



25
24

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

"Efecto Anticlastogénico de la Clorofilina en
Contra del Nitrito de Sodio Evaluado
en Ratones CEPA NIH"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
María del Carmen Alejandra Hernández Ceruelos

Directora: M en C. Sandra Díaz Barriga Arceo

Codirector: Dr. Eduardo Madrigal Bujaldar

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR U. N. A. M.
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIO

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicarle a usted que revisamos la TESIS TITULADA:
Efecto anticlastogénico de la clorofilina en contra
del nitrito de sodio evaluado en ratones cepa NIII.

que presenta 1a María del Carmen Alejandra Hernández Ceruelos
con número de cuenta: 8705088-2 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga ; en colaboración con :

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 15 de marzo de 1996

PRESIDENTE Q.F.B. Idalia Avila Miyazawa [Firma]
VOCAL M.en C. Luisa Martínez Aguilar [Firma]
SECRETARIO M.en C. Sandra Díaz Barriga Arceo [Firma]
PRIMER SUPLENTE Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez [Firma]
SEGUNDO SUPLENTE M.en C. Victor M. Zendejas Buitrón [Firma]

DEDICATORIAS

DEDICATORIAS

A mis padres, por todo el amor, cariño, consejos, ejemplos, apoyo y todos los mágicos momentos, las más infinitas gracias a ustedes por haberme formado como mujer, profesionalista y ser humano.

A mi hermano, por lo momentos compartidos.

A Bety, gracias ratona por escucharme, comprenderme y apoyarme, gracias hermana.

A la Maestra Sandra mi directora de tesis, gracias por permitirme encontrar mi camino, por ayudarme a descubrir y desarrollar mis habilidades, por ser mi guía, amiga y compañera.

Al Dr. Madrigal, gracias por los consejos y la oportunidad de trabajar y conocer el maravilloso mundo de la genotoxicología.

A todos mis profesores, que me dieron una sólida formación académica, haciendo realidad mi sueño de ser profesionalista.

A los sinodales por la atención y consejos brindados a este trabajo.

A todos mis amigos, al grupo del laboratorio de Genética, de la magnífica generación 17° de Q.F.B. y a todas las personas que me han permitido crecer cada día más.

Sobre todo gracias Dios por todas las bendiciones dadas, nunca me dejes de tu mano.

INDICE

RESUMEN.	
INTRODUCCION.....	1
HIPOTEIS.....	4
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS PARTICULARES.....	5
MARCO TEORICO	
1.MATERIAL GENETICO.....	6
2.MUTAGENESIS.....	11
2.A PRUEBAS DE MUTAGENESIS EN BACTERIAS.....	14
2.B PRUEBAS DE MUTAGENESIS EN HONGOS.....	15
2.C PRUEBAS CON CELULAS EN CULTIVO.....	16
2.D PRUEBAS DE MUTAGENESIS IN VIVO.....	18
3. PRUEBA DE MICRONUCLEOS.....	20
3.A ERITROPOYESIS.....	24
3.B ERITROCITOS POLICROMATICOS.....	28
3.C INCLUSIONES ERITROCITARIAS.....	29
3.D PRUEBA DE MICRONUCLEOS EN RATON.....	31
4.AGENTES ALQUILANTES.....	34
5.NITRITO DE SODIO Y NITROCOMPUESTOS.....	40
6.CLOROFILINA Y AGENTES ANTIOXIDANTES.....	49
MATERIAL Y METODO	
MATERIAL.....	55
METODO EXPERIMENTAL.....	57
RESULTADOS.....	62

DISCUSION.....	75
CONCLUSIONES.....	81
ABREVIATURAS.....	82
GLOSARIO.....	83
BIBLIOGRAFIA.....	85

INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRAFICAS.

FIGURA 1. FORMACION DE MICRONUCLEOS.....	23
FIGURA 2. PROCESO ERITROPOYETICO.....	27
FIGURA 3. MECANISMO DE ALQUILACION.....	37
FIGURA 4. CONTENIDO EN ALIMENTOS DE NITRATOS Y NITRITOS.....	42
FIGURA 5. RUTAS METABOLICAS DEL NITRATO Y NITRITO.....	44
FIGURA 6. ESTRUCTURA DE LAS NITROSAMINAS.....	48
FIGURA 7. ESTRUCTURA DE LAS NITROSOUREAS.....	48
FIGURA 8. ESTRUCTURA DE LA CLOROFILA.....	51
FIGURA 8. ESTRUCTURA DE LA CLOROFILINA.....	51
DIAGRAMA DE FLUJO.....	61
TABLA 1. PROMEDIO DE PESOS POR LOTE.....	62
GRAFICA 2. PROMEDIO DE PESOS POR LOTE.....	63
TABLA 2. PROMEDIOS DE LA RELACION EPC/ENC.....	64
GRAFICA 2. PROMEDIOS DE LA RELACION EPC/ENC.....	65
TABLA 3. RESULTADOS DE LA RELACION EPC/ENC POR ANIMAL.....	66
TABLA 4. RESULTADOS DE LA FRECUENCIA DE EPCMN POR LOTE.....	68
GRAFICA 3. RESULTADOS PROMEDIO DE LA FRECUENCIA DE EPCMN POR LOTE.....	70
GRAFICA 4. RESULTADOS DE LA FRECUENCIA DE EPCMN PARA LOS LOTES TESTIGO, METILUREA Y LA MEZCLA DE ESTA CON NITRITO.....	71
GRAFICA 5. RESULTADOS DE LA FRECUENCIA DE EPCMN PARA EL LOTE TESTIGO Y DE NITRITO A LAS TRES DOSIS MANEJADAS.....	72
GRAFICA 6. RESULTADOS DE LA FRECUENCIA DE EPCMN PARA LOS LOTES DE NITRITO Y SUS CONTRAPARTES ADMINISTRADAS CON CLOROFILINA.....	73
TABLA 5. RESULTADOS POR RATON DE LA FRECUENCIA DE EPCMN.....	74

RESUME

RESUMEN

Con la presente investigación, se evaluó el efecto anticlastogénico de la clorofilina en contra del nitrito de sodio *per se*, y por otra parte observar si el efecto del nitrito se veía incrementado en combinación con la metilurea, en el supuesto que en combinación con esta última el efecto se potenciaría. La técnica de evaluación seleccionada fue la de micronúcleos, y los sujetos de experimentación ratones de la cepa NIH; 60 animales fueron pesados, marcados y divididos en 10 lotes. Se les tomó una muestra de sangre periférica con la cual se realizó un frotis, se procedió a administrar las sustancias de estudio por vía oral con excepción de la clorofilina la cual se administró vía intraperitoneal en los lotes seleccionados; las administraciones se realizaron cada 24 horas por 3 días, al cuarto día se tomó la muestra de sangre nuevamente. Las laminillas fueron fijadas, teñidas y analizadas en el microscopio, cuantificando la cantidad de EPC en 1000 eritrocitos, y posteriormente en 1000 EPC se determinaron la cantidad de micronúcleos. De acuerdo con los resultados, el nitrito de sodio presenta un poder clastogénico considerable, sin que éste sea dependiente de la dosis, pero esta clastogenicidad no se vio potenciada cuando se combinó con metilurea. Por otra parte la clorofilina mostró el efecto esperado, pues la tasa de MN disminuyó en los lotes administrados con este compuesto y nitrito, por lo que se puede concluir que la clorofilina actuó como un eficiente anticlastógeno.

INTRODUCCION

INTRODUCCION

La presente investigación tuvo como principal objetivo evaluar el efecto anticlastogénico de la clorofilina sobre los efectos del compuesto químico denominado nitrito de sodio y el efecto que este tiene en combinación con metilurea. La combinación de ambos compuestos puede ocasionar una reacción de nitrosación in vivo. El producto formado a partir de esta reacción química es la metilnitrosourea, que es un compuesto de la familia de las nitrosaminas, algunas de las cuales presentan actividad carcinógena; éstas pueden ser activadas en solución acuosa y no requieren de activación enzimática; este tipo de sustancias producen generalmente cáncer estomacal y cerebral (Hodgson 1988).

El uso de los nitritos en la industria de cárnicos y embutidos es ampliamente conocido, sin contar con que ellos están presentes en una gran variedad de alimentos, su principal uso es como preservativo pues es un buen agente contra el desarrollo bacteriano. Se consideró a la metilurea para realizar el presente estudio, porque es una sustancia que podría considerarse como prototipo de todas aquellas con las cuales es posible que el nitrito de sodio pueda producir una nitrosación, incluso cuando puede ser inhibida por la presencia de agentes antioxidantes, como la vitamina C y vitamina E.

La técnica que se utilizó para la evaluación del efecto mutagénico de las sustancias involucradas fue la denominada Micronúcleos (MN), esta prueba fue descrita por Bolter y Schmid (1970), y se basa en la frecuencia de MN en diversos tipos de células tales como eritroblastos, eritrocitos, y espermatogonias, es usada

para la detección de agentes clastógenos in vivo, así como aquellos que afectan la distribución mitótica de los cromosomas.

Un micronúcleo es un fragmento de cromatina separado del total del núcleo de células eucariotas, tales micronúcleos se generan a partir de la fragmentación de cromosomas acéntricos o bien se deben a cromosomas de cromátide completo que no se incorpora a una célula hija durante la división celular mitótica.

El ensayo realizado durante la investigación fue de tipo agudo, es decir, se realizó la inducción dentro de un lapso de tiempo relativamente corto con el fin de que el efecto mutagénico se observará sin necesidad de realizar una administración larga de los reactivos antes mencionados.

De acuerdo con lo anterior la evaluación del efecto mutagénico del nitrito de sodio puede ser evaluado mediante la prueba de micronúcleos, pues como se observa, los derivados de esta reacción actúan como agentes alquilantes, con lo que se tiene la posibilidad de evaluar el incremento en las rupturas cromosómicas causadas por este agente.

Por otra parte, es necesario buscar formas de prevención efectivas contra el efecto mutacional ocasionado por los aditivos alimenticios, algunos de estos agentes son los antioxidantes como la vitamina C y E, que son efectivos depuradores o exterminadores de radicales libres, actúan sinérgicamente en la actividad biotransformadora de las enzimas hepáticas y en la prevención de la

formación de nitrosaminas en el tracto digestivo. En el caso de nuestra investigación decidimos probar el efecto antimutagénico de la clorofilina contra el nitrito de sodio, ya que este compuesto ha demostrado en otras investigaciones ser efectivo en este aspecto (Gentile 1991, 1994).

Por lo anteriormente descrito, este proyecto resulta como tesis una brillante oportunidad para aplicar los conocimientos adquiridos durante la carrera, además de permitirme trabajar en lo que es la investigación formal con el fin de buscar una solución al problema de los agentes mutágenos a los cuales el hombre moderno se encuentra expuesto de manera constante.

OBJETIVOS

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS:

La clorofilina es un desmutágeno que puede disminuir el daño clastogénico ocasionado por agentes alquilantes formados a partir del nitrito de sodio.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar mediante la técnica de micronúcleos el efecto anticlastogénico de la clorofilina, probado en contra de nitrito de sodio, y la mezcla de éste con metilurea, en ratones de cepa NIH.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Determinar la inducción de micronúcleos del nitrito de sodio a las dosis de 10 mg/kg, 15 mg/kg y 20 mg/kg
2. Evaluar si en combinación el nitrito de sodio (10 mg/kg) y la metilurea (8 mg/kg) presentan un efecto clastogénico mayor que el presentado por el nitrito de sodio per se a la misma dosis.
3. Observar si el efecto clastogénico del nitrito de sodio es proporcional a la dosis administrada.
4. Determinar, si el tratamiento con clorofilina a la dosis de 4 mg/kg, disminuye la frecuencia de micronúcleos inducida por el nitrito de sodio.
5. Evaluar el cambio en la actividad de la médula ósea ocasionado por los compuestos antes mencionados, mediante la variación en la relación de eritrocitos policromáticos con respecto a los eritrocitos normocrómicos, como medida de la toxicidad de los compuestos.

**MARCO
TEORICO**

MARCO TEORICO

1. EL MATERIAL GENETICO.

Como sabemos el material genético es la entidad que contiene la información a partir de la cual, todos y cada uno de los seres vivos del planeta desarrollan sus características de acuerdo a su especie (Ayala 1984).

El material genético está formado por nucleótidos, los cuales están conformados por bases nitrogenadas de tipo purínico y pirimidico unidas a una desoxirribosa que a su vez se encuentra asociada a un grupo fosfato. Los nucleótidos del ADN se unen por enlaces fosfodiéster por la reacción de grupo OH del carbono 3 de la desoxirribosa con el fosfato enlazado al carbono 5 del siguiente nucleótido, por lo que da un patrón de crecimiento en la dirección 5'a 3' ya que el extremo libre inicial es el fosfato del carbono 5' (Thomson 1991).

El ADN posee dos cadenas de polidesoxirribonucleótidos, antiparalelas que tienen sentidos opuestos, es decir, una va de 5' a 3' mientras que la complementaria va de 3' a 5' y esto se debe a la posición del enlace fosfodiéster en la segunda cadena aunque ella sigue aumentando en la posición 5' a 3' (Thomson 1991).

Estas dos cadenas se encuentran apareadas por complementariedad de bases de manera que una base purica (pu) se enlaza con una pirimidica (pi). Las cuatro bases nitrogenadas presentes generalmente en el material genético son la adenina y guanina que tienen

estructuras de tipo púrico y la citosina y timina que son de tipo pirimidico. La adenina se complementa siempre con timina por la formación de 2 puentes de hidrógeno, mientras que la guanina se asocia con citosina por la formación de 3 enlaces del mismo tipo. Ambas cadenas se enrollan alrededor de un eje hipotético dando una estructura helicoidal, algo similar a una escalera de caracol en donde los peldaños están conformados por las uniones entre 4 bases nitrogenadas y los fosfatos y la ribosa quedan hacia afuera. Por cada giro del helicoide existen 10 pares de bases y el diámetro uniforme de la hélice es de 20 Angstroms (Schmid 1987).

La forma de replicación del ADN es semiconservativa, durante la fase S del ciclo celular, el material genético se duplica. En este momento los enlaces hidrógeno entre A=T y C-G se disocian, formándose dos filamentos, a partir de los cuales por acción de enzimas específicas como las ADNpolimerasas se sintetiza otro filamento complementario de manera que se forman 2 cadenas de ADN en cada una de las cuales uno de los filamentos es la tira madre a partir de cuya secuencia se forma el filamento complementario recién sintetizado (Schmid 1987).

Cabe señalar que en la cadena 3'-5', la síntesis de DNA es discontinua, por lo que a la hebra recién formada se le denomina retrasada, este filamento esta compuesto por pequeños fragmentos denominados de Okasaki que se unen entre si por acción de la enzima polimerasa II (Alberts 1990).

Para realizar la síntesis de proteínas la cual ocurre en el citoplasma, el ADN debe de pasar su información a una molécula intermediaria conocida como ácido ribonucleico; en él la molécula de

azúcar es una ribosa :el ARN es complementario a la secuencia del ADN aunque particularmente presenta la característica de sustituir los lugares correspondientes a la timina por el nucleótido denominado uracilo (Gardner 1991).

Existen en el ADN secuencias determinadas denominadas primers o iniciadores .a partir de las cuales comienza la síntesis de ARN tomando solamente una cadena de ADN como template para la síntesis de la cadena lineal de ARN.En este punto sigue la complementaridad de bases, es decir, si la secuencia del ADN template es ATCGTAA la cadena de ARN tendrá la secuencia UAGCAUU.Una vez sintetizado el ARN sufre cambios postranscripcionales lo cual ocasiona que se tengan tres tipos de ARN, el ribosomal,el de transferencia y el mensajero (Alberts 1990).

El ARNm se acopla en los ribosomas que son estructuras formadas de ARN y proteínas, compuestos por dos subunidades que se disocian cuando ha terminado el proceso de traducción, es en él en donde se desenrolla cuando se va a llevar a cabo la síntesis de proteínas.la secuencia de cada tres bases es lo que se denomina un codón,el ARNt es el encargado de acarrear los aminoácidos durante la síntesis de proteínas,éste tiene una forma de trébol invertido,presenta complementaridad de bases en el asa inferior,a este triplete se le denomina anticodón.

El apareamiento de los codones ofrece 74 posibilidades,conforme sólo se tienen 22 aa, se tiene asegurada la síntesis de todas las proteínas:el lenguaje de los codones es universal para todas las especies,y es la secuencia de ellos la que indica los sitios en donde se debe comenzar y terminar la síntesis (Ayala 1984).

De acuerdo con Salamanca (1992) un gen es una porción de la molécula de ADN codificada para la síntesis de un polipéptido. Por otra parte Riegger (1991) nos dice que es un elemento que se transmite de forma hereditaria, compuesto por bases rigurosamente ordenadas que contienen la información para la síntesis de polipéptidos (gen estructural) o la información para una autorregulación del funcionamiento genético (gen regulador).

Dentro de una cadena de ADN se tienen muchos genes los cuales se asocian entre ellos, con proteínas y sistemas enzimáticos conformando lo que se denomina un cromosoma. En procariotes se tiene un solo cromosoma circular formado por una doble cadena de ADN; en los eucariotes, el ADN se reparte en varios cromosomas, que se organizan dentro del núcleo celular de manera lineal.

Las proteínas a las cuales se asocia el ADN para conformar un cromosoma son las denominadas histonas, de ellas se han caracterizado 5 tipos, las histonas 2a, 2b, 3 y 4 se encuentran formando octámeros a los cuales se les denomina core, alrededor de él se enrolla el ADN dando dos vueltas y media (146 pares de bases) y a ello es a lo que se denomina nucleosoma, se tiene una región espaciadora entre nucleosoma y nucleosoma y es en esta zona en donde se fijan las histonas de tipo 1 a manera de broche (Gardner 1991).

Al parecer 6 a 10 o más nucleosomas pueden enrollarse en torno a un canal central formando fibras de cromatina, de la cual están formadas los cromosomas.

Todos los seres que se reproducen sexualmente, tienen como característica presentar pares de cromosomas, de los cuales uno fue donado por la madre y el otro corresponde al padre, a este estado se le denomina diploide (2n) (Charlotte 1984).

Durante la fase G1 del ciclo celular los cromosomas se encuentran despirilizados y conformados por una sola cromátide, formando una especie de red; durante la fase S, todo el material genético se duplica y los cromosomas quedan compuestos por 2 cromátides, ambas son replica exacta de la original. Posteriormente cuando se entra a la etapa de división celular (mitosis o meiosis), los cromosomas se compactan en metafase al máximo, durante la anafase las cromátides se separan, quedando las células hijas cada una con un cromosoma. De esta manera es que la información genética pasa de manera intacta de generación en generación (Salamanca 1992).

2. MUTAGENESIS.

Como sabemos el hecho de que la información genética se transmita de generación en generación sin cambios aparentes asegura que las características de una especie se mantengan. Sin embargo esta información es susceptible de sufrir cambios de manera espontánea o bien inducidos por diversos agentes ambientales. Estos cambios son fundamentales para la evolución de las especies y la selección natural de ellas.

Aunque en un principio el término de mutación se aplicaba únicamente a aquellos cambios de la información genética heredables a la progenie, hoy el concepto se aplica a cualquier cambio heredable en el genotipo o bien al cambio en la secuencias del ADN (Gardner 1991).

De acuerdo al Glossary of Genetics Classical and Molecular (Rieger 1991) se considera como mutación a cualquier cambio en la secuencia del ADN o ARN o bien a una serie de rearrreglos en el material genético de una célula viva o un virus. Estas alteraciones se pueden dividir en dos grandes grupos, es decir, mutaciones génicas o microlesiones y a grandes cambios estructurales en un cromosoma es decir mutaciones o aberraciones cromosómicas.

Dentro de las aberraciones cromosómicas se tienen tanto de tipo estructural como numérico. Las alteraciones en el número cromosómico pueden originarse como resultado de una no disyunción (no separación de los cromosomas) o por un rezago anafásico, ambos fenómenos pueden originarse tanto en la división meiótica como en la mitótica. Cuando el número cromosómico es múltiplo exacto del número haploide, se habla de un estado de euploidía, sin embargo cuando uno o varios

cromosomas se encuentran involucrados. la alteración numérica se denomina aneuploidia. Las aneuploidias son más conocidas por sus repercusiones en el origen de alteraciones congénitas, teniéndose que las más encontradas en nacidos vivos son las trisomias que es cuando se presenta un cromosoma adicional como es el caso del Síndrome de Down (47, XX o XY, + 21). las monosomias o la falta de un cromosoma como la presente en el caso del Síndrome de Turner (45, X₁). las dobles trisomias, es decir, la presencia de dos cromosomas adicionales de distinto par cromosómico como en el caso de pacientes con un cromosoma X extra y Síndrome de Down (48, XXX, 21). las tetrasomias o la presencia de dos cromosomas adicionales del mismo par como en algunos casos de Síndrome de Klinefelter (48, XXXY). Otras aberraciones numéricas las constituyen las nulisomias o sea la falta total de un par cromosómico y los mosaicos o mixoploidias en las cuales dentro del mismo organismo se tienen 2 o más líneas celulares una de las cuales es normal y la otra u otras se encuentran afectadas en su número cromosómico. la producción de mosaicos se debe a la no disyunción de los cromosomas en la mitosis temprana después de la formación del cigoto (Salamanca 1992).

Las aberraciones estructurales son ocasionadas por agentes clastógenos, es decir aquellas sustancias que provocan la ruptura del cromosoma; cuando una ruptura se lleva a cabo se puede tener una restitución de la lesión dando un genotipo sin alteración alguna. Sin embargo si se tiene una ruptura y no hay restitución, se puede presentar un fenómeno en donde no se reúnan las partes afectadas dando como resultado una pérdida del material genético, o bien una reunión inter o intracromosomal que repercute como un cambio estructural (Thomson 1991).

Dentro de las aberraciones intracromosómicas se tienen deleciones, inversiones, anillos e isocromosomas. Por otra parte para las aberraciones intercomosómicas se presentan las translocaciones simples, recíprocas y robertsonianas, así como la duplicación que es una forma particular de translocación (Salamanca 1992).

Dentro del ciclo celular, las mutaciones se presentan con más probabilidad durante la etapa G1 por ser ésta la parte con mayor duración del ciclo, aunque en el caso de las mutaciones puntuales el periodo S parece ser la etapa más sensible para que ocurran (Gardner 1991).

Cuando se tiene una mutación, y dependiendo de la línea celular en la que se produzca, se presentan cambios que repercuten en el desarrollo del individuo afectado: cuando las mutaciones ocurren en células germinales estas generalmente se traducen en productos afectados, infertilidad y abortos espontáneos. Cuando se tienen mutaciones en células somáticas es muy posible que se tengan alteraciones en los procesos metabólicos de ellas, lo cual repercute en el funcionamiento normal además de ser el paso inicial para el desarrollo de un proceso cancerígeno, con lo cual se explica el aumento a últimos tiempos de personas afectadas por este mal (Salamanca 1992).

Cuando las mutaciones son provocadas por un agente, es decir que no ocurren de manera espontánea, puede evaluarse el efecto del mutágeno con diversas técnicas. Cuando los daños se presentan a nivel génico, las técnicas empleadas son preferentemente la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Southern Blot (SB), Northern Blot (NB), Western Blot (WB), Corrimiento electroforético en gel de agarosa (PAGE) e Inmunodetección.

Existen muchas pruebas de mutagenicidad evaluables en seres vivos que incluyen :

- a) Pruebas de cambio de pares de bases o en las pautas de lectura es decir mutaciones puntuales que se evalúan en bacterias como Escherichia coli, Salmonella thyphimurium o Bacillus subtilis.
- b) Prueba para determinar aberraciones cromosómicas a partir de cultivos celulares.
- c) Inducción de mutaciones de células en cultivo.
- d) Prueba en Drosophila melanogaster de recesivos letales.
- e) Evaluación de lesiones cromosómicas por el análisis de células en metafase o por prueba de micronúcleos.
- f) Inducción de mutaciones en células germinales mediante la evaluación de dominantes letales en rata o ratón (Derache 1990).

Estos se dividen en 4 grupos los cuales se explicarán brevemente a continuación:

2.a. Pruebas de mutagénesis en bacterias.

Estas pruebas se basan en la detección de bacterias que han sido afectadas por el mutágeno en un gen determinado, quedando la bacteria imposibilitada para sintetizar un compuesto vital para su existencia por lo que ésta queda incapacitada para crecer en un medio carente de él (Ayala 1984).

Otra posibilidad es la introducción de plásmidos, los cuales dan nuevas propiedades a la bacteria como puede ser la resistencia a determinados antibióticos (Levin 1989).

Este tipo de ensayos tienen ciertas restricciones: ya que todos los experimentos deben repetirse al menos 2 veces. las sustancias de ensayo deben tener cierto grado de solubilidad. no pueden ser ni bacteriostáticas ni citotóxicas. se necesita en muchos casos la adición de fracciones microsomales para detectar los mutágenos que necesitan activación enzimática. además se necesita manejar un gran número de muestras para obtener significancia en los resultados (Derache 1990).

2.b Pruebas realizadas en hongos.

En este tipo de prueba generalmente se utilizan levaduras tales como Saccharomyces cerevisiae. ya que a demás de su capacidad para la rápida reproducción mitótica. bajo algunas condiciones es posible obtener reproducción meiótica produciéndose 4 ascas haploides. cuando se unen 2 de ellas se obtienen cigotos diploides. Cuando las mutaciones se inducen en el estado haploide son fácilmente detectables en la fase diploide :en esta prueba es necesario también adicionar inductores enzimáticos en los casos que así se requiera (Gardner 1991).

En *S.cerevisiae* en estado haploide las mutaciones pueden darse en dos loci que sintetizan para adenina.en donde aquellas colonias mutadas presentan una coloración roja al incorporar ésta del medio.mientras que aquellas colonias normales presentan la coloración característica blanca pues estas son capaces de sintetizar adenina.

Otra técnica que utiliza el mismo hongo consiste en detectar las recombinaciones mitóticas anormales entre genes,dentro de un gen o

incluso una aneuploidia mitótica (perdida de un cromosoma homólogo). El homocigoto puede detectarse por la expresión del fenotipo recesivo que se mantiene en generaciones sucesivas. el marcador utilizado para la detección del carácter recesivo es la resistencia a agentes químicos. marcadores distales usando A y T el homocigoto para adenina que provoca una acumulación del pigmento rojo (Derache 1990).

2.c. Pruebas con células en cultivo.

Las pruebas mencionadas anteriormente tienen como principal desventaja el hecho de que el metabolismo de bacterias y virus es totalmente diferente al de un ser humano o cualquier mamífero. es por ello que se han desarrollado pruebas para la evaluación del efecto mutagénico de las sustancias en células humanas y de diversos animales.

En el caso de los humanos es factible realizar cultivos celulares a partir de un gran número de tejidos que van desde la sangre periférica. aspirados de médula ósea. piel. líquido amniótico y vellosidades coriónicas. (Salamanca 1992).

El fundamento de los cultivos celulares es estimular la división celular adicionando a los cultivos un agente mitógeno. por ejemplo en los cultivos de linfocitos se adiciona fitohemaglutinina. la cual estimula la clonación de linfocitos B. posteriormente las células se detienen en la metafase de la mitosis al adicionar un agente que impida la migración de los cromosomas como la colchicina. pudiendo de esta manera visualizar los cromosomas pudiendo evaluar en ellos las aberraciones que puedan presentar (Grouchy 1984).

Estas técnicas citogenéticas de evaluación incluyen pruebas tales como determinación de cariotipo a partir de un cultivo celular, intercambio de cromátides hermanas (ICH), bandeos como el G.C. bandas Q, etc.

La técnica más común para evaluar daño citogenético es el análisis de aberraciones cromosómicas de células en metafase tratadas con el mutágeno a estudiar; sin embargo estas pruebas son tediosas, se necesita de personal entrenado y con suficiente experiencia para determinar el tipo de daño que se presente en metafase, además de que se necesita tener experiencia y habilidad en el montaje de los cultivos y la preparación de laminillas; las condiciones de trabajo son bastante estrictas y un error puede significar el fracaso del ensayo (Salamanca 1992).

Una alternativa técnica muy aceptable la constituye la prueba de intercambio de cromátides hermanas (ICH) *in vitro*, pues el aumento en la frecuencia en el número de intercambios en células obtenidas de un cultivo celular o bien de médula ósea de un animal en ambos casos tratados con un análogo de base (5-Bromodeoxiuridina) y el compuesto a probar realizando la técnica de tinción diferencial nos permite evaluar el efecto del compuesto sobre el material genético. Sin embargo esta prueba necesita realizarse con extremos cuidados, ya que la posible contaminación bacteriana o micótica de los cultivos pueden dificultar la obtención de resultados óptimos (Enciclopedia 1991).

En estos casos se hace también necesaria la adición de fracciones microsomales pues algunos mutágenos pueden pasar inadvertidos al no biotransformarse en el metabolito activo.

2.d. Pruebas de mutagénesis in vivo.

Probablemente la mayor ventaja de utilizar animales para este tipo de pruebas es que en ellos se puede evaluar el efecto de una sustancia en un sistema completo y expuesto a las condiciones metabólicas del sujeto de estudio. por lo que este tipo de pruebas son más representativas sobre el efecto que una sustancia podría presentar en el humano (Derache 1991).

En los animales se puede hacer análisis del cariotipo. a éstos se les ha administrado el mutágeno y horas después colchicina obteniendo así cromosomas en metafase a partir de muestras sanguíneas o al extraer médula ósea del fémur del animal para la evaluación de aberraciones cromosómicas (Derache 1990).

Otra prueba en la que se evalúa el efecto de una sustancia sobre las células germinales es la dominancia letal. en donde se examina la muerte del embrión o feto del animal a causa de la alteración de los cromosomas por un proceso mutacional. ya que aparentemente no existe alguna disfunción en células germinales. pero el huevo fecundado no es viable. Generalmente se trata al macho que después es acoplado con las hembras a intervalos determinados ; posteriormente se evalúa el número de fetos muertos por hembra comparándolos con un control negativo. Sin embargo para que esta prueba sea significativa. el número de fetos muertos debe duplicar los valores obtenidos con respecto al control negativo .esta prueba puede realizarse tanto en rata como en ratón (Derache 1990).

La prueba "Spot" o de las manchas consiste en someter a los embriones durante su desarrollo al compuesto por analizar. en este

caso los melanoblastos se ven afectados ocasionando que los genes que controlan la pigmentación del pelo del animal presenten alteraciones y ello se traduzca en la aparición de manchas blancas en el vientre, manchas amarillas alrededor de la garganta y zonas con "spots" blancos que se relacionan con mutaciones somáticas (Derache 1990).

Otra prueba in vivo es la translocación en ratón, en este caso el mutágeno puede inducir que uno de los cromosomas sexuales X se una a otro, por lo que la hembra queda en estado XO, dando como resultado una hembra infértil. Al realizar un análisis citológico, las metafases obtenidas del animal solo presentan 39 cromosomas de los 40 normales o bien uno de estos cromosomas presenta una longitud de un largo anormal al ser el producto de la translocación del cromosoma X con algún autosoma (Derache 1990).

Otro modelo por excelencia es la Drosophila melanogaster, en ella se pueden realizar un gran número de pruebas como la recesividad letal cuando se evalúa el efecto sobre células germinales, o bien la prueba de Mutaciones Somáticas y Recombinaciones (SMART) cuando se evalúa el efecto en células somáticas (Ramos 1993).

Por último otra de las pruebas realizables in vivo es la prueba de Micronúcleos (MN) de la cual se hablará más ampliamente en la siguiente sección.

3. PRUEBA DE MICRONUCLEOS.

Los micronúcleos (MN) son corpúsculos intracitoplasmáticos de cromatina, separados del núcleo principal, y que se forman a partir de la ruptura de fragmentos cromosómicos acéntricos, o bien por aquellos cromosomas que sufren un rezago anafásico, lo cual se traduce en la aparición de un pequeño núcleo en células anucleadas como los eritrocitos, o bien en el citoplasma de nucleadas como linfocitos o espermatogonias. El incremento en su número es indicativo de un rezago anafásico o bien de la ruptura de cromosomas en una región acéntrica ocasionada por agentes clastógenos (Riegger 1991).

La existencia de micronúcleos ha sido reconocida durante años; su asociación con el daño cromosómico fue bien conocida desde los primeros trabajos en el campo de la radiación. El primer intento de usar los MN como monitores de daño citogenético parece ser el reportado por Evans y colaboradores en 1959, ellos usaron la frecuencia de los MN para cuantificar el daño citogenético inducido por los rayos gamma y los neutrones en la presencia y ausencia de oxígeno. Dentro de los resultados obtenidos se observó en las cromátidas intercambios asimétricos y simétricos incompletos que dan el incremento de fragmentos acéntricos en la mitosis; estos fragmentos son excluidos de los núcleos frecuentemente en las células hijas y aparecen en la siguiente interfase como MN. Evans y colaboradores (1963) estimaron que la frecuencia de micronúcleos en las células recientemente formadas después de la radiación fue de aproximadamente 60% de la frecuencia de los fragmentos observados en preparaciones en metafase de células tratadas similarmente.

Subsecuentemente Schroeder (1966,1970), recomendó el uso de las tinciones de médula ósea para detectar el daño in vivo de mutágenos químicos y demostró que la frecuencia de MN en células de ella está en conexión con el daño citogenético. Este investigador recomendó el conteo de micronúcleos con otras anomalías nucleares constituyéndose como "prueba de anomalía nuclear", siendo utilizada en los primeros intentos para substituir la observación directa de las tinciones de médula ósea para el análisis citogenético de metafases (Frohberg, Bauer 1973; Vogel y colaboradores 1974).

Al comienzo de los años setenta, Schmid y colaboradores, así como Heddle iniciaron los estudios para determinar que parámetros podrían servir como indicadores útiles del daño citogenético en la médula ósea in vivo. Este trabajo llevó a la conclusión de que la incidencia de eritrocitos policromáticos micronucleados EPCMN era un indicador útil en del daño citogenético: en médula ósea (Von Ledeburg y Schmid 1973). En base a este trabajo fue posible el desarrollo de una prueba simple in vivo, en donde la identificación de EPC micronucleados, nos permite evaluar el daño citogenético, esta prueba es ampliamente usada y referida comúnmente como "Prueba de Micronúcleos" (Schmid 1976).

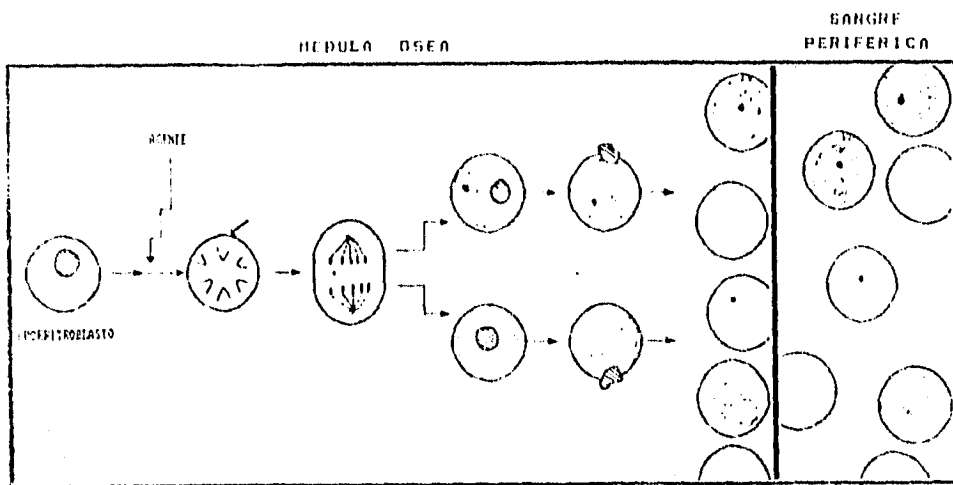
Puesto que los MN resultaron del daño citogenético en muchos tipos de células proliferantes, no hay una prueba única, sin embargo la importancia del estudio es evidente debido a su amplia aceptación.

El incremento en el uso de varias pruebas de micronúcleos desde 1973, indudablemente proviene de las ventajas principales como velocidad y simplicidad. Heddle en 1973 argumentó que el conteo de MN es 10 veces más rápido que el conteo de metafases. La velocidad y simplicidad no son las únicas ventajas pues los MN pueden observarse

en todas las fases del ciclo celular y el número de ellas es ilimitado; el conteo de MN es fácilmente reconocido y por personal con poco adiestramiento formal en citogenética.

No se requiere un cariotipo favorable y los MN formados durante la división celular persisten al menos durante la siguiente interfase, ya que el tiempo de muestreo es menos crítico. El daño ocurrido en algún estadio del ciclo celular puede ser observable como MN con solo un ciclo celular transcurrido, y un tiempo de fijación simple es en principio suficiente. En la práctica, esto es necesario para asegurar que la división celular no ha sido bloqueada e *in vivo*, el tiempo permite a la forma mutagénica activa para alcanzar la población de células blanco previa la división próxima al conteo. Como resultado 2 o más muestras son requeridas normalmente (Mac Gregor 1990).

La basal genética espontánea es baja y casi uniforme entre las especies (Hepple 1983) en la figura 1 se muestra el mecanismo de formación de los micronúcleos.



MECANISMO DE FORMACION DE LOS MICRONUCLEOS EN MEDULA OSEA DE RATON
 POR ACCION DE UN AGENTE CLASTOGENO (HAYASHI 1984).

El deterioro del huso acromático, el cual lleva a la exclusión del núcleo de las células hijas en el retraso de los cromosomas en la anafase es rápidamente detectado en la prueba (Mac Gregor 1990).

Esta prueba se puede realizar en una gran variedad de células tanto *in vivo* (en médula ósea, sangre periférica y células fetales de hígado); como *in vitro* utilizando células tanto de animales como humanas ,por ejemplo se ha reportado esta prueba en hepatocitos de rata (Ashby 1989), en células de hamster chino V79 (Bonatti 1985) e incluso linfocitos humanos y queratinocitos.

3.a Eritropoyesis .

El eritrocito es un vehículo para el transporte de la hemoglobina, la cual se produce en las células precursoras de los eritrocitos, los normoblastos. La función de la hemoglobina consiste en transportar oxígeno y dióxido de carbono dentro del organismo. Se considera que ciertas influencias microambientales inducen a la célula madre hematopoyética pluripotencial a convertirse en la progenitora eritroide diferenciada. Con técnicas *in vitro* se ha establecido que existen dos tipos de células productoras de eritrocitos, las unidades formadoras en estallido eritroides (UFE-E), que son la forma más precoz y responden al estímulo de la interleucina 3 y la eritropoyetina, y las unidades formadoras de colonias eritroides (UFC-E), que se originan de las anteriores y responden a concentraciones bajas de eritropoyetina, estas células forman los pronormoblastos (Henry 1993).

El pronormoblasto es el primer precursor eritroide reconocible al microscopio. presenta un núcleo prominente que se tiñe intensamente con colorantes basófilos y tiene un tamaño aproximado de 20 micras. cuando éste se divide produce dos normoblastos basófilos que son de menor tamaño. Estas células presentan una tinción nuclear que da la apariencia de una rueda con radios. la cantidad de citoplasma corresponde al 25% del total de la célula y es muy basófilo por la cantidad de RNA (Henry 1993).

Después de la mitosis del normoblasto basófilo se presenta una policromasia en la célula debida a la producción de hemoglobina. por lo que las células resultantes son conocidas como normoblastos policromáticos; su tamaño es menor al de su precursor, el núcleo ocupa la mitad del volumen celular y su cromatina está moderadamente condensada y se colorea con intensidad. Esta célula sufre dos mitosis que dan como resultado la producción de normoblastos ortocromáticos. los cuales presentan un núcleo pequeño y denso (picnótico). citoplasma abundante con una gran concentración de hemoglobina y pocos polirribosomas. En este estadio ya no hay división mitótica y el núcleo es expulsado por movimientos ondulares con numerosas contracciones dinámicas. la célula se divide inequitativamente. resultando una porción pequeña. la cual contiene al núcleo y un poco de citoplasma con hemoglobina (fagocitada rapidamente por células del retículo).y una porción mayor que se convierte en reticulocito (Williams 1977).

Durante el proceso de maduración se producen 3 o 4 divisiones mitóticas en un periodo de 3 días. lo cual origina la producción de 16 reticulocitos por cada normoblasto. Los reticulocitos son anucleados y mayores que los hematíes maduros. y antes de ser liberados permanecen por uno o dos días en el estroma de la médula y

se mantienen aproximadamente un día en circulación (Henry 1993); en ellos se sintetiza aún hemoglobina por lo que presentan una coloración policromatófila, ya que contienen ribosomas residuales, mitocondrias y otros organelos que son eliminados hasta la maduración eritrocítica .

Los eritrocitos en el humano permanecen 120 días en circulación, durante este tiempo envejecen gradualmente disminuyendo sus actividades enzimáticas y finalmente son destruidos por las células fagocíticas del sistema retículo endotelial (Williams 1977). La figura 2 presenta esquematiza el proceso eritropoyético.

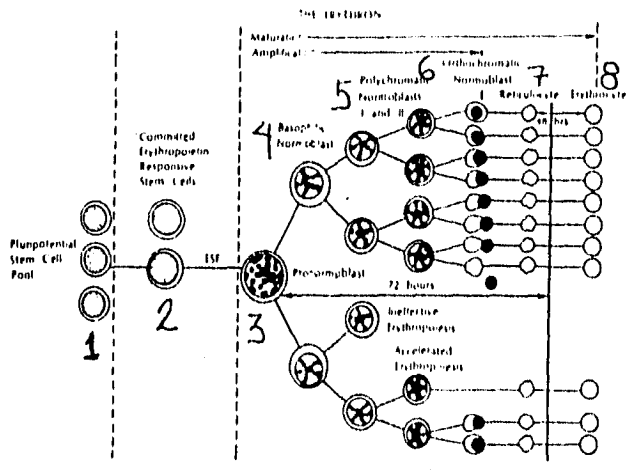


FIGURA 2. PROCESO ERITROPOYETICO (Henry 1993).

1. CELULAS PLURIPOTENCIALES.
2. CELULAS QUE RESPONDE AL ESTIMULO DE ERITROPOYETINA (UFE-E Y UFC-E)
3. PRONORMOBLASTOS.
4. NORMOBLASTOS BASOFILOS.
5. NORMOBLASTOS POLICROMATICOS.
6. NORMOBLASTOS ORTOCROMATICOS.
7. RETICULOCITOS.
8. ERITROCITOS.

3.b.Eritrocitos policromáticos .

El hecho de que en un estudio agudo se monitoree la presencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos (EPC) se debe a que éstas son células jóvenes (reticulocitos) recientemente liberadas a la circulación, estos presentan una coloración mezclada de basofilia y eosinofilia, por lo que presentan un tinte azulado violáceo, son generalmente un poco mayores que los eritrocitos normocromicos (ENC) y proceden de normoblastos que pierden su núcleo antes de que la hemoglobinización del protoplasma sea completa, generalmente un aumento en su número con respecto a los valores normales indica una eritropoyesis aumentada. La coloración azulada que presentan los EPC es por la presencia de ácido ribonucleico, en el momento de su diapedesis hacia la circulación, falta aproximadamente 20% del contenido final de hemoglobina por lo que aún conservan parte del aparato ribosómico para terminar la síntesis y constituir de esta manera una célula madura (Henry 1993). Debido a que son células producidas y liberadas durante el tiempo de estudio, constituyen la manera más eficaz de evaluar en ellas la afección de la actividad medular, así como la capacidad clastógena de los compuestos en corto tiempo (Mac Gregor 1990).

El número de EPC en circulación es en general muy bajo, en humanos representan apenas el 1 o 2 % del total de los eritrocitos, sin embargo cuando esta tasa aumenta considerablemente se pueden tener alteraciones como ocurre en los casos de anemia grave, eritropoyesis aumentada por pérdida celular como ocurre en hemorragias o en casos de reticulocitosis (William 1977). En la prueba

de micronúcleos el aumento puede deberse al efecto citotóxico de la sustancia, que obliga al organismo a acelerar el proceso eritropoyético (Susuki 1993).

La eritropoyetina es el regulador para la formación de eritrocitos en los mamíferos. el aumento en la circulación de esta hormona puede ser ocasionado por estados anóxicos por falta de oxígeno atmosférico, disminución del volumen sanguíneo, la concentración deficiente de hemoglobina o que ella se encuentre alterada. La ingesta de cobalto, produce un estado anóxico en el riñón, resultando en la producción de eritropoyetina y por lo tanto acelerando la eritropoyesis en médula ósea por lo que se registra un incremento en la tasa de EPC (Suzuki 1993).

3.c. Inclusiones eritrocitarias.

En algunos casos los eritrocitos presentan cuerpos de inclusión, que son visibles cuando se tiñen con Wright o Giemsa, estos cuerpos aparecen en algunos casos clínicos.

a) Núcleo.

En casos de enfermedad, aparecen hematies nucleados en la sangre periférica, sobre todo cuando la médula ósea se encuentra muy estimulada, estos son generalmente eritroblastos ortocrómicos con citoplasma hemoglobinizado y pequeño; el núcleo es picnótico pero puede ser muy grueso en los megaloblastos inmaduros (Henry 1993).

b)Anillos de Cabot.

Se observan como fibras dentro de los eritrocitos y presentan una coloración púrpura .están formados por restos de huso de microtubulos alterados. aparecen en el reticulocito.pueden presentar formas de anillos o de ochos (Henry 1993).

c)Punteado basófilo.

Se observan como puntos basófilos gruesos o finos y varia su forma tamaño y distribución.cuando son ocasionados por hierro presentan una coloración azul al Wright y al azul de Prusia; su origen se debe a la precipitación patológica de ribosomas (Williams 1977).

d)Parásitos.

Los parásitos como el de la malaria se asocian con puntos de Schuffnet.estas inclusiones presentan una coloración roja dentro de los hematies pero separadas del parásito (Williams 1977).

e)Los cuerpos de Heinz

Son cuerpos refringentes observables sin teñir o bien con violeta de metilo;se forman a partir de hemoglobina H desnaturalizada por oxidación de ella (Henry 1993).

f) Cuerpos de Howel-Jolly

Son pequeñas inclusiones corpusculares de alrededor de una micra de diámetro no son refringentes y son de forma circular bien definida. presentan una coloración basófila (violeta a púrpura); están compuestos de material nuclear. este es el nombre que se les da a los micronúcleos en hematología (Williams 1977).

3.d. Prueba de micronúcleos en ratón.

De acuerdo con Mac Gregor (1990), el tiempo de vida de un eritrocito en ratón es de 30 días y considera que el ciclo celular es de 10 a 20 horas, el lapso que transcurre de la división a la enucleación es de 6 horas, y el tiempo de los EPC en médula ósea es de 24 horas.

Se propone que el tratamiento debe ser continuo y repetido por un tiempo suficiente para alcanzar una condición estable o pseudoestable en la cual las células micronucleadas alcanzan su frecuencia más alta en el compartimento de interés para el estudio, ya sea médula ósea o bien sangre periférica, esta tasa permanece constante cuando la entrada de células que presentan el daño es balanceada con la pérdida de las mismas. En términos cinéticos la entrada de las células a un compartimento es determinada por la tasa de eliminación constante, que en el caso de eritrocitos micronucleados está determinada por el tiempo de vida de las células (Mac Gregor 1990).

Por lo anterior se deduce que el periodo de dosificación debe exceder el tiempo de vida de EPCs en médula ósea más el tiempo requerido para una división celular y la expulsión del núcleo.

Cuando se trata de un estudio subcrónico (90 días) o crónico (2 años), las células a analizar son los eritrocitos normocrómicos, al parecer es posible alcanzar una tasa estable cuando se ha tenido 45 días de exposición, pues la frecuencia de eritrocitos policremáticos micronucleados (ENCMN) tanto en sangre como en médula es igual a la frecuencia en ENC circulantes (Mac Gregor 1990).

En ensayos agudos, en donde el clastógeno actúa rápidamente y no presenta un efecto acumulativo, el régimen de exposición generalmente recomendado para una prueba de rutina es de una sola administración o bien dos con 24 horas de diferencia entre ellas, pues con ello nos aseguramos que el compuesto a probar actúa en las células dentro de su periodo de maduración. Si el tejido a analizar es médula ósea, la información se mantendrá en ella por aproximadamente 2 días, pero si se trata de realizar el estudio en sangre periférica se necesitarán 24 horas más para tener una tasa estable, pues es este el tiempo requerido para remover los EPCs de médula hacia sangre. En caso de que el compuesto a analizar tenga un efecto acumulativo o su acción sea lenta se requiere de un tiempo de dosificación más largo (Mac Gregor 1990).

Una vez que se ha alcanzado un estado estable, hay un periodo de tiempo en el cual se obtiene el máximo de células micronucleadas cuando se trata de un estudio agudo, por ejemplo, en estudios realizados por Mac Gregor en 1990 utilizando mitomicina C y trietilenmelamina, se observa en ambos casos que el pico de EPCMN en médula ósea se tiene en las 24 horas posteriores a una administración simple, pero que esta frecuencia disminuye a las 48 horas en este tejido, mientras que en este tiempo se tiene la frecuencia máxima en sangre periférica, lo anterior en lo que se refiere a médula ósea coincide con los resultados presentados por Shelby (1991) el cual utilizó para su estudio mitomicina C como control positivo, teniendo su máximo a las 24 horas de administración.

En el estudio de Mac Gregor (1990) también se reporta una disminución en la frecuencia de EPCMN a las 72 horas después de la administración en ambos tejidos, sin embargo en la parte del estudio subagudo en donde se hicieron administraciones repetidas y se evaluaron MN en sangre periférica utilizando trietilenmelamina, mitomicina C, dimetilbenzantraceno y colchicina, se observa que a partir del tercer día se alcanza un máximo en EPCMN, y que esta tasa permanece más o menos constante en los días subsecuentes. Esto nos indica que los ensayos de micronúcleos en corto tiempo pueden incrementar su eficiencia cuando se administra el compuesto de interés diariamente por 3 días, tomando la muestra de sangre a las 24 horas de la última administración, es decir a las 96 horas de iniciado el ensayo, pues en este tiempo se ha alcanzado el estado estable tanto en médula ósea como en sangre.

Cabe señalar que la tasa de MN basal es variable dependiendo de la cepa utilizada. Un estudio realizado por Salamone y Mavournin (1994) demostró que la frecuencia espontánea de MN analizando distintas cepas presentan variabilidad, aunque de manera general estos mantienen un rango en la mayoría de los casos que va de 1 a 3 MN en 1000 EPC, teniéndose en la generalidad de los casos que el valor es cercano a $1.95 \text{ MNEPC} / 1000 \text{ EPC}$.

Cabe señalar que en este tipo de estudios el estado en el que se encuentren los ratones es muy importante, ya que el número de EPC varía de acuerdo a la edad de los ratones, encontrándose que en los ratones jóvenes el número de ellos en circulación es alto comparado con la tasa de EPC en ratones adultos. Además de la edad, el estado de salud de los animales, y el que estos sean mantenidos en condiciones óptimas de alimento, agua, temperatura e iluminación, son factores que deben de considerarse para evitar que ellos interfieran con los resultados (Solomon 1994).

4. AGENTES ALQUILANTES.

Los agentes alquilantes son posiblemente las sustancias mutagénicas más potentes, ya que presentan más de un mecanismo de interacción con el ADN. Existen muchos agentes dentro de esta categoría, tales como el etil- y metilmetanosulfonato, las mostazas nitrogenadas y sulfuradas, las nitrosaminas, etc.; todos ellos tienen la característica en común de formar electrófilos muy potentes como el ion carbonilo u otros intermediarios que forman enlaces covalentes con sitios blancos como son los grupos fosfato, amino, sulfhidrilo, hidroxilo, carboxilo e imidazol (Goodman 1986), presentes en las moléculas de un organismo.

Todos estos agentes tienen varios mecanismos de acción, en lo que se refiere a su acción con el ADN: el primero es la transferencia de grupos metil o etil a las bases nitrogenadas, en particular hacia la posición del carbono 6 ó 7 de la guanina, sin embargo Kaina (1993) reporta la formación de otros sitios como el nitrógeno 3 y 1 de la adenina, el nitrógeno 3 y el oxígeno 6 de guanina y la alquilación del grupo fosfato de los nucleótidos, en uno de ellos la base es retirada teniendo un proceso de depuración ocasionando la formación de un hueco al cual se denomina brecha (figura 8). En el caso de tenerse una brecha, cualquier otra base puede ocupar el lugar dejado teniendo la posibilidad de tener una transición o cambio de una base púrica por otra púrica y de una pirimidica por otra de esta clase, o bien una transversión en la cual una base púrica es sustituida por una pirimidica y viceversa, cabe señalar que sólo los agentes alquilantes son capaces de dar ambos tipos de mutación puntual; lo anterior fue evaluado en bacterias (Gardner 1991).

También se tiene un mecanismo en el que la alquilación ocasionada por estos agentes activa procesos de reparación, lo cual ocasiona transversiones, transiciones y desfaseamientos, además de dar una reparación defectuosa. Otro proceso de reparación consiste en transferir el grupo alquilreactivo al centro activo de una cisteína, como ocurre en el caso de tener una O6-alquilguanina que es reparada por la O6-metilguanina-ADN-metiltransferasa, que es una enzima presente en las células de mamíferos, la cual reduce la tasa de mutaciones puntuales. Las alquiltransferasas representan el principal mecanismo de protección en contra de los agentes alquilantes (Kaina 1993).

Cuando se tiene alquilada la posición 7N de la guanina, ocasiona que la forma predominante del nucleótido sea el tautómero enólico y no el cetónico que es normalmente el predominante, al tenerse en su forma enólica, la guanina se une con timina y no con citosina, dando errores en la codificación (Gardner 1991).

La alquilación de N7 puede labilizar el anillo imidazólico de la base nitrogenada, dando la posibilidad de que esta quede unida al ADN, o bien que este se remueva de la cadena ocasionando un hueco. Cuando la base es retirada teniendo un proceso de depuración se da la formación de un hueco al cual se denomina brecha; en este caso cualquier otra base puede ocupar el lugar dejado teniéndose la posibilidad de tener una transición (cambio de una base púrica por otra púrica y de una pirimidica por otra de esta clase), o bien una transversión en la cual una base púrica es sustituida por una pirimidica y viceversa, cabe señalar que sólo los agentes alquilantes son capaces de dar ambos tipos de mutación puntual; lo anterior fue evaluado en bacterias (Gardner 1991).

Los alquilantes sobre todo aquellos con dos grupos alquilreactivos pueden entrecruzar las cadenas de ADN al enlazar dos guaninas con ello se impide la separación de las cadenas complementarias haciendo imposible la replicación (Goodman 1986). Los alquilantes también presentan radiomimetismo es decir provocan rupturas cromosómicas al igual que las radiaciones ionizantes ya que al parecer la formación de O6-metilguanina (O6MeG) parece ser el primer paso para tener una aberración cromosómica como lo considera Kaina (1993).

De acuerdo con Galloway (1994) se tiene la hipótesis de que en la primera fase S de la replicación podría continuar el paso de O6MeG al dejarla en la tira madre e insertando una base errónea (timina) en la recién sintetizada en una siguiente fase S la base incorrecta de la tira hija puede ser removida teniendo la formación de una brecha en la cadena sencilla. Posiblemente estas brechas pueden convertirse en rupturas de la doble cadena y por último en aberraciones cromosómicas estructurales.

Los alquilantes son considerados carcinogénicos, mutágenos, teratógenos e inmunosupresores sin embargo este tipo de agentes al interactuar con el material genético frenan la replicación y por ende la división celular además de que las mutaciones ocasionadas a las células pueden ser letales siendo esta la base para utilizarlos como agentes terapéuticos en procesos neoplásicos aunque por otra parte en células normales pueden desencadenar la aparición de propiedades alteradas en la superficie que resulta en una división descontrolada y la pérdida de diferenciación. A continuación se presenta el mecanismo de alquilación del ADN en la figura 3 (Goodman 1986).

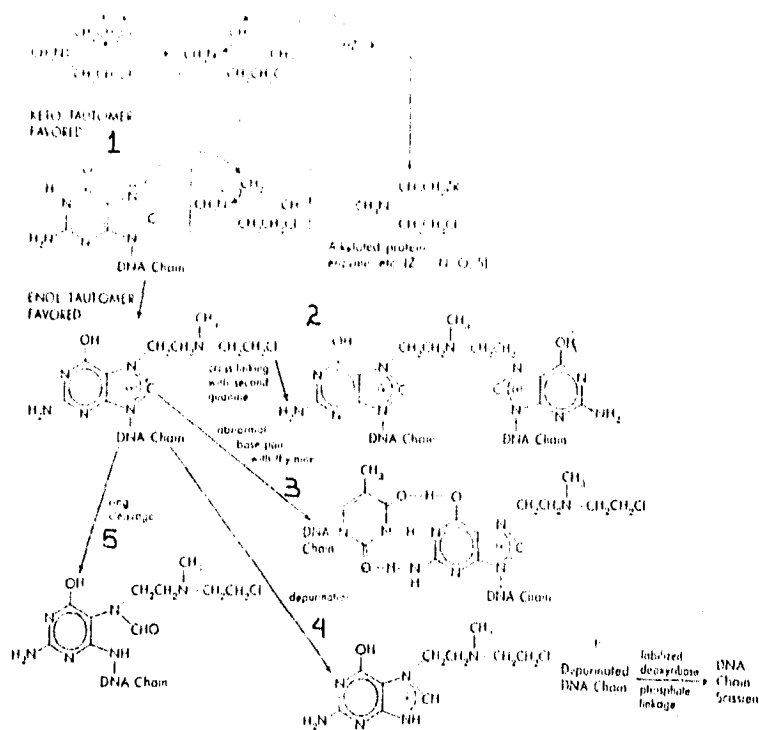


FIGURA 3. MECANISMO DE ACCION DE LOS AGENTES ALQUILANTES SOBRE EL ADN (Goodman 1986).

1. TAUTOMERO ENOL DE GUANINA FAVORECIDO.
2. ENTRECRUZAMIENTO CON UNA SEGUNDA GUANINA.
3. APAREAMIENTO ANORMAL G-T.
4. DEPURINACION Y EXCISION DE LA CADENA.
5. RUPTURA DEL ANILLO HETEROCICLICO.

Al parecer, se tiene una correlación entre la organización espacial de la cromatina y el acceso de los carcinógenos a ella; pues en el empaquetamiento del ADN en cromatina el ADN internucleosomal parece ser preferido como sitio de ataque de varios carcinógenos en oposición a lo encontrado en el ADN del nucleosoma. Al parecer las histonas del core y la histona H1 (por sus residuos de arginina y lisina) interactúan con los grupos fosfatos del ADN protegiendo los sitios nucleofílicos (Nehls 1985).

El mismo autor sugiere que las regiones de cromatina que transcriben presentan una mayor frecuencia de aductos carcinógenos que la cromatina inactiva. Además el ADN vecino a estos puntos de ataque de la matriz nuclear (que probablemente replican acompañados) y las partes activas transcripcionales del genoma parecen ser más accesibles a los carcinógenos.

El ADN organizado en donde existen muchas repeticiones muestran ser menos accesibles a los carcinógenos activos. Por otro lado la replicación influye en la unión de los aductos al ADN pues se han encontrado niveles elevados de ellos en el ADN sintetizado (Salamanca 1992).

Sin embargo, la capacidad alquilante de los compuestos, también depende de la estructura del agente. Shelby (1991) sugiere que este tipo de agentes tienen reacciones del tipo de Michael como ocurre con los sulfonatos, sin embargo algunos presentan la posibilidad de realizar una sustitución nucleofílica (SN), tal es el caso de las nitrosaminas por ejemplo la Etilnitrosourea, es un modelo de alquilante que sigue el modelo de SN1, en estas reacciones se tiene racemización, no importa el efecto estérico y se tiene un intermediario de reacción.

Existe una cantidad impresionante de agentes que actúan como alquilantes. algunos se presentan de forma directa, mientras que otros se forman dentro del mismo organismo, como es el caso de las nitrosemillas de las cuales se hablará en el capítulo siguiente.

5. NITRITO DE SODIO Y NITROCOMPUESTOS.

El nitrito de sodio tiene un peso molecular de 69 g /mol cuya fórmula es NaNO_2 . son cristales blancos o amarillentos son higroscópicos y muy solubles en agua y otros solventes polares. Puede ocurrir envenenamiento por ingestión, pero además puede ser usado como antidoto en casos de envenenamiento por cianuro, su efecto sistémico en el humano incluye alteraciones motoras, decremento de la presión arterial, dilatación arterial y venosa, náusea, vómito, meta- y carboxihemoglobinemia (Sax 1989).

Son muchas las fuentes de nitrito que se pueden encontrar pues los nitritos son componentes comunes de diversos alimentos y bebidas, usándose en cantidades considerables como aditivo (2000 mg/kg). Se ha comprobado que contribuyen a la formación de N-nitrosocompuestos. Además el nitrito presenta por si solo mecanismos de mutación tales como sustitución de bases o desfaseamientos del DNA en bacterias como Salmonella typhimurium (Balimandawa 1994).

Como mencione anteriormente el ión NO_2 no es un alquilante directo, sin embargo al combinarse con aminas y amidas en medio ácido, dan como resultado la formación de agentes alquilantes. Los nitritos se pueden encontrar en alta proporción en algunos vegetales, especialmente legumbres, ello se debe al uso de fertilizantes ricos en nitratos y nitritos.

Por otra parte, los nitratos constituyen una fuente adicional de nitritos, ya que son transformados por la nitratoreductasa presente en bacterias de la flora intestinal y en plantas (Fritsch 1985).

Dentro de la industria el NaNO_2 es utilizado en embutidos, pues al reaccionar con la mioglobina presente en el tejido animal, da así a la carne un color rojizo mejorando las propiedades organolépticas. Además es un agente muy efectivo contra la proliferación de esporas de *Clostridium botulinum*.

En la figura 4 se presenta el contenido aproximado de nitratos y nitritos en diversos alimentos.

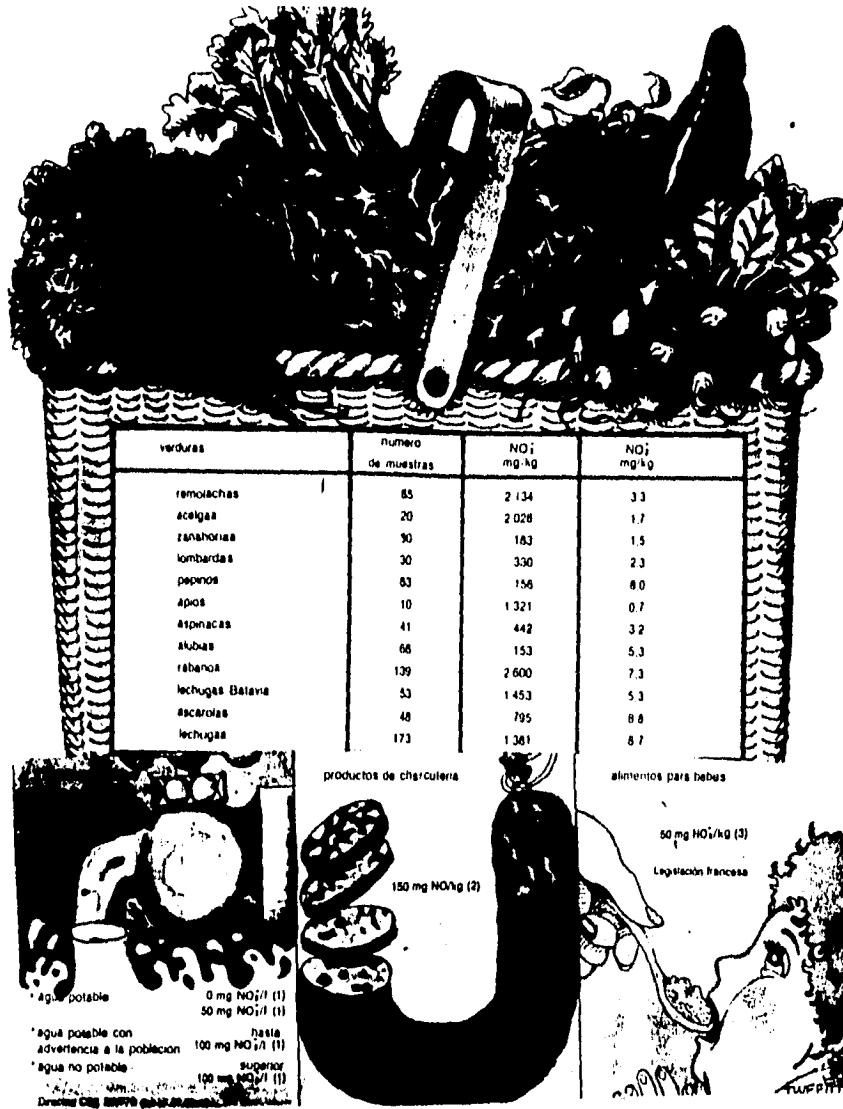


FIGURA 4 TABLA DEL CONTENIDO DE NITRATOS Y NITRITOS EN DIVERSOS ALIMENTOS (Fritsch 1985).

Durante el cocimiento fritura de proteínas se liberan aminoácidos como prolina, arginina, lisina, etc al igual que aminor secundarias como cadaverina y putrecina, estos compuestos reaccionan en el medio ácido del estómago con el ácido nitroso formado a partir del ion nitrito, formando así las nitrosaminas, las cuales son carcinógenas en especial para el tracto digestivo y urinario teniendo el mismo efecto sobre órganos reproductores, hígado y cerebro. El ADN puede metilarse o etilarse por la acción de las nitrosaminas recién formadas (Derache 1990). La figura 5 muestra las rutas metabólicas del nitrito dentro del organismo.

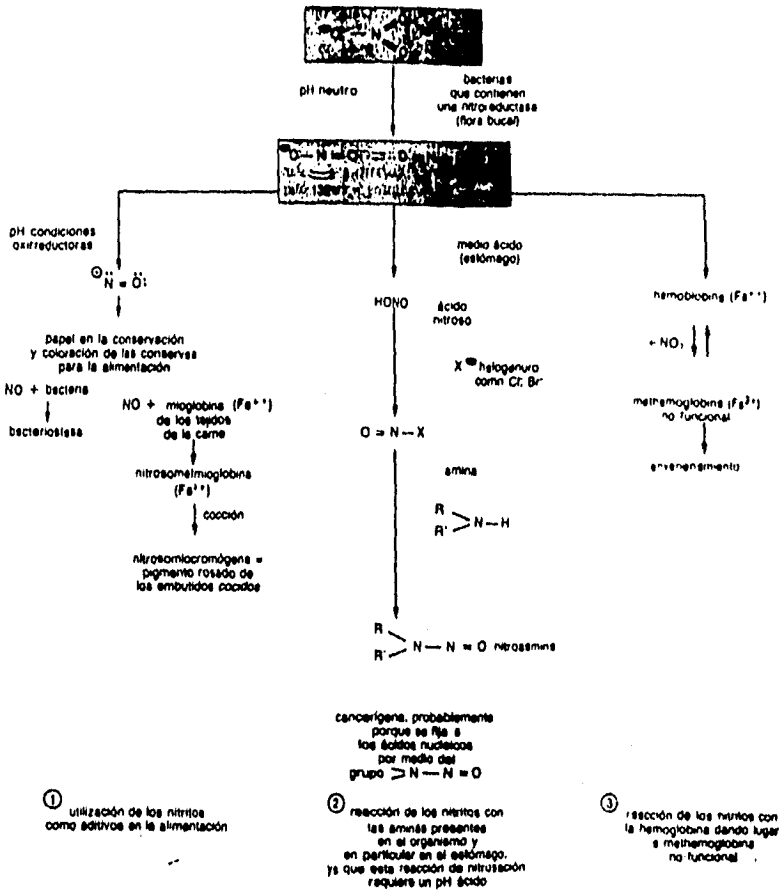


FIGURA 5. RUTAS METABOLICAS DE NITRATOS Y NITRITOS EN EL ORGANISMO (Fritsch 1985).

Dentro de los intermediarios de reacción que pueden presentar algún efecto, se tiene el ácido nitroso (NA), de acuerdo con Hartman (1994), el NA actúa indirectamente como alquilante junto con compuestos nitrosados que forman los denominados aductos, lo cual da un espectro en lo que se refiere a las mutaciones; por otra parte el NA induce entrecruzamientos entre las cadenas de ADN, que pueden provenir de dos residuos de G en una de las cadenas, lo que distorsiona el duplex y facilita una desaminación oxidativa de la citocina.

Algunos de los productos terminales que se pueden formar de este tipo de reacción son las nitrosaminas, estas son agentes alquilantes que tienen una vía de reacción de sustitución nucleofílica del tipo 1, al parecer presentan un mayor rendimiento en la alquilación de la posición 6 de la guanina, lo cual influye en la alta capacidad de estos compuestos para ocasionar mutaciones y carcinogénesis, también presentan efecto más pronunciado y prolongado que los metilanosulfonatos (Mc Caffrey 1994). Algunas nitrosaminas son utilizadas como antineoplásicos, pues éstas no necesitan activación ni degradación enzimática. El ion carbonio que se forma a partir de ellas es altamente electrofílico, por lo que pueden alquilar una gran variedad de sustancias y por supuesto de ocasionar entrecruzamientos en el ADN. Las nitrosaminas generalmente se utilizan como antitumorales y presentan efectos citotóxicos, tales como depresión de médula ósea reflejada en leucopenia y trombocitopenia (Goodman 1986).

Las nitrosaminas formadas endógenamente, generalmente no son detectables en sangre, pues se excretan muy rápidamente por orina o bien porque se forman pequeñas cantidades, además de su capacidad de reaccionar muy velozmente con el material celular. Al parecer la

cantidad de nitrosaminas formadas es proporcional al consumo de nitrato (Helmut 1984). El mismo autor indica que las nitrosaminas tienen al menos 20 sitios de alquilación. Algunas nitrosaminas requieren de activación enzimática, y se convierten en electrófilos al sufrir una oxidación, ejemplos de ellas son la dimetil, dietil y dibutilnitrosaminas, metilfenilnitrosamina y la streptozocina.

Dentro de los compuestos nitrosados se tiene a las nitrosoureas, algunas son carcinógenas y pueden activarse en solución acuosa espontáneamente, algunas de ellas generalmente se utilizan como antitumorales, dentro de las más conocidas se tienen la carmumustina, lomustina y semustina, y las que generalmente se usan dentro de protocolos de investigación son la metil y etilnitrosourea MeNU y EtNU. Las nitrosaminas presentan efectos citotóxicos, tales como depresión de la médula ósea reflejada en leucopenia y trombocitopenia (Goodman 1986); las figuras 6 y 7 presentan las formulas generales de las nitrosaminas y nitrosoureas respectivamente. Estas presentan el mecanismo de S_N1 , no se conoce que formen radicales libres. La EtNU la cual ha sido la más estudiada, se descompone espontáneamente (en un tiempo medio de 8 minutos) generando un ion reactivo etildiazonio, que es el responsable de la etilación del ADN en una docena de sitios diferentes (Nehls 1985).

La MeNU se ha reportado como un potente carcinógeno. Ehling (1991) reportó que este agente puede causar mutaciones dominantes letales en ratón, y al parecer en reportes consultados por él, presenta un mecanismo alquilante tanto *in vivo* como *in vitro*. En los resultados de su experimento, concluyó que el compuesto induce mutaciones específicas de locus en espermatogonias y en general en todas las células germinales con excepción del espermatozoide.

La MeNU es un derivado de la reacción en medio ácido del nitrito y la metilurea: esta en algunos protocolos como en el presentado por Bonatti en 1985 y Ehling en 1991. administran a los sujetos experimentales el compuesto terminal. Sin embargo Guzmán en 1994. reporta haber obtenido reacciones de nitrosación in vivo. utilizando como modelo Drosophila melanogaster: pensando en lo anterior, nosotros intentamos llevar a cabo una nitrosación in vivo al administrar al ratón vía oral nitrito y metilurea en solución acuosa. La metilurea tiene una fórmula condensada de $C_2H_6N_2O$. un peso molecular de 74.1 g/mol. se presenta como cristales con un punto de fusión de 101 grados. muy soluble en agua. se ha reportado que es moderadamente tóxica por ingestión. reacciona con agentes oxidantes. y al descomponerse al calor libera vapores tóxicos de óxidos nitrosos (Sax 1989).

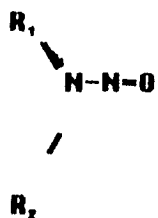


FIGURA 6. FORMULA GENERAL DE LAS NITROSAMINAS.

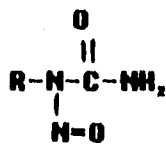


FIGURA 7. FORMULA GENERAL DE LAS NITROSOUREAS.

6. CLOROFILINA Y AGENTES ANTIOXIDANTES

Debido a que el ser humano está constantemente expuesto a diversos agentes mutágenos y carcinógenos, es necesario prevenir de alguna manera el efecto de ellos. Una opción viable para ello es el consumo de agentes antioxidantes tales como vitamina C y E, las cuales han demostrado tener la capacidad de influir en la respuesta del organismo cuando se expone a un mutágeno, cuando estos compuestos se consumen en la dieta (Chorvaticova 1991)

Los antioxidantes son efectivos depuradores o exterminadores de radicales libres, actúan sinérgicamente en la actividad biotransformadora de las enzimas hepáticas y en la prevención de la formación de nitrosaminas en el tracto digestivo (Chorvaticova 1991) ; por otra parte Aidoo (1994) dice que los estudios epidemiológicos indican que las dietas ricas en antioxidantes pueden reducir el riesgo de ciertos tipos de cáncer en el humano. Estos agentes son metabolizados y excretados rápidamente, por lo que no representan peligro para el consumidor (Nobuyudiu 1991)

Este tipo de agentes, generalmente actúan como desmutágenos o interceptores moleculares, es decir, previenen la formación de mutágenos o los atrapan vía tejido y organización celular. La capacidad de ellos para interceptar mutágenos depende de la fisicoquímica de las especies interactuantes, y del contenido de ellas en la dieta (Aidoo 1994).

Uno de los antioxidantes que han demostrado tener un amplio espectro de acción en este rubro es la clorofilina (CFN), un derivado soluble en agua de la clorofila, la cual es sometida a hidrólisis

alcalina sustituyendo el grupo fitol y el metilo de la fórmula original por sodio o potasio dando una sal soluble. Por otra parte al tratarse la clorofila con ácidos es posible remover el magnesio del centro de la estructura, sustituyéndolo por otros metales tales como el hierro o el cobre. La clorofilina es usada como colorante de jabones, aceites, grasas, ceras y como preservador en licores, cosméticos y perfumes, en vulcanización y agentes desodorantes en veterinaria se utiliza para la reducción de olores y como promotor de el sanamiento de lesiones cutáneas. La clorofilina es un polvo de color verde obscuro cuya fórmula es $C_{55}H_{72}N_4Na_2CuO_6$ con peso molecular de 722.14 g/mol.

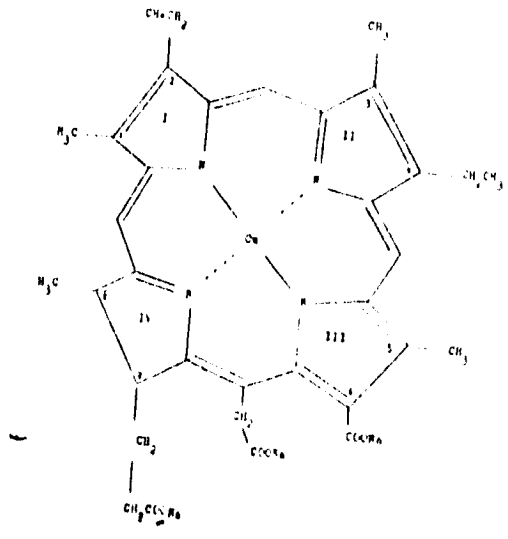


FIGURA 8. FORMULA DE LA CLOROFILA (ALDRICH 1993)

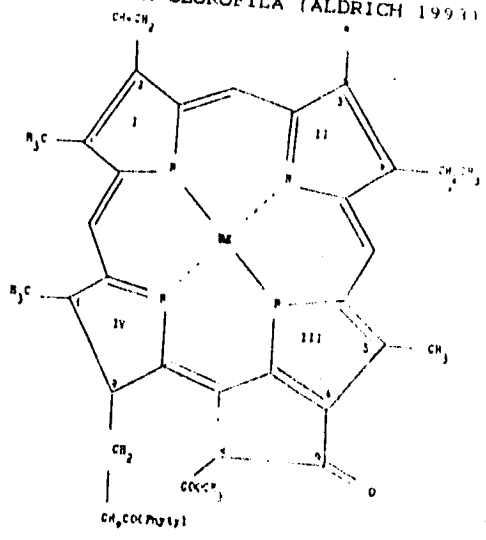


FIGURA 9. FORMULA DE LA CLOROFILINA (ALDRICH 1993)

La clorofila (CFL) ha mostrado ser responsable mayormente de la actividad antimutagénica de ciertos extractos vegetales (Wagner 1991), y al parecer el alto contenido de ella en plantas verdes es lo que se estima potencialmente para que estas presenten actividad antimutágena y anticarcinógena (Gentile 1991).

Sin embargo el mismo autor ha encontrado reportado que los extractos de plantas fotosintéticas ricas en CFL también tienen una alta efectividad en la activación de promutágenos dependiendo del contenido en ellas de enzimas tales como las peroxidasas

Al parecer no existe una diferencia en el mecanismo de acción de la CLF y CFN, y se sugiere que ambas actúan como interceptores moleculares. De acuerdo con lo encontrado por Dashwood (1992) cuando se administra CFN vía oral, ésta reduce la absorción de aminometaimidazolquinoleína (IQ) en intestino y es por ello que la unión de IQ a ADN disminuye, al afectar la distribución y metabolismo de IQ. El autor propone que la CFN opera como un desmutágeno o interceptor molecular al formar complejos estequiométricos 2:1 con IQ, facilitando su excreción vía heces.

Por otra parte dentro del mismo estudio se propone que cuando la IQ actúa en tejido, la baja frecuencia de la unión del mutágeno al ADN, se debe a una inhibición enzimática en el citocromo p450IA2, acompañado de un aumento en el compuesto no metabolizado (80%), que es fácilmente eliminado en orina, y por otra parte sugiere la interacción de la CFN con moléculas planas incluyendo procarcinógenos y sus metabolitos activos, con los cuales forma complejos disociables no covalentes.

El mismo Dahswood (1993) basado en otros estudios y en el propio propone 3 mecanismos por los cuales la CFN interactúa reversiblemente.

1. Disminuye la absorción o distribución de los carcinógenos
2. Disminuye la concentración efectiva del sustrato en células blanco.
3. Bloquea la interacción del ADN con compuestos electrificilos.

Se cree que las clorofilas forman complejos con moléculas planas, y que la adición de grupos metilo sobre o bajo el plano de heterociclo de una amina puede interferir el transiape CFL-Mutágeno. La solubilidad del sustrato y la interacción con CFL se puede alterar con funciones nitro, disminuyendo la interacción entre ambos compuestos (Dahswood 1993).

Por otra parte Dsahwood (1993) en el mismo trabajo sugiere que el remplazo por cobre en la molécula de CFN dentro del núcleo protoporfirínico es menos crítica para la inhibición que la presencia del anillo pirrólico. Al parecer a nivel de tejido *in vitro* la función de la CFN es formar complejos con el citocromo P450 disminuyendo la actividad enzimática de él; sin embargo *in vivo* no se tiene claro el mecanismo mediante el cual la CFN disminuye la activación de carcinógenos a este nivel.

Por otra parte la CFLN exhibe una actividad antitransformante en células tratadas con mezclas complejas de contaminantes aéreos de acuerdo con Chen (1994). El propone que ello se debe a la intercepción de radicales libres en especial de oxígeno y a la interacción con los grupos activos de compuestos mutagénicos.

Los mecanismos mencionados son congruentes con los resultados obtenidos en otros estudios. por ejemplo Gentile (1991) apoya la hipótesis de que la CFN interactúa directamente con el grupo activo de agentes tales como la 4-nitroso-orto-fenilendiamina. mientras que Pérez (1994). piensa que la actividad del compuesto se debe a la formación de complejos entre la CFN y el mutágeno. inactivándolo o bien interfiriendo su absorción como encontró que ocurre con la adriamicina.

Con todo lo anterior. nosotros esperamos probar si la clorofilina puede interferir con el efecto clastógeno de las nitrosaminas producto de la administración de nitrito de sodio a nivel de tejido por lo que se eligió la vía intraperitoneal para la primera. con el fin de no intervenir en las reacciones de nitrosación.

**MATERIAL
Y
METODO**

MATERIAL**MATERIAL DE CRISTALERIA:**

8 vasos de precipitados.

3 vidrios de reloj.

4 vasos coppling.

portaobjetos.

cubreobjetos.

MATERIAL DIVERSO:

balanza granataria.

balanza analitica.

espátula.

pinzas

jeringas de insulina.

sonda epigástrica metálica.

tijeras quirúrgicas

jaulas.

microscopio de contraste de fases.

MATERIAL BIOLÓGICO:

60 ratones machos cepa NHI.

REACTIVOS:

agua purificada.

metilurea.

nitrito de sodio.

clorofilina.

metanol.

Giemsa.

buffer de fosfato.

resina.

xilol.

aceite de inmersión.

METODO EXPERIMENTAL

1. Se realizaron los cálculos para la preparación de soluciones de acuerdo a la posología determinada previamente para el trabajo experimental, teniéndose que para metilurea la dosis a aplicar correspondió a 8 mg/kg de peso, para nitrito de sodio dosis de 10 mg/kg, 15 mg/kg y 20 mg/kg, mientras que para la clorofilina se consideró una dosis de 4 mg/kg de peso, por lo que se prepararon soluciones con concentraciones de 0.88 mg/ml de metilurea, 1.1 mg/ml, 1.65 mg/ml y 2 mg/ml de nitrito de sodio y 0.4 mg/ml de clorofilina, todos ellos disueltos en agua.

2. Se seleccionaron 60 ratones cepa NIH formando 10 lotes de 6 ratones cada uno, pesándose y marcándose previamente, distribuyéndolos de manera que el peso de los lotes fuera uniforme.

3. Una vez ordenados se le tomaron a todos los lotes muestras, mediante la técnica de frotis de sangre periférica obtenida por un corte en la porción terminal de la cola del ratón, depositando una gota de sangre en un portaobjetos previamente desengrasado y limpio, realizando la extensión de la gota con la ayuda de otro portaobjetos colocado en un ángulo de 45 grados del primero. Las preparaciones se dejaron secar al aire y se les etiquetó con el número de lote y ratón; dichas preparaciones se designaron tiempo T0 o lotes antes de la administración.

4. Una vez realizadas las preparaciones (T0), se procedió a la administración de nuestras sustancias por vía oral, con excepción de la clorofilina la cual se administró por vía intraperitoneal 30

minutos después de la administración oral, todos en un volumen de 0.3 ml de cada agente siguiendo el orden presentado a continuación:

LOTE	REACTIVO
1	AGUA (testigo negativo)
2	METILUREA 8 mg/kg
3	METILUREA 8 mg/kg + NITRITO DE SODIO 10 mg/kg
4	NITRITO DE SODIO 10 mg/kg
5	NITRITO DE SODIO 10 mg/kg + CLOROFILINA 4 mg/kg
6	NITRITO DE SODIO 15 mg/kg
7	NITRITO DE SODIO 15 mg/kg + CLOROFILINA 4 mg/kg
8	NITRITO DE SODIO 20 mg/kg
9	NITRITO DE SODIO 20 mg/kg + CLOROFILINA 4 mg/kg
10	CLOROFILINA 4 mg/kg

5. La inducción oral se realizó mediante una sonda epigástrica metálica adaptada a una jeringa plástica para insulina. La técnica consiste en sujetar al ratón tomándolo de la piel a la altura del cuello para posteriormente asegurarlo tomando la cola y curvándolo un poco para inmovilizarlo; se coloca en posición vertical al ratón y se introduce la sonda en la cavidad oral hasta llegar al esófago, vertiendo el contenido de la jeringa, esto con el fin de evitar pérdidas durante la administración.

6. La administración se efectuó nuevamente a las 24.48 y 72 horas después de la primera administración.

7. A las 96 horas después de la administración inicial, se procedió a tomar los pesos de los animales y muestras sanguíneas a los 6 lotes de animales de la manera indicada en el apartado 3. Estas muestras se denominan tiempo uno (T1) o lotes administrados. Posteriormente se procedió a sacrificar a los animales.

8. Los frotis sanguíneos obtenidos en los tiempos T0 y T1 se fijaron en metanol absoluto sumergiendo cada una de las laminillas por 3 minutos en un vaso coppling.

9. Una vez fijadas las laminillas se realizaron pruebas de tinción empleando colorante de Giemsa en buffer de 6.8 a 7.0. Para ello cada laminilla de prueba se observó en el microscopio seleccionando las mejores condiciones de tiempo para observar en las laminillas el correcto contraste y coloración celular.

10. Una vez obtenidas las condiciones óptimas de tinción que en este caso fue un tiempo de 15 minutos, se procedió a teñir por inmersión en un vaso de coppling.

11. Una vez teñidas las preparaciones, se procedió a la lectura al microscopio de cada una de ellas tomando 5 animales por cada lote, considerando como parámetros a evaluar la diferencia de color entre dos tipos de células: los eritrocitos normocrómicos se observan al microscopio a 100x como células de color rosa, mientras que los eritrocitos policromáticos presentan una coloración azulada. Se procede a contar 1000 células cuantificando de acuerdo a la diferencia de coloraciones cuantas eran normocrómicas y cuantas policromáticas.

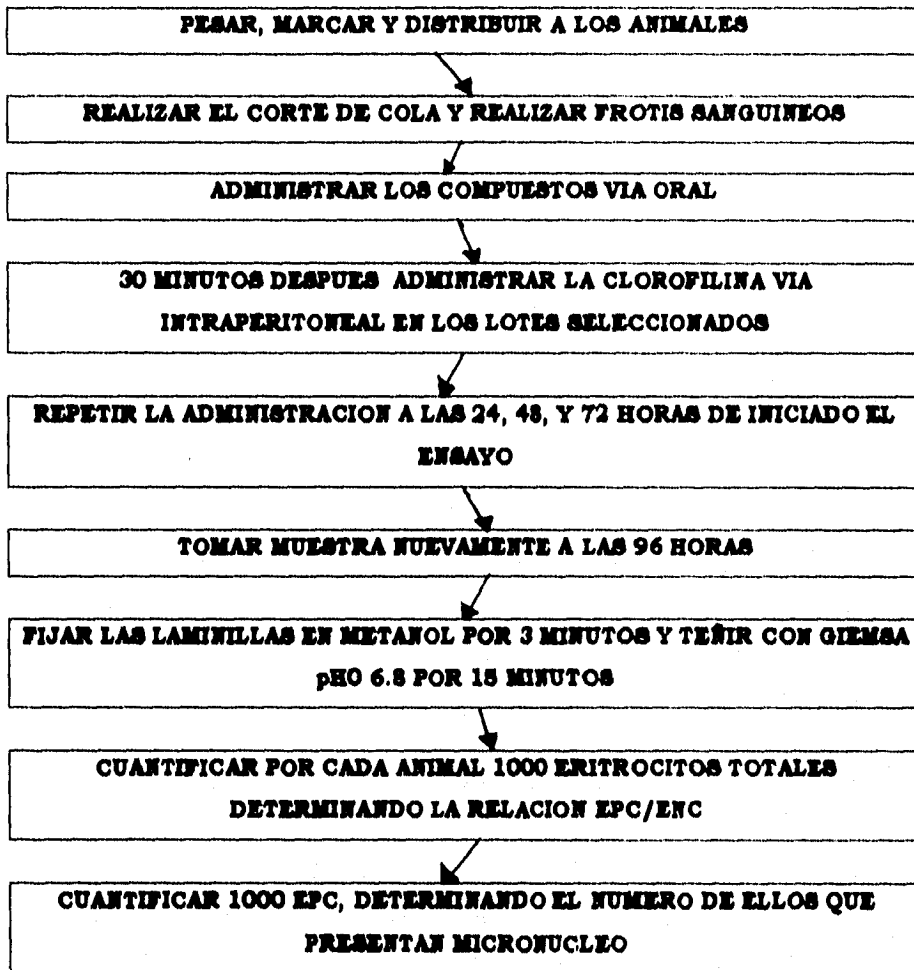
12. También se cuantifican en 1000 eritrocitos policromáticos cuantos presentan micronúcleos, los cuales se observan como corpúsculos redondos, pequeños y bien definidos con una coloración púrpura.

13. Los resultados obtenidos de los pesos se analizaron mediante la prueba de ANOVA realizando las comparaciones entre el antes y el después para cada lote.

14. Los resultados obtenidos experimentalmente en lo que se refiere a la frecuencia de EPCMN, se analizaron utilizando el programa estadístico PLOT 50, mediante las pruebas de Friedman para Medidas Repetidas con Análisis de Varianza por Rangos, en los casos en los que se compararon el estado basal y el estado final, es decir, tiempo 0 y tiempo 1.

15. Por otra parte se realizó la prueba de Kruskal-Wallis de un Sentido con Análisis de Varianza en Rangos para la comparación de los distintos lotes entre sí a tiempo 1; tanto la prueba de Friedman como la de Kruskal-Wallis son pruebas no paramétricas, ya que siguiendo la recomendación de Daniels (1988), cuando no se conoce la distribución de las muestras no es pertinente realizar pruebas estadísticas de tipo paramétrico.

16. En lo que se refiere a la relación EPC/ENC se evaluó la significancia estadística por comparación con las tablas de Kastenbaum-Bowman (1970) basadas en las pruebas propuestas por Birnbaum y Kimball.

DIAGRAMA DE FLUJO

RESULTADOS

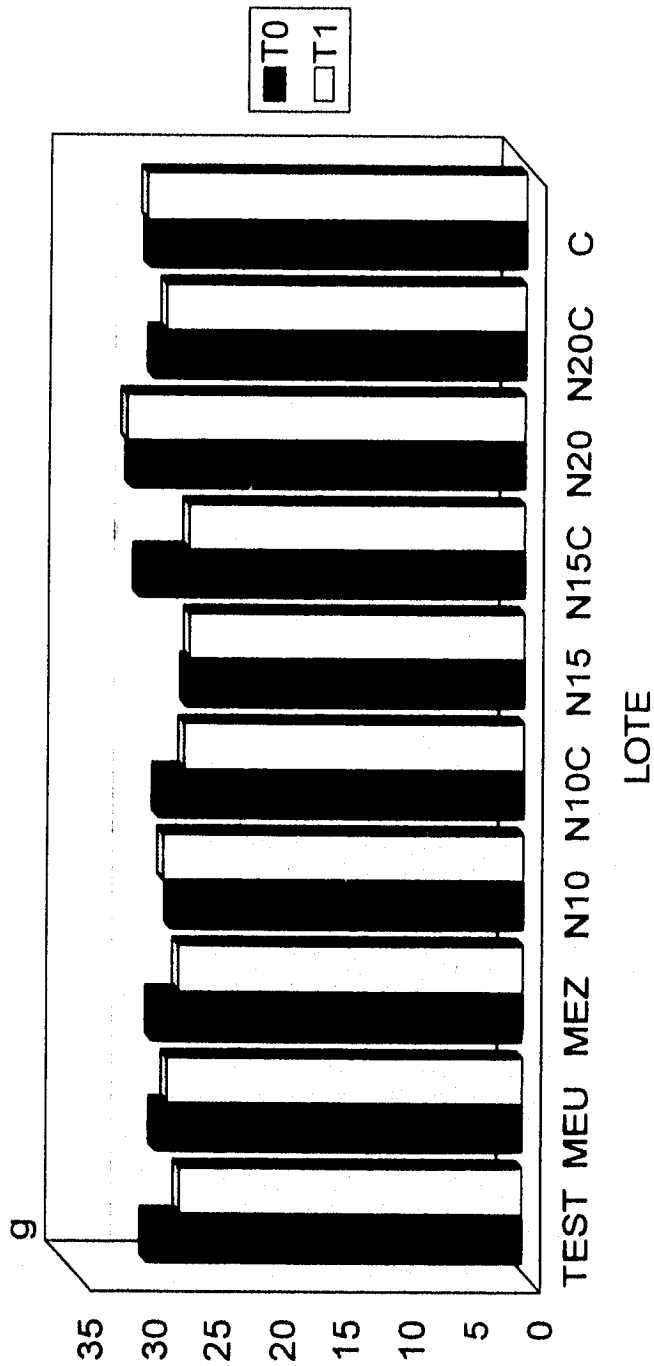
RESULTADOS

En las siguientes tablas y gráficas se presentan los resultados obtenidos a partir del trabajo experimental

En la tabla 1 se reportan los resultados promedio del peso de los animales, los cuales fueron evaluados mediante la prueba de ANOVA $p=0.05$ realizando comparaciones entre T0 y T1. Para cada lote, sin que se observaran resultados estadísticamente significativos. Como se puede ver los pesos de los animales no varían mucho entre sí teniéndose un rango de entre 26 a 31 g de peso, en donde la media de medias para T0 es de 28.76 mientras que para T1 tiene un valor de 27.57, lo que indica que el tratamiento usado no repercute significativamente en el peso de los animales. Lo anterior se aprecia claramente en la gráfica 1.

TABLA 1. RESULTADOS DE LOS PESOS PROMEDIO POR LOTE ANTES (T0) DESPUES (T1) DEL TRATAMIENTO NO SE TIENEN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON LA PRUEBA DE ANOVA P=0.05				
AGENTE	DOSIS mg/kg	PESO		
		DIA 1 (T0) X(+/-)E.E.	DIA 4 (T1) E(+/-)E.E.	
TESTIGO	0	29.20±0.52	28.58±1.10	
MEU	8	28.56±1.11	27.68±0.94	
MEZ	10+8	28.88±0.93	26.72±0.63	
N	10	27.42±0.42	28.02±0.44	
N+C	10+4	28.42±0.97	26.32±1.37	
N	15	28.18±0.90	25.92±0.93	
N+C	15+4	30.00±0.93	26.00±1.47	
N	20	30.84±0.90	31.02±0.71	
N+C	20+4	28.99±1.47	28.00±1.63	
C	4	29.34±0.43	29.55±0.18	

TEST-TESTIGO, MEU-METILUREA, MEZN+M- MEZCLA DE NITRITO + METILUREA, N- NITRITO DE SODIO, C o CFLN-CLOROFILINA, T0- TIEMPO 0 o TASA BASAL, T1- TIEMPO 1 o TASA TERMINAL.



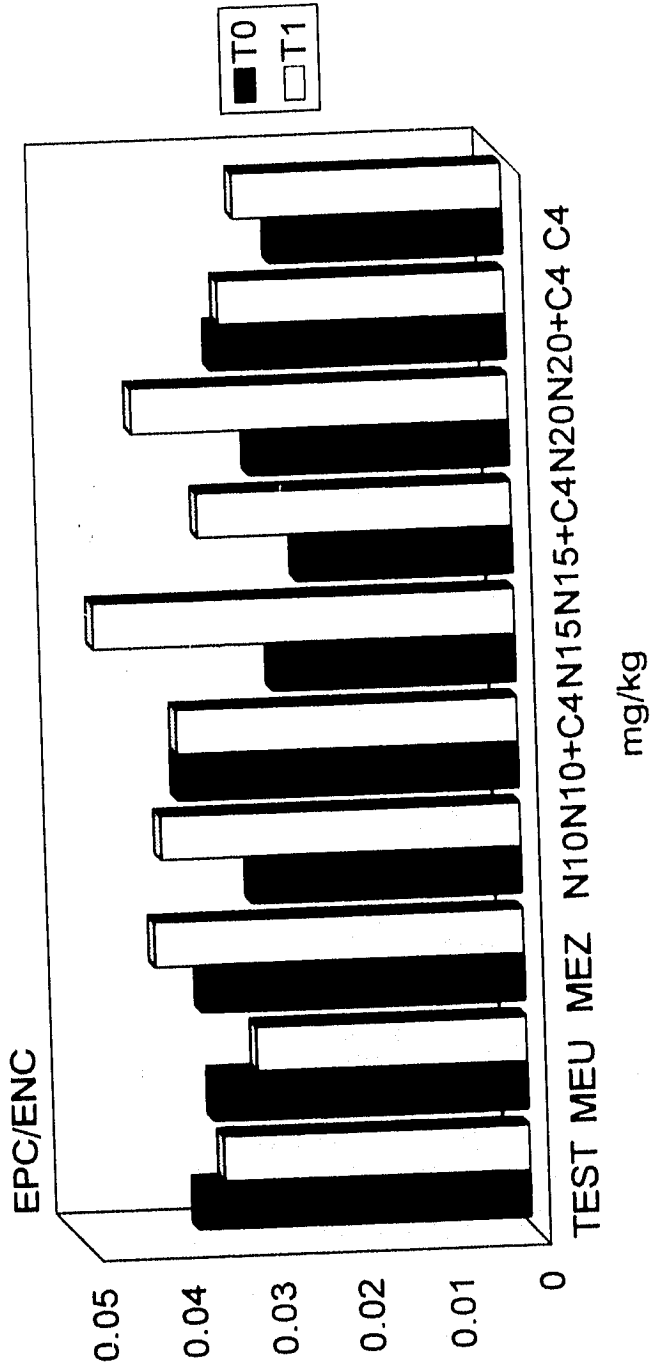
GRAFICA 1. RESULTADOS DE LOS PESOS PROMEDIO POR LOTE ANTES (T0) Y DESPUES (T1) DEL TRATAMIENTO. NO SE TIENEN DIFERENCIAS ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON LA PRUEBA DE ANOVA $P=0.05$

En lo referente a la relación EPC/ENC, la tabla 2 muestra los resultados tanto a T0 como a T1 con sus respectivas desviaciones estándar. En T0, la tasa se sitúa entre 0.026 y 0.038, mientras que en T1 el valor mínimo es de 0.030 y el máximo que corresponde a la dosis de nitrato de 15 mg/kg se sitúa en 0.047, si bien no se tienen diferencias estadísticas significativas con la tablas de Kastembau-Bowman, en los casos donde se administró nitrato de sodio se observa un incremento moderado, lo anterior se aprecia mejor en la gráfica 2, la cual contiene los datos graficados a T0 y T1 de cada lote.

TABLA 2. RESULTADOS DE LA RELACION DE EPC/ENC ANTES (T0) Y DESPUES (T1) DEL EXPERIMENTO. NO SE TIENEN DIFERENCIAS ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS AL REALIZAR EL ANALISIS CON LAS TABLAS D DE KASTEMBAU-BOWMAN P=0.01

AGENTE	DOSIS mg/kg	EPC/ENC DIA 1 (T0) X(+/-)D.E.	EPC/ENC DIA 4 (T1) X(+/-)D.E.
TESTIGO	0	0.037±0.007	0.034±0.006
MEU	8	0.035±0.005	0.030±0.004
MEZ	10+8	0.038±0.010	0.041±0.002
N	10	0.030±0.004	0.040±0.008
N+C	10+4	0.038±0.008	0.038±0.008
N	15	0.027±0.002	0.047±0.004
N+C	15+4	0.024±0.007	0.035±0.018
N	20	0.029±0.005	0.042±0.014
N+C	20+4	0.033±0.007	0.032±0.008
C	4	0.028±0.006	0.030±0.006

TEST- TESTIGO, MEU- METILUREA, MEZ N+M- MEZCLA DE NITRITO METILUREA, N- NITRITO DE SODIO, C o CFLN- CLOROFILINA, EPC-ERITROCITOS POLICROMÁTICOS, ENC-ERITROCITOS NORMOCROMICOS, T0- TIEMPO 0 o TASA BASAL, T1- TIEMPO 1 o TASA TERMINAL.



GRAFICA 2. RELACION ENTRE LA FRECUENCIA DE EPC/ENC EN 1000 CELULAS AL INICIO T0 Y FINAL T1 DEL ENSAYO. NO SE OBSERVARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS PRUEBA DE KASTEMBAUM-BOWMAN P=0.01

En la tabla 3 se presentan los resultados de todos los animales con respecto a la relación de eritrocitos policromáticos/normocrómicos, como se puede observar el valor más alto es 0.066 registrado para el ratón 4 del lote de nitrito a la dosis de 15 mg/kg y clorofilina, mientras que en la mayoría de los demás casos la tasa se encuentra entre 0.020 y 0.050, por lo que se puede establecer que el rango de la relación se encuentra entre estos 2 valores para los animales utilizados en el experimento tanto a T0 como a T1.

TABLA 4. RELACION EPC/ENC POR RATON EN CADA LOTE A T0 Y T1.

LOTE	RAT 1	RAT 2	RAT 3	RAT 4	RAT 5
1 T- T0	0.034	0.050	0.038	0.036	0.030
1 T1	0.029	0.027	0.041	0.034	0.034
2 MEU T0	0.044	0.030	0.031	0.037	0.036
2 T1	0.034	0.031	0.029	0.033	0.023
3 MEZ T0	0.026	0.031	0.034	0.036	0.053
3 T1	0.043	0.040	0.043	0.037	0.042
4 N 10 T0	0.028	0.029	0.030	0.026	0.037
4 T1	0.053	0.050	0.035	0.036	0.043
5 N10+C T0	0.047	0.028	0.037	0.033	0.047
5 T1	0.040	0.042	0.049	0.024	0.037
6 N15 T0	0.029	0.029	0.023	0.025	0.033
6 T1	0.050	0.054	0.044	0.042	0.046
7 N15+C T0	0.014	0.024	0.026	0.035	0.025
7 T1	0.017	0.034	0.030	0.066*	0.031
8 N20 T0	0.033	0.019	0.029	0.032	0.033
8 T1	0.062	0.034	0.053	0.031	0.030
9 N20+C T0	0.033	0.025	0.028	0.038	0.044
9 T1	0.042	0.020	0.038	0.029	0.034
10 CLFN T0	0.033	0.035	0.021	0.021	0.023
10 T1	0.030	0.021	0.040	0.031	0.028

TEST- TESTIGO, MEU- METILUREA, MEZ- MEZCLA DE NITRITO+METILUREA, N-NITRITO DE SODIO, C o CLFN-CLOROFILINA, T0- TIEMPO 0 o TAJA BASAL, T1- TIEMPO 1 o TAJA TERMINAL.

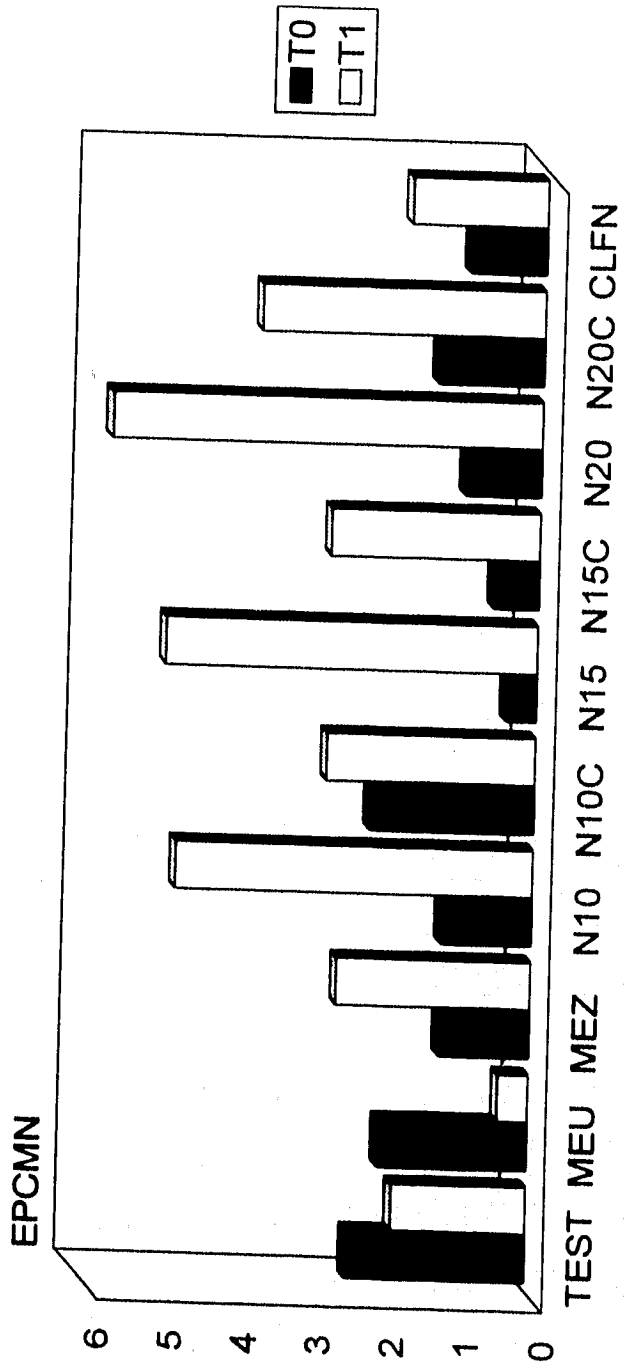
En lo referente a la frecuencia de EPCMN la tabla 4 resume los resultados promedios tanto antes como después del tratamiento con sus respectivos errores estándar para cada lote, como se puede apreciar en los resultados basales se tiene valores de 0.4 a 2.4, sin que se tengan diferencias significativas al compararse entre los lotes, lo que indica una distribución uniforme en la frecuencia a T0. Dentro de la misma tabla se presentan los lotes con diferencias estadísticamente significativas tanto para la prueba de Friedman en la comparación entre la tasa basal y la terminal de cada lote, como para la de Kruskal-Wallis, que se utilizó para comparar las tasas terminales entre todos los lotes. Como se puede observar, los lotes administrados con nitrato tienen un incremento marcado de EPCMN, dando significancia con respecto a la tasa basal de cada uno de acuerdo a la prueba de Friedman. Por otra parte la prueba de Kruskal-Wallis revela diferencias significativas de estos tres lotes contra el resto, sin embargo el valor de las medias de ellos se encuentra muy cercano, por lo que no se tiene significancia en el incremento de la frecuencia entre los 3 lotes.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	TABLA 4. RESULTADOS DE LA FRECUENCIA DE EPCMN EN 1000 EPC								
2	ANTES (T₀) Y DESPUES (T₁) DEL TRATAMIENTO, ANALIZADOS CON LAS								
3	PRUEBAS DE FRIEDMAN Y KRUSKAL-WALLIS AMBAS CON UNA								
4	SIGNIFICANCIA DEL 5%.								
5									
6									
7	AGENTE	DOSIS	EPCMN/1000EPC	EPCMN/1000EPC					
8		mg/kg	DIA 0 (T ₀)	(X \pm -E E)	DIA 4 (T ₁)	(X \pm -E E)			
9									
10	TEST		0	2.4 \pm -0.08		1.8 \pm -0.40			
11	MEU(*)(**)		8	2.0 \pm -0.70		0.4 \pm -0.31			
12	MEZ		10 \pm 8	1.2 \pm -0.73		2.6 \pm -0.69			
13	N(*)(**)		10	1.2 \pm -0.68		4.8 \pm -0.37			
14	N+C(*)(**)		10 \pm 4	2.2 \pm -0.73		2.8 \pm -0.37			
15	N(*)(**)		15	0.4 \pm -0.24		5.0 \pm -0.31			
16	N+C(*)(**)		15 \pm 4	0.6 \pm -0.24		2.8 \pm -0.40			
17	N(*)(**)		20	1.0 \pm -0.31		5.8 \pm -0.86			
18	N+C(*)(**)		20 \pm 4	1.4 \pm -0.24		3.8 \pm -0.86			
19	C		4	1.0 \pm -0.31		1.8 \pm -0.37			
20									
21	(*) SIGNIFICANCIA ESTADISTICA PARA LA PRUEBA DE FRIEDMAN P=0.05								
22	(**) SIGNIFICANCIA ESTADISTICA PARA LA PRUEBA DE KRUSKAL								
23	WALLIS P=0.05								

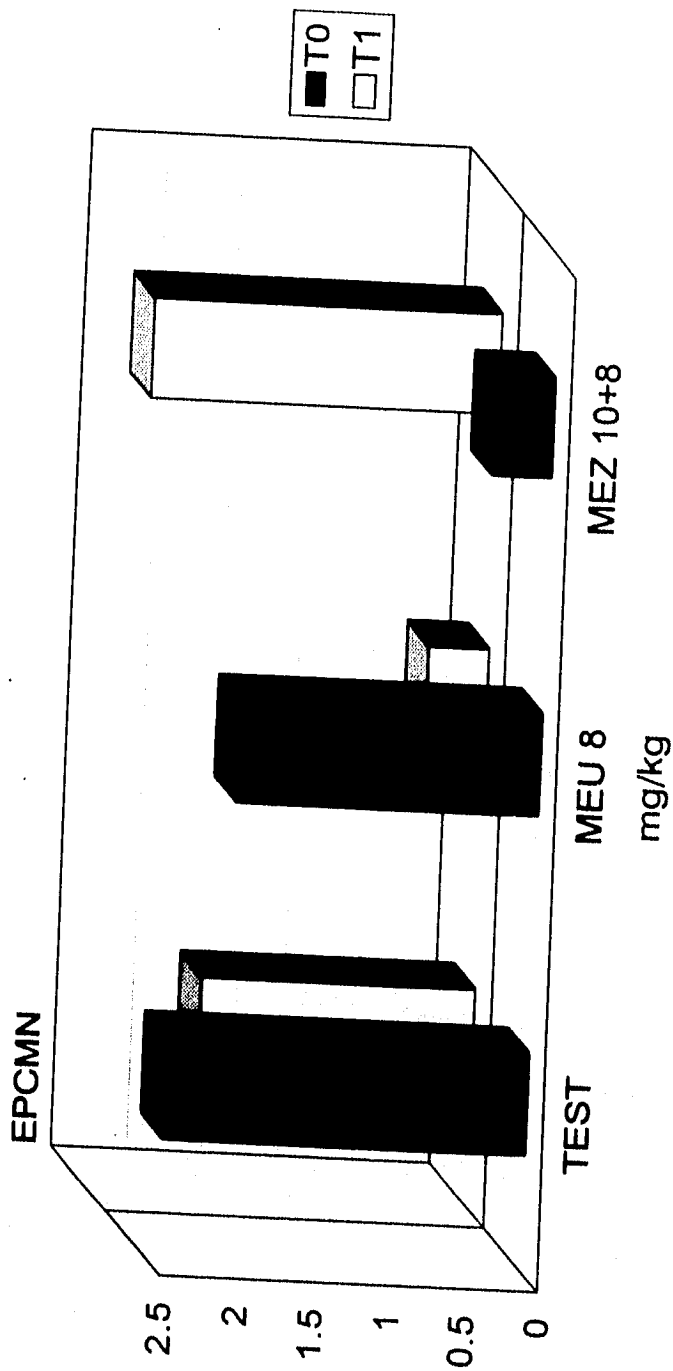
TEST-TESTIGO, MEU- METILUREA, MEZ-MEZCLA DE NITRITO DE SODIO + METILUREA, N- NITRITO DE SODIO, C o CLFN- CLOROFILINA, T₀- TIEMPO 0 O TASA BASAL, TIEMPO 1 O TASA TERMINAL.

Las grafica 3 presenta los resultados anteriores en histograma, como se puede apreciar, las tasa basales de todos los lotes tienen un comportamiento semejante al tener valores de entre 0.4 a 2.6. En la tasa terminal se observan incrementos en algunos lotes, por lo que estos se presentan de manera concreta en las gráficas siguientes. La gráfica 4 se refiere a los resultados de los lotes testigo, metilurea y mezcla, como se puede observar estos tres grupos tienen una tasa de EPCMN entre 0 y 2.6, tanto antes como después del tratamiento, en el caso de la metilurea, la tasa terminal es la menor registrada, dando diferencia estadísticamente significativa.

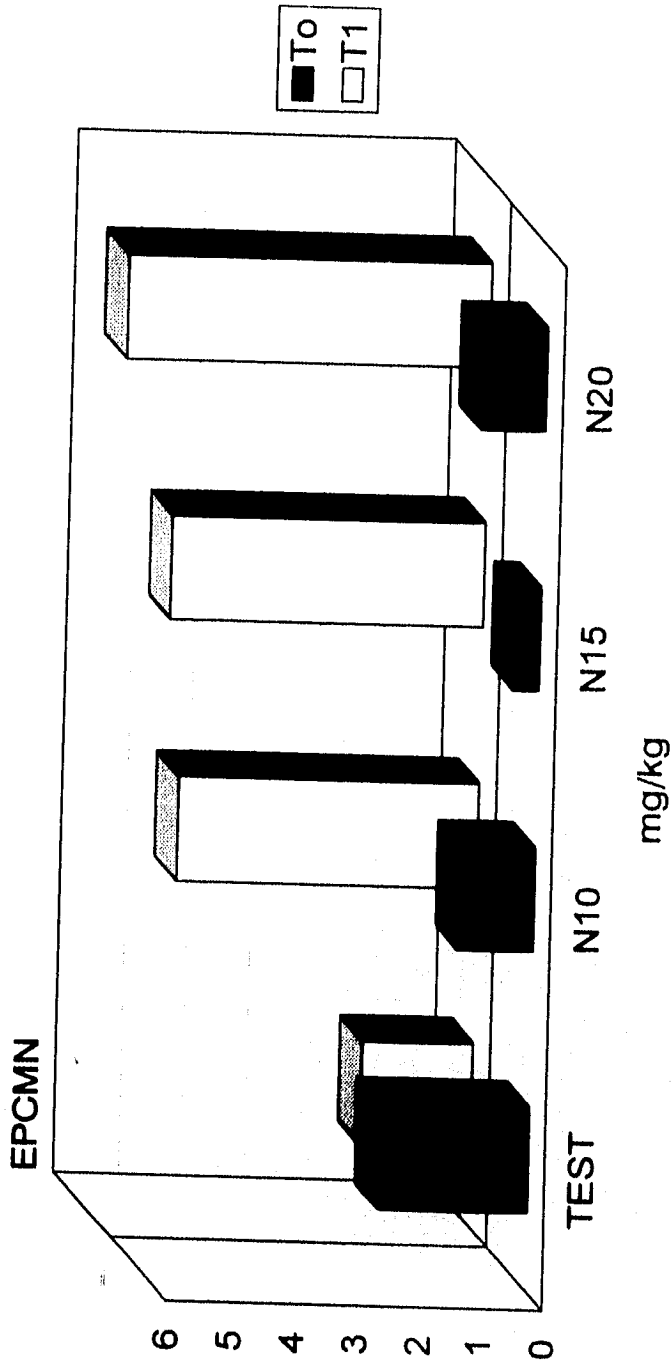
por otra parte la gráfica 5 presenta a los lotes administrados con nitrito y el testigo negativo. como se puede apreciar en los tres casos las tasa teminales de micronúcleos tienen valores muy superiores a los encontrados en el testigo y con respecto a su tasa basal. pero muy cercanos entre ellos. La gráfica 6 presenta la frecuencia de EPCMN en los lotes administrados con nitrito, los administrados con nitrito y clorofilina además del testigo negativo y el testigo de clorofilina. en esta gráfica es fácilmente observable como los lotes tratados con clorofilina disminuyen la tasa de micronúcleos con respecto a los lotes administrados únicamente con nitrito de sodio.



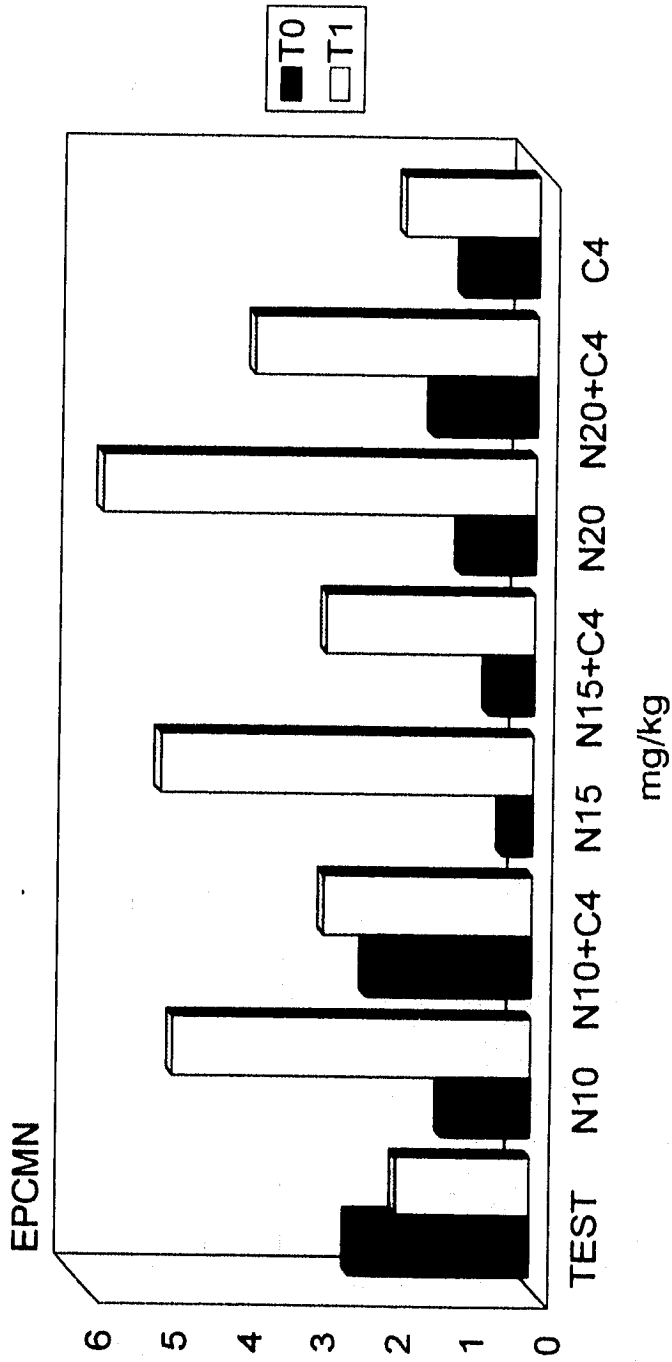
GRAFICA. 3 FRECUENCIA DE EPCMN ANTES (T0) Y DESPUES DEL TRATAMIENTO (T1).SIGNIFICANCIA ESTADISTICA PARA LA PRUEBA DE FRIEDMAN (*) Y KRUSKALL WALLIS (***) AMBAS A P=0.05



GRAFICA 4. FRECUENCIA DE EPCMN INDUCIDOS POR METILUREA Y SU MEZCLA CON NITRITO DE SODIO. SE TIENE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA EN EL LOTE 2 PARA LA PRUEBA DE FRIEDMAN (*) Y KRUSKALL WALLIS (**)
 AMBAS A P=0.05



GRAFICA 5.FRECUENCIA DE EPCMN PRODUCIDOS POR NITRITO DE SODIO A T0 Y T1. DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS PARA LA PRUEBA DE FRIEDMAN Y KRUSKALL-WALLIS AMBAS A P=0.05



GRAFICA 6. FRECUENCIA DE EPCMN EN 1000 EPC, ANTES T0 Y DESPUES T1 DEL EXPERIMENTO. DIFERENCIAS ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS EN LA PRUEBAS DE FRIEDMAN(*) Y KRUSKALL-WALLIS(**) AMBAS A P=0.05

Por último la tabla 5 presenta los resultados de todos los animales tanto antes como después del tratamiento.

TABLA 5. DATOS DE LA RELACION EPCMN POR RATON EN CADA LOTE A T0 Y T1.

LOTE	RAT 1	RAT 2	RAT 3	RAT 4	RAT 5
1 TEST T0	2	2	0	5	3
1 T1	2	0	2	2	3
2 MEU T0	2	3	2	2	1
2 T1	0	1	1	0	0
3 MEZ T0	0	0	4	1	1
3 T1	4	2	1	2	4
4 NO210 T0	2	1	3	0	0
4 T1	4	6	5	5	4
5 N10+C T0	2	1	1	5	2
5 T1	3	4	3	2	2
6 NO215 T0	1	0	1	0	0
6 T1	5	5	6	4	5
7 N15+C T0	1	1	1	0	0
7 T1	2	2	2	4	4
8 NO220 T0	1	2	0	1	1
8 T1	8	3	7	5	6
9 N20+C T0	1	1	2	2	1
9 T1	3	3	4	5	4
10 CLFN T0	1	0	1	1	2
10 T1	1	1	3	2	2

TEST- TESTIGO NEGATIVO, MEU- METILUREA, MEZ - MEZCLA DE NITRITO DE SODIO Y

METILUREA, N- NITRITO DE SODIO, C o CLFN- CLOROFILINA, T0- TIEMPO 0 o TASA BASAL,

T1- TIEMPO 1 o TASA TERMINAL.

DISCUSSION

DISCUSION

En lo concerniente a la relación EPC/ENC como se observa en la tabla y gráfica 2 no se tuvieron diferencias significativas en ninguno de los lotes entre las tasas T0 y T1 ($\alpha=0.01$), aunque cuando se administró nitrito de sodio en sus diferentes dosis se observó una tendencia al incremento de EPC, por lo que se concluye que si existe un cierto grado de citotoxicidad por parte del compuesto si bien no se presentan diferencias significativas. Esto mismo se observó en el caso en el que se administró el nitrito junto con metilurea. La explicación de este fenómeno es que el nitrito de sodio convierte la hemoglobina en metahemoglobina al cambiar el estado de oxidación del hierro presente en el grupo HEM y, como sabemos, la metahemoglobina es incapaz de transportar oxígeno, lo que puede ocasionar un estado de anoxia ligera. Susiki (1993) propone que este estado indujo la producción de eritropoyetina y por ende una elevación en la cantidad de EPC circulantes. Por otra parte, el mismo investigador indica que el aumento de eritropoyetina puede incrementar la producción de MN originados por los mutágenos, probablemente como consecuencia de la aceleración en la eritropoyesis, ya que el aumento en la proliferación de eritroblastos puede incrementar la susceptibilidad de las células a daños mutagénicos, al disminuir la oportunidad para la reparación durante la fase S del ciclo celular (Salamanca 1992), además de que la formación del huso acromático podría interrumpirse durante una rápida división celular. Lo antes mencionado también puede ser una de las causas por las cuales se observa una elevación en el número de EPCMN a T1 en los lotes administrados con nitrito.

Como se indica en los demás lotes la relación EPC/ENC permanece casi constante, por lo que se deduce que no se presentó

citotoxicidad, el hecho de que el grupo control permanezca prácticamente sin cambio, nos indica que los resultados obtenidos solo se deben al efecto de los compuestos probados, y que no hubo interferencia de algún factor externo, como la dieta u otras condiciones experimentales. La homogeneidad de la relación EPC/ENC en estado basal nos proporcionó un valor promedio de 0.031.

En los grupos donde además de nitrito de sodio se administró clorofilina, se observó que la tasa basal y la terminal son muy cercanas (en las dosis de 10mg/kg y 20 mg/kg), sin embargo, en la dosis de nitrito de 15mg/kg y clorofilina se presentó un incremento de EPC ligeramente marcado, esta situación muestra que la clorofilina no disminuyó la citotoxicidad del compuesto en la misma medida que en los otros dos lotes, sin embargo, el resultado se explica por la variación en uno de los ratones del lote cuya tasa de EPC/ENC casi se duplicó, a diferencia de los demás animales que mostraron un incremento muy leve. La causa de que este animal presente un elevado número de EPC (y que coincida con que también se observe un alto número de MN) puede deberse a un error durante la administración de clorofilina, o bien que por resistencia al efecto del compuesto o una marcada susceptibilidad al NO₂ como se aprecia en las tablas 3 y 5.

Inicialmente se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para determinar posibles variaciones en las frecuencias de EPCMN a T0 entre los lotes, el resultado del análisis indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0.05$), lo cual es evidente al haberse determinado medias que van de 0 a 2 EPCMN por cada 1000 EPC (Gráfica 3). Estos datos son congruentes con los valores de MN que se presentan espontáneamente en esta cepa como reporta Salamone (1994) que establece una media de 3.95.

Con respecto a la frecuencia de EPCMN, la prueba de Friedman que compara los valores de cada lote a T0 y T1 indicó la siguiente información:

En el lote testigo no se presentaron diferencias significativas entre la tasa basal y la terminal, lo cual indica que el experimento se desarrolló de manera adecuada y que no existió interferencia de factores externos como se puede apreciar en la Gráfica 4

En el caso de la metilurea, se podría pensar que el compuesto actuó como un anticlastógeno, pues redujo significativamente ($p=0.05$) la frecuencia de EPCMN a T1 con respecto a la tasa registrada inicialmente (Gráfica 4), sin embargo esto no tiene ningún significado biológico ya que ambas lecturas se encuentran dentro de los valores normales registrados para la cepa utilizada. Estos resultados no coinciden con lo observado previamente (Sax 1989), aunque es conveniente señalar que aún hay controversia sobre la genotoxicidad de la metilurea, ya que en un estudio reciente realizado por Guzmán (1994) se encontró que dicho agente es inocuo en *Drosophila melanogaster* utilizando la prueba de SMART.

En el lote donde se hizo actuar la mezcla de nitrito de sodio y metilurea se esperaba la formación endógena del compuesto N-metil-n-nitrosourea, y por lo tanto un aumento en el efecto clastogénico, en virtud de que dicho compuesto en estudios previos ha mostrado una alta capacidad mutagénica (Bonatti 1985; Ehling 1991; Fenech 1991); y en estudios efectuados en *Drosophila* (Guzmán 1994) concluyeron que la combinación de ambas sustancias en el alimento elevó en forma significativa la frecuencia de mutaciones. Nuestros resultados sugieren que la nitrosación in vivo no se llevó a cabo y de acuerdo al comportamiento de los datos, esto puede estar relacionado con las siguientes hipótesis:

1. Aun cuando se consideró que la estequiometría de la reacción es de 1 a 1, es posible que las dosis administradas (10 mg/kg para nitrito y 8 mg/kg para metilurea) de ambos compuestos no son suficientes para evidenciar el efecto de la nitrosación.

2. Es posible que elementos presentes en la dieta de los animales teniendo agentes antioxidantes como el butilhidroxianisol y el acetato de vitamina A o que participen en reacciones de oxidación-reducción tales como riboflavina y biotina por ejemplo, hubieran influido para inhibir la reacción, o bien que la metilurea o el nitrito reaccionaran con otros elementos dietéticos y que esta interferencia sea la causa por la cual no se tuvo el efecto de potenciación de la clastogenicidad.

Otro lote que no presenta diferencias significativas con la prueba de Friedman es el de clorofilina, lo cual nos indica que este compuesto no induce por sí solo daño citogenético, y el hecho de que tampoco incrementa la relación EPC/ENC nos indica que tampoco es citotóxico y por ende se puede considerar inocuo al organismo.

Al realizar las comparaciones de EPCMN entre el lote testigo, el de metilurea, el de mezcla y el de clorofilina todos a T1 mediante la prueba de Kruskal-Wallis se tienen diferencias significativas entre el testigo, la mezcla y la clorofilina en contra de la metilurea; esta diferencia se debe a que a T1, los animales tratados con metilurea presentan una frecuencia menor a la del resto, e incluso menor que la tasa a T0; al comparar los tres lotes no se presentan diferencias significativas entre ellos, pues presentan medias similares, estos resultados nos sugieren que los compuestos no tienen un efecto clastógeno (gráficas 3 y 4).

En lo que se refiere a los tres lotes de nitrito, la comparación entre los resultados de EPCMN obtenidos a T0 y T1 (Gráfica 5) reveló diferencias significativas ($p=0.05$) en los tres casos como consecuencia de un considerable incremento en la frecuencia de EPCMN. Por otra parte, al hacer las comparaciones entre los efectos del nitrito de sodio a las dosis de 10, 15 y 20 mg/kg en el tiempo 1 (mediante la prueba de Kruskal-Wallis $p=0.05$), no se observó diferencia significativa entre los tres lotes, habiéndose determinado medias semejantes para los tres lo que indica que el compuesto tuvo una respuesta de tipo cuantal, es decir, en todos ellos hubo un incremento de EPCMN consecuencia del efecto clastogénico de los compuestos formados endogenamente a partir del nitrito, pero éste no dependió de la dosis administrada. La posible explicación que proponemos al respecto es que los elementos que reaccionan con el nitrito (quizá componentes de la dieta), actúan como un reactivo limitante, es decir, una vez agotados en la reacción, el nitrito restante es incapaz de formar más nitrosaminas.

En el caso de los grupos administrados con nitrito y clorofilina, las comparaciones entre el efecto observado en T1 con respecto a T0, mostraron diferencia significativa en los lotes de nitrito a las dosis de 15 y 20 mg/kg, pero tal diferencia no se presentó en la dosis más baja. También se estableció que el aumento en las dosis mencionadas fue mucho menor al detectado en sus contrapartes administradas exclusivamente con nitrito, lo cual demuestra que la clorofilina sí tuvo un efecto anticlastogénico. Al realizar las comparaciones múltiples entre los lotes de Nitrito de sodio a las dosis 10 mg/kg, 15 mg/kg y 20 mg/kg a T1 y sus correspondientes contrapartes administradas con clorofilina, se observó que todas presentaron diferencias significativas, es decir, aquí el efecto de disminución en la tasa de EPCMN por acción de la clorofilina se hizo estadísticamente evidente (Gráfica 5).

Con respecto a la clorofilina, es conveniente enfatizar que el hecho de no haber presentado citotoxicidad ni genotoxicidad, y una evidente capacidad antigenotóxica contra el daño producido por el nitrito sugiere que en estudios posteriores se podría incrementar la dosis con el fin de optimizar su efecto.

Para determinar el efecto antigenotóxico, la clorofilina se ha probado por vía oral contra el efecto de mutagenos como 2-amino-3-metilimidazol(4.5-f)quinoleina en rata (Dashwood 1992) y adriamicina en *Drosophila melanogaster* (Pérez-Chiesa 1994) mientras que su capacidad antitransformante fue evaluada por Wu (1994) probándola contra mezclas complejas de carcinógenos utilizando cultivos de células BALB/3T3. En nuestro caso, utilizamos la vía intraperitoneal, primeramente para evitar interferencias en la formación de nitrosaminas en el tracto digestivo y al tratarse de un estudio agudo, nosotros necesitabamos que el anticlastógeno se encontrara rápidamente en circulación, pues las nitrosaminas tienen un tiempo de vida media corto (Bartsch 1994). Como en nuestro estudio la clorofilina por vía intraperitoneal fue un eficiente inhibidor de MN, suponemos que actuó como un desmutágeno, es decir, como un interceptor molecular frente a las nitrosaminas, entidades altamente electrofílicas con las que la clorofilina puede formar complejos (Dashwood 1992).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se demostró que el nitrito de sodio fue un eficiente inductor de la formación de micronúcleos en eritrocitos policromáticos, al triplicar la frecuencia de ellos con respecto al testigo negativo.

2. Se determinó que el efecto anterior del nitrito no dependió de la dosis administrada.

3. Aún cuando no se presentan diferencias estadísticamente significativas en la relación eritrocitos policromáticos / eritrocitos normocromáticos, en los casos administrados con nitrito de sodio se observa una tendencia al aumento de ella.

4. Se observó que la combinación de nitrito de sodio con metilurea, no presentó un efecto clastogénico, no indujo modificación en la actividad eritropoyética de la médula ósea.

5. La clorofilina a la dosis ensayada de 4 mg/kg fue un eficiente anticlastógeno contra el daño inducido por el nitrito de sodio (a las dosis de 10 mg/kg, 15 mg/kg y 20 mg/kg).

6. Se estableció que la clorofilina no presentó citotoxicidad ni genotoxicidad, y que presenta un efecto anticlastógeno al ser utilizada vía intraperitoneal.

GLOSARIO

ABREVIATURAS

A- Adenina.
Aa- aminoácidos
ADN- Acido desoxirribonucleico.
ARN- Acido ribonucleico.
C- Citocina.
CFL- Clorofila.
C.CLFN o CFN- Clorofilina.
ENC- Eritrocitos normocromicos.
EPC- Eritrocitos policromáticos.
EPCMN- Eritrocitos policromáticos micronucleados.
EtNU- Etilnitrosourea.
G- Guanina.
ICH- Intercambio de cromátides hermanas.
MN- Micronúcleo.
MeNU- Metilnitrosourea.
MeU- Metilurea.
MEZ- Mezcla de nitrato de sodio metilurea.
NO₂ .N- Nitrito de sodio.
Pi- Base pirimidica.
Pu- Base púrica.
SN- Sustitución nucleofilica.
T- Timina.
T0- Tiempo cero o tasa basal.
T1- Tiempo 1 o tasa terminal.
TEST, T(-)- Testigo negativo.
U- Uracilo.

GLOSARIO

ABERRACION CROMOSOMICA- Cambio en la estructura o numero de los cromosomas.

ACENTRICO- Fragmento o región del cromosoma que carece de centrómero

ANTICLASTOGENO- Agente químico que impide las rupturas cromosómicas ocasionadas por agentes físicos o químicos

ANTIMUTAGENO- Agente que inhibe el efecto mutacional de sustancias o factores físicos.

ANTINEOPLASICO- Farmaco utilizado en el tratamiento contra el cáncer al inhibir la proliferación celular.

CARIOTIPO- Conjunto de cromosomas característico de un individuo o especie.

CITOTOXICIDAD- Efecto tóxico que se refleja como muerte celular.

CLASTOGENO- Agente físico o químico que produce rupturas cromosómicas.

DESMUTAGENO- Agente que inhibe la acción de un mutágeno, pero que no actúa en los proceso de reparación celular, sino de manera externa a ella.

ERITROCITOS NORMOCROMICOS- Eritrocitos maduros del ratón

ERITROCITOS POLICROMATICO- Hematíes inmaduras del ratón que aún contienen una determinada cantidad de ARN por lo que presentan una coloración basófila. suelen denominarse reticulocitos

GEN- Porción de ADN que codifica para la producción de un determinado polipéptido o ARN.

GENOTOXICIDAD- Efecto tóxico que se presenta sobre el material genético.

LOCUS- Localización exacta de un gen dentro de un cromosoma.

MUTACION- Cambio heredable en la secuencia o disposición del ADN.

NUCLEOTIDO- Monómero constituido por una base nitrogenada, un azúcar y un grupo fosfato.

RESTITUCION- Reunión de un fragmento cromosómico en su sitio original, que impide la formación de una aberración cromosómica.

REZAGO ANAFASICO- Pérdida de un cromosoma al no migrar durante la anáfase.

BIBLIOGRAFIJA

BIBLIOGRAFIA.

- Alberts, B., Bray, B., Lewis, J., *Biología molecular de la célula*. Ed. Omega, Barcelona España 1990. p.p. 100-110
- Aidoo Anane, Lyn-Cook L.E., Lensing Shelly, Warner Wayne (1994) Ascorbic Acid (Vitamin C) Modulates the Mutagenic Effects Produced by an Alkylating Agent In Vivo. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 24: 220 - 228.
- Ashby J. and Lefevre P.A. (1989): The rat-liver carcinogen N-nitrosomorpholine initiates unscheduled DNA synthesis and induces micronuclei in the rat liver in vivo. *Mutation Research*, 225: 143 - 147.
- Balimandawa M., Meester de C., Leonard A. (1994) The mutagenicity of nitrite in the Salmonella/microsome test system. *Mutation Research*, 321: 7 - 11.
- Bartsch Helmut and Montesano Ruggero. (1984). Relevance of nitrosamine to human cancer. *Carcinogenesis*, vol -5. 1382 - 1393.
- Bonatti Stefania, Simi Luciana and Abbondandolo A. (1985): The effect of the thymidine on the induction of micronuclei by alkylating agents in V79 Chinese hamster cells. *Mutation Research* 150: 347 - 353.
- Bowma W., Rand M. (1980): textbook of pharmacology 2a ed. Australia. Neoplastic Disease and Anticancer Drugs 38.1 - 38.15. Blacewel Scientific Publication
- Charlotte, J., Avers S., *Genetics*, 2a. Edición. Ed. Willard Grant Press E.U.A., 1984. pp. 264-267, 301-306.
- Chorvatovicova D., Ginter Emil, Anna Kosinova and Zdenek Zloch (1991): Effect of vitamins C and E on toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium in rat and pig. *Mutation Research* 262: 41 - 46.
- Daniel, W., *Bioestadística*, 3a ed. Limusa (1988) Mexico 221 - 281 503 - 557.
- Dashwood Roderick and Liew Christina. (1992): Chlorophyllin-Enhanced Excretion of Urinary and Fecal Mutagens in Rats Given 2-Amino-3-Methylimidazo[4,5-f]Quinoline. *Environment and mutagenesis* 20: 199 - 205.
- Dashwood Roderick and Guo Dexin. (1993): Antimutagenic Potency of Chlorophyllin in the Salmonella Assay and Its Correlation With binding Constants of Mutagen-Inhibitor Complexes. *Environment and molecular Mutagenesis* 22: 164 - 171.

- De Flora Silvio, Agostini D'KF, Izzitti and Balansky Roumon.
Prevention by N-acetylcysteine of benzowawpyrene clastoge-
nicity and DNA adducts in rats Mutation Research 250: 87- 93
(1991).
- Dean A. John. (1985): Langes Hand Book of chemistry Ed Mc
Graw Hill (13 ed).. 1245.
- Bernard Daranche.(1990): Toxicologia, seguridad de los alimentos.
De. Omega,México. pp 73 - 88.233 - 247. 443 - 444
- Dollery C. Therapeutic Drugs vol. 1. Ed. Churchill (1991)
England pp c82 - c87.
- Dreisbac Robert. Manual de toxicologia clinica 5a Ed.
Manual moderno (1983). pp. 344 - 347.
- Ehling U.H. and Neuhfuser-klaus. (1991). Induction of specific-
locus and dominat lethal mutations in male mice by 1-methyl-
1-nitrosourea (MNU). Mutation Research. 250: 447 - 456
- Enciclopedia of the human Biology;vol.5 Ed. Academic press
Inc. E.U.A. (1991): pp 243 - 254.
- Fenech M. and Neville S. (1992): Conversion of excision-Repaira-
ble DNA lesions to Micronuclei Within One Cell Cycle in human
Lymphocytes. Enviromental and Molecular Mutagenesis 19:27-36.
- Fritsch Pierre. De sait Blanqueat George. La contaminacion por
los nitratos. Mundo cientifico No 52.vol 5,pp 1172-118.
- M.Galloway Sheila.(1994): Chromosome Aberrations Induced In
Vitro:Mechanisms,Delayed EXpression, and Intriguing Questions
Environmental and Molecular Mutagenesis 23.suplement 24:
44 - 53.
- Gardner,Simmons, Snustand. Principles of genetic 8a Ed.
editorial Jonh Wiley b Sons; E.U.A; (1991) pp 289-312
253-287.
- M.Gentile James and J.Gentile Glenda. The metabolic activation of
4-nitro-o-phenylenediamine by chlorophyll-containing plant
extracts: The relationsship between mutagenicity and anti-
mutagenicity (1991):Mutation Research 250:79 - 86
- Goodman Lous,Gilman A. Bases farmacologicas de la terapeutica
(1986): mexico 5a edicion Interamericana. antineoplastic
Agents. pp 1209 - 1223.
- Grouchy,J.,Turlou, C.,Atlas de las enfermedades cromosómicas.Ed.
Marín. España 1984. pp.214-229.

- Guzman, Graf, Espinosa, Madrigal. *Drosophila melanogaster* un modelo de nitrosación in vivo: Revista Internacional de contaminación ambiental; No 10; sup. 1. (1994): pp 27 - 28.
- Hartman Zlata, N. Henrikson Erik, E. Hartman P A Cebula Thomas. Molecular Models That May Account for Nitrous Acid Mutagenesis in Organisms Containing Double-Stranded DNA. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. (1994):24, pp 168 - 175.
- Hayashi Makoto, Sofuni Toshio and Morita Takeshi. Simulation study of the effects of multiple treatments in the mouse bone marrow micronucleus test. (1991): *Mutation research*, 252: 281 - 287.
- Heddle, J., Hite, M., Kirkhart, B. The Induction of micronuclei as a measure of genotoxicity, (1983): *Mutation research*, 123: 61-118.
- Henry, J., Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio, ed. 9a., Ed. Salvat, (1993), España, 603-631.
- Hodgson, Mailman: *Dictionary of Toxicology*, Ed. Van Nostrand Reinhold company; E.U.A. (1988): pp 243, 263 - 265
- Kaina Bernd, Fritz Gerhard and Coquerelle Therese. (1993): Contribution of O-Alkylguanine and N-Alkylpurines to the Formation of Chromatid Exchanges, Chromosomal Aberrations, and Gene Mutations: New insights Gained From Studies of Genetically Engineered Mammalian Cell Lines. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 22:283 - 292.
- Kamiguchi Yujiroh, Tateno Hiroyuki and Mikamo Kazuya. (1991) Micronucleus test in 2-cell embryos as a simple assay system for human sperm chromosome aberrations. *Mutation research* 252: 297 - 303.
- Kato Tetsuta, Tadokoro Natsuyo, Tsutsi Mina and Kikugawa K. (1991) Transformation of arylamines into direct-acting mutagens by reaction with nitrite. *Mutation research* 249: 243 - 254.
- Kreyzig Erwin. *Introducción a la estadística matemática*, principios y métodos edit. Limusa PP. 282 - 284. México 1976.
- Luca Doina, Raileanu L., Luca V. and Duba R. (1985) Chromosomal aberrations and micronuclei induced in rat and mouse bone marrow cell by sodium nitrate. *Mutation Research* 155: 121-125.
- McCaffrey Jennifer and W. Hamilton Joshua. (1994): Comparison of Effects of Direct-Acting DNA Methylating and Ethylating Agents on Inducible Gene Expression In vivo. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 23: 164 - 170.

- Mcfee A.F. Cook S.B. and Abbott M.G. (1994): Negative Dose-Response Relationship for Radiation-Induced Micronuclei in Polychromatic Erythrocytes of Mice. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 23: 128 - 131.
- Macgregor J., M.Wehr Carol., Henika R. Philip and D Michael S. (1990): The in vivo Erythrocyte Micronucleus Test Measurement at Steady State Increase Assay Efficiency and permits Integrations with Toxicity Studies. *Fundamental And Toxicology* 14: 513 - 522.
- Marshall. *Hematologia Clinica*: Ed. Interamericana. Mexico 1983: pp 54, 145 - 150.
- Merck b Co Inc. *The Index Merck* 10a ed. U.S.A 1983 pp 303
- Miller Klara. *Toxicology Aspets of Food Ed Elsevier Applied Science Publister LPT, England, 1987* pp 253 - 287.
- Nehls Pater and F. Rajewsky Manfred. (1985) Ethylation of nucleophilic sites in DNA by N-ethyl-N-nitrosourea depends on chromatin structure and strength. *mutation Research* 150: 13-21.
- Perez-Chiesa Yvette, Soto nelly Anti, Figueroa Annette, L. colon Jorge and M.del Hoyo Julio (1989): Efecto inhibidor de la clo-rofilina en la genotoxicidad de adrimicina en *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contaminacion ambiental* 10 (suplemento 1) 23:23.
- Ramos.P. Manual de laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster*. Ed. Mc Graw-Hill. (1991). México. pp. 41-59.
- Rieger. Michaelis. Green. *Glosary of Genetics Classical and molecular*; 5a ed. Springer Verlang; Alemania. (1991) pp 339 - 345.
- Salamanca.F. *citogenética humana*. Ed. Médica Panamericana. (1992). México: pp. 37-41. 43-62. 83-105.
- Salomone F. Michael and H. Mavournin Kathleen. (1994): Bone Marrow Micronucleus Assay: Review of the Mouse Stocks Used and Their Published Mean Spontaneous Micronucleus Frequencies. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 23: 239 - 273.
- Sax N. Irving. *Dangerous piloperties of Industrial Materials* (1989): vol. 2.3. Ed. Van Nostrand Reinhold. pp 2403-2405 3082 - 3083.
- Schimd.G. *Química biológica*. Ed. Interamericana. (1988). España. pp. 573-578, 589.

- Shelby M.D., Gutierrez-Espelta, Generoso W.M. and McFoe A F (1991): Mouse dominant lethal and bone marrow micronucleus studies on methyl vinyl sulfone and divinyl sulfone. *Mutation Research* 250:431 - 437.
- Sing Han-sun, Kuzmicky Paul A. Y. Kado Norman, P H Hsieh Dennis (1991): Micronucleus formation in cultured fetal liver blood cell using mitomycin C. *Mutation Research* 264: 187 - 192.
- Suzuki Y., Shimizu H., Nagae Yusuke, Fufumoto M., Okonogi H. and Kodokura Makoto. (1993): Micronucleus Test and Erythropoiesis: Effect of Cobalt on the Induction of Micronuclei by Mutagens. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 22:101-106.
- Valle; Toxicologia de los alimentos Ed. Centro Panamericano de ecologia humana y salud O.M.S. Mexico 1986. 107 - 110.
- Warner R. Janet, Nath Joginder and Ong Tong-Man. (1991): Antimutagenicity studies of chlorophyllin Using the salmonella arabinose resistant assay system. *Mutation Research* 262: 25 - 30.
- Williams, W., Beutler, E., Hematology 2a ed. editorial Mc Graw-Hill 1977 pp 17, 18, 302, 117, 118, 613.
- Wu Z.L., Chen J.K., Ong T., Brockman H.E., and Whong W.Z. (1994) Antitransforming Activity of Chlorophyllin Againsts Selected Carcinogens and Complex Mixtures. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 14: 75 - 81.