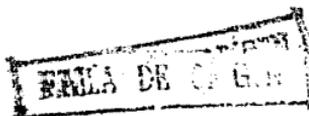




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



"EL EFECTO INHIBITORIO DE LA VITAMINA -C
SOBRE LA FRECUENCIA DE LOS INTERCAMBIOS DE
CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS MEDIANTE
MITOMICINA-C "in vivo"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A ;

GUADALUPE RIVAS OLMEDO

Directores de Tesis: M.C. Sandra Díaz Barriga Arceo
Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1989



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.

G L O S A R I O

G L O S A R I O

ADN	Acido Desoxirribonucleico
ARN	Acido Ribonucleico
Br	Bromo
BrdU	Bromodesoxiuridina
I	Porcentaje de Inhibición
ICH	Intercambios de Cromátidas Hermanas
IdU	Yododesoxiuridina
IR	Indice de Replicación
MMC	Mitomicina-C
MNNG	N-metil-N'-nitro-N-nitroso- guanidina

RESUMEN

RESUMEN

Desde los años 70's se ha encontrado que por sus características antioxidantes, la vitamina-C posee cierta actividad anticancerígena, además se han visto efectos antimutagénicos con dosis específicas de esta vitamina sin causar riesgo alguno al material genético sobre diferentes sistemas de estudio.

Este trabajo comprendió el estudio de tres dosis diferentes de vitamina-C (ácido ascórbico) (3 g/Kg, 5 g/Kg y 7 g/kg), sobre ratones expuestos al mutágeno nitomicina-C (MMC) que ha mostrado ser el más potente (pero con baja producción de aberraciones cromosómicas) tanto *in vivo* como *in vitro*.

Dicho efecto fué evaluado mediante la prueba de intercambios de cromátidas hermanas (ICH), que es la que actualmente proporciona el índice más sensible para detectar el daño genético, y analizado estadísticamente mediante un análisis de varianza y la prueba de Tuckey, ambas con $p < 0.05$.

También se evaluó el efecto de dicha vitamina sobre la proliferación celular de la médula ósea de los ratones, y se analizó estadísticamente mediante la prueba de chi cuadrada con $p < 0.05$.

La vitamina-C por sí misma, además de no aumentar la frecuencia de ICH, ejerció un efecto anti-ICH estadísticamente significativo en las tres dosis administradas; no presentó efectos sinérgicos con la MMC en la frecuencia de ICH, pero sí en la proliferación celular de la médula ósea *in vivo*, lo cual quizás sea un reflejo de su acción genoprotectora.

INDICE

I N D I C E

1. I N T R O D U C C I O N

1.1. Definición y Antecedentes de los Inter- cambios de Cromátidas Hermanas (ICH)	1
1.2. Importancia del Estudio de los ICH	5
1.3. Métodos y Compuestos Inductores de ICH	10
1.4. La Vitamina-C y sus Efectos Genotóxicos y Anticancerígenos.	14
1.5. La Vitamina-C en Relación a los ICH	18

2. H I P O T E S I S

2.1. Objetivo Primario	20
2.1.1. Objetivos Secundarios	20

3. M A T E R I A L Y M E T O D O S

3.1. Material Biológico	21
3.2. Soluciones Administradas a los Ratones	21
3.3. Procedimiento	22
3.4. Análisis	26

4. R E S U L T A D O S

5. D I S C U S I O N

6. C O N C L U S I O N E S

7. R E F E R E N C I A S

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

1.1. Definición y Antecedentes de los Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH).

Se puede establecer de manera sencilla que los intercambios de cromátidas hermanas (ICH) son, como su nombre lo indica intercambios de segmentos homólogos o casi homólogos, simétricos y equivalentes entre las cromátidas de un mismo cromosoma (Morales, 1988; y Stetka y Carrano, 1977). Figura 1

Fue McClintock en el año de 1938 quien al percatarse de que los cromosomas en anillo podían, eventualmente, originar anillos dicéntricos, sugirió el fenómeno de los ICH (McClintock, 1938). En 1958 J. Herbert Taylor y sus colegas (de los departamentos de Biología y Medicina en el Laboratorio Nacional de Brookhaven demostraron y publicaron la existencia de los ICH detectados citológicamente en las células de la raíz de Crepis capalaris (Tice y Hollander, 1984). Mediante el análisis autorradiográfico de dichas células, cultivadas en presencia de timidina tritiada durante el primero de dos ciclos de división sucesivos, ellos observaron intercambios de segmentos entre una cromátida marcada y otra no marcada (Taylor, 1958).

Años más tarde los intentos para detectar la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN), y junto con ella a los ICH, se basaron en la incorporación en el ADN de un átomo pesado y polarizable como el bromo (Br) en forma de un análogo de base, la

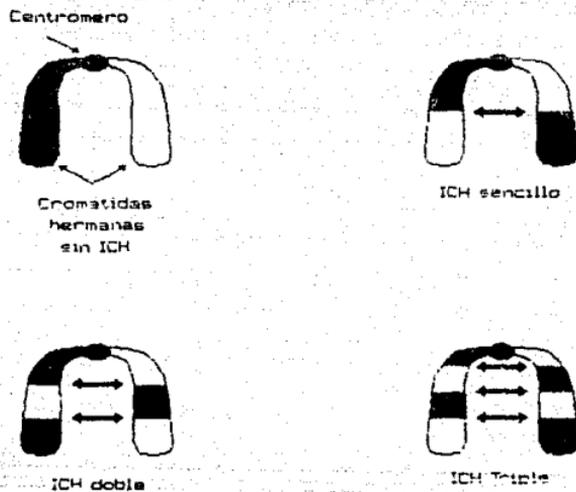


Figura 1. Representación de los intercambios de cromatidas hermanas. Sencillos, dobles y triples en cromosomas de ratón (Morales, 1988).

bromodesoxiuridina (BrdU), que pudiera ser detectado por la perturbación a estados excitados de dicho sustituyente y que, por tanto, mostrara las propiedades luminiscentes de él o los colorantes apropiados, unidos al ADN. Los primeros experimentos de este tipo se realizaron a mediados de 1972 por investigadores como Latt y Sugiyama (Tice y Hollander, 1984; y Goto y cols, 1975), centrándose en el uso de la quinacrina y sus derivados, principalmente debido a la capacidad de estos compuestos de producir patrones de bandeado de cromosomas en metafase. Sin embargo, debido a que no había un marcado efecto entre la sustitución de la BrdU y la fluorescencia de la quinacrina sólo se pudo continuar con -- este procedimiento hasta que Grapp y Hilwigg encontraron nuevos -- tipos de colorantes como los bisbenzimidazoles (v.gr. el Hoechst -- 33258). Más tarde se comprendió que dichos bisbenzimidazoles al unirse al ADN podían ser reducidos por la sustitución de BrdU -- y que dicho efecto podría servir para la detección citológica de la incorporación y por tanto de la síntesis de ADN. Poco después se observó que la emisión de fluorescencia del Hoechst 33258 al unirse a poliu(dAdc-BrdU) era inestable a la iluminación repetida y que las células substituidas con BrdU y expuestas al colorante eran claramente sensibles a la luz.

Debido a que el método original de Latt requería entonces un microscopio de fluorescencia y que además esta fluorescencia se extingue rápidamente durante la observación (Latt, 1973 y 1974), Perry y Wolff en 1974 propusieron un nuevo método utilizando además de la BrdU, el colorante de Giemsa y la exposición de las preparaciones a un buffer caliente (2 x SSC a 60 C)

(Perry,1974), la observación resultado de dicha técnica puede ser explicada en términos de una fotólisis y una elución por el buffer caliente (Goto y cols,1975), aunque ésta no ha sido la única explicación dada al respecto a través de los años (Burkholder,1979). Así, esta técnica de tinción con Giemsa facilitó el -- análisis de los ICH y por tanto su utilización en un laboratorio sin necesidad de un microscopio de fluorescencia.

Actualmente se continúa ampliando el interés en la naturaleza, el significado y la utilidad de este fenómeno observado citogenéticamente (Tice y cols,1984).

1.2. Importancia del Estudio de los ICH.

Con respecto a la investigación de los ICH se puede decir que por lo menos tres aspectos han recibido una atención significativa. El primero concierne al mecanismo actual por medio del cual las técnicas de tinción con BrdU detectan los ICH. El segundo se centra en la utilización de los ICH como una prueba a corto plazo para estudiar tanto a los agentes mutagénicos como a los carcinogénicos, y el tercero se refiere al mecanismo de formación de los ICH y su relación a ciertas enfermedades hereditarias en el humano (v.gr. el Síndrome de Bloom), que se caracterizan a su vez, por una predisposición a diferentes tipos de neoplasias) aunque el posible significado biológico de esta evento, al menos desde el punto de vista citológico, parece ser perfectamente recíproco y por tanto, no un medidor obligatorio del daño genético (Cheganty y cols, 1974). Sin embargo, aunque se tiene más información del primero, ninguno de estos tres aspectos es considerado como del todo entendido. Por otro lado, la creciente utilización de las técnicas del ADN recombinante en la investigación genética, han hecho que la comprensión a nivel molecular del fenómeno y su utilización se haya incrementado (Lall, 1984).

Desde un punto de vista molecular, los ICH consisten en un intercambio de doble cadena entre las moléculas de ADN de las cromátidas hermanas: esto ha dado lugar a que se propongan modelos que expliquen cómo ocurre el fenómeno, basados fundamentalmente en los modelos de recombinación bacteriana (Moxley, 1985).

En una revisión que realizaron Tice y Hollander en 1984, se encuentran varios modelos de la formación de los ICH, algunos de ellos son:

- * El modelo del Desvío de la Replicación (replication bypass model) (D.A.Shafer).
- * El modelo de la Conformación de la Cromatina (chromatin-conformation model) propuesto por DuFrain.
- * El modelo de la Ruta de la Probabilidad (path-probability model) de M.K.Conner.
- * El modelo Tricorte cruzamiento-unión de A.D.N. (DNA cross-link 3-cuts model) propuesto por Y. Fujiwara del Japón.

Cada modelo está basado en evidencia experimental específica aunque a veces limitada y ningún modelo o mecanismo de la formación de ICH en general ha sido hasta el momento confirmado (Tice y cols, 1984). En un principio, se pensó que los ICH podrían ser el resultado de un proceso de reparación de lesiones en el ADN (Bender y cols, 1974; y Latt, 1974); sin embargo, la observación de que algunos agentes pueden inducir un incremento en la frecuencia de ICH, que se prolonga mucho tiempo después de su administración (Ishii y Bender, 1978), sugiere que las lesiones no son reparadas .

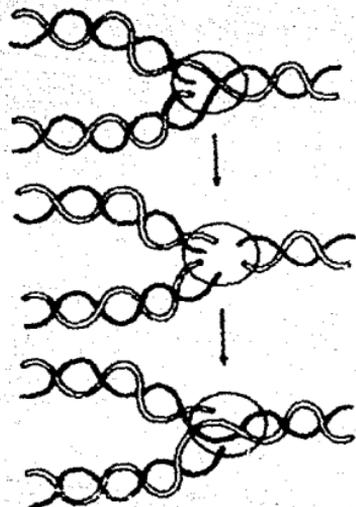
Más tarde, Robert B. Painter en el año de 1980 propuso lo que llamó el Modelo de Replicación de ICH basado en la idea que los rompimientos de doble cadena son generados en la conjunción entre un replicón completamente duplicado y otro parcialmente duplicado. Este modelo constituye la hipótesis más aceptada de la

inducción de ICH actualmente.

Se denominan replicones a las unidades discretas de replicación del ADN separadas unas de otras por ARN (ácido ribonucleico) y proteínas. Painter (1980), sugirió que el ADN en estas conjunciones o sitios de separación son susceptibles a rompimientos de doble cadena durante la replicación, lo cual es factible por la presencia de la enzima Topoisomerasa II descubierta en -- células de *Drosophila*; dicha enzima es capaz de inducir rompimientos de doble cadena del ADN. De esta manera, el daño que involucra la detención en la progresión de los orígenes de replicación provoca una asincronía en la replicación de dichas unidades lo que incrementa la posibilidad de dobles rupturas después de que una unidad haya terminado su replicación (Painter, 1980).

Figura 2

Aunque todavía no se conoce el significado biológico de los ICH, el hecho de que se han observado en las células de todos los organismos estudiados, sugiere que éstos son un fenómeno o la expresión de un fenómeno común y fundamental para la célula (Tice y cols, 1984). Por otro lado, es posible que el fenómeno de los ICH sea la consecuencia de un proceso que permite a la célula dividirse, aun en presencia de lesiones en su ADN; de ser así, pudiera haber una correlación entre el fenómeno y la mutación -- (Carrano y Thompson, 1982), dado que las lesiones persistentes -- aumentarían la probabilidad de esta última en el ADN. Lo anterior tiene importancia en relación con la formación de células cancerosas, debido a que existen pruebas que asocian la persistencia de lesiones en el ADN con las células malignas (Margison y Klei-



Unidad discreta de replicación
del ADN (replicón).

Discontinuidad de las cadenas de
ADN que puede ser inducida por
agentes genotóxicos.

Intercambio entre una cadena de
ADN recién sintetizada y una cadena
original aún sin replicarse.

Figura 2. Modelo de replicación para el intercambio de cromátidas hermanas.
(Painter, 1980).

hues,1975).

A pesar de que los experimentos en autorradiografía de Kato indicaban que los mutágenos inducen ICH (Kato,1974), no fué sino hasta la introducción de la técnica dependiente de BrdU de Latt (Latt,1973) cuando los ICH fueron ampliamente considerados como un indicador de potencialidad mutagénica y carcinogénica. De hecho, los ICH son un método de mayor sensibilidad para la detección de muchos mutágenos químicos en comparación con las aberraciones cromosómicas; (De acuerdo con Latt, la sensibilidad de la prueba de ICH es aproximadamente 100 veces mayor que la prueba estándar de aberraciones cromosómicas) (Latt,1974), aunque parecen no estar relacionados entre si y llevarse a cabo mediante mecanismos distintos (Wolff,1982). Este interés en los ICH como una alternativa genotóxica fué iniciada por el estudio extensivo a cargo de Perry y Evans en 1975. Actualmente hay evidencia de que para muchos agentes químicos, el estudio de los ICH proporciona el índice más sensible para detectar el dano genético porque se ha encontrado que existe una correlación entre la frecuencia de ICH y la dosis del mutágeno (Perry y Evans,1975 ; y Takehisa,1982). Por esto el Comité de Genética Toxicológica de los EE.UU. lo ha incluido como sistema de prueba (Latt y cols,1981).

1.3. Métodos y Compuestos Inductores de ICH.

Hasta el momento se han creado diversas pruebas que utilizan bacterias, levaduras y *Drosophila* así como otros organismos "inferiores" para detectar agentes mutagénicos y/o carcinogénicos (Ames y cols,1975), pero a pesar de que estas pruebas han sido altamente satisfactorias, en organismos "superiores" es de gran importancia el desarrollo de sistemas complementarios para la detección de este tipo de agentes particularmente en células de mamífero *in vivo* (Nakanishi y Schneider,1979).

Recientemente, los ICH han sido utilizados para detectar el daño genético en células eucarióticas con una gran sensibilidad (Perry y Evans,1975). Pero, mientras muchos mutágenos y carcinógenos son activos *in vitro*, otros, como la ciclofosfamida, requieren la adición de microsomas hepáticos para su activación metabólica (Stetka y Wolff,1976). Los sistemas *in vivo*, por tanto, ofrecen la capacidad de detectar agentes que requieren sistemas de activación conocidos así como de sistemas potenciadores.

El problema fundamental para el desarrollo de sistemas *in vivo* que permitan el análisis de ICH es la dificultad de suministrar BrdU a los animales de prueba por periodos prolongados. Esto se ha resuelto de diversas formas, como la infusión - continua por vía intraperitoneal o venosa de una solución de BrdU (Schneider y cols,1976); la implantación de tabletas de BrdU simples (Allen y cols,1977) o cubiertas con parafina (Mcfee y -- cols,1983) o agar (King y cols,1982); así como la administración

por vía intraperitoneal de una suspensión de BrdU previamente adsorbida en carbón activado (Morales,1980), una sola inyección de BrdU en agar fundido (Qin y Huang,1984) o una inyección de una suspensión de aceite de cacahuete y IdU (Jian-bin y Bao-xiang,1985).

Igualmente se han descrito muchas variedades de sistemas in vivo para el ICH : embriones de pollo, espermatozonias de ratón, médula ósea de hámster chino, médula ósea de ratón, y --- glándula salival de ratón, entre otros (Morales,1980 y Tice ; y cols,1984). Sin embargo, desde un punto de vista práctico el sistema de médula ósea es el más simple y rápido debido a que la preparación de figuras metafásicas es menos elaborada y el ciclo celular de este sistema es más corto en relación a otros. Por -- ejemplo, mientras que el ciclo celular del sistema de glándula salival dura 35 hrs, el de médula ósea dura tan solo 9 hrs (Morales,1980).

Por otro lado, Kato en 1976 agrupó en tres categorías a los distintos agentes químicos en base a su eficiencia de inducción de ICH y aberraciones cromosómicas (Takehisa,1982):

- 1) El primer grupo, designado como agentes tipo rayos-X abarca a aquellos agentes que presentan efectos de manera similar a los de las radiaciones ionizantes; es decir que el aumento en la frecuencia de ICH es mínimo en comparación con su capacidad - para producir aberraciones cromosómicas. En este grupo se incluyeron entonces: cafeína, 8-etoxicafeína y bleomicina.

- 2) Los agentes del segundo grupo corresponden al tipo UV, capaces de inducir de manera muy eficiente los ICH, aunque también se producen en marcada proporción aberraciones cromosómicas. En este grupo se incluyen la mayoría de los agentes alquilantes.
- 3) En este tercer grupo se sitúan aquellos inhibidores metabólicos como la fluorodesoxiuridina, la hidroxiaurea, timidina en exceso y la cicloheximida; sus daños en el ADN son indirectos.

Se debe puntualizar en el sentido de que la prueba de los ICH es efectiva en detectar los mutágenos del tipo UV y S-dependientes, pero inefectiva para los mutágenos G₂-dependientes bajo ciertas condiciones. Los mutágenos S-dependientes son los agentes que rompen a los cromosomas como los agentes alquilantes, que requieren que la célula pase a través de la fase de síntesis de ADN para manifestar las aberraciones. Los mutágenos G₂-dependientes o S-independientes como la bleomicina inducen rompimientos de cromátidas en células en G₂ o mitosis (Littlefield, 1979). Así, en estos últimos no se observa un incremento en los ICH si son aplicados durante la última vuelta del ciclo celular justo antes de la fijación porque para la formación de los ICH las células necesitan pasar a través de la fase S (Takehisa, 1982).

Por su parte, Nakanishi y Schneider probaron 18 agentes mutagénicos capaces de inducir ICH tanto *in vivo* como *in vitro* - y llegaron a la conclusión de que la Mitomicina-C (MMC) es el inductor más potente en ambos sistemas, 1 mg de MMC por kg de peso indujo aproximadamente 21 ICH por célula, pero tanto este mutágeno como la ciclofosfamida, (otro fuerte inductor de ICH)

producen bajas frecuencias de aberraciones cromosómicas (Nakani-
shi y Schneider, 1979).

1.4. La Vitamina-C y sus Efectos Genotóxicos y Anticancerígenos.

A mediados del siglo XVIII James Lind demostró que el jugo de diferentes cítricos frescos curaban el escorbuto (Stewart y Guthrie, 1953). El principio activo, la forma enólica de la 3-ceto-L-gulofuranlactona, fué entonces llamada ácido ascórbico o vitamina-C (Figura 3) y aislada a finales de 1920 por Albert Szent-Gyorgyi (Szent-Gyorgyi, 1928). Ya a mediados de los años 30's se habían desarrollado diferentes métodos para sintetizarla convirtiéndose muy pronto, en un compuesto ampliamente disponible y a un bajo costo. Poco después se estableció que la sustancia carecía de toxicidad en cualquier dosis utilizada. Sin embargo, en algunos sistemas biológicos se ha observado que la administración de grandes cantidades de vitamina-C origina diferentes efectos genotóxicos en diversos sistemas de prueba (Shamberger, 1984), tal es el caso de las pruebas realizadas por Ames, en las que encontró ligeramente positivo al ácido ascórbico (Ames y cols, 1973). También Stich en 1979 reportó que la vitamina-C en un cierto intervalo de dosis, indujo dano cromosómico en células de mamífero *in vitro*, e *in vivo* la administración de ascorbato en ratones dió como resultado una fragmentación de las células de la mucosa estomacal (Stich y cols, 1979).

También se han encontrado una gran variedad de efectos benéficos de la vitamina-C que la relacionan además del escorbuto y la matriz intercelular, con la eritropoyesis, el potencial óxido-reducción, los nucleótidos cíclicos (que a su vez se rela-

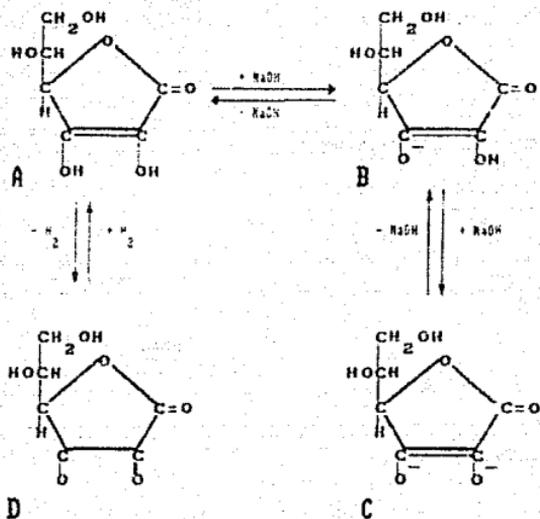


Figura 3: El ácido ascórbico u algunos de sus metabolitos.

A = ácido ascórbico

B = anión ascórbato

C = radical ascórbilo

D = ácido dehidroascórbico

(Shamberger, 1984)

cionan con el balance hormonal) y el sistema inmune, entre otros aspectos (Lewin, 1976). Además, Prasad ha planteado la posibilidad de que el ascorbato pudiese modular el efecto de varios agentes farmacológicos (Prasad y cols, 1979).

Por otro lado, las propiedades antioxidantes que presenta el ácido ascórbico hacen pensar que, al igual que otros agentes antioxidantes, éste también tenga alguna actividad anticancerígena (Cameron y cols, 1979). Al respecto, Cameron, Campbell y Pauling han reportado desde los años 70's el efecto benéfico de dosis altas de ácido ascórbico en neoplasias humanas avanzadas (Cameron y Campbell, 1974 ; y Cameron y Pauling, 1976). Asimismo, se ha mostrado que el ácido ascórbico inhibe de manera preferencial a las células cancerosas *in vitro*, quizás debido a un efecto tóxico o a un efecto anticancerígeno (Bram y cols, 1980).

Recientemente Ghaskadbi y Vadya (1989), encontraron mediante la prueba de micronúcleos en ratones, que el ácido ascórbico es también un efectivo antimutágeno del antiambiano dióxido-hidroxiquinoleína, y que además las dosis antimutagénicas de esta vitamina no causan riesgo alguno sobre el material genético de este sistema. Sin embargo, Gebhart y colaboradores recomiendan que antes de considerar al ácido ascórbico como un agente antimutagénico de uso terapéutico, es necesario no solo elucidar su mecanismo de acción desde el punto de vista molecular, sino también su metabolismo *in vivo* (Gebhart y cols, 1985).

Finalmente, también se ha estudiado el efecto sinérgico antimutagénico de la vitamina-C con otras vitaminas. Tal es el

caso de los estudios realizados por Noto y cols (1989), Gebhart y cols (1985); y Bala y Grover (1989). Noto y cols, al investigar los efectos combinados de las vitaminas K y C en líneas celulares cancerosas de humano, confirmaron el efecto sinérgico de ambas vitaminas en la inhibición del crecimiento tumoral. Por su parte, Bala y Grover utilizando la prueba de Ames, probaron en *Salmonella typhimurium*, la actividad antimutagénica del ácido ascórbico y del ácido cítrico contenidos en el jugo de 10 frutas cítricas, aunque sus resultados hacen pensar que existen dentro de estas frutas cítricas otros factores también con propiedades antimutagénicas. Por otro lado, en los estudios a cargo de Gebhart y cols, tanto la vitamina-C como la vitamina-E mostraron tener un claro efecto anticlastogénico en relación a agentes alquilantes, lo que apoya la posibilidad de una aplicación práctica de protectores naturales en contra de la acción clastogénica, mutagénica y carcinogénica, de los mutágenos químicos.

1.5. La Vitamina-C en Relación a los ICH.

Con respecto a los ICH *in vitro*, Stich reportó en 1976 - que éstos eran inducidos en células de hámster chino expuestas durante 2 a 3 horas a una concentración de 10^{-4} - 10^{-2} M de ácido ascórbico o bisulfito, y que dicho efecto aumentaba para periodos de exposición aún más prolongados (hasta de 24 hr) (Stich y cols, 1976 y 1979). Al igual que Stich, Galloway y Painter realizaron la misma prueba, pero utilizando además linfocitos humanos y una dosis de ascorbato de $0.1 - 10$ mM obteniendo también un incremento en los ICH. Sin embargo, al mismo tiempo encontraron que esta vitamina puede reducir los ICH inducidos por MNNG (N-metil-N'-nitro-N-nitroso-guanidina) (Galloway y Painter, 1979). De esta manera, Stich et al. concluyeron que aunque la naturaleza de las especies activas de las sustancias que inducen los ICH es desconocida, estas evidencias indican que el ácido ascórbico rompe al ADN cuando se producen radicales hidroxilo en presencia de oxígeno, cuya reacción es estimulada por el ión Cu^{2+} (Stich y cols, 1976 y 1979).

En contraste con los resultados *in vitro*, la vitamina-C no dió lugar a la inducción de ICH en la médula ósea de hámster chino en una prueba *in vivo* realizada por Speit et al. en 1980. La dosis de ascorbato probada fué de un rango de 200 a 10 000 mg/kg de peso y administrada tanto oral como intraperitonealmente. Ellos concluyeron al respecto que, en comparación con las células *in vitro*, el organismo de los mamíferos parece estar bien protegido en contra del dano que induce el H_2O_2 y los radicales

con enzimas como la catalasa y la superóxido dismutasa (Speit y cols,1980). Los estudios recientes a cargo de Krishna corroboran los resultados de Speit. En 1986 Krishna, Nath y Ong determinaron que el ácido ascórbico en una dosis máxima de 6.68 g/Kg *in vivo* inhibe en un 39.56% los ICH inducidos previamente con MMC, pero que en condiciones *in vivo/in vitro* la misma dosis de vitamina actuó como un agente co-inductor de ICH y fué tóxico para células de bazo. Dicho fenómeno podría estar relacionado con la selección de las células, las diferencias en la duración de su ciclo celular o la sobresaturación de los mecanismos de reparación en las células en la presencia de excesivas cantidades de ácido ascórbico (Krishna y cols,1986).

HIPOTESIS

2. HIPOTESIS

La vitamina-C tiene un efecto inhibitor de la inducción de ICH, producida por la MMC.

OBJETIVO PRIMARIO

- 2.1. Determinar la frecuencia de ICH en médula ósea de ratones expuestos a MMC en presencia de diferentes dosis de vitamina-C.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- 2.1.1. Determinar si estas dosis de vitamina-C (ácido ascórbico) al ser administradas por vía intraperitoneal, disminuyen o inhiben la frecuencia de ICH inducidos mediante una dosis determinada del mutágeno MMC en médula ósea de ratón.
- 2.1.2. Establecer si las dosis utilizadas de vitamina-C inducen además, alguna modificación sobre la proliferación celular in vivo.
- 2.1.3. Determinar si la vitamina-C y la MMC poseen efectos sinérgicos sobre la frecuencia de ICH in vivo.

MATERIAL Y METODOS

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Material Biológico :

Se utilizaron 40 ratones macho de 20 a 25 g de peso de 5 a 7 semanas de edad, de la cepa NIH (SW), procedentes del bioterio de la Secretaría de Salud Pública ubicado en Tlalpan México, D.F., mismos que se mantuvieron con alimento y agua ad libitum antes y durante el experimento.

3.2. Soluciones Administradas a los Ratones :

3.2.1. Solución de Mitomicina-C, preparada con agua destilada en una dosis de 2.0 mg/Kg de peso, para ser administrada por vía intraperitoneal hasta un volumen máximo de 0.5 ml por ratón.

3.2.2. Solución de ascorbato de sodio preparada con agua destilada en tres dosis: 3.0 g/Kg, 5.0 g/Kg y 7.0 g/Kg, para ser administrada por vía intraperitoneal hasta un volumen máximo de 0.5 ml por ratón.

3.2.3. Tabletas de 5-bromodesoxiuridina de 40 mg, (de una altura de 1.7 mm y de 4.6 mm de diámetro, comprimidas en un punzón de acero de dichas dimensiones, a una presión de 23 Kg/cm² durante 3 seg, en una prensa con manómetro, proporcionada por el Departamento de Farmacia de la E.N.C.B.), recubiertas con parafina (p.f.58-60 C) en un 70% (con el objetivo de controlar la liberación de la tableta dentro del organismo del animal (McFee y cols,1983)), para ser implan-

tadas subcutáneamente en el área abdominal, una en cada ratón.

3.2.4. Solución de colchicina al 0.04% preparada en agua destilada, para administrar una dosis de 5 ug/g de peso por vía intraperitoneal.

3.3. Procedimiento :

Se distribuyeron los ratones en 8 lotes de 5 animales - cada uno, y se les implantó, subcutáneamente en la región abdominal, una tableta de 5-BrdU, recubierta con parafina en un 70%, con el objetivo de marcar diferencialmente las cromátidas hermanas (McFee y cols, 1983).

Los lotes fueron designados de la siguiente manera:

# TRATAMIENTO (LOTE)	SOLUCION A ADMINISTRAR (+ 5-BrdU)
1) TESTIGO (-)	Unicamente con la tableta de 5-BrdU.
2) TESTIGO DE VITAMINA-C	3 g/Kg de Ascorbato de sodio.
3) TESTIGO DE VITAMINA-C	5 g/Kg de Ascorbato de sodio.
4) TESTIGO DE VITAMINA-C	7 g/Kg de Ascorbato de sodio.
5) TESTIGO (+)	2 mg/Kg de Mitomicina-C.
6) TRATADO CON VITAMINA-C	2 mg/Kg de Mitomicina-C + 3 g/Kg de Ascorbato de sodio.
7) TRATADO CON VITAMINA-C	2 mg/Kg de Mitomicina-C + 5 g/Kg de Ascorbato de sodio.
8) TRATADO CON VITAMINA-C	2 mg/Kg de Mitomicina-C + 7 g/Kg de Ascorbato de sodio.

Después de 1 hora de implantadas las tabletas, se procedió a inocular por vía intraperitoneal MMC en dosis de 2.0 mg/Kg de peso de acuerdo a Krishna y cols (1986) a 4 lotes: los 3 lotes tratados con vitamina-C (tratamientos 6,7 y 8) y el testigo positivo de MMC (tratamiento 5).

A las 4 horas de implantadas las tabletas, se administraron las tres dosis de ascorbato de sodio (3.0, 5.0 y 7.0 g/Kg de peso), tanto a los tres lotes tratados con vitamina-C (tratamientos 6,7 y 8) como a los 3 lotes testigos de vitamina-C (tratamientos 2, 3 y 4); siendo el lote restante el testigo negativo (tratamiento 1), únicamente con la tableta de 5-BrDU implantada, como ya se mencionó, al principio del experimento.

Finalmente, a las 21 hrs de haber iniciado el experimento, a todos los ratones se les administró colchicina por vía intraperitoneal en una dosis de 5 ug/g de peso, para que las células en división se detuviesen en metafase y los cromosomas fuesen mejor visualizados. Tres horas después, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, y se extrajo la médula ósea femoral, haciendo pasar a través del hueso, al cortar las epifisis, un mililitro de KCL 0.075M, el cual se recibió con las células, en tubos de centrifuga y se dispersó en 7 ml más de esta solución. Este tratamiento hipotónico se efectuó durante 25 min incubado a 37 °C. Posteriormente, el paquete celular se fijó por dos ocasiones de 20 min cada una, en solución metanol:ácido acético 3:1.

Con esta suspensión celular se realizaron las preparaciones cromosómicas correspondientes por cada ratón, goteando esta suspensión en portaobjetos humedecidos en etanol al 50% y flameando unos segundos las laminillas. Después de uno o dos días se procedió a ténir diferencialmente las células, de acuerdo a la técnica de Goto modificada que se describe a continuación - (Goto y cols, 1975) :

- 1) Se sumergieron las laminillas en una solución de bisbenzimid (Hoechst 33258) a una concentración de 100 ug/ml en agua destilada durante 40 minutos.
- 2) A continuación se lavaron las laminillas con agua destilada y se secaron en el horno a 60 °C durante 15 min.
- 3) Una vez secas, se montaron en solución reguladora de fosfato-citrato, pH 7, con un cubreobjetos, para así ser expuestas, durante 40 min, a luz negra (luz ultravioleta cercana $\lambda = 10^{-7}$ cm) a una distancia de 2 cm.
- 4) Enseguida se enjuagaron con agua destilada y se secaron, durante 15 min., nuevamente en el horno a 60 °C.
- 5) Posteriormente se incubaron en una solución salina-citrato (2 x SSC) a 60 °C durante 20 minutos.
- 6) Finalmente se enjuagaron con agua destilada y se secaron en el horno a 60 °C durante 15 minutos y se téniron con colorante de Giemsa al 4% en solución reguladora de fosfatos pH 6.8.

Figura 4.

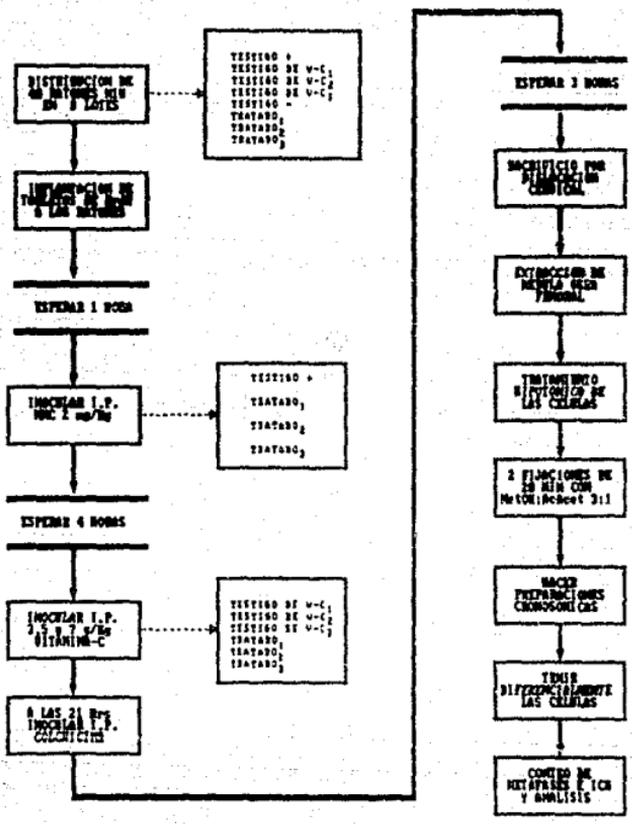


Figura 4 : Diagrama de flujo del procedimiento.

3.4. Análisis.

Por cada ratón se analizaron 25 metafases de segunda división para determinar la frecuencia de ICH, para cuyo tratamiento estadístico se efectuó un análisis de varianza (Prueba F) con $p = 0.05$, y posteriormente la prueba de Tuckey con $p = 0.05$. Se calculó además, el porcentaje de inhibición de ICH (% I) por cada dosis de vitamina-C, utilizando la fórmula :

$$\% I = \frac{\text{No. de ICH por célula en la presencia de V-C}}{\text{No. de ICH por célula en la ausencia de V-C}} \times 100 - 100$$

donde tanto al numerador como al denominador, se les restó el número de ICH /célula espontáneo (Testigo (-)) (Krishna y cols,1986).

A continuación, por cada ratón se obtuvo la proporción de células de primera, segunda y tercera división en las primeras 100 metafases encontradas, y por cada lote de 5 ratones, se calculó el Índice de Replicación (IR), para determinar la duración de la proliferación celular. El IR fué calculado de la siguiente manera :

$$IR = 1M_1 + 2M_2 + 3M_3 / 100$$

donde M_1 , M_2 y M_3 representan los porcentajes de metafases de primera, segunda y tercera división, respectivamente (Krishna y cols,1985) Figura 5. Se consideraron también como M_1 a aquellas células cuyo ADN se replicó antes de la adición de BrdU,

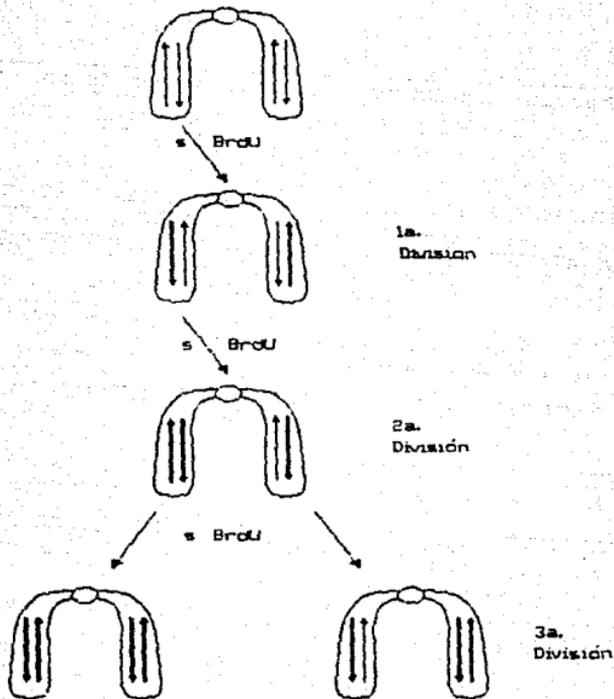


Figura 5 Siluetas de los cromosomas de médula ósea de ratón, representando la tinción de ICH correspondiente a las características de sustitución de BrdU por uno, dos y tres ciclos de división. Las dobles bandas del ADN se representan como flechas, y las cadenas sustituidas con BrdU durante la síntesis de ADN, con una flecha mas oscura (Morales, 1988).

pues por el tipo de tinción no podían ser diferenciadas de las primeras; asimismo, a aquellas que pasaron por 3 o más ciclos celulares se les consideró como M₃.

La proliferación celular se analizó estadísticamente por medio de la prueba de chi cuadrada con $p = 0.05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

En la tabla-1 se presentan los resultados de la frecuencia de ICH en médula ósea de ratón *in vivo*. Como se puede observar, el promedio de ICH, inducidos por MMC (2mg/Kg) en el testigo (+) (9.54 ICH/célula), fué mayor en aproximadamente 3.5 veces que aquel obtenido para el testigo (-) (2.6 ICH/célula). Esto indica que realmente la MMC aumenta considerablemente la frecuencia de los ICH y que, por tanto, el sistema planteado en este trabajo funcionó adecuadamente.

El análisis de varianza (Prueba F) ($P > 0.05$) efectuado (Tabla 2), indicó que no hubo diferencias significativas entre los promedios de ICH de todos los lotes; asimismo los resultados de la prueba de Tuckey (Tabla 3), revelaron que los promedios de ICH de los tres testigos de vitamina-C (2.79, 3.11 y 2.3 ICH/célula) tampoco difieren estadísticamente del testigo (-) o basal (2.6 ICH/célula).

Sin embargo, al comparar los promedios de ICH de los tres lotes tratados con vitamina-C y MMC (5.94, 6.42 y 4.38 ICH/célula) con respecto al del testigo (+) (9.54 ICH/célula), se observó claramente una fuerte y estadísticamente significativa inhibición de la frecuencia de los ICH. Dicha inhibición se cuantificó en un porcentaje de 37.73% ICH/célula para la primera dosis de vitamina-C (3g/Kg) hasta un 54.04% para la dosis más alta (7g/Kg) (Tabla 1).

Con respecto a la cinética de proliferación celular, los resultados de la prueba de chi cuadrada efectuada ($p > 0.05$), se muestran en la tabla 4. La proliferación celular en los testigos

de vitamina-C disminuyó de manera significativa con respecto al testigo (-); mientras que los lotes tratados con vitamina-C y -- MHC mostraron un retraso aún más significativo con respecto a este testigo (-) y mucho mayor con respecto al testigo (+). Esto se corroboró con las diferencias existentes entre los IR de cada lote, e indica que la vitamina-C y la MHC ejercen entre sí un efecto sinérgico retrasando significativamente la proliferación celular de la médula ósea de los ratones tratados.

Tabla 1 : El efecto del ácido ascórbico sobre la frecuencia de los ICH inducidos mediante Mitomicina-C en médula ósea "in vivo"

Tratamiento	*1	Promedios de ICH/célula	Porcentaje de Inhibición
1	Testigo (-)	2.68 +/- 0.50	
2	Testigo de Vitamina-C	2.79 +/- 0.63	
3	Testigo de Vitamina-C	3.11 +/- 0.58	
4	Testigo de Vitamina-C	2.38 +/- 0.17	
5	Testigo (+)	9.54 +/- 0.93	
6	Tratado con Vitamina-C	5.94 +/- 1.09	37.73
7	Tratado con Vitamina-C	6.42 +/- 2.20	32.78
8	Tratado con Vitamina-C	4.38 +/- 1.14	54.84

$$* X \text{ de Inhibición} = \frac{\text{NÚMERO DE I.C.H./CÉLULA EN LA PRESENCIA DE V-C}}{\text{NÚMERO DE I.C.H./CÉLULA EN LA AUSENCIA DE V-C}} \times 100 - 100$$

* 1 Tratamiento :

{ Testigos de Vitamina-C : Ascorbato (1 g/Kg, 3 g/Kg y 7 g/Kg)

{ Tratados con Vitamina-C : (6, 7 u 8) Ascorbato (1 g/Kg, 3 g/Kg y 7 g/Kg) + Mitomicina-C (2 mg/Kg)

Testigo (-) : Solo con BrdU (1)

Testigo (+) : Mitomicina-C (2 mg/Kg) (5)

Tabla 2 : Resultados del analisis de
 varianza (prueba F) con
 p = 0.05 y los datos de
 la tabla-1. (Reyes,1983)

Fuente de variacion Efectos Principales	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	T ² calculada	T ² de tablas
Tratamiento	221.3949	7	31.6278	27.7632	82.3388
Error	804.1768	38	81.1352		
Total	255.5718	37			

Tabla 3 : Resultados de la prueba de Tukey con $p = 0.05$, para los ICH.

— Promedios de ICH (Orden Decreciente) —

T R A T A M I E N T O S

	5	7	6	8	3	2	1	4
	9.54	6.42	5.94	4.38	3.11	2.79	2.60	2.30
4	2.30	7.24	4.12	3.64	2.88	0.81	0.49	0.30
1	2.60	6.94	7.02	3.34	1.78	0.51	0.19	0.00
2	2.79	6.75	3.63	3.15	1.59	0.32	0.00	
3	3.11	6.43	3.31	2.83	1.27	0.00		
8	4.38	5.16	2.04	1.56	0.00			
6	5.94	3.60	0.40	0.00				
7	6.42	3.12	0.00					
5	9.54	0.00						

W = 0.6750 ICH

→ Promedios de ICH (Orden Creciente)

T R A T A M I E N T O S

Las diferencias arriba de la línea gruesa son significativas, en tanto que las diferencias-abajo de dicha línea no son significativas, -- pues sus valores son menores de 0.6750 ICH -- (Reyes, 1983).

T R A T A M I E N T O S :

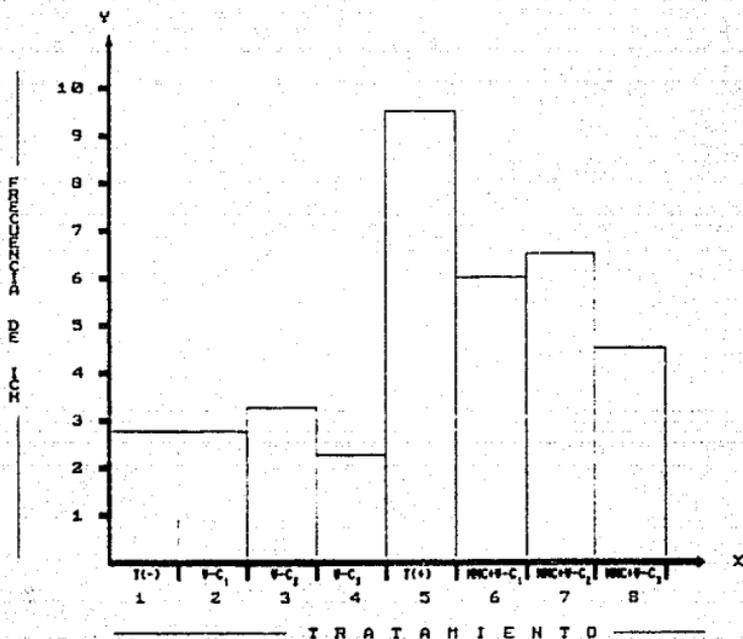
- | | |
|--------------------|------------------------|
| 1) T (-) | 5) T (+) |
| 2) UC ₁ | 6) MHC UC ₁ |
| 3) UC ₁ | 7) MHC UC ₁ |
| 4) UC ₁ | 8) MHC UC ₁ |

Tabla 4 : El efecto del ácido ascórbico sobre la proliferación celular.

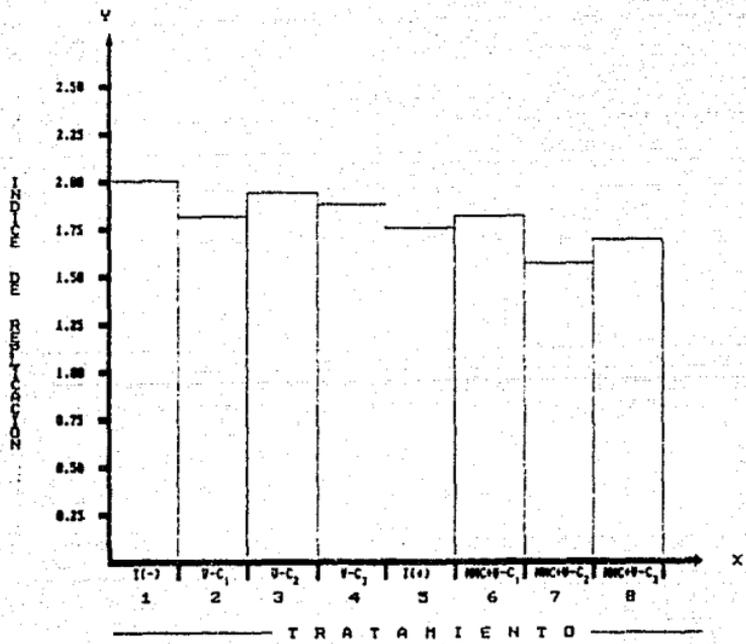
TRATAMIENTO	X De			I.R.
	n ₁	n ₂	n ₃	
TESTIGO (-) U-C1 U-C2 U-C3	28.4 29.2 27.4 27.8	41.6 39.8 48.2 34.4	27.6 17.8 18.4 24.4	2.82 1.86 1.73 1.79
TESTIGO (-) HHC + U-C1 HHC + U-C2 HHC + U-C3	28.4 28.8 27.6 27.8	41.6 44.2 39.8 35.2	27.6 17.4 21.2 21.2	2.82 1.89 1.74 1.73
TESTIGO (+) HHC + U-C1 HHC + U-C2 HHC + U-C3	28.4 27.8 27.4 27.8	41.6 42.2 39.8 35.2	27.6 17.4 21.2 21.2	1.73 1.89 1.74 1.73

* Significativo con la prueba de χ^2 con $p = 0.05$.

Grafica 1 : La frecuencia de ICH en relacion con el tratamiento utilizado.



Grafica 2 : El IR en relacion con el tratamiento utilizado.



DISCUSSION

5. D I S C U S I O N

La vitamina-C inhibió de manera significativa la frecuencia de los ICH inducidos con MMC, en un porcentaje de 37.73% en la primera dosis (3g/Kg) hasta 54.04% en la dosis más alta (7g/Kg) (Tabla 1). Al comparar el testigo (+) de MMC (tratamiento 5), con los lotes tratados con vitamina-C y MMC (tratamientos 6, 7 y 8), se observa claramente este efecto anti-ICH por parte de la vitamina-C (Tabla 3).

Sin embargo, la prueba de Tuckey efectuada con los datos de la prueba F (ambas con $p > 0.05$), indicaron que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia promedio de los ICH de los tratamientos 6 y 7, es decir, entre los lotes tratados con vitamina-C (3 g/Kg y 5 g/Kg) y MMC (2 mg/Kg). Esto indica entonces que, al menos en las condiciones de este experimento, resulta indistinto administrar 3 g/Kg o 5 g/Kg de vitamina-C a aquellos ratones tratados con MMC, pues no cambia el efecto sobre la frecuencia de los ICH con ambas dosis. Sin embargo, al aumentar la dosis de vitamina-C hasta 7 g/Kg (tratamiento 8) el porcentaje de inhibición se eleva hasta un 54.04 % (Tabla 1), y las diferencias entre este lote (tratamiento 8) y los dos anteriores (tratamientos 6 y 7) si son significativas (Tabla 3).

Cabe hacer notar que la vitamina-C disminuye la frecuencia de ICH en un porcentaje considerado como elevado, y que además lo hace sin causar efectos genotóxicos, al menos en las dosis estudiadas en este trabajo, lo que hace interesante saber si estos mismos efectos benéficos continuarán ocurriendo en dosis

superiores, y/o con diferentes dosis de MMC.

Por otro lado, se observa que la vitamina-C por sí misma, en ninguna de las tres dosis estudiadas (tratamientos 2, 3 y 4), aumentó significativamente la frecuencia de ICH con respecto al testigo (-) (niveles basales) (tabla 3). Es decir, que la vitamina-C administrada por vía intraperitoneal, no indujo un aumento significativo de la frecuencia de ICH. Aunque resulta curioso el aumento en el promedio de ICH en la dosis de 5 g/Kg (tratamiento 3) (tabla 1) que además de ser significativamente superior a los ICH de la dosis inmediata (7 g/Kg)(tratamiento 4), extranamente no lo es con respecto a los niveles basales del testigo (-) (tratamiento 1) (tabla 3).

Al respecto, Speit y cols (1980), obtuvieron un resultado similar en la frecuencia de ICH al analizar *in vivo*, con la prueba t de Student ($p < 0.01$), diferentes dosis de vitamina-C en un intervalo de 200 - 10,000 mg/Kg de peso. Estos investigadores obtuvieron un aumento significativo de ICH en solo una de las dosis estudiadas, aunque no especificaron la dosis exacta en la que esto ocurrió.

La vitamina-C en combinación con la MMC (tratamientos 6, 7 y 8), no aumentó de manera significativa la frecuencia de ICH con respecto al testigo (+) (tratamiento 5) (tabla 3), lo cual indica que la vitamina-C en ninguna de las dosis administradas, ejerció un efecto sinérgico con la MMC.

En el ser humano los requerimientos mínimos diarios de ácido ascórbico ascienden a 60 mg/persona (Mirvish, 1986), mientras que para la prevención del escorbuto son tan solo de 45 -- mg/día/persona (Shamberger, 1984); estas dosis son realmente bajas

comparadas a las que se estudiaron en este trabajo. Sin embargo, Cameron y Campbell (1974) demostraron que dosis mucho más elevadas de esta vitamina (45 g/día/persona por vía intravenosa y --- 2.5 g, 4 veces al día por vía oral), durante tiempos prolongados (2 semanas a 2.5 eos), en pacientes con cancer terminal, pueden aumentar la resistencia natural al cancer y sin efectos "tóxicos" significativos.

Los resultados aquí obtenidos se diferencian de los obtenidos por Krishna y cols (1986), quienes obtuvieron un porcentaje menor de inhibición de la frecuencia de ICH, la cual fué analizada con la prueba t de Student ($p > 0.05$). Sin embargo, ellos administraron una dosis mayor de MMC (2.5 mg/Kg) y trabajaron con una cepa diferente de ratones. Además, la secuencia de administración de sustancias y el espacio de tiempo entre ellas fué de manera diferente a la aquí empleada. De acuerdo a De Flora (1988), un agente que aparenta tener ciertos efectos protectores en una situación dada, puede tornarse ineficiente o hasta deletéreo cuando tan solo se modifica el sistema de prueba o se varían las condiciones de prueba, la dosis, la vía de administración, la secuencia a seguir o la combinación ya sea intencional o no, de otros agentes. Esto puede explicar entonces, las diferencias obtenidas en los resultados, con respecto a los de otros investigadores.

Desde 1976 Schneider y cols. plantearon la posibilidad de analizar mediante la técnica de ICH, la duración, y por tanto los cambios del ciclo celular, además del dano que diversos agentes pueden provocar al ADN (Schneider y cols, 1976). De acuerdo al mismo Schneider, aquellas células que se han replicado en

presencia de BrdU, una, dos, tres o más veces pueden ser identificadas sin equivocación (Schneider y cols, 1977). De hecho se ha comprobado que la MMC inhibe la replicación celular, lo que se demuestra al disminuir ésta, las frecuencias de células de tercera división *in vivo* e *in vitro* (Kram y cols, 1979).

Con respecto a la vitamina-C, Price desde 1966 observó que la adición de ascorbato aumenta la síntesis de ARN en el núcleo de trigo, lo cual apoya el hecho de que el ascorbato participa en la actividad del núcleo, tanto en la actividad mitótica como en la transcripción (Lewin, 1976). Actualmente, las observaciones de Liso y cols (1984) indican que el ácido ascórbico está involucrado en el control de la división celular y que es requerido para algunos pasos de G₁ y G₂, anterior y posterior respectivamente, a la replicación del ADN. Es decir, que es ampliamente utilizado en la interfase durante la síntesis de macromoléculas.

En este trabajo se encontró que la vitamina-C por sí sola modifica la proliferación celular, pues se nota un retraso con las dosis más bajas (3 g/Kg y 5 g/Kg), mismo que se evidencia por una acumulación de células en segunda división (M₂) que no pasan a ser de tercera división (M₃) o más (Tabla 4). Asimismo, en la tercera dosis (7 g/Kg) aunque no hubo una diferencia estadísticamente significativa con la prueba de chi cuadrada, con respecto al testigo (-), la progresión de las metafases hace notar también un retraso, pues se observan más células en primera división, y repartido el resto en segundas y terceras. Todo esto se corrobora con la disminución del IR del testigo (-), con respecto a estos tres lotes testigos de vitamina-C (tabla 4).

Por otro lado, al comparar el testigo (-) con los tratados con vitamina-C y MMC (Tabla 4), se observa que hay una diferencia significativa entre ellos y que el IR de este testigo (-) es mayor que el de los tres lotes tratados con vitamina-C y MMC. Se observa también un retraso en la proliferación celular, el cual se hace más obvio en las dosis mayores (5 g/Kg y 7 g/Kg). Igualmente, al comparar al testigo (+) con los tres lotes tratados con vitamina-C y MMC (tabla 4), la falta de significancia estadística con la primera dosis indica que la vitamina-C junto con la MMC disminuyen la proliferación celular tanto como el mutágeno solo, pues el número de células de primera, segunda y tercera división son casi iguales en ambos lotes.

Finalmente, a dosis mayores de vitamina-C, este efecto sinérgico entre la Vitamina-C y la MMC se hace más pronunciado, pues además de existir una diferencia significativa con respecto al testigo (+), hay una gran acumulación de células en primera división, y el IR del testigo (+) es menor que el de los tres lotes tratados con vitamina-C y MMC (tabla 4).

Esto es indicativo de una depresión de la proliferación celular, que suponemos es consecuencia del efecto genoprotector ejercido por esta vitamina, pues no se puede establecer que el ascorbato es genotóxico, ya que disminuye de manera significativa la frecuencia de los ICH. Esto se contrapone con los resultados obtenidos por Krishna y cols. (1986) ($p > 0.01$), en donde no hubo cambios significativos en el ciclo celular. Tal vez debido a que en su experimento, los animales solo estuvieron en contacto con las sustancias químicas (MMC y ascorbato) por un espacio de 8 hrs (desde su administración hasta el sacrificio), y no las 23

hrs de este trabajo; además de haber sido administradas juntas. Por tanto, quizás el ascorbato, al haber sido administrado después del mutágeno, efectuó una acción protectora en contra de la MMC, y no una acción preventiva como en el caso del experimento de Krishna et al, lo cual repercutió en el comportamiento celular, sin por ello ser genotóxico.

De hecho, estudios recientes de mutagenicidad del ácido ascórbico han revelado que éste no es genotóxico en cobayos, aún en niveles superiores a los de saturación de tejidos por ingestión diaria (5 g/Kg) (Norkus y cols,1983). Además se ha visto que una alta ingestión de ácido ascórbico en la dieta reduce los efectos mutagénicos del dicromato de potasio y su influencia tóxica en las enzimas metabolizantes hepáticas. Dicho efecto protector consiste probablemente en la reducción del Cr^{VI} a Cr^{III}, menos mutagénico (Ginter y cols,1989).

Aunque también, cabe mencionar que se ha mostrado que el ácido ascórbico es genotóxico en ciertos sistemas de prueba bacterianos, así como en diversos sistemas de prueba *in vitro* (Shamberger,1984). Estos efectos se han explicado por la oxidación intracelular que sostiene el ácido ascórbico (AA) para transformarse en ácido dehidroascórbico (DHA) con la formación de H₂O₂, de acuerdo a la siguiente reacción :



De hecho, el H₂O₂ y otros agentes que lo producen, inducen alteraciones inactivantes del ADN capaces de bloquear su replicación y afectar a los cromosomas, aún en tumores ascíticos (Liotti y cols,1986). Sin embargo, como se ha visto, dichas propiedades

genotóxicas del ácido ascórbico no han podido ser totalmente --- confirmadas en pruebas con mamíferos *in vivo*, pues se ha propuesto que pueden ser suprimidas en la presencia de enzimas como la catalasa y la superóxido dismutasa (Morgan y cols,1976; Galloway y Painter,1979; y Rosin y cols,1980). Además, se ha visto que la transformación de las células neoplásicas está siempre acompañada de la disminución en la actividad de la catalasa (Bartkowiak y Bartkowiack,1981; y Salansky y cols,1981).

Hasta el momento se han propuesto una gran variedad de mecanismos por medio de los cuales la vitamina-C resulta ser antimutagénico, anticlastogénico, anticarcinogénico y anti-ICH, de acuerdo al tipo de agentes, células y sistemas en los que se experimenta, (Cameron y cols,1979; Speit y cols,1980; Shamberger,1984; Weitberg y Weitzman,1985; Marshall y Rauth,1986; Bartsch y cols,1988; De Flora y Ramel,1988; y Simic,1988) y pueden ser entonces, clasificados en varias categorías o subcategorías dependiendo del paso en el que actúan en los procesos de carcinogénesis o mutagénesis, o en los patrones de modulación de los dispositivos de defensa del sujeto (De Flora,1988). Sin embargo, para el caso de la MMC, que fué el mutágeno utilizado en este trabajo, se sabe que interactúa con los cromosomas por un ataque electrofílico en los sitios nucleofílicos del ADN . Es posible entonces, que el L-ascorbato, que es la forma que predomina en el pH fisiológico, y que según Edgar (1974) posee cierto carácter nucleofílico, actúe quizás como protector de dicho ataque interceptando este agente mutagénico (Liehr y cols,1983).

Asimismo, recientemente se estudió el efecto del ácido ascórbico durante los procesos gestacionales, en donde resultó no

ser genotóxico aún en las llamadas megadosis, y pareció proteger a embriones de ratón en contra del dano inducido por el genotóxico ciclofosfamida (Vogel y Spielmann, 1989).

Por tanto, la vitamina-C parece ser más benéfica que tóxica en mamíferos (Liotti y cols, 1984; y Dunham y cols, 1982) incluyendo al hombre, tanto que se han utilizado grandes dosis en pacientes con cancer terminal con resultados satisfactorios en cuanto a la regresión del tumor (Cameron y Campbell, 1974). Esto sugiere que esta vitamina debería ser empleada como una medida estándar de reforzamiento de los métodos de tratamiento establecidos para el cáncer (Cameron y Pauling, 1974). Es por ello, que el National Research Council de los E.E.U.U. ha concluido que adecuadas cantidades de vitamina-C así como de beta-caroteno en la dieta, reducen el riesgo al cancer (Hayatsu y cols, 1988); aunque la vitamina-C como tal no es recomendada por Mirvish, como un tratamiento muy eficaz del cancer, pero si de utilidad para esta enfermedad al ser ingerida en frutas y vegetales frescos que la contengan (Mirvish, 1986).

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- 6.1. Las tres dosis utilizadas de vitamina-C (3 g/Kg, 5 g/Kg y 7 g/Kg) que fueron administradas por vía intraperitoneal disminuyeron de un 37.73% hasta un 54.04% la frecuencia de los ICH, en médula ósea de ratón, inducidos previamente con el mutágeno MMC en una dosis de 2 mg/Kg.
- 6.2. La vitamina-C por sí misma, no indujo un aumento significativo en la frecuencia de ICH en médula ósea de ratón in vivo, en ninguna de las tres dosis administradas.
- 6.3. La vitamina-C por sí misma indujo un retraso estadísticamente significativo sobre la proliferación celular, y aún más al estar en combinación con la MMC, sin embargo, dicho comportamiento quizás sea un reflejo de la acción genoprotectora, más que genotóxica.
- 6.4. Existe un efecto sinérgico entre la Vitamina-C y la MMC sobre la proliferación celular, in vivo.
- 6.5. La vitamina-C y la mitomicina-C no poseen efectos sinérgicos significativos, en las dosis utilizadas, sobre la frecuencia de ICH en médula ósea de ratón in vivo.

R E F E R E N C I A S

7. R E F E R E N C I A S

- Allen, J.W., C.F. Shuler, R.W. Mendes y S.A. Latt. A Simplified Technique for in vivo Analysis of Sister Chromatid Exchanges Using 5-bromodeoxyuridine Tablets. *Cytogenet. Cell Genet.* 18:231-237, 1977.
- Ames, B., W. Durston, E. Yamasaki y P. Lee. Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 70: 2281-2285, 1973.
- Ames, B.N., J. McCann y E. Yamasaki. Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.* 31: 347-364, 1975.
- Bala, S. e I.S. Grover. Antimutagenicity of some citrus Fruits in *Salmonella Typhimurium*. *Mutation Res.* 222:141-148, 1989.
- Bartkowiak, A. y J. Bartkowiak. Superoxide Dismutase and Catalase Activities in Normal and Cancerous Tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 70 B : 819-820, 1981.
- Bartsch, H., H. Ohshima y B. Pignatelli. Inhibitors of Endogenous Nitrosation. Mechanisms and Implications in Human Cancer Prevention. *Mutation Res.* 202: 307-324, 1988.
- Bender, M.A., H.G. Griggs y J.P. Bedford. Recombination DNA Repair and Sister Chromatid Exchanges. *Mutation Res.* 24:117-123, 1974.
- Bram, S., et al. Vitamin-C Preferential Toxicity for Malignant Melanoma Cells. *Nature* 284:629-631, 1980.
- Burkhalter, G.D. An Investigation of the Mechanism of the Reciprocal Differential Staining of BrdU-substituted and Unsubstituted Chromosome Regions. *Exp. Cell Res.* 121: 209-219, 1979.
- Cameron, E. y L. Pauling. The Orthomolecular Treatment of Cancer. I. The Role of Ascorbic Acid in Host Resistance. *Chem. Biol. Interact.* 9:273-283, 1974.
- Cameron, E. y A. Campbell. The Orthomolecular Treatment of Cancer. II. Clinical Trial of High-dose Ascorbic Acid Supplements in Advanced Human Cancer. *Chem. Biol. Interact.* 9:285-315, 1974.
- Cameron, E., L. Pauling y B. Leibovitz. Ascorbic Acid and Cancer: A Review. *Cancer Res.* 39: 663-681, 1979.

- Cameron, E. y L. Pauling. Supplemental Ascorbate in the Supportive Treatment of Cancer: Prolongation of Survival Times in Terminal Human Cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73: 3685-3689, 1976.
- Carrano, A.V. y L.H. Thompson. Sister Chromatid Exchange and Single Gen Mutation en Sister Chromatid Exchange John Wiley and Sons, New York, 1982, pp. 59-86.
- Chaganty, R.S.K., S. Sconberg y J. German. A Manyfold Increase in Sister Chromatid Exchanges in Bloom's Syndrome Lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 71: 4508-4512, 1974.
- De Flora, S. Problems and Prospects in Antimutagenesis and Anticarcinogenesis. Mutation Res. 202: 279-283, 1988.
- De Flora, S. y C. Ramel. Mechanisms of Inhibitors of Mutagenesis and Carcinogenesis. Classification and Overview. Mutation Res. 202: 285-306, 1988.
- Dunham, W.B., et al. Effects of Intake of L-ascorbic acid on the Incidence of Dermal Neoplasms Induced in Mice by Ultraviolet Light. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 79 : 7532-7536, 1982.
- Edgar, T.A. Ascorbic acid and biological alkylating agents. Nature (Lond.). 248: 136-137, 1974.
- Galloway, S.M. y R.B. Painter. Vitamin-C is Positive in the DNA Synthesis Inhibition and Sister Chromatid Exchange Tests. Mutation Res. 60 : 321- 327, 1979.
- Gebhart, E., H. Wagner, K. Grziwok y H. Behnsen. The Action of Anticlastogens in human Lymphocyte Cultures and their Modification by Rat-liver S9 Mix. Mutation Res. 149: 83-94, 1985.
- Ghaskadbi, S. y V.G. Vaida. In Vivo Antimutagenic Effect of Ascorbic Acid Against Mutagenicity of the Common Antiamebic Drug Dihydroxyquinoline. Mutation Res. 222: 219-222, 1989.
- Ginter, E., D. Chorvatovicova y A. Kosinova. Vitamin-C Lowers Mutagenic and Toxic Effects of Hexavalent Chromium in Guinea Pigs. Internat. J. Nutr. Res. 59: 161-166, 1988.
- Goto, K., T. Akematsu, H. Shimazu y T. Sugiyama. 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.
- Hayatsu, H., S. Arimoto y T. Negishi. Dietary Inhibitors of Mutagenesis. Mutation Res. 202: 429-446, 1988.
- Ishii, Y y M.A. Bender. Factors Influencing the Frequency of Mytomycin C induced SCE in 5-BrdU substituted Human Lymphocytes in Culture. Mutation Res. 51: 411-422, 1978.

- Jian-bin, L. y O.Bao-xiang. An Improved Method for the Analysis of Sister Chromatid Exchange in vivo. Mutation Res. 144 : 243-245,1985.
- Kato,H. Induction of SCE by Chemical Mutagens and Its Possible Relevance of DNA Repair. Exp.Cell Res.85: 239-247,1974.
- King, M.T., D.Wild, E. Gocke y K. Eckhardt. 5-BrdU Tablets with Improved Depot Effect for Analysis in vivo of Sister Chromatid Exchanges in Bone Marrow and Spermatogonial Cells. Mutation Res. 97: 117-129,1982.
- Kram, D., E.L. Schneider, G.C.Senula y Y.Nakanishi. Spontaneous and Mitomycin -C Induced Sister Chromatid Exchanges. Comparison of in vivo Systems. Mutation Res. 60 : 339-347,1979.
- Krishna, G., J. Nath y T.Ong. Inhibition of Cyclophosphamide and Mitomycin C- induced Sister Chromatid Exchanges in Mice by Vitamin C. Cancer Res. 46 : 2670-2674, 1986.
- Latt,S.A. Microfluorometric Detection of DNA Replication in Human Metaphase Chromosomes. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 70: 3395-3399,1973.
- Latt,S.A. Sister Chromatid Exchange Indices of Human Chromosome Damage and Repair Detection by Fluorescence and Induction by Mitomycin C. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 71: 3162-3166,1974.
- Latt,S.A., et al. Sister Chromatid Exchange :A Report of the Gene Tox Program. Mutation Res. 87: 17-62,1981.
- Lewin,S. Vitamin-C :Its Molecular Biology and Medical Potential, Academic Press Inc., New York,1976.
- Liehr,J.G. y W.J.Wheeler. Inhibition of Estrogen-induced renal carcinoma in Syrian Hamsters by Vitamin-C. Cancer Res.43:4638-4642,1983.
- Liotti, F.S., M.Bodo, F.Pezzetti, P.Guerrieri y A.R.Menghini. Inhibition of the Binding of 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene to DNA by Ascorbic Acid, Reduced Glutathione and Cysteine in Chick Embryo Cells Cultured in vitro. Oncology 43: 183-186, 1986.
- Liotti, F.S., A.R.Menghini, P.Guerrieri, V.Talesa y M.Bodo. Effects of Ascorbic Acid on the Multiplication of Tumor Ascites Cells in vitro. J.Cancer Res.Clin.Oncol.108:230-232,1984.
- Liso,R. G. Calabrese, M.B.Bitonti y O.Arrigoni. Relationship Between Ascorbic Acid and Cell Division. Exp.Cell Res. 150:314-320,1984.

- Littlefield, L.G., S.P. Colyer, A.M. Sayer y R.J. DuFrain. Sister Chromatid Exchanges in Human Lymphocytes Exposed During Go to Four Classes of DNA-damaging Chemicals. Mutation Res. 67: 259-269, 1979.
- Margison, G.P. y P. Kleihues. Chemical Carcinogenesis in the Nervous System: Preferential Accumulation of O6methylguanine in Rat Brain DNA During Repetitive Administration of N-Methyl-nitrosourea. Biochem. J. 148:521-525, 1975.
- Marshall, R.S. y M.A. Rauth. Modification of the Cytotoxic Activity of Mitomycin C by Oxygen and Ascorbic Acid in Chinese Hamster Ovary Cells and a repair-deficient Mutant. Cancer Res. 46: 2709-2713, 1986.
- McClintock, B. The Production of Homozygous Deficient Tissues with Mutant Characteristics by Means of the Aberrant Mitotic Behaviour of Ring-shaped Chromosomes. Genetics, 23:315-376, 1938
- McFee, A.F., K.W. Lowe y J.R. San Sebastian. Improved Sister Chromatid Differentiation Using Paraffin-coated Bromodeoxyuridine Tablets in Mice. Mutation Res. 119: 83-88, 1983.
- Mirvish, S.S. Effects of Vitamins C and E on N-nitroso Compound Formation, Carcinogenesis, and Cancer. Cancer 58:1842-1850, 1986.
- Morales R., P. Analysis In Vivo of Sister Chromatid Exchange in Mouse Bone Marrow and Salivary Gland Cells. Mutation Res. 74: 61-69, 1980.
- Morales R., P. El Dano a la Información Genética y los Inter-cambios Entre Cromátides Hermanas. Ciencia y Desarrollo XIV, 81: 65-72, 1988.
- Morgan, R.A., R.L. Cone y T.M. Elgert. The Mechanism of DNA Strand Breakage by Vitamin-C and Superoxide and the Protective Roles of Catalase and Superoxide Dismutase. Nucl. Ac. Res. 3:1139-1149, 1976.
- Nakanishi Y. y E.L. Schneider. In Vivo Sister-chromatid Exchange: A Sensitive Measure of DNA Damage. Mutation Res. 60: 129-137, 1979.
- Norkus, E.P., W. Kuenzig y A.H. Conney. Studies on the Mutagenic Activity of Ascorbic Acid in vitro and in vivo. Mutation Res. 117: 183-191, 1983.
- Noto, V., et al. Effects of Sodium Ascorbate (Vitamin C) and 2-Methyl-1,4-Naphtoquinone (Vitamin K3) Treatment on Human Tumor Cell Growth In Vitro. Cancer 63: 901-906, 1989.
- Painter, R.B. A Replication Model for Sister Chromatid Exchange. Mutation Res. 70: 337-341, 1980.

COPIA DESTROYED BY THE
 STATE OF CALIFORNIA

- Perry, P. y H.J. Evans. Cytological Detection of Mutagenic Carcinogen Exposure by SCE. *Nature* 258:121-124, 1975.
- Perry, P. y S. Wolff. New Giemsa Method for Differential Staining of Sister Chromatids. *Nature* 261:156-158, 1974.
- Prasad, K.N., P.K.Sinha, M.Ramanujam y A.Sakamoto. Sodium Ascorbate Potentiates the Growth Inhibitory Effect of Certain Agents on Neuroblastoma Cells in Culture. *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A.* 76: 829-832, 1979.
- Qin, S. y C.C.Huang. A New Method for Sister-chromatid Exchange Studies In Vivo, a Single Injection of BrdU in Melted Agar. *Mutation Res.* 142: 189-193, 1984.
- Reyes Castaneda, P. *Biostatística Aplicada*. Edit. Trillas Méx. 1983, p.104-114; 181-185.
- Rosin, M.P., R.H.C. Sam y H.F. Stich. Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures. *Cancer Lett.* 8: 299-305, 1980.
- Salansky, V., R.S. Rena y T.J. Slaga. Diminution of Mouse Epidermal Superoxide Dismutase and Catalase Activities by Tumor Promoters. *Carcinogenesis* 2:1141-1146, 1981.
- Schneider, E.L., J.R.Chaillet y R.R.Tice. In Vivo BrdU Labeling of Mammalian Chromosomes. *Exp. Cell Res.* 100:396-399, 1976.
- Schneider, E.L., H. Steinberg y R.R.Tice. In vivo Analysis of Cellular Replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 74: 2041-2044, 1977.
- Shamberger, R.J. Genetic Toxicology of Ascorbic Acid. *Mutation Res.* 133: 135-159, 1984.
- Simic, M.G. Mechanisms of Inhibition of Free-radical Processes in Mutagenesis and Carcinogenesis. *Mutation Res.* 202:377-386, 1988.
- Speit, G., H. Wolff y W.Vogel. The SCE-inducing Capacity of Vitamin C: Investigations In Vitro and In Vivo. *Mutation Res.* 78: 273-278, 1980.
- Stetka, D.G. y A.V.Carrano. The Interaction of Hoechst 33258 and BrdU substituted DNA in the Formation of Sister Chromatid Exchanges. *Chromosoma* 31:21-31, 1977.
- Stetka, D.G. y S.Wolff. Sister Chromatid Exchange as an Assay for Genetic Damage Induced by Mutagen-carcinogens. I.-II. In vivo, in vitro Test for Compounds requiring Metabolic Activation. *Mutation Res.* 41:333-350, 1976.

- Stewart, C.P. y D. Gunthrie (eds.). A Treatise of the Scurvy, by S. Lewin. Edinburg : Sands, Murray and Cochrane, 1753. Reprinted by Edinburg University Press, 1953.
- Stich, H.F., J. Karim, J. Koropatnick y L. Lo. Mutagenic Action of Ascorbic Acid. Nature (London). 260:722-724, 1976.
- Stich, H.F., L. Wei y R.F. Whiting. The Enhancing effect of Transition Metals on the Chromosome-damaging Action of Ascorbate. Cancer Res. 39: 4145-4151, 1979.
- Szent-Gyorgyi, A. Observations of the Functions of Peroxidase Systems and the Chemistry of the Adrenal Cortex. Biochem. J. 22:1387-1409, 1928.
- Takehisa, S. Induction of Sister Chromatid Exchanges by Chemical Agents, en Sister Chromatid Exchange John Wiley and Sons, New York, 1982, pp.87-149.
- Taylor, J.H. Sister Chromatid Exchange in Tritium-labeled Chromosomes. Genetics 43: 515-529, 1958.
- Tice, R.R., y A. Hollander, eds. Sister Chromatid Exchanges: 25 Years of Experimental Research. Part A: The Nature of SCEs. New York, London : Plenum Press, 1984.
- Tice, R.R., et al. A Review of The International Symposium on Sister Chromatid Exchanges: Twenty Five Years of Experimental Research. Environ. Mut. 6: 737-752, 1984.
- Vogel, R. y H. Spielmann. Beneficial Effects of Ascorbic Acid on Preimplantation Mouse Embryos After Exposure to Cyclophosphamide In Vivo. Terat. Carcin. Mutagen. 9:51-59, 1989.
- Weitberg, A. B. y S.A. Weitzman. The Effect of Vitamin C on Oxygen Radical-induced Sister-chromatid Exchanges. Mutation Res. 144: 23-26, 1985.
- Wolff, S. Chromosome Aberrations, Sister Chromatid Exchanges and the Lesions that Produce Them en Sister Chromatid Exchange. John Wiley & Sons, New York, 1982, pp 43-86.