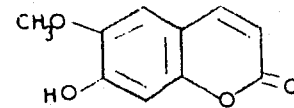
UMBELLIFERONA

AC CAFEICO



ESCULETINA

AC FERULICO



ESCQPOLETINA

MATERIAL Y METODO

Para obtener el cultivo de linfocitos se utilizó la técnica de Arakaki y colaboradores (1963).

Se colocaron 6 gotas de sangre humana extraída con una jeringa previamente heparinizada en cada uno de los frascos de cultivo que contenían; 5 ml de medio TC 199 (Difco, 5477) al 20% con suero fetal de bovino (Hycl) previamente inactivado a 60°C. por 20 minutos.

A esto se adicionaron una gota de heparina (Abbot), 0.25 ml de fitohemaglutinia M, (Difco, 0528), que serviría como estimulante mitótico, 0.10 ml de penicilina estreptomicina (Difco, 5854), y 0.10 ml de glutamina (Difco, 5789).

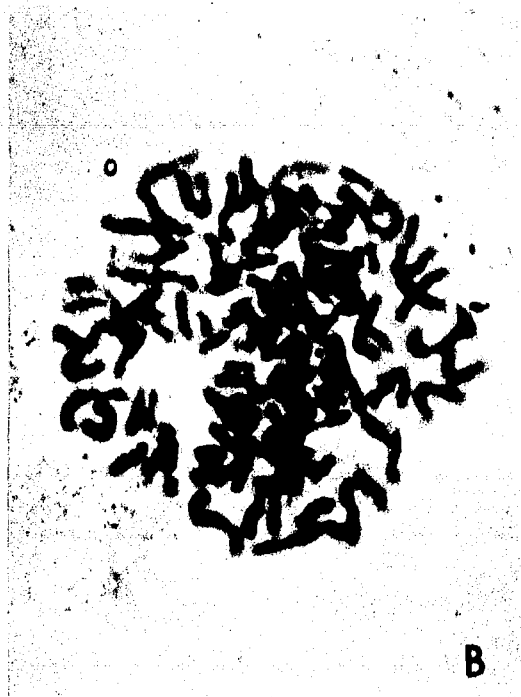
Los cultivos de leucocitos se incubaron durante 71 hrs. 45 minutos a 37°C. Una vez completado dicho tiempo se adicionó a unos --

frascos 0.10 ml de una solución acuosa saturada de cumarina (Tratado - I); a otros se les agregó como mitostático 0,10 ml de colcemid (Tratado II), y a los últimos no se les adicionó ninguna sustancia, considerándose éstos como testigos,

Después de adicionadas las sustancias se incubaron nuevamente los cultivos por 15 minutos a 37°C, y completadas las 72 hrs. de incubación se realizó la cosecha, que consistió en un choque hipotónico, fijación por 24 hrs., elaboración de preparaciones y tinción de las mismas con una mezcla de colorante Giemsa Leishman por 20 minutos. (Moorhead et al., 1960).

Obtenidas las preparaciones se procedió a efectuar el análisis de éstas tomando en cuenta las siguientes características tanto en los tratamientos I y II como en el testigo:

- A.- Observación y cuantificación de mitosis normales y afectadas.
- B.- Observación y número de mitosis analizables y no analizables; entendiéndose por analizables las mitosis en las cuales los cromosomas se encontraban bien individualizados y podían ser identificados por lo menos hasta grupo cromosómico, y por no analizables las mitosis en las cuales los cromosomas no podrían ser medidos por carecer de individualidad (Fig. 1A, 1B).

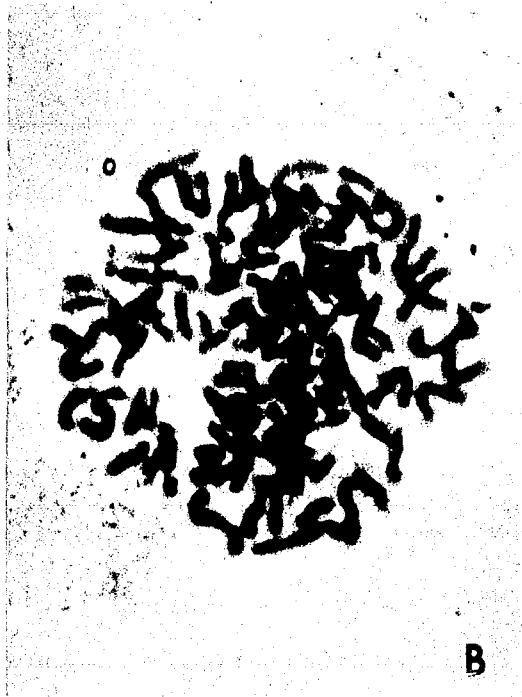


BIBLIOTECA CENTRAL
U. N. A. M.

Fig. 1-A, Mitosis analizable, 1250 X. B, Mitosis
no analizable, 1250 X.



A

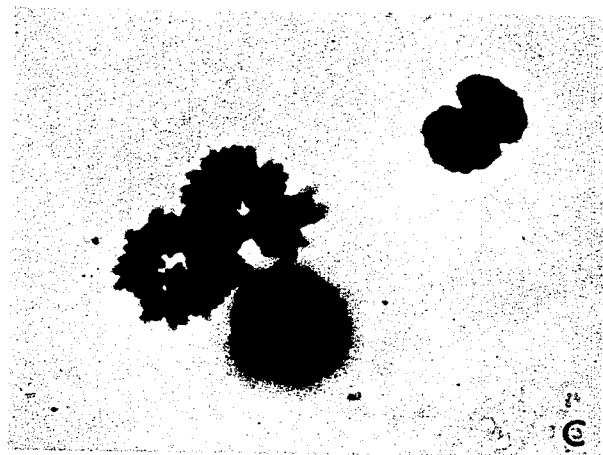
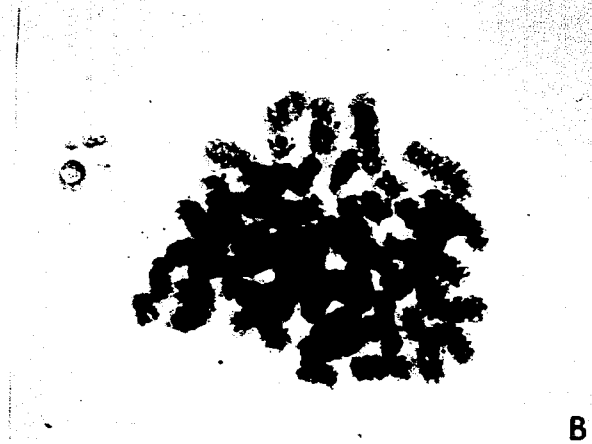


B

BIBLIOTECA CENTRAL
U. N. A. M.

- C.- Número cromosómico en cada una de las mitosis analizables..
- D.- Observación de diferentes características morfológicas como son: cromosomas alargados, presencia de cromátidas y centrómeras separadas, presencia de satélites, así como también la presencia de anafases. (Fig. 2A, B, C, - D.).
- E.- Observación y determinación de aberraciones (rompimientos y aberturas, tipo, sitio y grupo que las presentaba principalmente). Por rompimiento se entiende una discontinuidad morfológica total que involucra tanto a los ácidos nucleicos como a las proteínas, y por abertura - una discontinuidad parcial, que al igual que el rompimiento puede involucrar tanto a los ácidos nucleicos como a las proteínas en una cromátida.
- F.- Selección de mitosis que presentaban aberraciones cromosómicas.
- G.- Obtención de fotografías de las mitosis seleccionadas, con un fotomicroscopio Carl Zeiss.
- H.- Obtenidas las fotografías se procedió a identificar los cromosomas. Para esto se utilizó el sistema estandar de nomenclatura de cromosomas humanos propuesto en la -

Fig. 2. Cultivos de linfocitos humanos testigo y -
tratados con cumarina y colcemid. A, Cro-
mosomas con cromátidas y centrómeras sepa-
radas. B, Cromosomas desespiralizados. C,-
Anafases. D, Cromosomas alargados.



conferencia de Denver (1960). Dicho sistema consiste - en arreglar a los cromosomas según su tamaño y posición del centrómero. De acuerdo a esto los cromosomas se en encuentran acomodados en siete grupos (A, B, C, D, E, F, G.), Los autosomas se encuentran en los números 1 a 22 en orden decreciente a su longitud y los cromosomas - sexuales se refieren como X Y.

Para la identificación de los cromosomas se obtuvo la relación de los brazos, expresada como la longitud del brazo largo respecto al brazo corto. Obtenida dicha relación se utilizó la tabla II del reporte de Denver en donde se determina el rango de la relación de los brazos de cada cromosoma.

Los cromosomas se ordenaron según esa relación y se ~~clasifi~~caron de acuerdo a su morfología utilizando el diagrama que se presenta en el reporte mencionado anteriormente y cuya fotografía se anexa - a continuación. (Fig. 3).

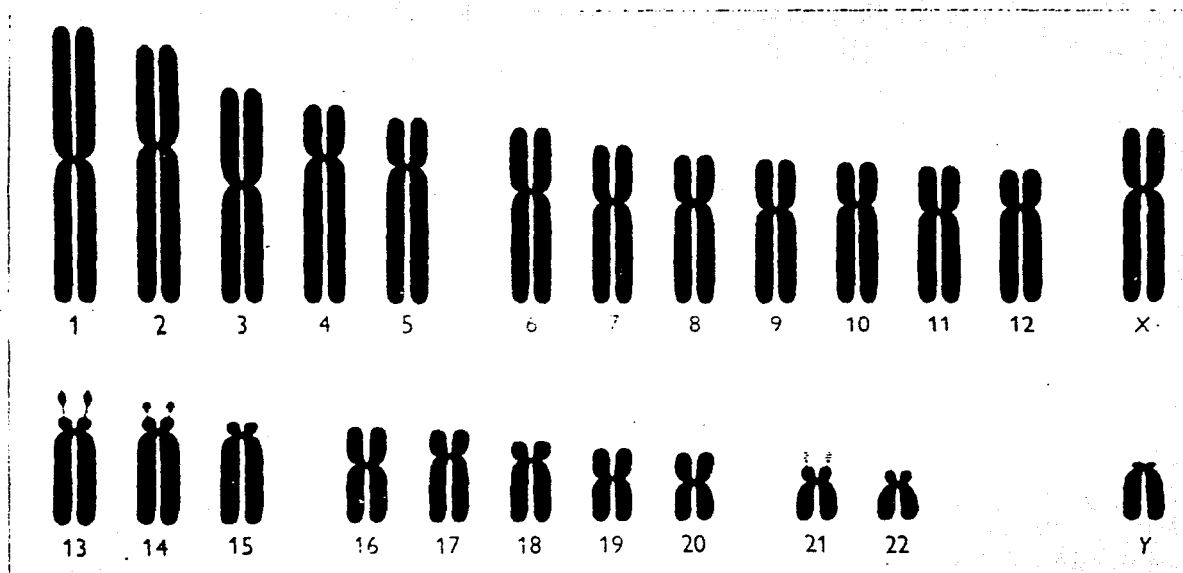


FIG. 3 DIAGRAMA DE DENVER

A = 1-3

E = 16-18

B = 4-5

F = 19-20

C = 6-12-X

G = 21-22-Y

D = 13-15

RESULTADOS

Se observaron núcleos y figuras mitóticas en metafase tanto en los cultivos que recibieron los tratamientos I y II como en el cultivo testigo.

También se observó la presencia de anafases.

Así mismo se distinguieron entre los caracteres morfológicos, cromosomas alargados, cromosomas con cromátidas y centrómeras separadas, presencia de satélites, rompimientos y aberturas.

En el cultivo con el tratamiento I se observaron 569 mitosis, y de éstas 160 se vieron afectadas (presentaron rompimientos y aberturas), en el tratamiento II se observaron 68 mitosis dañadas de 439, que fue el total observado. En el cultivo testigo de 241 mitosis encontradas sólo 34 se vieron afectadas (Tabla 1).

Como se muestra con los datos obtenidos la cumarina actúa co

T A B L A I

RELACION DEL NUMERO DE MITOSIS DAÑADAS Y NO DAÑADAS
OBTENIDAS EN LOS CULTIVOS TRATADOS Y TESTIGO

CULTIVO	MITOSIS DAÑADAS	MITOSIS NO DAÑADAS	TOTAL DE M. OBSERVADAS
TRATADO I	160	409	569
TRATADO II	68	371	439
TESTIGO	34	207	241

mo mitostático, y en este caso podemos decir que fue más efectiva que el colcemid (tratamiento II), pues se encontraron 139 mitosis más en dicho tratamiento.

Comparando el número de mitosis observadas en cada caso, podemos ver que la cumarina incrementó en un 42.3% el número de mitosis en relación al cultivo testigo, y en un 12.8% en relación al tratamiento II.

El número total de rompimientos y aberturas en los cultivos tratado y testigo se muestra en la tabla II.

La frecuencia de rompimientos en el cultivo con el tratamiento I, fue semejante en los cromosomas pertenecientes a los grupos A y C. El grupo B, el E y el F presentaron rompimientos, pero su frecuencia fue mucho menor que en los casos anteriores.

Los grupos D y G no presentaron rompimientos.

En el tratamiento II el grupo A fue el más afectado en frecuencia de rompimientos, siguiéndole en orden decreciente el grupo C, el B, el D, el E y el F.

T A B L A II

NUMERO TOTAL DE ROMPIMIENTOS Y ABERTURAS OBTENIDOS
EN LOS CULTIVOS TRATADOS Y TESTIGOS

CULTIVO	ROMPIMIENTOS	ABERTURAS
TRATADO I	55	81
TRATADO II	26	19
TESTIGO	15	11

El grupo G no se vió afectado.

En el cultivo testigo se observó que el grupo más afectado - en rompimientos fue el A, enseguida el C, B, F y D. Los grupos E y G no presentaron rompimientos.

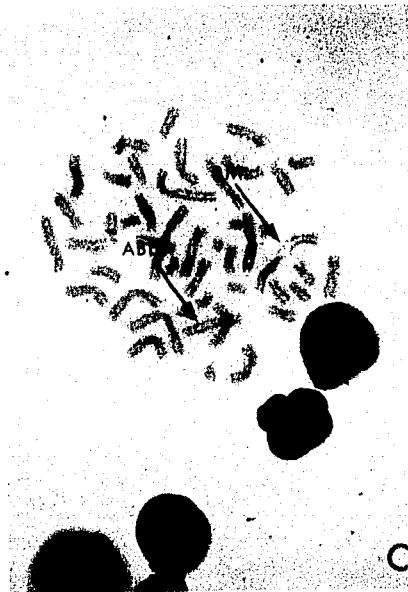
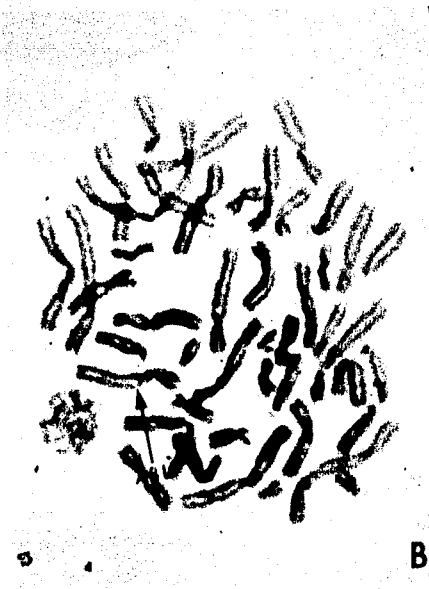
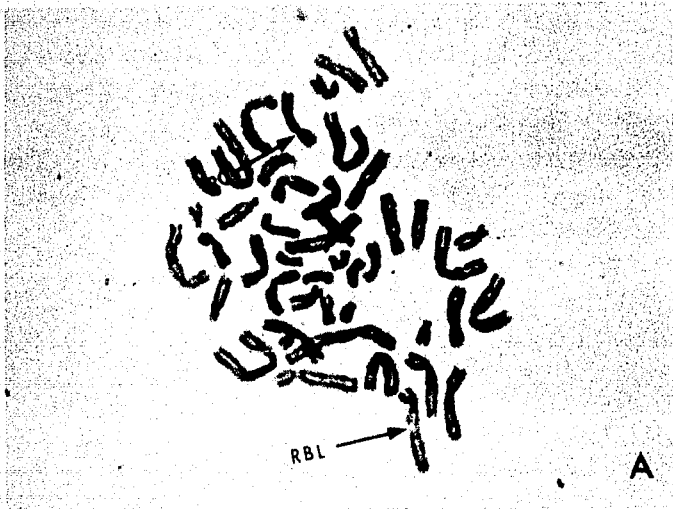
Los rompimientos fueron divididos según el sitio donde se -- presentaran en: rompimiento en el brazo largo, brazo corto y a la altura del centrómero.

Según esto se observó que el número de rompimientos en el - brazo largo fue mucho mayor que en el brazo corto. El grupo más afectado fue el C. El grupo A y el B también se vieron afectados, aunque éste último en menor proporción. (Fig. 4-A).

En relación a los rompimientos en el brazo corto, los cromosomas se vieron poco dañados; sólo el grupo A presentó un rompimiento.

En el cultivo que recibió el tratamiento II, el grupo A se - vió más afectado en el brazo largo, no así el grupo B y el C que sólo presentaron rompimientos en el brazo corto.

Fig. 4 Efectos clastogénicos analizados en los -
cultivos de linfocitos humanos expuestos a
la acción de la cumarina por 15 minutos.--
Detalles: ABL, Abertura en el brazo largo,
RBL, Rompimiento en el brazo largo, RC, --
Rompimiento a la altura del centrómero, RM,
Rompimiento múltiple.



En el testigo los cromosomas no presentaron rompimientos en el brazo corto; sólo los grupos A, B, y C, presentaron daño en el brazo largo, pero en muy baja proporción.

Sin embargo los rompimientos a la altura del centrómero fueron muy abundantes; y el grupo más afectado en el tratamiento I fue el A, enseguida los grupos C, B, E, y F. (Fig. 5-A).

En el tratamiento II el grupo más dañado fue el C, luego el grupo A, B, F, y D en orden decreciente; pero en relación con el cultivo que recibió el tratamiento I la diferencia es aparente, siendo muy notable el incremento de rompimientos obtenidos en el cultivo expuesto a la acción de la cumarina.

En general el cultivo con el tratamiento II, fue el que presentó menor número de rompimientos.

El número de aberturas fue bastante mayor que el de rompimientos en los tres casos estudiados.

Todos los grupos con excepción del G se vieron alterados. - En este caso el cultivo tratado con cumarina fue el más afectado, pero a diferencia de lo ocurrido con los rompimientos el grupo más dañado - fue el C, siguiéndole los grupos A y E. Los grupos F, D, y B mostraron poco daño. (Fig. 4-B y 5-B).

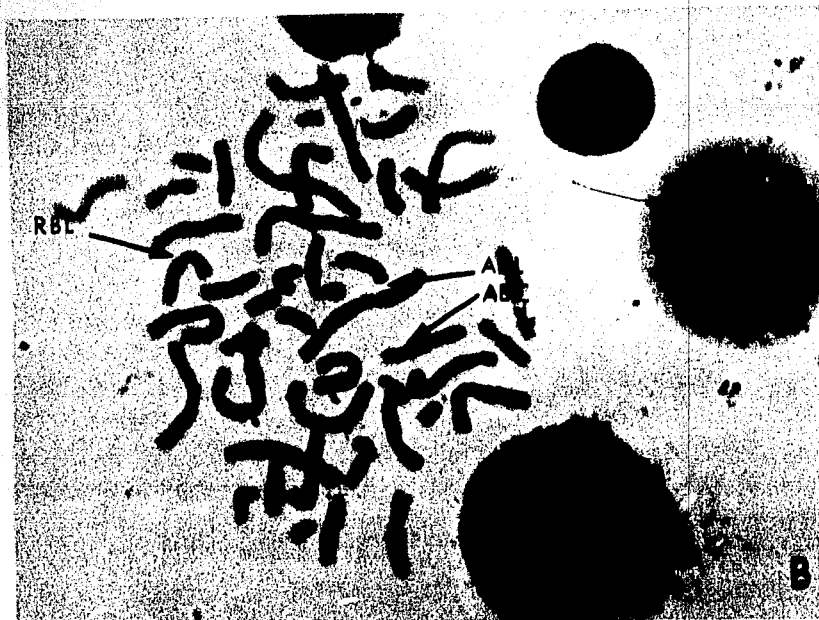
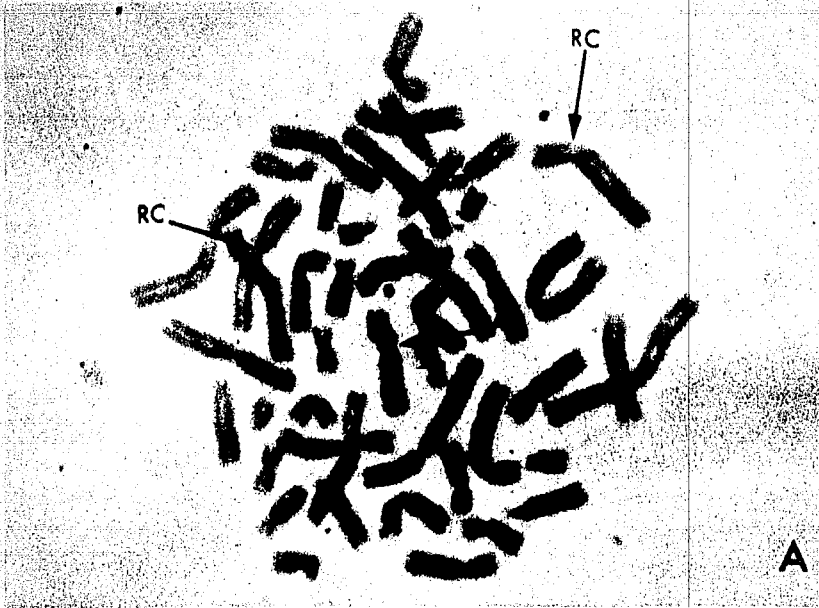
En el cultivo con el tratamiento II, el grupo C fue el más dañado. Se observaron aberturas en todos los grupos con excepción del G, lo cual no sucedió en el cultivo testigo, ya que en éste último ni el grupo G ni el D y F presentaron aberturas; pero se observó como grupo más afectado el C.

Las aberturas en el brazo largo fueron mucho más notables -- que a la altura del centrómero, o en el brazo corto respectivamente -- (Fig. 4-C). En éstas tres características en el cultivo que recibió el tratamiento I, siempre el grupo C fue el más afectado, luego el grupo B, y en seguida el grupo A. Salvo en las aberturas en el brazo corto en donde el número de éstas fue mayor en los grupos A y B.

Otra diferencia observada fue en el grupo E. que se vió más dañado en el brazo largo, que a la altura del centrómero o en el brazo corto.

En el tratamiento II, se vió que en general, en el brazo largo fue donde los cromosomas se dañaron más, siendo el grupo C, el que-

Fig. 5. Efectos clastogénicos analizados en los -
cultivos de linfocitos humanos expuestos-
a la acción de la cumarina por 15 minutos.
Detalles: ABL, Abertura en el brazo largo,
ABC, Abertura en el brazo corto, AC, Aber-
tura a la altura del centrómero, RBL, Rom-
pimiento en el brazo largo, RC, Rompimien-
to a la altura del centrómero.



T A B L A I I I

NUMERO DE ROMPIMIENTOS Y ABERTURAS POR GRUPO CROMOSOMICO
EN EL CULTIVO TRATADO CON CUMARINA DURANTE 15 MINUTOS

GRUPO	A	B	C	D	E	F	G
Romp. B.L.	7	I	9	-	-	-	-
Romp. B.C.	I	-	-	-	-	-	-
Romp. en el centró- mero.	15	6	12	-	2	2	-
Abert. B.L.	13	15	25	2	2	I	-
Abert. B.C.	2	I	6	-	-	-	-
Abert. en el centró- mero.	5	7	12	-	I	I	-

T A B L A I V

NUMERO DE ROMPIMIENTOS Y ABERTURAS POR GRUPO CROMOSOMICO
EN EL CULTIVO TRATADO CON COLCEMID DURANTE 15 MINUTOS

GRUPO	A	B	C	D	E	F	G
Romp. B.L.	2	-	-	-	-	-	-
Romp. B.C.	2	I	I	-	-	-	-
Romp. en el <u>centró</u> mero.	5	4	6	I	-	2	-
Abert. B. L.	-	2	4	I	2	-	-
Abert. B.C.	I	-	I	-	-	-	-
Abert. en el <u>centró</u> mero.	I	-	4	I	I	I	-

T A B L A V

NUMERO DE ROMPIMIENTOS Y ABERTURAS POR GRUPO CROMOSOMICO
EN EL CULTIVO TESTIGO

GRUPO	A	B	C	D	E	F	G
Romp. B. L.	I	I	I	-	-	-	-
Romp. B. C.	-	-	-	-	-	-	-
Romp. en el centró- mero.	6	2	3	I	-	-	-
Abert. B. L.	I	I	I	-	-	-	-
Abert. B. C.	2	-	3	-	-	-	-
Abert. en el centró- mero.	-	-	2	-	I	-	-

T A B L A VI

NUMERO TOTAL DE ROMPIMIENTOS Y ABERTURAS POR GRUPO CROMOSOMICO EN LOS CULTIVOS TRATADOS Y TESTIGOS

GRUPO	ROMPIMIENTOS			ABERTURAS		
	TRATADO I.	TRATADO II.	TESTIGO	TESTIGO	TRATADO II.	TRATADO.
A	23	II	7	3	2	20
B	7	5	3	I	2	21
C	21	7	4	6	9	43
D	-	2	I	-	2	2
E	2	I	-	I	3	3
F	2	2	-	-	I	2
G	-	-	-	-	-	-
TOTAL	55	28	15	11	19	91

más aberturas presentó.

En el caso del cultivo testigo, la frecuencia de aberturas - fue muy baja, aunque siempre el grupo más afectado fue el C.

Estos resultados se encuentran resumidos en las tablas III a VI.

Aunque no se presentaron translocaciones ni inversiones detectables, sí se observaron múltiples fragmentos en pequeña proporción (Fig. 6-C).

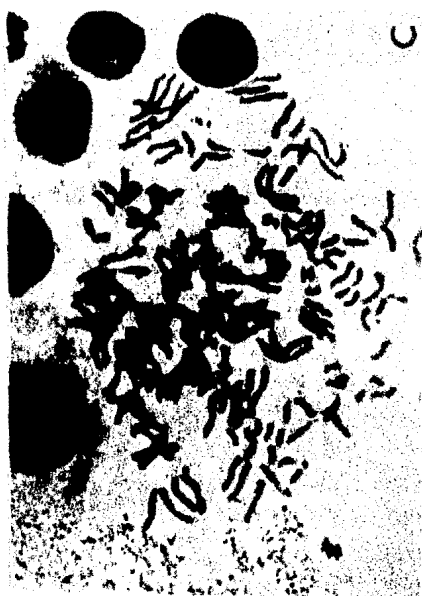
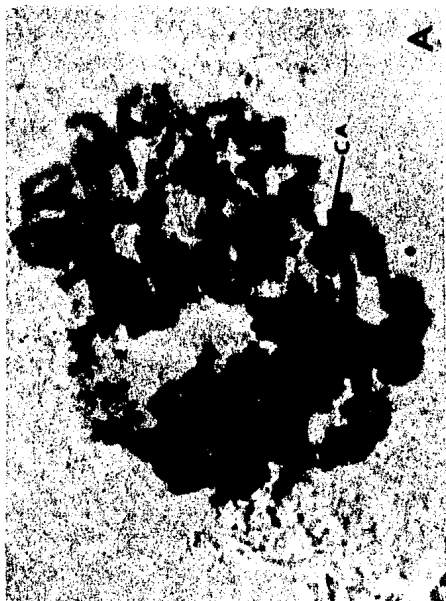
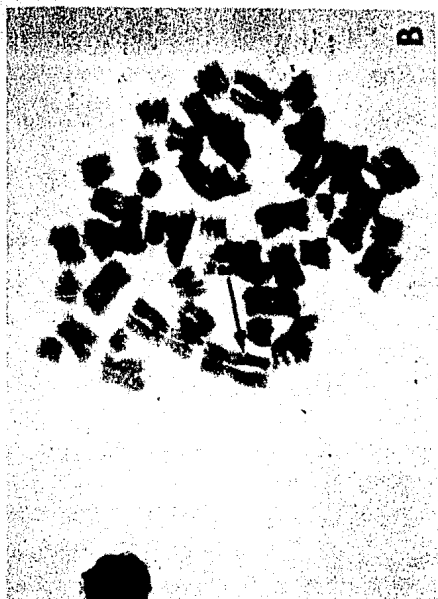
En el cultivo que recibió el tratamiento I, un carácter importante que se observó fue el de rompimiento múltiple, presentándose dos en el grupo A y uno en el grupo B. (Fig. 4-C).

Se observó también un probable cromosoma en anillo cuyo grupo cromosómico no pudo ser identificado. (Fig. 6-A). También se presentó una endorreduplicación. (Fig. 6-B).

En el cultivo con el tratamiento II se observó un segmento acéntrico, que correspondía a un segmento faltante en un cromosoma del grupo E.

La presencia de anafases se observó en los tratamientos I y II y en el testigo, siendo de un 45.4% en el cultivo con el tratamiento

Fig. 6. Efectos clastogénicos observados en el -
cultivo tratado con cumarina. A, Probable
cromosoma en anillo. B, Endorreduplica-
ción en la que se muestra un rompimiento-
en el brazo largo RBL. C, múltiples frag-
mentos.



I y de un 27.3% en cada uno de los cultivos tratado II y testigo.

Una vez obtenidos todos éstos datos se aplicó la prueba de χ^2 (Chi cuadrada) (Siegel, 1972), para tratar de demostrar si el daño- (rompimientos y aberturas unicamente) existente entre los tratamientos I y II y el testigo era debido al azar (hipótesis nula) y no al efecto de la sustancia.

En este caso se obtuvo un valor de 24.33 para la χ^2 , dos grados de libertad y una probabilidad menor de 0.001 ($\chi^2 = 24.33$; $df = 2$; $p = 0.001$).

La hipótesis nula fue rechazada. Esto demostró que los grupos dañado y no dañado son significativamente diferentes y con la difefencia debida al efecto de la sustancia, presentándose sólo un caso de mil en que la diferencia se debería al azar. (Tabla VII).

Una vez demostrado que el daño era debido a la sustancia se aplicó esta misma prueba para tratar de conocer si éste era indepen- -diente del grupo cromosómico.

En este caso el valor obtenido para la χ^2 fue de 12.21, diez grados de libertad y la probabilidad de $.30 > p > .20$

Por lo tanto la hipótesis de que el daño puede ocurrir en --

T A B L A VII

PRUEBA DE χ^2

	# MITOSIS DAÑADAS	# MITOSIS NO DAÑADAS
TRATADO I	160	409
TRATADO II	68	371
TESTIGO	34	207
VALOR DE χ^2	= 24.33	
df	= 2	
PROBABILIDAD	= 0.001	

cualquier grupo y de que no haya selectividad por ninguno de éstos en particular fue aceptada. (Tabla VIII).

En estos cálculos no se incluyó al grupo G. debido a que no presentó ningún tipo de daño.

T A B L A VIII PRUEBA DE χ^2 NUMERO DE ABERTURAS Y ROMPIMIENTOS (DAÑO)
POR GRUPO CROMOSOMICO

	A	B	C	D	E	F
TRATADO I	43	28	64	2	5	4
TRATADO II	13	7	16	4	4	3
TESTIGO	10	4	10	1	1	-

VALOR DE $\chi^2 = 12.21$

df = 10

PROBABILIDAD = . 30 > p > . 20

El grupo G no fue incluido ya que no prestó ningún -
tipo de daño.

D I S C U S I O N

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que la cumarina si tuvo efecto sobre los cromosomas de los linfocitos humanos en cultivo, pues al llevar a cabo la prueba de X^2 se comprobó que la diferencia de daño evaluado por la frecuencia de rompimientos y aberturas que existen entre los tratamientos I y II y el testigo fue debida a la acción de la sustancia y no al azar.

Estos resultados hubieran podido variar, probablemente debido a:

- A.- Que la concentración de la sustancia no fuera la adecuada para producir efectos clastogénicos.
- B.- Que el tiempo de exposición de la sustancia fuera demasiado alto o demasiado bajo, como para producir los efectos deseados.
- C.- Que los mecanismos de reparación no permitieran observar los efectos.

Dolimpio y colaboradores en 1968 realizaron un experimento -- en el que se utilizó aflatoxinas (cumarinas sustituidas) en cultivo de linfocitos humanos; postularon que existe un patrón definido de rompimientos que están confinados principalmente en los cromosomas más grandes; siendo los cromosomas 1 y 2 los más afectados.

Los resultados obtenidos en este trabajo contradicen lo que menciona dicho autor, pues al aplicar la prueba estadística de χ^2 se -- encontró que el daño puede ocurrir al azar en cualquier grupo cromosómico, sin importar el tamaño de los cromosomas.

En relación a los datos obtenidos por Aroche (1973), se puede decir que sus resultados son similares a los presentados en este -- trabajo, respecto a la presencia de rompimientos y aberturas, tanto en el tipo como en el sitio que las mostraban, a pesar de haber utilizado en ese caso hongos, y haberlos dejado actuar por 72 hrs. Además el -- testigo utilizado fue expuesto a la acción del colcemid durante 3 hrs.; fue probablemente por esto que dicho autor no reportó aberraciones en su testigo. A pesar de la diferencia de condiciones, tiempo de exposición, utilización en ese caso de un organismo vivo y en éste de una -- sustancia orgánica, los resultados como ya se mencionó son similares, -- lo cual hace pensar en la existencia probable de un mecanismo común para la producción de aberraciones cromosómicas, que será discutido más adelante.

Los resultados obtenidos también permiten afirmar que la cumarina actúa como mitostático y en este caso fue más efectiva que el Colcemid como se muestra en los resultados.

El conjunto de los datos obtenidos en el trabajo nos permiten dar una idea del efecto producido por la sustancia in vitro, pero estos datos no pueden ser extrapolados a un sistema vivo, pues ahí -- existen una serie de mecanismos y reacciones que no ocurren in vitro, -- como los mecanismos de desintoxicación y probablemente la sustancia -- sea eliminada. Por otra parte en el experimento la sustancia sólo se dejó actuar durante 15 minutos y ésta era químicamente pura; en un sistema vivo la sustancia no es utilizada en forma pura, sino mezclada -- con otros productos, esto podría hacer que el efecto de la cumarina -- quedara enmascarado por acción de otras sustancias; además el tiempo -- de acción de la cumarina y la concentración no sería igual in vitro -- que in vivo.

El haber obtenido rompimientos y aberturas a los 15 minutos de acción de la sustancia, nos hace pensar que de 0 a 15 minutos el -- comportamiento del daño sea exponencial; es decir que se vaya acumulando. Se piensa también que a medida que el tiempo de acción de la -- sustancia aumente el daño apreciable sea menor, ya que como es sabido -- existen mecanismos de reparación que empiezan a actuar probablemente -- en un tiempo mayor a una hora de exposición a los agentes clastogénicos.

Esto último se encuentra apoyado en los resultados obtenidos en experimentos que se están realizando actualmente (García, 1974), dejando actual la cumarina a diferentes tiempos, y éstos parecen indicar que en un período de una hora los daños son menores que a los 15 minutos de exposición de la sustancia.

Para explicar como se producen las aberraciones se han sugerido varias ideas, pero una de las hipótesis más atractivas implica "la reacción dilatadora" o de "retraso", que está relacionada con la liberación de la ADN asa. Puede ser que la acción primaria de la droga o agente en cuestión no sea sobre el cromosoma por sí mismo, pero sí en algún otro organoide celular.

También se ha sugerido que la liberación de la ADN asa lisosómica causada por desestabilización de las membranas del lisosoma en células diploides humanas producen aberraciones cromosómicas. (Allison y Paton, 1965).

El presente estudio forma parte de una serie de investigaciones, que se están realizando en el laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Experimental del Instituto de Biología de la UNAM, con el objeto de estudiar diferentes tiempos de exposición, así como diferentes concentraciones de la sustancia sobre los cromosomas de linfocitos humanos en cultivo.

Una vez encontrado el rango máximo y mínimo de ambos parámetros es importante repetir el experimento bajo las condiciones utilizadas para tratar de encontrar hasta donde sea posible en qué momento empieza a actuar el mecanismo de reparación.

Así mismo es importante probar la cumarina sustituida, a la que se le haya introducido algún radical, y repetir el experimento bajo las condiciones ya mencionadas en el método, con el objeto de ver si el nuevo radical tiene algún efecto diferente o si éste solamente se debe al grupo funcional.

También sería de interés administrar a algunos animales la cumarina por varias vías durante cierto tiempo y comparar los cromosomas obtenidos de éstos animales con los de otros animales testigos.

Esta y las futuras investigaciones planteadas podrían ser de gran utilidad para el estudio de las aberraciones cromosómicas y no sólo nos permitirían ver los efectos que causan los clastógenos, sino -- que nos ayudarían a tratar de interpretar cómo es el mecanismo que conduce a éstas, a la vez que nos proporcionarían una idea sobre la forma de actuar de los mecanismos de reparación.

B I B L I O G R A F I A

Allison, A. C., y G. R. Paton (1965). Chromosome damage in human di--
ploid cells following activation of lysosomal enzy
mes. Nature 207: 1170 - 1173.

Arakaki, D. T., y R. S. Sparks (1963). Microtechnic for culturing leu
cocytes from whole blood. Cytogenetics 2(213): -
57 - 60.

Aroche, R. M., (1973). Efecto de toxinas de Asperigillus parasiticus-
speare sobre linfocitos humanos en cultivo. Tesis
prof. Fac. de Ciencias UNAM México.

Arrighi, F. E., y T. C. Asu (1965). Experimental alteration of meta--
phase chromosome morphology. Effect of Actinomy--
cin D. Exp. Cell. Res. 39: 305 - 308.

Aula, O., Y W. W. Nichols (1968). Lysosomes and virus induced chromo-
some breakage. Exp. Cell Res. 51: 595 - 601.

Bonner, J., y J. E. Varner (1965). Plant Biochemistry. Acad. Press --
New York and London. 605 - 607.

- Brown, S. A., G. H. Towers, y D. Wright (1960). Biosynthesis of the - Coumarins. Tracer studies on Coumarin formation - in Hierochloe odorata and Melilotus officinalis. - Can. J. Biochem. Physiol. 38: 143 - 156.
- Brown, S. A. (1962). Biosynthesis of the Coumarins. The role of glycosides in the formation of Coumarin by Hierochloe odorata. Can. J. Biochem. Physiol. 40: 607-618.
- Denver Study Group (1960). A proposed Standard System of Nomenclature of human mitotic chromosomes. Denver Colorado -- Addendum - I. Acta Genet. 10: 322 -328.
- Dolimpio, D. A., M. Legator, y C. Jacobson (1968). Effect of afla---- toxin on human leucocytes. Proc. Soc. Exp. Biol. - Med. 127: 559-562.
- Fieser y Fieser (1948). Química orgánica. Editorial Atlante, S. A. - México, 706-707.
- Finar, I. L. (1959). Organic Chemistry. Longmans 1: 662-663.
- Fitzgerald, P. H., y L. A. Brehaut (1970). Depression of DNA synthesis and mitotic index by colchicine in cultured -- human lymphocytes. Exp. Cell. Res. 59: 27-31.
- García, R. L. (1974). Comunicación personal.
- Kosuge, T., y E. Conn (1959). The metabolism of aromatic compounds in higher plants. Coumarin and o - Coumaric acid. J. Biol. Chem 234: 2133-2137.

- Kosuge, T., y E. Conn (1961). The metabolism of aromatic compounds in higher plants. The B Glucosides of o- Coumaric, - Coumarinic and Melilotic acids. J. Biol. Chem. 236 (6): 1617-1621.
- Liendergardh, H. (1966). Plant Physiology. Oliver and Boyd. Edin- - burgh and London. 375-384.
- Mc. Feely, R. A. (1969). Aneuploidy, Poliploidy and Structural rea-- rrengement of chromosomes in mammals other than -- man. Comparative Mammalian Cytogenetics. Springer Verlag New York. 434-444.
- Moorhead, P. S., P. C. Nowell, W. J. Wellman, D. M. Battips, y D. A. - Hungerford (1960). Chromosome preparation of leu- cocytes cultures from human peripheral blood. Exp. Cell. Res. 20: 613-616.
- Moorhead, P. S., y E. Saksela (1963). Non random chromosomal aberra-- tions in SV 40 - transformed human cells. J. Cell. Comp. Physiol. 62 (1): 57-83.
- Neish, A. C. (1964). In biochemistry of phenolic compounds. Citado - en Bonner, J., y E. Varner (1965). Plant Bioche-- mistry. Acad. Press. New York and London 605-607.
- Reznik, H. (1960). Erg biol 23: 14. Citado en Bonner, J., y E. Var-- ner (1965). Plant Biochemistry. Acad. Press. New York and London 605-607.
- Sarma, CBSR. (1968). Coumarin induced chromosome breakages in the -- root tips of Ephedra foliata Boiss var. ciliata. - Cytologia 33: 94-96.

Shaw, M. W. (1970). Human chromosome damage by chemical agents. Ann. Rev. Med. 21: 409-432.

Siegel, S. (1972). Estadística no Paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. Ed. Trillas. México. 64-69.