

BOF
GOM
2891M

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

B I O L O G I A .

Mutaciones Génicas en Linfocitos Humanos

Tesis para obtener el Grado de Maestra en Ciencias

(B i o l o g í a)

REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA

México, D. F.

1 9 8 6



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.

INDICE

PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO.

INTRODUCCION.

Riesgos clínicos de la mutación.

Pruebas directas de mutagenicidad.

Síntesis de purinas.

Vía de novo.

Vía de recuperación o de ahorro.

Catabolismo de purinas.

Resistencia de análogos de purinas.

Características de la enzima HGPRT

El locus HGPRT

Localización.

Deficiencia congénita en el locus HGPRT

Prueba directa de mutagenicidad en el locus HGPRT en

linfocitos humanos de sangre periférica.

Fenocopias.

Clonación.

MATERIAL Y METODOS.

Criterios para la evaluación de autorradiografías.

Análisis estadístico.

Intervalo de confianza para una frecuencia.
de células variantes (Vf).

Intervalo de confianza para la relación en
tre dos frecuencias de células variantes -
(Vf2/Vf1).

Preparación de sustancias.



PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO.

Los medicamentos, las radiaciones ionizantes y otros factores ambientales son capaces de inducir alteraciones genéticas (mutaciones) cuyos efectos pueden resentirse a corto o a largo plazo e incluso heredarse a generaciones posteriores.

Aunque no ha podido establecerse directamente que la frecuencia de enfermedades de origen genético se haya elevado por consecuencia de la exposición a fármacos u otros agentes ambientales la posible interacción de las sustancias con el ADN y la producción de mutaciones, es causa de preocupación.

Las mutaciones pueden tener dos niveles: cromosómico o génico. Las mutaciones cromosómicas afectan bloques de genes ^{integrados} ~~en~~ ~~el~~ ~~interior~~ ~~de~~ ~~un~~ ~~solo~~ ~~cromosoma~~ o entre diferentes cromosomas. Las mutaciones génicas afectan ^{la estructura de} un gen particular, lo inactivan o cambian su expresión.

Con el fin de evaluar la producción de ^{recombinaciones cromosómicas} (aberraciones) o de mutaciones génicas por agentes químicos se han desarrollado diversos sistemas de prueba; estas pruebas van desde el daño físico al ADN aislado hasta la utilización de mamíferos completos.

Sin embargo, mientras más alejado evolutivamente se encuentre del humano el sistema empleado, la extrapolación de datos se dificulta más. Se considera que las pruebas establecen la potencialidad de los agentes probados para dañar el material genético, pe *ro no* reproducen todos los eventos que en el organismo humano pueden modificar esa potencialidad. De aquí el interés de contar con pruebas directas en el humano, capaces de medir el daño real que sufren las células cuando el organismo se ve expuesto in vivo a algún mutágeno.

Para medir daño in vivo en humanos, se cuenta con pruebas que miden la inducción de aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas como pruebas directas de mutagenicidad en células humanas. Mas existe la necesidad de una prueba que mida mutaciones a nivel génico, por lo que diversos grupos han dirigido sus esfuerzos al establecimiento de una prueba de este tipo.

57

En 1979, Strauss y Albertini (45) propusieron la detección de mutaciones en ^{el} locus de la enzima hipoxantina, guanina-fosforibosil transferasa (HGPRT) en linfocitos de sangre periférica como una prueba directa de mutagenicidad. En el laboratorio de Mutágenos-Ambientales del Instituto de Investigaciones Biomédicas se han integrado una serie de sistemas biológicos de prueba para la evaluación de una amplia gama de efectos genotóxicos; → (siguiente)

El poder contar con una prueba que mida mutaciones génicas in vivo en humanos es de gran interés para los estudios de mutagenicidad de agentes ambientales.

Así, el trabajo que aquí se presenta tiene como metas:

- 1.- Incorporar al laboratorio de Mutagénesis una prueba que permita la detección de mutaciones génicas ocurridas in vivo en los linfocitos humanos de sangre periférica.
- 2.- Obtener una frecuencia basal de mutación para :
 - a) poder estudiar efectos mutagénicos,
 - b) comparar la frecuencia obtenida en nuestro laboratorio con lo obtenido en estudios realizados en otros laboratorios del mundo.

INTRODUCCION.

RIESGOS CLÍNICOS DE LA MUTACIÓN.

El desarrollo cultural, desde la Revolución Industrial, ha seguido el camino de una evolución tecnológica que se basa en el consumo de grandes cantidades de energéticos como el petróleo y sus derivados, y más recientemente los elementos radiactivos, que sostienen en funcionamiento innumerables y variados tipos de empresas que transforman materias primas en artículos de uso para el ser humano. El consumo de energéticos y la transformación de materias primas producen residuos de desechos que han contribuido en gran medida al deterioro del ambiente que habitamos, es decir, del ambiente mundial, y no sólo esto, sino que los mismos productos resultado de la transformación de las materias primas y que son de uso cotidiano, como los detergentes, los alimentos conservados, los aparatos electrónicos y los medicamentos (entre otros), se han constituido en agentes que aunados al deterioro ambiental, amenazan la salud y la calidad de la vida de las poblaciones humanas.

Uno de los daños más temibles, por el tipo de consecuencias que produce, es el daño al material genético que se traduce en mutaciones, las cuales tienen consecuencias tanto a nivel del individuo, como de las poblaciones.

Diversos estudios han señalado la existencia de relaciones causa efecto entre la producción de mutaciones y la transformación maligna de las células somáticas (carcinogénesis) así como entre la mutagénesis y las alteraciones en el desarrollo embrionario (teratogénesis), lo cual lleva a malformaciones congénitas (tabla I.1) o muerte fetal.

Tanto para las alteraciones congénitas, como para el cáncer, no se conoce una curación efectiva, sin secuelas. Por este motivo, gran parte de los esfuerzos de la investigación se dirigen a la prevención de estos males y una estrategia de prevención adecuada debe contemplar la determinación de los eventos mutagénicos que representan un riesgo para la salud.

Existen más de 70000 sustancias producidas por la industria, diseminadas en el medio ambiente. Es necesaria la identificación de aquéllas capaces de producir mutaciones y para ello la evaluación más directa es en el hombre, por lo que se ha utilizado el estudio epidemiológico; sin embargo, en general este tipo de estudio tiene la desventaja de que se registran hechos consumados, cuando ya se produjo un daño en el acervo génico de las poblaciones expuestas, además en muchas ocasiones la correlación directa es dificultada por los largos períodos que transcurren entre la exposición a un agente determinado y la aparición de sus efectos, así como también por la multitud de -

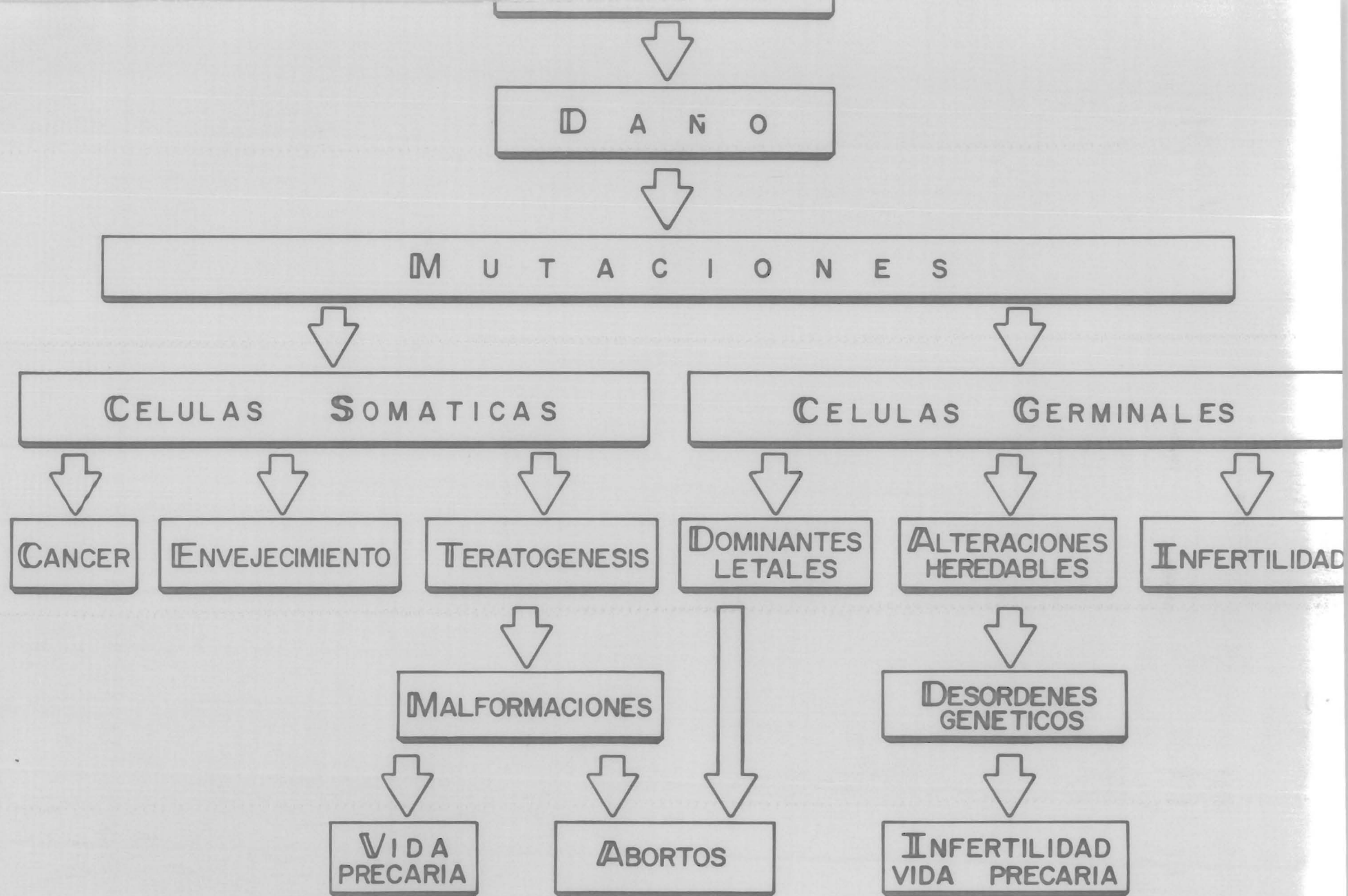


Tabla I.1

agentes a los que nos exponemos.

Estos hechos han llevado al uso de sistemas biológicos de prueba como modelos en la evaluación de riesgos (tabla I.2)⁽¹⁹⁾ y están basados ^{los cuales} en el hecho de que los seres vivos compartimos características generales como es, fundamentalmente, el que todos poseemos un código genético con mecanismos de transcripción y traducción, cabe señalar sin embargo que existen diferencias, por ejemplo: los organismos procariontes carecen de cromatina y de las barreras protectoras que a los organismos complejos nos brindan los sistemas como el inmunológico, el digestivo y el de excreción; las plantas poseen sistemas de transporte diferentes y la presencia de una pared celular es una barrera con la que no cuentan las células animales. Estas diferencias modifican ^{fr. de aparición} la ocurrencia de alteraciones ^{uc} indevidas por la exposición a mutágenos. Estos hechos hacen que la extrapolación de datos al hombre es menos confiable cuanto más alejado funcionalmente de éste se encuentre el organismo de prueba.

En un esfuerzo por evaluar la mutagenicidad de las sustancias en sistemas más cercanos al hombre se han desarrollado diversas pruebas en las que se utilizan células humanas: fibroblastos, linfocitos y líneas celulares transformadas, principalmente linfoblásticas. Estas células en cultivo son expuestas a la actividad de la sustancia que se quiere investigar y su efecto se analiza

Sistema de Prueba	Mutaciones g \acute{e} n \acute{e} cas	Daño le \acute{t} al al-ADN	Recombinación	Aneuploidia	Mosaicismo de alas	Aberr. Crom.	I.C.H.	Micro-núcleos	Síntesis no pro-gram.	Trans-formación.
BACTERIAS:										
Salmonella typhimurium	+									
Escherichia coli		+								
Bacillus subtilis		+								
LEVADURAS :										
Saccharomyces										
Cerevisiae	+		+	+						
Schizosaccharomyces pombe										
Aspergillus nidulans	+		+	+						
DCOSOPHILA	+					+				
CELULAS DE MAMIFERO	+					+	+	+	+	+
CELULAS HUMANAS										
Linfocitos <u>in vivo</u>	+					+	+			
Linfocitos <u>in vitro</u>	+					+	+		+	

en el marcador elegido: puede ser una evaluación a nivel cromosómico (aberraciones o intercambio de cromátidas hermanas) o una evaluación del efecto de un daño en un locus específico (tabla I.3) (1). De esta manera se mide el efecto que se produciría en las células en vivo en caso de que el mutágeno alcanzara su blanco dentro del organismo. Pero estas pruebas in vitro todavía tienen la desventaja de que no pueden representarse en ellas todas las acciones metabólicas y farmacocinéticas que en el organismo vivo afectan directamente la actividad de las sustancias (38). Así, estos ensayos se limitan a ser una fuente más de información acerca de los muchos aspectos que afectan a un evento mutagénico, son útiles en el monitoreo de posibles agentes que causen mutaciones y sirven como base para el desarrollo de pruebas que permitan medir la ocurrencia de daño directamente en el organismo íntegro, in vivo.

PRUEBAS DIRECTAS DE MUTAGENICIDAD.

Se consideran como pruebas directas de mutagenicidad aquellas que permiten cuantificar el evento mutagénico que tuvo lugar en el individuo, in vivo, aunque se detecta en un ensayo in vitro cuyas condiciones están controladas para permitir el reconocimiento de las células afectadas por el agente.

Las pruebas citogenéticas son las que han tenido mayor

TABLA I.3 SISTEMAS MUTACIONALES EN CELULAS SOMATICAS EN CULTIVO. *

Sistema	Líneas y estirpes celulares		Número de Referencias
Fenotipo variante	Loci genéticos o funciones bioquímicas involucradas.		
Resistencia a drogas: Resistencia a análogos de guanina e hipoxantina (8-azaguanina, 6-tioguanina, etc.).	Hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa.	Fibroblastos diploides humanos	12 57
		Líneas celulares humanas (Glen; D98s; WI-L2; PGLC 33H)	7 48
		V 79 (Línea de pulmón de hamster chino)	35 30
		CH 0 (línea de ovario de hamster chino)	7 48
		Otras células de hamster chino, sirio y de ratón.	9 64
Resistencia a análogos de adenina (2,6-diaminopurinas)	Adenina fosforribosil transferasa	Fibroblastos humanos diploides	1 19
Resistencia a análogos de nucleósidos de pirimidina (BrdU, IdrU) o exceso de timidina	Timidina cinasa	Diversas líneas celulares provenientes de mamíferos	17 39
		Una línea haploide de rana y otra semidiploide	3 1
Resistencia a exceso de adenosina	Adenosina cinasa o biosíntesis de novo de pirimidinas	CHO y Ag (línea de ratón)	2 51
Resistencia a AMP cíclico	Proteína que se adhiere al cAMP	Células de linfoma de ratón	2 51

Sistema		Línea y estirpes celulares	Número de Referencias
Fenotipo variante	Loci genéticos o funciones bioquímicas involucradas		
Resistencia a ouavaína	ATPasa activada por Na^+ - K^+ - Mg^{++}	HeLa, V 79, CHO y otras	8 64
Resistencia a α -amanitina	RNA polimerasa II	CHO	2 51
Resistencia a actinomicina D	Transporte a través de membrana.	Líneas celulares de hamster	2 51
Resistencia a 2-desoxigalactosa.	Galactocinasa	Línea de hamster	1 19
Resistencia a inhibidores de síntesis de proteínas en eucariotes (cicloheximida, puromicina)	Proteínas ribosomales, estructura de membranas	CHO Línea de riñón de cerdo Líneas celulares de rana (ICR 2A, ICR 132)	3 1 1 19 2 51
Resistencia a concanavalina-A, fitohemaglutinina-P y otras lectinas	Estructura de membranas	CHO	4 38
Resistencia a antagonistas a folato (aminopterina, ametopterina, -metasquina).	Dihidrofolato reductasa	Líneas de hamster y ratón	2 1
Resistencia a colchicina	Proteínas de membrana	CHO	1 19

Sistema		Línea y estirpes celulares	Número de Referencia
Fenotipo variante	Loci genéticos o funciones bioquímicas involucradas.		
Sensibilidad y Temperatura	Síntesis de macromoléculas	Diversas líneas de hamster y una de mono (BS-C-1)	15 62
	Requerimientos nutricionales	CHO	1' 19
	Utilización de galactosa	V 79	1' 19
	HGPRT	V 79	1' 19
	G-6-PD	Fibroblastos humanos	1' 19
	Ciclo de Krebs	Líneas de hamster	2' 51
	Citocinesis	Línea de hamster	2' 19

* Tomado de Abbondandolo, 1977. (3)

uso en la detección de daño genético en células somáticas in vivo -
como fibroblastos y linfocitos de sangre periférica, en las que se -
evalúa el daño a nivel de: a) alteraciones en la estructura de los -
cromosomas (aberraciones estructurales) y b) intercambio de cromáti-
das hermanas (I.C.H.)

a) Aberraciones cromosómicas estructurales:

Son alteraciones en la apariencia normal de los cromosomas que consisten en rupturas de una o de las dos cromátidas que a menudo resultan en pérdida de material o translocaciones de porciones de un cromosoma a otro; también pueden producirse inversiones en la secuencia de material del cromosoma. Las figuras a las que esto da origen son muy variadas: pueden ser simples como una grecha ^b cromatídica ^v o complejas como los cromosomas trirradiados o los anillos.

Diversas sustancias mutagénicas son inductoras de estas alteraciones, de ahí que el uso de esta prueba esté muy extendido. - pero el daño que detecta implica una lesión de gran magnitud a un -
hay ^x de fibras de cromatina que es el cromosoma metafásico y no existe seguridad sobre su sensibilidad para detectar un daño que afecte sólo a la estructura génica.

b) Intercambio de cromátidas hermanas:

Consiste en un intercambio de material entre las cromátidas de un mismo cromosoma y se sabe que es una prueba sensible para detectar lesiones por mutágenos dependientes de S (síntesis).⁽⁶³⁾ ^p para que se produzca un intercambio debe haber ruptura del dúplex de ADN de cada cromátida y una reunión de ambos, cada uno en la cromátida opuesta: el proceso se inicia cuando se efectúa la síntesis del ADN sobre una banda dañada.

Los dos sistemas: aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas han demostrado su utilidad para la detección de sustancias mutagénicas y en diversos estudios se ha determinado que son indicadores de eventos diferentes ya que hay agentes capaces de inducir aberraciones sin inducir intercambios o viceversa. (27,28,43)

Se ha buscado si existe alguna relación entre estos eventos y la producción de mutaciones puntuales. En lo que se refiere a intercambios y mutaciones se ha encontrado que algunos mutágenos conocidos producen un incremento de ambos, de acuerdo con la dosis, pero la eficiencia con que se producen unos y otras es diferente. (16,66)

Por otra parte, un estudio reciente hecho por el Programa Internacional sobre la Seguridad de las Substancias Químicas - - (IPCS) (31) reveló una escasa correlación entre la ^{aparición} ~~ocurrencia~~ de aberraciones cromosómicas y la producción de mutaciones puntuales en bacterias, pero no así entre las aberraciones y la producción de mutaciones puntuales en células de mamíferos in vitro.

Esto hace resaltar la importancia de realizar los ensayos de mutagenicidad para el hombre en células o sistemas tan cercanos a él como sea posible. Por esto y por el interés de detectar mutaciones puntuales, se ha tratado de desarrollar pruebas directas de mutagenicidad que emplean como marcadores determinados genes (tabla I.4) y en los que se aplican los métodos bioquímicos y citoquímicos más modernos, herramientas de la inmunología y de la biología molecular. Algunos se han objetado como pruebas de mutagenicidad porque no miden el evento mutacional, sino eventos fisiológicos o inherentes al desarrollo que provocan los cambios observados. (5,47) No obstante tres de ellos están en fase de evaluación:

1.- Mutaciones en la glicoforina: detecta mutaciones somáticas en eritrocitos humanos que expresan sólo una de las dos formas alélicas de la proteína glicoforina A, de membrana. Se utilizan anticuerpos monoclonales marcados con fluoróforos: uno verde para un alelo y otro rojo, para el otro alelo.

TABLA 1.4 PRUEBAS DIRECTAS PARA MEDIR MUTACIONES GENICAS QUE SE HAN INTENTADO EN DIFERENTES SISTEMAS HUMANOS.

Sistema Celular Humano	Marcador
ERITROCITOS	ANTIGENOS A-B (pérdida)
LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES	GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (Variantes deficientes).
ERITROCITOS MADUROS	HEMOGLOBINA FETAL PERSISTENTE.
^I ERITROCITOS MADUROS	HEMOGLOBINA S; HEMOGLOBINA C (Mutantes estructurales).
ERITROCITOS	ALELOS DE GLICOFORINA

La frecuencia de los dos alelos en la población humana es la misma y se considera que aproximadamente la mitad son heterocigóticos.

En estos individuos se espera encontrar los dos colores al tratar sus eritrocitos con los anticuerpos. Las células mutantes presentan sólo un color, indicando así la ausencia de uno de los dos productos génicos de los alelos de glicoforina. Para hacer la evaluación se utiliza flourocitómetro o microscopio de fluorescencia. El análisis también puede llevarse a cabo en eritrocitos congelados. (12,14)

2.- Mutaciones en la hemoglobina: se basa en el reconocimiento inmunológico de formar^s alteradas de hemoglobina; las alteraciones consisten en dos mutaciones que se producen en el gen de la hemoglobina y que causan diferente sustitución de aminoácidos.

La técnica sigue un procedimiento mediante el cual la capa superficial de hemoglobina se hace accesible a la acción de anticuerpos monoclonales específicos para cualquiera de las dos variantes de hemoglobina; a los anticuerpos se les pega otro anticuerpo fluorescente que permite el reconocimiento rápido de las células teñidas por fluorocitometría. (14,15)

Estos dos sistemas tienen la ventaja de que se pueden aplicar tanto al humano como al ratón, para hacer comparaciones, y - que se pueden adaptar in vitro para estudios de drogas.

Las desventajas son que se están desarrollando y necesitan probarse y validarse. Además, la utilización de anticuerpos monoclonales y citofotómetros los hace no sólo complej^oas, sino cost^oosos.

Al ensayo de glicoforina, además, se le opone el que detecta la heterogeneidad de las poblaciones de eritrocitos que carecen de un alelo u otro indistintamente y en algunos casos también - detecta células homocigóticas; todo esto hace muy compleja la interpretación de los resultados. (14)

3.- Mutaciones en el locus HGPRT: este ensayo detecta mutaciones en locus HGPRT en linfocitos T; fue propuesto en 1979 por Strauss y Albertini (57) y está basado en las características, ampliamente estudiadas, de este locus y de la enzima que se sintetiza a partir de él que tiene a su cargo la recuperación de hipoxantina y guan^{ina} libres en el citoplasma para transformarlas en - ácido inosímico (IMP) y ácido guanílico (GMP).

De los tres sⁱstemas señalados es el que más ha sido-

estudiado y por ello fue elegido en el presente trabajo. A continuación se describen sus características y desarrollo histórico.

SÍNTESIS DE PURINAS.

Vía Novo.

En las células humanas, como en las de otros mamíferos, se sintetizan los nucleótidos de purinas (guanina, adenina, inosina y xantina) para satisfacer los requerimientos de precursores monoméricos para los ácidos nucleicos y para otras funciones.

Existe una vía de biosíntesis, llamada biosíntesis de novo que comienza con la formación de 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) a partir de la ribosa-5-fostato y ATP. Esta vía, esquematizada en la figura I.1 lleva a la formación de inosinmonofosfato (IMP), a partir del cual se pueden formar: adenosinmonofosfato (AMP) por una vía para la cual se requiere GTP, o bien, xantosinmonofosfato (XMP) del que se forma guanosinmonofosfato (GMP) por otra vía - en la cual se requiere ATP.

Según se sabe, la vía de novo no es funcional en todos los tejidos del cuerpo humano, mientras en los linfocitos de sangre periférica sí lo es; en el encéfalo, en cambio, se ha detectado un contenido reducido de la enzima que se requiere para formar la 5-fosforribosil-1-amina, por lo que se ha sugerido que el encéfalo depende de purinas exógenas para la formación de sus nucleótidos de purina. (13,17)

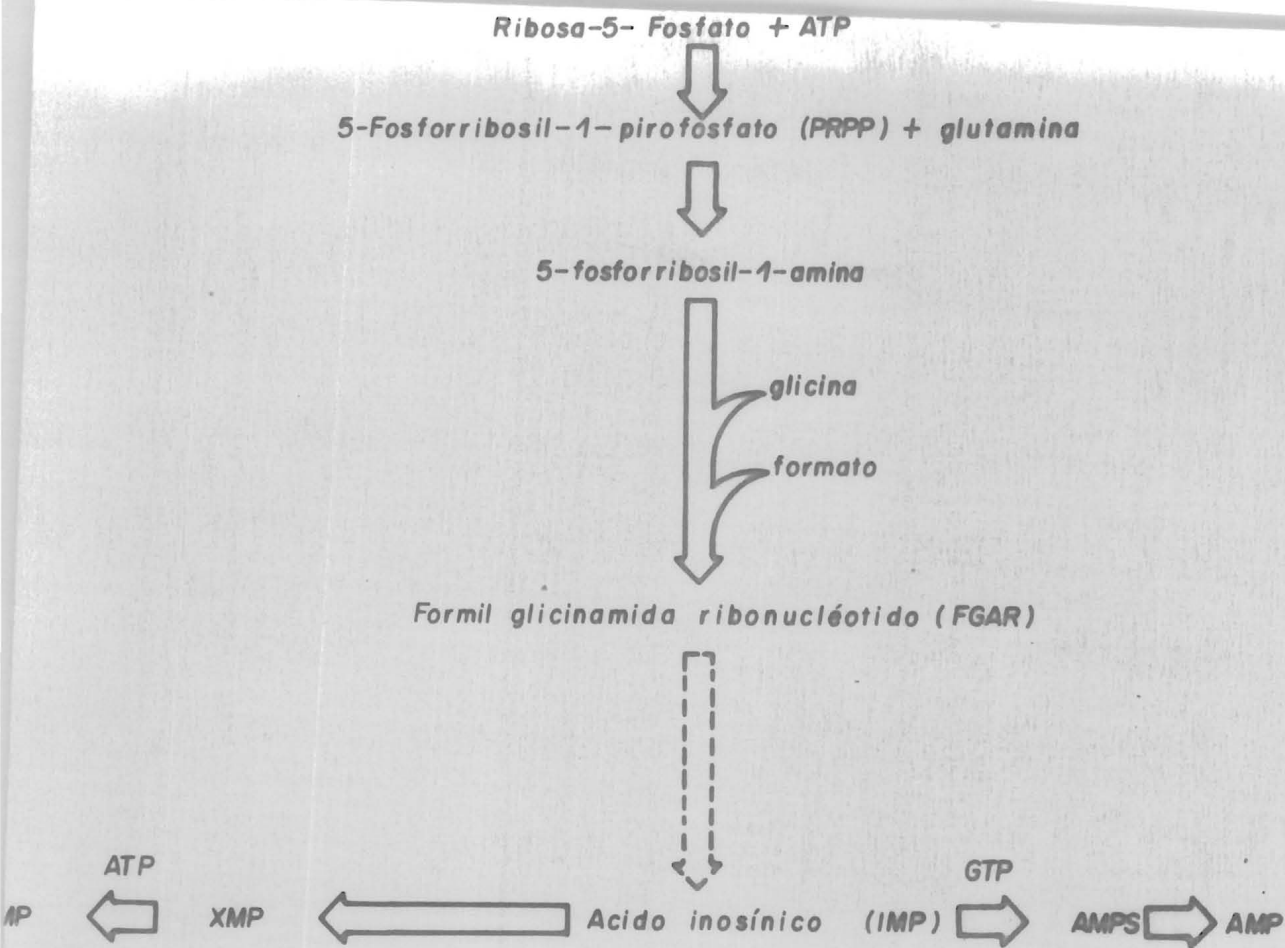


Fig I.1 Vía de novo de síntesis de purinas

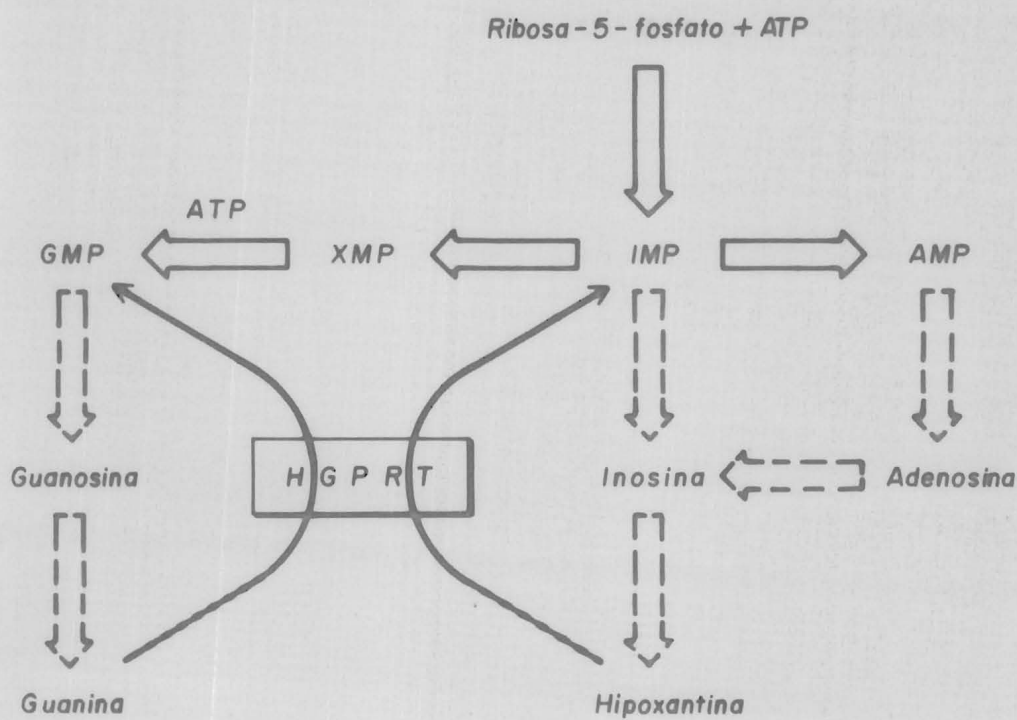


Fig I.2 Vía de ahorro de purinas

Vía de recuperación o ahorro.

La recuperación de estos monómeros precursores de los ácidos nucleicos (CMP y AMP) a partir de las bases purínicas libres (adenina, hipoxantina y ⁿguanina) se efectúa mediante la fosforribosilación de las mismas. En las células humanas existen dos enzimas que ejercen esta función y las dos requieren la presencia de PRPP en el medio: la adenina fosforribosiltransferasa (APRT) para la recuperación de AMP, y la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT) para la recuperación de IMP y GMP a partir de hipoxantina y guanina (fig. I.2).

La función de la vía de recuperación de purinas en el cuerpo humano, considerado como un todo, es mayor que la vía de síntesis de novo.

CATABOLISMO DE PURINAS.

El producto final en el catabolismo de las purinas en el ser humano es el ácido úrico. Los nucleótidos GMP, IMP y AMP son convertidos a nucleósidos por una purina 5'-nucleotidasa; por la intervención de otra enzima se obtienen las purinas libres y si no media la HGPRT para recuperar la ⁿguanina y la hipoxantina libres, se forma ácido úrico como producto final (fig. I.3).

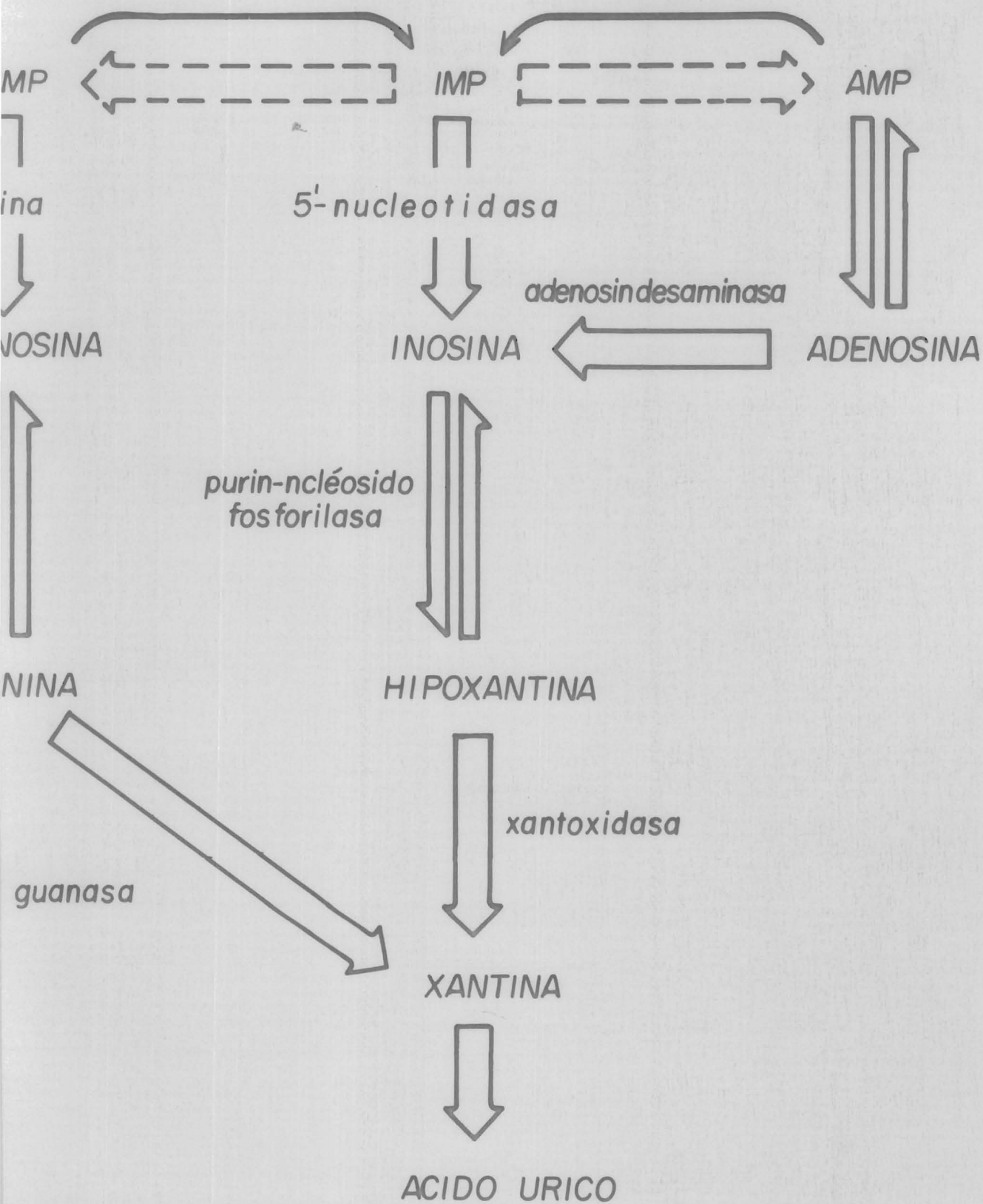


Fig. I.3 Catabolismo de purinas

RESISTENCIA A ANÁLOGOS DE PURINAS.

En 1858 Szybalsky aisló una línea celular humana resistente a la acción tóxica^c de la 8-azaguanina (8-AG). (62)

En 1963 Stutts y Brock^mvan (59) estudiando las bases-bioquímicas de esta resistencia a análogos, encontraron que las células resistentes carecían de actividad de la enzima HGPRT, de tal forma que la resistencia provenía de la incapacidad de estas células para sintetizar los nucleótidos tóxicos correspondientes, a partir de los análogos de bases, en la vía de recuperación de purinas. (fig. I.4).

En 1975, Nelson y Col. (39) estudiaron los posibles mecanismos por los cuales la 6-tio^{g an}zuerina (6-TG) y otros análogos pudieran producir la toxicidad celular y encontraron que cuando se inhibía la síntesis de ADN la toxicidad por 6-TG disminuía notablemente, por lo que postularon que la incorporación de este análogo al ADN era uno de los mecanismos. Se descartó que fuera tóxica su incorporación al ARN o su acción^U de la PRPP amidotransferasa, una enzima de la vía de novo, lo cual causa un decremento en la disponibilidad de ribonucleótidos de purinas, pero no inhibe la vía; por otra parte, en dosis bajas de 6-TG (inferiores a 1mM que es superior a la dosis farmacológica de este agente antitumoral) no se produce bloqueo para la -

síntesis e incorporación del nucleótido normal de ⁿguayⁿina, que fue otro de los mecanismos que se propusieron para explicar la toxicidad de este análogo. (fig. I.⁴).

De lo anterior se desprende que la incorporación al ADN de la 6-tioguanina es la causa de su toxicidad. Para que se incorpore al ADN es necesario que se forme primero el nucleótido correspondiente que, como se aprecia en la figura I.⁴ se sintetiza por mediación de la enzima HGPRT. De aquí que una célula que carece de la actividad de esta enzima no forma los nucleótidos del análogo; dado que su vía de novo no se ve afectada y la incorporación de los nucleótidos normales a los ácidos nucleicos tampoco, una célula mutante para la enzima HGPRT es capaz de sobrevivir en un medio en presencia de 6-tioguanina.

En las células en vivo, la falta de esta enzima lleva a una eliminación aumentada de purinas en forma de ácido úrico (fig.I.3).

CARACTERÍSTICAS DE LA ENZIMA HGPRT.

En procariontes se ha detectado la existencia de más de una transferasa involucrada en la vía de ahorro para la síntesis de purinas, mientras que en células de mamíferos sólo hay una para la vía de ahorro de hipoxantina, guanina y sus análogos: 6-mercaptopurí

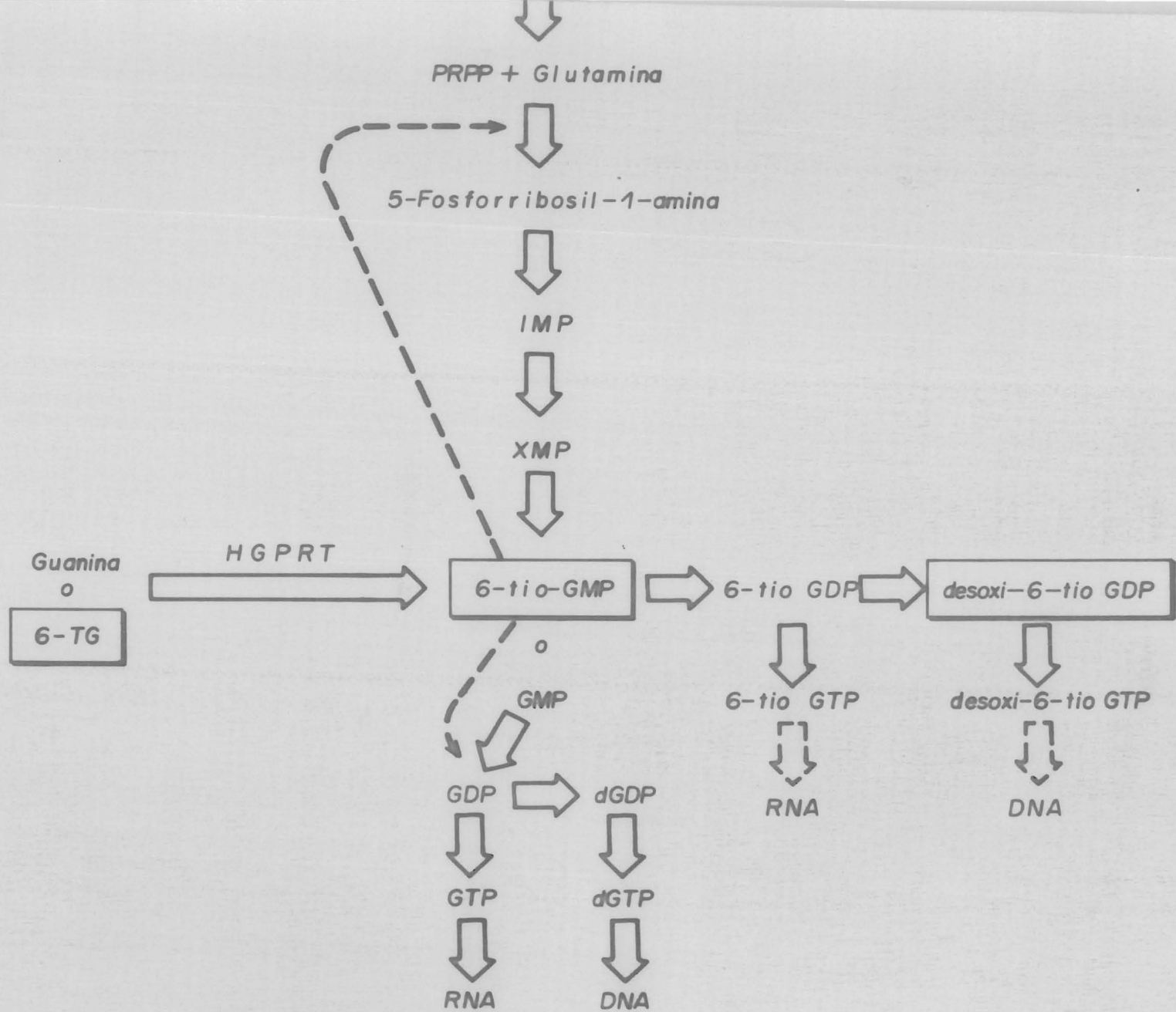


Fig. I.4. Mecanismos propuestos para la acción inhibitoria de la 6-tioguanina

na y 6-tioguanina. También reconoce como sustrato la 8-azaguanina, - pero con menos eficiencia.

De los estudios hechos con la enzima HGPRT purificada de células de diversos mamíferos se ha visto que guardan semejanza - entre especies y que se trata de una enzima multimérica compuesta por subunidades idénticas cuyos pesos moleculares determinados en geles - de poliacrilamida SDS son de 24-²⁶⁰⁰⁰6000 daltons en el humano; 25-26000 - en hamster y 27000 en ratón. Una subunidad sola aparentemente no tie- ne acción catalítica.

En el humano la enzima funcional parece consistir en - un tetrámero compuesto por subunidades de 24000 daltons (^{2, 12}), - idénticas, lo que indica que esta enzima tiene origen en un solo gen.

EL LOCUS HGPRT.

Localización.

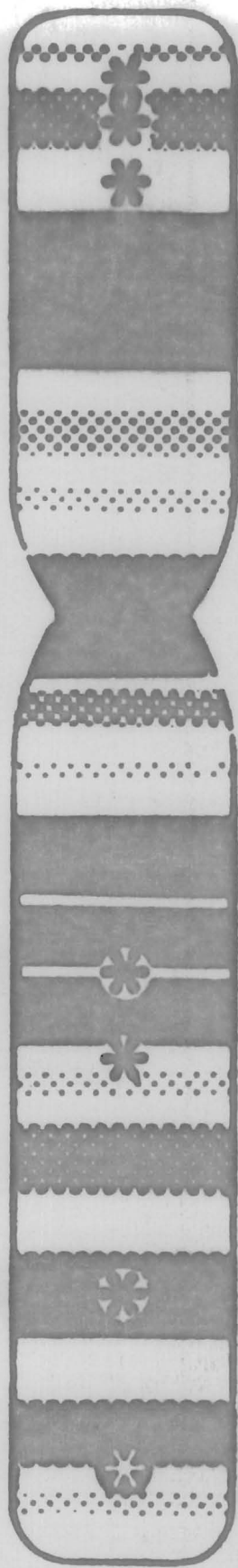
Este locus se encuentra en el brazo largo del cromoso- ma X (17, 52) ; Shos^{WS}os y Brown (56) demostraron que se encuentra entre los loci glucosa-6-fostato deshidrogenasa (G6PD) y fosfoglicerato - cinasa (PGK), en algún punto entre las bandas ²²q22-qter.

En los estudios iniciales de obtención de mutantes -
llamó la atención la frecuencia tan alta de células resistentes a -
8-azaguanina (8-AG^r), que es un análogo de guanina e hipoxantina, en
comparación con la frecuencia de células resistentes a bromodesoxiu -
ridina (análogo de timidina) y que resulta de una deficiencia en la
enzima timidina cinasa cuyo locus se encuentra en un autosoma: el cro -
mosoma 16. Los estudios citogenéticos más recientes indican que la -
frecuencia mayor de mutantes resistentes a análogos de purinas se de -
be a que el locus HGPRT responsable de la resistencia se encuentra -
en el cromosoma X, es una región donde se ha detectado una alta fre -
cuencia de rompimientos que podrían considerarse " sitios frágiles " -
("hot spots") (46, 67) . Yunis y Sutherland han encontrado en esta -
región cromosómica tres sitios frágiles: dos de ellos constitutivos -
(68) y el otro, heredable (60) (fig. I.6).

Deficiencia congénita en el locus HGPRT.

La mutación en el locus HGPRT en una célula germinal -
es la causa del síndrome de Lesch- Nyhan (37, 41, 55) en el que se pre -
sentan alteraciones de dos tipos: neurológicas (retraso mental y en -
el desarrollo, automutilación compulsiva) y en la excreción (sínte -
sis de purinas muy aumentada y excesiva excreción de ácido úrico), -
Se trata de un padecimiento ligado al X, por lo tanto las mujeres -
no presentan el síndrome, pero son portadoras.

p22.31
p22.2
p22.1



q21.32

q22.1

q25

q28.1

X

Fig. I.5 Sitios frágiles en el cromosoma X humano

Las células de individuos afectados por el síndrome Lesch-Nyhan (LN) carecen de la actividad de la enzima HGPRT, lo que les permite crecer en medio de cultivo que contiene análogos de purinas, ya que no son capaces de reutilizar las purinas libres. En cambio, las células normales que sí las pueden utilizar, se intoxican. (17)

Las células de las mujeres portadoras pueden tener la actividad de la enzima o carecer de ella. En fibroblastos en cultivo y en células de folículos pilosos se ha determinado esa heterogeneidad en la actividad de la enzima HGPRT (21, 29), pero en células sanguíneas como eritrocitos o linfocitos se detectó actividad normal de la misma. (20, 33)

Albertini y De Mars (4) consideraron que debía existir una población de linfocitos mutantes en las portadoras y que por su baja frecuencia se requería un método muy sensible para poder detectarlas. Basándose en las características de las células LN (tabla I.5) encontraron que podrían detectar los linfocitos mutantes de las mujeres heterocigóticas haciendo una selección de las células resistentes al análogo 8-azaguanina e identificándolas adicionando a los cultivos timidina tritiada (^3H -tdr) que es incorporada al ADN durante la fase de síntesis: las células resistentes la incorporan al replicarse, mientras que las normales mueren antes de incorporarla.

TABLA I.5 CARACTERISTICAS CONSIDERADAS PARA LA PRUEBA DIRECTA DE MUTAGENICIDAD EN LSP HUMANOS.

	CELULAS DEL TIPO LESCH-NYHAN	CELULAS NORMALES
Actividad de la enzima HGPRT	Negativa o Baja	Positiva
Actividad en presencia de análogos de purinas	Pueden crecer	Se inhiben
Incorporación de hipoxantina triada	Negativa	Positiva
Incorporación de timidina triada en presencia de 6-tioguanina	Positiva	Negativa

* LSP .- linfocitos de sangre periférica

La cuantificación de la timidina radioactiva incorporada a las células se hizo por el método de centelleo.

Con mezclas de linfocitos normales y linfocitos de un individuo con el síndrome de Lesch-Nyhan en diferentes proporciones - (1:3 hasta 1:81; L^N : normales) encontraron que el método fue suficientemente sensible para diferenciar cada proporción y para detectar a las mujeres portadoras.

En algunos individuos normales utilizados como controles se encontró incorporación de ^3H -tdr en presencia de 8-AG, es decir, se detectó que había algunas células alteradas en individuos no afectados por el síndrome de Lesch-Nyhan, pero la determinación de la incorporación de ^3H -tdr por medio de centelleo no permitió determinar esa frecuencia con exactitud; para ello Albertini y Strauss (57) propusieron un método enumerativo con el cual se podían identificar en forma individual las células alteradas, producto de mutaciones somáticas.

PRUEBA DIRECTA DE MUTAGENICIDAD EN EL LOCUS HGPRT EN LINFOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFERICA,

La técnica propuesta permite seleccionar, en presencia de 6-tioguanina, aquellos linfocitos deficientes en la enzima -

HGPRT presentes en una muestra de sangre. Se utiliza timidina tritio-
da como marcador de las células y la evaluación se hace por autorra-
diografía, lo que permite identificar la actividad de células indivi-
duales.

Aplicando este método a la detección de mujeres porta-
doras del síndrome de Lesch-Nyhan se logró una mayor sensibilidad que
en la evaluación por centelleo. Se utilizaron diferentes dosis del -
análogo y se encontró que la concentración óptima de 6-TG para selec-
cionar las células mutantes de las normales es de 2×10^{-6} M (fig. 1.7)

Con el fin de validar este método autorradiográfico -
de detección de linfocitos TG^R se evaluaron individuos expuestos a -
diferentes tratamientos mutagénicos. Se estudiaron muestras de pa -
cientes en quimioterapia y/o radioterapia; un paciente de transplan-
te renal con terapia inmunosupresora con azatioprina y se analizaron
los efectos del tratamiento con psoralen y luz ultravioleta en enfer-
mos de vitiligo y psoriasis (58). Los resultados demostraron un -
incremento en los valores basales de la frecuencia de linfocitos TG^R
(tabla I,6).

Pero surgieron dos problemas asociados al uso de esta
técnica para el monitoreo en humanos;

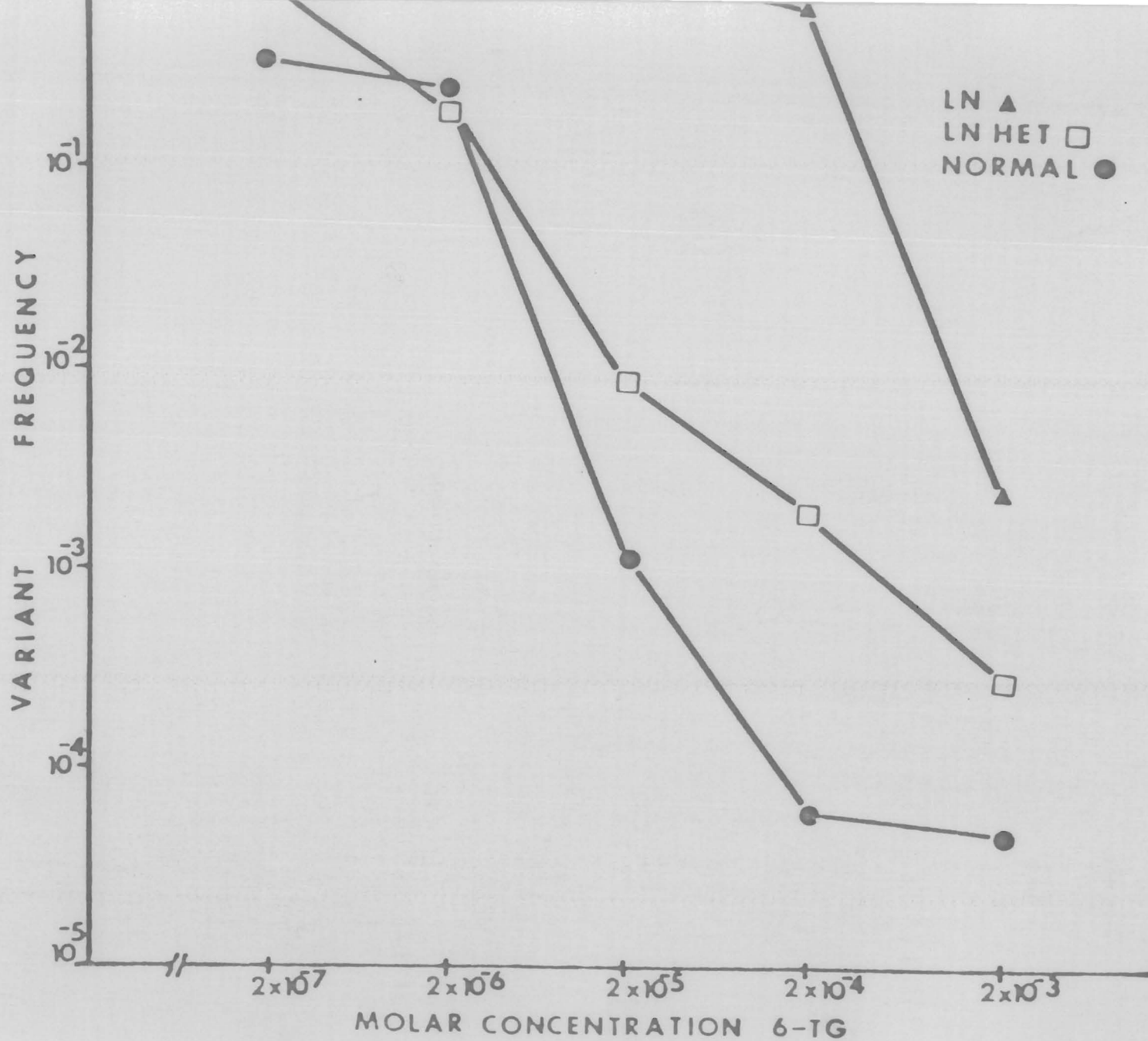


Fig. I.6. Determinación de la concentración óptima de 6-TG para el ensayo, con
 ... (LN) y de mutaciones portadoras (LN HET)

514

TABLA I.6 APLICACION DE LA PRUEBA DEHGPR T COMO PRUEBA DE MUTAGENICIDAD IN VIVO E IN VITRO

AGENTES MUTAGÉNICOS	COMPORTAMIENTO FRENTE A MUTAGENOS	FRECUENCIAS ENCONTRADAS		METODO
		CONTROLES	EXPUESTOS	
Rayos-X	Incremento con la dosis (<u>in vitro</u>)	1.48×10^{-5}	6.05×10^{-5}	Clonación (65)
		2.9×10^{-6}	9.5×10^{-5}	Clonación (53)
Luz UV	Incremento con la dosis <u>in vitro</u>	2.9×10^{-6}	5.6×10^{-5}	Clonación (53)
Qumioterapia + rayos-X	Incremento en pacientes tratados	8.5×10^{-5}	2.8×10^{-3}	Cultivo fresco + Autorradiografía (57)
		1.9×10^{-6}	2.8×10^{-3}	Criopreservación + Autorradiografía (10)
EMS	Incremento con la dosis (<u>in vitro</u>)	4.8×10^{-6}	$19.2-66.2 \times 10^{-6}$	Clonación (66)
ENU	Incremento con la dosis (<u>in vitro</u>)	6.1×10^{-6}	$26.0-91.0 \times 10^{-6}$	Clonación (66)
MMC	Incremento con la dosis (<u>in vitro</u>)	6.6×10^{-6}	$10.6-34.1 \times 10^{-6}$	Clonación (66)
Psoralen <i>Psoralen</i> Osirakeb + UV				
Azatioprina	Incremento después de tratamiento	10^{-5}	3.5×10^{-2}	Cultivo fresco + autorradiografía (57)

- 1° Las frecuencias basales de células TG^r encontradas en los estudios eran superiores a las que se habían observado en estudios in vitro en fibroblastos y linfoblastos, considerándose por esto la presencia de fenocopias en las muestras;
- 2° Se planteó el que las variantes observadas pudieran no ser células resistentes a la tioguanina por causa de una mutación, sino por causa de alguna alteración en el proceso de síntesis de la enzima o cualquier otro mecanismo epigenético.

1° Fenocopias:

En el ensayo de la HGPRT propuesto se utilizan leucocitos obtenidos de la sangre y al cultivarlas en presencia de fitohemaglutinina los linfocitos T en la muestra entran en ciclo celular; pero algunos de estos linfocitos ya se encuentran en alguna etapa del ciclo diferente de G_0 al momento de extraer la sangre del organismo. Puestas en cultivo estas células ya activas pueden efectuar uno o dos ciclos celulares antes de quedar inhibidas por la acción de la 6-TG. Cuando se agrega el marcador 3H -tdr estas células lo incorporan y en la autorradiografía aparecen como células TG^r sin serlo realmente (6) ; se les designa como fenocopias y la forma de evitar su enumeración se logra por medio de la criopreservación. Cuando la prueba se hace con linfocitos congelados se encuentran frecuencias consis

tentemente inferiores (del orden de 10^{-6} a 10^{-5}) que las encontradas en pruebas hechas con linfocitos " frescos " (entre 10^{-5} y 10^{-4}). Cabe señalar que la frecuencia después de la criopreservación concuerda mejor con la que se encuentra en fibroblastos in vitro (10^{-6} a 10^{-5}). (6)

Se ha propuesto que la congelación actúa como un sincronizador de las células que vienen activas en la muestra de sangre, haciendo que se detengan, posiblemente en G1 (8) ; al entrar a cultivo salen de G1, pasan por S en las primeras 24 horas del cultivo - y cuando se agrega el marcador ya no son capaces de incorporarlo, de tal forma que no se cuentan ya como células TG^R en la autorradiografía.

2°Clonación:

Para poder estudiar las características de una mutante se requieren muchas copias de ella; para obtenerlas se seleccionan las células mutantes originadas in vivo y se mantienen en cultivo para que proliferen y formen clonas (7) ; en este diseño la congelación se hace innecesaria ya que sólo proliferan las células que pueden resistir la tioguanina.

En las clonas de mutantes, Albertini y cols. (7) demostraron que son linfocitos T, que en el cultivo conservan su -

resistencia a la 6-TG, la transmiten a su descendencia y carecen de la enzima HGPRT (tabla I.7)

Dempsey y Morley⁴ (24) establecieron que las células TG^R son realmente mutantes porque en un medio con aminopterina (agente que bloquea la síntesis de novo de purinas) las clonas de células TG^R dejan de proliferar.

El estudio de diversas clonas TG^R aisladas de un mismo donador demostró que la alteración del locus HGPRT es distinta en cada clona, lo cual demuestra que la mutación somática puede producirse en diferentes regiones del locus en el mismo individuo y que cada clona que se produce representa un evento mutacional diferente (9) ; otro estudio en el que se analizó, por especificidad de anticuerpos, la configuración de los marcadores T de membrana de las mismas clonas, confirmó que eran mutantes de origen diferente, pues se encontró que cada marcador era distinto (10,40) (tabla I.7).

El método de clonación ya ha sido usado también para estudiar el efecto que la irradiación in vitro produce en los linfocitos normales (53,65) y la acción de mutágenos químicos conocidos, con diferentes mecanismos de producción de daño al ADN y en diferentes dosis (9) (tabla I.6).

TABLA I.7 CARACTERÍSTICAS DE LAS CELULAS TG^r DETERMINADAS POR EL METODO DE CLONACION.

Tipo celular	Marcadores de membrana	Genes para receptores de células T	Actividad de la enzima HGPRT	Sensibilidad de aminopterina
Células T (9,10)	T4, T8 (10)	10 diferentes en 11 clonas (10,40)	Negativa (7)	Positiva (24)

Albertini ha recomendado el uso de ambos métodos (clonación y autorradiografía) para la detección de mutantes en el locus HGPRT, ^t Tomando en cuenta que el método de clonación ^a da la posibilidad de obtener mayor información acerca del origen de la mutación y del modo de acción del mutágeno, mientras que para un monitoreo de la frecuencia con que ocurre un evento mutagénico en el locus, con la técnica de autorradiografía se obtiene la información necesaria.

Los intereses de nuestro grupo de trabajo, que pretende hacer el monitoreo de individuos expuestos a mutágenos, nos llevaron a elegir el método autorradiográfico cuyo uso en nuestras condiciones fue la meta principal de este trabajo.

MATERIAL Y METODOS.

1. Separación de linfocitos.- De una muestra de sangre de 40-50 ml se separan las células blancas utilizando un gradiente de Fycoll-hypaque, que se centrifuga durante 30 min. a 1500 r.p.m. (Este proceso debe llevarse a cabo en forma estéril).
2. Conteo de células.- El anillo de células blancas obtenidos en el gradiente se separa con una pipeta Pasteur y se resuspende en 1.5 ml de medio RPMI-1640. Con una micropipeta de 20ul se toma una muestra de esta suspensión de células que se diluye en 1 ml de colorante vital (eosina o azul de tripano), y se cuenta en un hemocitómetro diferenciando entre los linfocitos vivos y los muertos.
3. Congelación.- Una vez determinado el número de células obtenidas en la separación, se resuspenden éstas en medio de cultivo RPMI-1640, con suero autólogo ^{al} de 10% y DMSO 7.5%, a una ^{densidad} concentración de 10×10^6 células/ml y se distribuyen en cápsulas de plástico que se colocan rápidamente en una caja de unicel de 3cm. de grueso con tapa, que a su vez se guarda en un ultracongelador a -70°C , donde se conservarán hasta que se desea cultivar (resisten aproximadamente 2 meses). Si se deja más tiempo, la viabilidad disminuye considerablemente.

4. Descongelación.- Se prepara un baño María a 37°C y se retiran del ultracongelador las cápsulas para el experimento; éstas se sumergen en el baño durante 1 minuto, sin agitar para no formar burbujas en la suspensión de células.

Se toman con una pipeta Pasteur y se resuspenden en 30 ml. de medio a 37°C. Se lavan para quitar el DMSO que puede resultar tóxico para la célula ^{descongelada} activa, centrifugando durante 10 minutos a 1200 r.p.m.

Se resuspenden en 1.5 ml de medio RPMI-1640 para determinar el número de células que se recuperaron y su viabilidad. El procedimiento para el conteo es el mismo que se describe en el paso 2; si la proporción de células vivas alcanza el 80% se procede a montar el cultivo. La viabilidad se obtiene dividiendo el número de células vivas que se encontró, entre el total de células contadas.

5. Preparación para cultivo.- Las células recuperadas se resuspenden en medio RPMI-1640 y suero autólogo al 20% ajustando a una concentración de 1×10^6 células por cada 0.9 ml.
6. Cultivos para control.- Estos cultivos son el testigo del experimento para cada individuo y en ellos se determina el índice de marcaje.

De la suspensión de células preparada en el paso 5, se toman 4.5 ml, de tal forma que se tienen 5×10^6 células. Se les agrega 0.5 ml de medio básico (cuya preparación se describe más adelante) con el fin de igualar el pH con el de los cultivos de prueba en presencia de 6-TG. Finalmente se agregan 0.2 ml de PHA (PHA-M, GIBCO liofilizada). No empleamos antibióticos .

7. Cultivos en presencia de 6-TG.- Se toman igualmente 4.5 ml de suspensión de células y se agrega 0.5 ml de 6-TG preparada como se describe en otro apartado. Se agrega 0.2 ml de PHA, sin antibióticos.

Se monta el experimento de cada individuo con 1 testigo y 3 cultivos^s en presencia de TG, como mínimo.

8. Incubación y marcaje con 3 H-tdr.- Se ponen a incubar los cultivos así montados, a 37°C. A las 24 horas se agregan 20ul de ^{6.7 Ci/mmol de actividad específica;} timidina tritiada, (4uCi/ml de cultivo) y se dejan incubar 16 horas más.

9. Cosecha.- (A partir de este paso ya no es necesario trabajar en area estéril .) A las 40 horas de iniciados los cultivos se agregan 10 ml de ácido cítrico 0.1M y se extraen los núcleos por centrifugación a 1700 r.p.m. durante 15 minutos. El sobre-

nadante, radiactivo, se desecha en un recipiente especial y los núcleos se fijan en metanol-acético 7.0:1.5, 10 ml ; se resuspende fuertemente con un agitador vórtex y se extraen nuevamente a 1700 r.p.m. durante 15 minutos. Finalmente, se resuspenden en 200ul de fijador y se guardan en refrigerador durante 24 hrs al menos, antes de proceder a preparar las laminillas para autorradiografías.

10. Preparación de laminillas.- Antes de extender los núcleos recuperados en los portaobjetos, para su análisis, es necesario saber cuántos núcleos se recuperaron. Para contarlos se toma una gota de la resuspensión de núcleos, con pipeta Pasteur, y se diluye con 20 gotas de fijador; se resuspende bien y se cuenta en un hemocitómetro.

Las laminillas se preparan como sigue:

Para determinar el índice de marcaje del testigo.- Se resuspenden bien los núcleos con una pipeta Pasteur o si quedan muy aglutinados, se emplea una aguja para punción lumbar, de 7.5 cm de largo, delgada, hasta que queden resuspendidos homogéneamente. Entonces se extienden por goteo sobre un portaobjetos seco, perfectamente limpio; para lograr que se separen bien los núcleos, el goteo se efectúa desde una altura de 10 cm y se

ponen sólo 5 o 6 gotas por laminilla y se dejan secar al aire.

Para determinar el índice de marcaje de los cultivos en presen
cia de TG.

Se suspenden de la misma manera que los controles, -
cuidando que las pipetas y las agujas se encuentren limpias -
para evitar que se mezclen los resultados entre el control y -
los cultivos de prueba.

Las laminillas se hacen también por goteo sobre el -
portaobjetos, desde una altura de 5 cm, para evitar que salpi-
que la muestra y se pierda material. Se ponen 2-5 gotas por la
minilla, procurando que no se dispersen mucho, ^{mejor,} ~~sin~~ ~~más~~ ~~bien~~ -
que queden en el centro.

Haciéndolo de esta manera, los núcleos, que tienden
a aglutinarse, se dispersan bien y permiten una mejor y más -
rápida evaluación de las autorradiografías.

11. Tinción.- Las preparaciones de núcleos se dejan secar un día -
por lo menos, y después de tiñen con acetorceína fresca al 1%,
de la siguiente manera:

El colorante se filtra primero, después las laminillas se -

sumergen durante 60 segundos en el colorante, se lavan con H_2O destilada durante 10 segundos y se enjuagan luego en agua corriente durante 10 minutos. Se dejan secar al aire. (Si el colorante está viejo se debe alargar el tiempo de tinción hasta obtener el color que se desea).

El mejor tono para la evaluación es un rosa claro que permita ver claramente la marca en la autorradiografía.

12. Autorradiografías.- Proceso en oscuridad:

Las laminillas ya teñidas se cubren con una emulsión para autorradiografías NTB-2 de Kodak, que se puede utilizar diluida 1:2 (ver apartado especial para preparación de sustancias).

La emulsión se licúa en baño María a 40°C y cuando ya está completamente líquida se vierte en un recipiente estrecho con una profundidad equivalente al largo de la laminilla.

Con un portaobjetos limpio se eliminan las burbujas que pudieran haberse formado al licuarse y se procede a cubrir las preparaciones. Esto se hace simplemente sumergiendo-

ada laminilla en el recipiente durante 1 segundo, tiempo suficiente para que se adhiera una delgada película de la emulsión sobre la preparación; se quita con un pañuelo desechable la emulsión del reverso de la preparación (asegurándose antes de que efectivamente se limpia el reverso) y se deja secar sobre la mesa, en posición vertical.

Cuando ya secaron todas las laminillas se guardan en una caja negra, ésta se envuelve con plástico negro, o bien con papel aluminio de tal forma que no reciban luz y se guardan en refrigeración durante 3 días como mínimo, para permitir que la timidina radioactiva marque la emulsión de autorradiografía.

Revelado; proceso en oscuridad.

Para el revelado se utiliza revelador D-19 (Kodak) - agua destilada y fijador rápido (Kodak) en recipiente para tinción de laminillas con canastilla de aluminio o de vidrio. En ésta se colocan las autorradiografías y se procede al revelado:

1º 5 min. en el revelador D-19 a 18°C; el revelador debe cubrir completamente las laminillas.

2° lavar en H₂O destilada durante 1 a 2 minutos.

3° 5 - 6 min. en fijador;

4° lavar en H₂O destilada 3 minutos.

Esto se hace sin agitar en ningún momento; se puede enjuagar con agua de la llave, pero no en agua corriente pues eso puede estropear la emulsión.

5° se dejan secar al aire.

Desde el 4° paso ya se puede trabajar con luz.

El proceso en oscuridad se efectúa " a la luz " de una lámpara con filtro rojo, número 2.

13. Evaluación al microscopio de los índices de marcaje en el cultivo testigo y en los cultivos en presencia de 6-TG. Las autorradiografías ya reveladas se analizan al microscopio.

Las del cultivo testigo se analizan con el objetivo de medio aumento (40 X) y se cuentan 2500 núcleos en cada una, diferenciando entre los núcleos que presenten la marca autorradiográfica y los que no la presentan. Se toman como positivos los que contengan más de 20 granos de precipitación de plata. (véanse " Criterios para la evaluación de autorradiografías").

El índice de marcaje del cultivo se obtiene como el -

promedio del índice de cada laminilla del mismo.

$$L.I._c = \frac{\text{Número de núcleos marcados}}{2500}$$

El índice de marcaje de los cultivos selectivos se obtiene contando la cantidad total de núcleos marcados en las autorradiografías (M) sobre el total de núcleos recuperados en esos cultivos (T):

$$L.I._m = \frac{M}{T}$$

14. Finalmente se obtiene la frecuencia de variación o de mutación (Vf) que está dada por la razón entre los dos índices obtenidos previamente:

$$Vf = \frac{L.I._m}{L.I._c} = \frac{M/T}{L.I._c} = \frac{M}{L.I._c \times T}$$

$L.I._c \times T$ se define como el número de núcleos evaluables en los cultivos con 6-TG o N.

CRITERIOS PARA LA EVALUACIÓN DE AUTORRADIOGRAFÍAS.

Con los núcleos recuperados de los cultivos se -

hicieron preparaciones en las que se puede distinguir al microscopio cada célula individual; al cubrir estas laminillas con una emulsión-fotográfica sensible la desintegración del isótopo radiactivo produce precipitación de gránulos de plata de la emulsión y esta precipitación, de color negro, se nota claramente sobre el núcleo teñido con acetorceína. Si la cantidad del isótopo incorporada al núcleo es alta, la precipitación de emulsión causada por su desintegración hará aparecer al núcleo completamente negro, con un contorno circular u ovalado, pero siempre redondeado, y gránulos individuales alrededor; a menudo la intensidad de esta marca autorradiográfica es tal que no es posible distinguir al núcleo teñido subyacente.

Si la cantidad de isótopo incorporada en un núcleo no fue muy elevada, la proporción de gránulos de emulsión que se forman sobre el núcleo no lo cubre por completo y es posible distinguir todavía el núcleo teñido por debajo de ella.

Cuando la cantidad de gránulos sobre el núcleo no rebasa el número de 20, se ha establecido que se considere como no marcado; se asume que la cantidad de ^3H -tdr incorporada no es indicativa de que la célula efectuó la fase de síntesis del ADN.

En la evaluación de estos núcleos con escasa marca -

es importante considerar lo que se llama precipitación inespecífica de la emulsión (background).

Cuando es muy frecuente o intensa esa precipitación puede causar confusión en la evaluación, principalmente en las zonas de la autorradiografía donde hay muchos núcleos muy próximos; pero es sencillo diferenciar si se trata de precipitación inespecífica o no, analizando las zonas de la autorradiografía donde no hay células para determinar la frecuencia, proximidad y distribución de las precipitaciones.

Esta forma de ²mercado es exactamente igual ya sea que se trate de núcleos que incorporaron ³H-tdr en cultivos de control, o bien, que la hayan incorporado en presencia de 6-tioguanina.

Resumiendo, los criterios para evaluar como positivo un núcleo se pueden enumerar como sigue:

- 1) que se distingan precipitaciones de la emulsión directamente, sobre el núcleo, en un número mayor de 20,
- 2) que se aprecie por debajo de la marca al núcleo teñido por la acetorceína en tonos rosa o rojizo,
- 3) si la marca es muy intensa y no permite ver el -

núcleo teñido, entonces se determina por la forma redondeada u ovalada del núcleo, alrededor del cual se puede distinguir una corona de gránulos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se calculó el intervalo de confianza (C.I.) de una frecuencia de células variantes, así como el C.I. de la relación entre dos frecuencias; dichas pruebas fueron desarrolladas por Sylwester y Albertini en 1985. (61)

Se aprovecha en ellas una propiedad de las distribuciones de Poisson que consisten en que su logaritmo natural se distribuye aproximadamente en forma normal.

Intervalo de confianza para una frecuencia de células variantes (Vf)

Como ya se explicó: $Vf = M/N$, donde M es el número de células marcadas en presencia de tioguanina (que suele ser un número pequeño) y N es el número de células evaluables (que es un número grande). Las dos ^{son} variables aleatorias. Se asume que M tiene una distribución de Poisson pues sólo una pequeña fracción de los linfocitos de individuos normales tiene el fenotipo variante de resistencia a tioguanina.

El logaritmo natural de una variable de Poisson (sea en este caso m^*) se distribuye aproximadamente como una normal con una media $\ln (m^*)$ y varianza $1/m^*$. A partir de esto, se hizo una aproximación para los intervalos de confianza para M ;

$$(\ln (M) - 1.96 / \sqrt{M}; \ln (M) + 1.96 / \sqrt{M}) \quad (a)$$

donde 1.96 es una constante obtenida de una tabla para valores Z para intervalos de confianza del 95%.

El antilogaritmo de (a) es:

$$(m_i^*; m_s^*) = (M \cdot \exp(-1.96 / \sqrt{M}); M \cdot \exp(1.96 / \sqrt{M})) \quad (b)$$

Esto equivale a los intervalos de confianza para M donde m_i^* es el valor inferior del intervalo y m_s^* es el valor superior.

Pero $Vf = M/N$, de donde, si se divide (b) entre N :

$$(Vi^* ; Vs^*) = (Vf \exp (-1.96 / \sqrt{M}); Vf \exp (1.96 / \sqrt{M})) \quad (1)$$

Esta fórmula es la que se empleó en la evaluación de cada valor de Vf encontrado.

Intervalo de confianza para la relación entre dos frecuencias de variantes (Vf_2/Vf_1)

Los mismos autores (61) utilizaron la relación entre dos frecuencias de linfocitos variantes Vf_2/Vf_1 para estimar si son iguales o no. Si la relación da un valor cercado al 1 no se puede rechazar la posibilidad de que las dos frecuencias sean iguales.

El intervalo de confianza para esta relación se apro

ximó de la misma manera que se hizo para evaluar frecuencias individuales, utilizando la transformación logarítmica.

Para dos muestras independientes, el $\ln(M_2/M_1) = \ln(M_2) - \ln(M_1)$ se distribuye en forma aproximadamente normal con media $\ln(m_2^*/m_1^*)$ y desviación estándar cuyo valor se estima: $s = (1/M_2 + 1/M_1)^{1/2}$. De aquí el intervalo de confianza del 95% para $\ln(m_2^*/m_1^*)$ se obtiene aproximadamente en esta forma:

$$(\ln(M_2/M_1) - 1.96s ; \ln(M_2/M_1) + 1.96s) \quad (c)$$

Sacando el antilogaritmo para (c):

$$((M_2/M_1) / \exp(1.96s) ; (M_2/M_1) \exp(1.96s)) \quad (d)$$

Si se divide nuevamente entre N se obtiene el intervalo de confianza del 95% para la relación entre dos frecuencias de células variantes V_2^*/V_1^* :

$$((Vf_2/Vf_1) / \exp(1.96s) ; (Vf_2/Vf_1) \exp(1.96s)) \quad (2)$$

Esta es la fórmula empleada en el análisis de las relaciones entre cada par de frecuencias. Si el número 1 queda incluido en el intervalo de confianza de esta relación, se considera-

que son iguales las dos frecuencias analizadas.

PREPARACION DE SUSTANCIAS.

- Fycoll-hypaque.-

Se utiliza a una densidad de 1.077.

Pesar 30 g de Fycoll (Sigma 4375-tipo 400) en 200 ml de agua destilada.

Diluir 50 ml de hypaque en 80 ml de agua destilada (Hypaque M, 90%, Winthrop NDC 0024-0788).

Se mezclan ambas sustancias y se diluyen con aproximadamente 130 ml más de agua destilada, para alcanzar la densidad deseada que se determina con un hidrómetro para gravedad específica 1000-1220 (VWR-Scientific Inc.).

Se separa luego en frascos color ámbar, se esteriliza en autoclave y se guarda en refrigeración.

↖ Dimetil sulfóxido (DMSO) Sigma N°D-5879.

↖ Medio RPMI-1640 con HEPES y glutamina.

El polvo para 5 litros de medio RPMI-1640 (Flow Lab, 10-601-21), se rehidrata en 3 litros de agua desionizada, se agregan 29.79 g

de HEPES (25 mM ; P.M. 238.3) lo cual baja el pH aproximadamente a 6.

Añadir 10g de $\text{Na}_2 \text{HCO}_3$; ajustar el pH a 7.4, completar a 5 litros y filtrar en filtro Millipore con membranas $0.45 \text{ }\mu\text{m}$, $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ y pre filtro.

Se separa en frascos de 100 ml y al momento de usar se le agrega glutamina (Flow Lab. 16-801-49; 200 mM , 29.23 mg/ml para obtener una concentración 2 mM).

6-TG $2 \times 10^{-3} \text{ M}$:

- . 33.44 mg de 6-TG (Sigma A-4882),
- . Agregar 2ml de medio RPMI-1640.
- . Disolver con 0.5 ml de NaOH 1N, agitando fuertemente con vórtex o calentado a baño María hasta que se disuelva bien.
- . Agregar 9.5 ml de medio RPMI-1640 para obtener el stock a una concentración de $2 \times 10^{-2} \text{ M}$.

Se separa en alícuotas de 1 ml y se congela.

La solución de trabajo se obtiene descongelando una alícuota, que se diluye 1:10 en medio RPMI-1640 para obtener una concentración $2 \times 10^{-3} \text{ M}$. De esta solución se tomarán 0.5 ml para agregar a cada cultivo de 5 ml, con lo que queda a una concentración de $2 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Medio básico:

* 11.5 ml de medio RPMI-1640,

* 0.5 ml de NaOH 1N

Se mezclan, se separan alícuotas ^{de} 1 ml y se congelan.

Para trabajar, se descongela una alícuota, se diluye 1:10 con medio RPMI-1640 y de esta solución se toma 0.5 ml para cada cultivo restigo de 5 ml.

- Suero autólogo:

Este suero se obtiene en el gradiente con fycoll-hypaque al separar las células blancas de la ^gsangre del donador.

El suero queda en la parte superior del gradiente y se separa en forma estéril con una pipeta Pasteur. Se centrifuga a 1500 r.p.m. durante 30 min. y después se separa de los sedimentos que se obtengan, que pueden consistir en proteínas desnaturalizadas y restos de fycoll-hypaque, mediante una pipeta Pasteur y se guarda en congelación. No es necesario inactivarlo.

- ³H-tdr; NEN, NET-027 6.7 Ci/mmol de actividad específica.

Se usó 4uCi/ml de cultivo de esta solución.

- Acido cítrico (Baker 0110) 0.1M:

5.254 g en 250ml de agua destilada.

- Fijador metanol + acético:

7.0 partes de metanol absoluto

1.5 partes de ácido acético glacial

- Acetorceína (orceína natural Sigma I.C. N°1242)

Orceína natural al 2% en ácido acético al 45% en agua destilada.

Diluir con ac. acético al 45%, 1:2 para obtener el colorante al 1%, que es la concentración que se utiliza en la tinción. Antes de usarlo se debe filtrar con papel de poro grueso, simplemente para eliminar las precipitaciones que se forman en el colorante almacenado en lugar seco, a temperatura ambiente, en la oscuridad.

- Emulsión NTB-2 (Kodax nuclear track emulsion NTB2, cat. 165-4433)

Es una emulsión especial para autorradiografías, de rápida exposición; se puede utilizar tal y como viene, pero para obtener un mayor rendimiento de la misma nosotros la diluimos, sin que esto perjudique la obtención de las autorradiografías.

Se hace de la siguiente manera (en oscuridad y luz de filtro N°2 rojo):

+ Se extrae del envase una cantidad de emulsión equivalente a 20 ml. (La emulsión en refrigeración se solidifica) con una varilla de vidrio limpio, se coloca en un vaso de precipitados de 50 ml y se deja licuar a baño María a 40°C.

+ Una vez licuada se diluye 1:2 con agua destilada previamente hervida y dejada enfriar a temperatura ambiente, en una probeta graduada.

+ Esta emulsión así preparada se vierte en el recipiente estrecho en el que se van a cubrir las laminillas, cuya capacidad es aproximadamente de 20 ml; esta cantidad de emulsión alcanza para un número de 30 autorradiografías aproximadamente.

- Revelador D-19 (ó D-11). Se utiliza diluido 1:2 para aumentar su rendimiento: 31 g del polvo que contiene el empaque se diluyen en 400 ml de agua destilada a 52°C con agitación constante (con agitador magnético). Ya disuelto se vierte en un recipiente ámbar u oscuro y se deja enfriar.

Para su uso se enfría a 18 o 20°C.

- Fijador. También se diluye 1:2 (Fijador rápido con endurecedor Kodak, cat. 616-0014),

- Colorante vital eosina amarillenta (Sigma I.C. N°45380)

1 mg en 50 ml de NaCl 0.9% (solución isotónica).

- Colorante vital azul de tripano; GIBCO # 525.

0.4% (1:6).

RESULTADOS.

Evaluación de autorradiografías.

Los linfocitos que responden al estímulo de la P[#]A incorporan ³H-tdr a su ADN durante la fase de síntesis; esto permite la diferenciación de las células capaces de dividirse en el cultivo de las que no lo son.

Cuando se analizan al microscopio las autorradiografías de estos cultivos, en los controles se pueden observar campos como el que aparece en la figura R.1 en el que el 30% de los núcleos aparecen con marca autorradiográfica (aumento 200x). El resto de los núcleos representan las células que no fueron viables en el cultivo o bien, que no fueron capaces de responder al estímulo de la fitohemaglutinina. En la figura R.2 se aprecia una parte del mismo campo, a mayor aumento (1000x) en el que se aprecian mejor las características que se toman como base para contar un núcleo como positivo. En estas autorradiografías se hizo la determinación de índice de mercaje L.I_C^a (ver ^M material y métodos)

En las mismas condiciones de cultivo, pero en presencia de 6-tioguanina, sólo son capaces de crecer las células

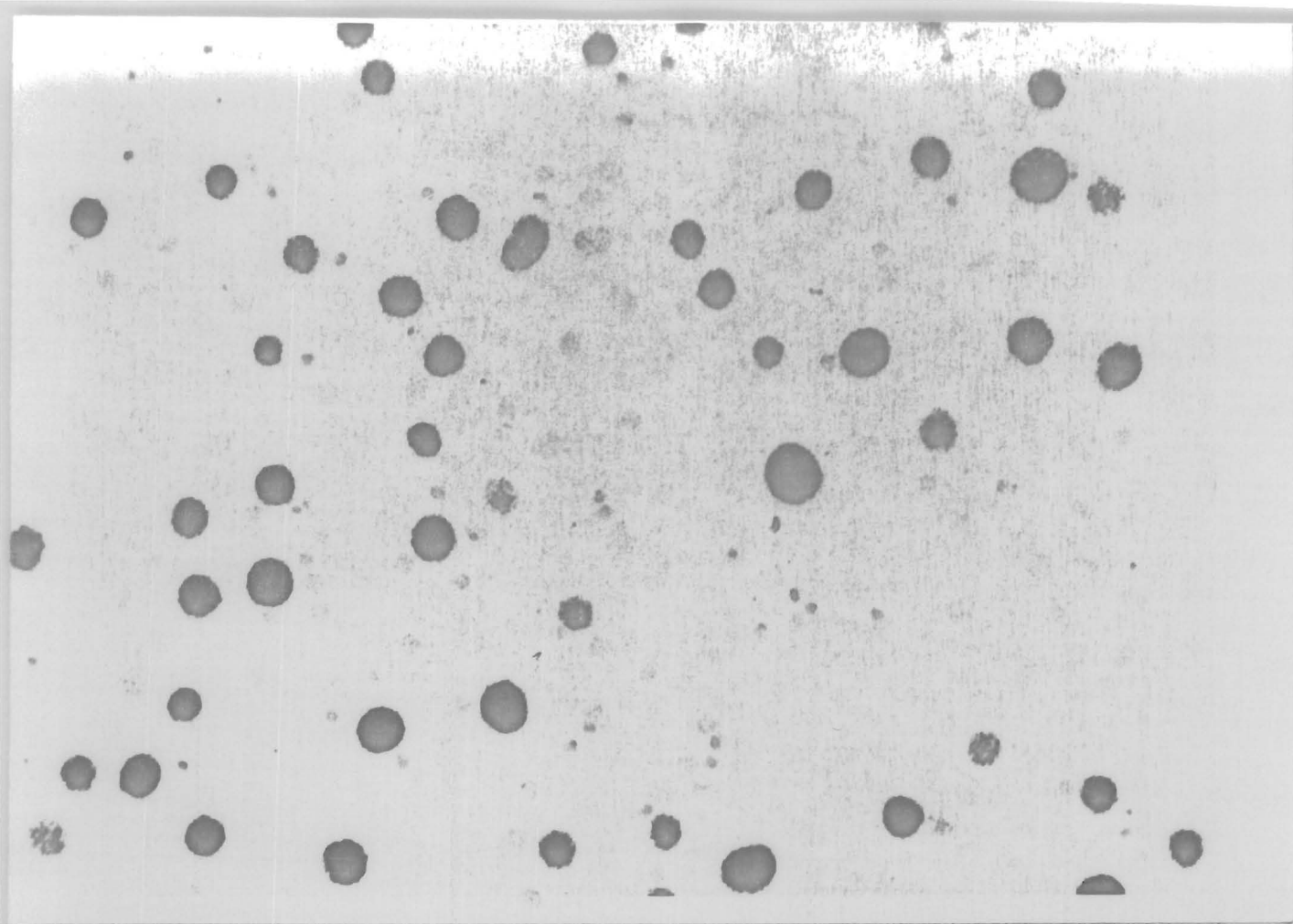


Fig. P.1 - Autoradiografía de cultivo control.

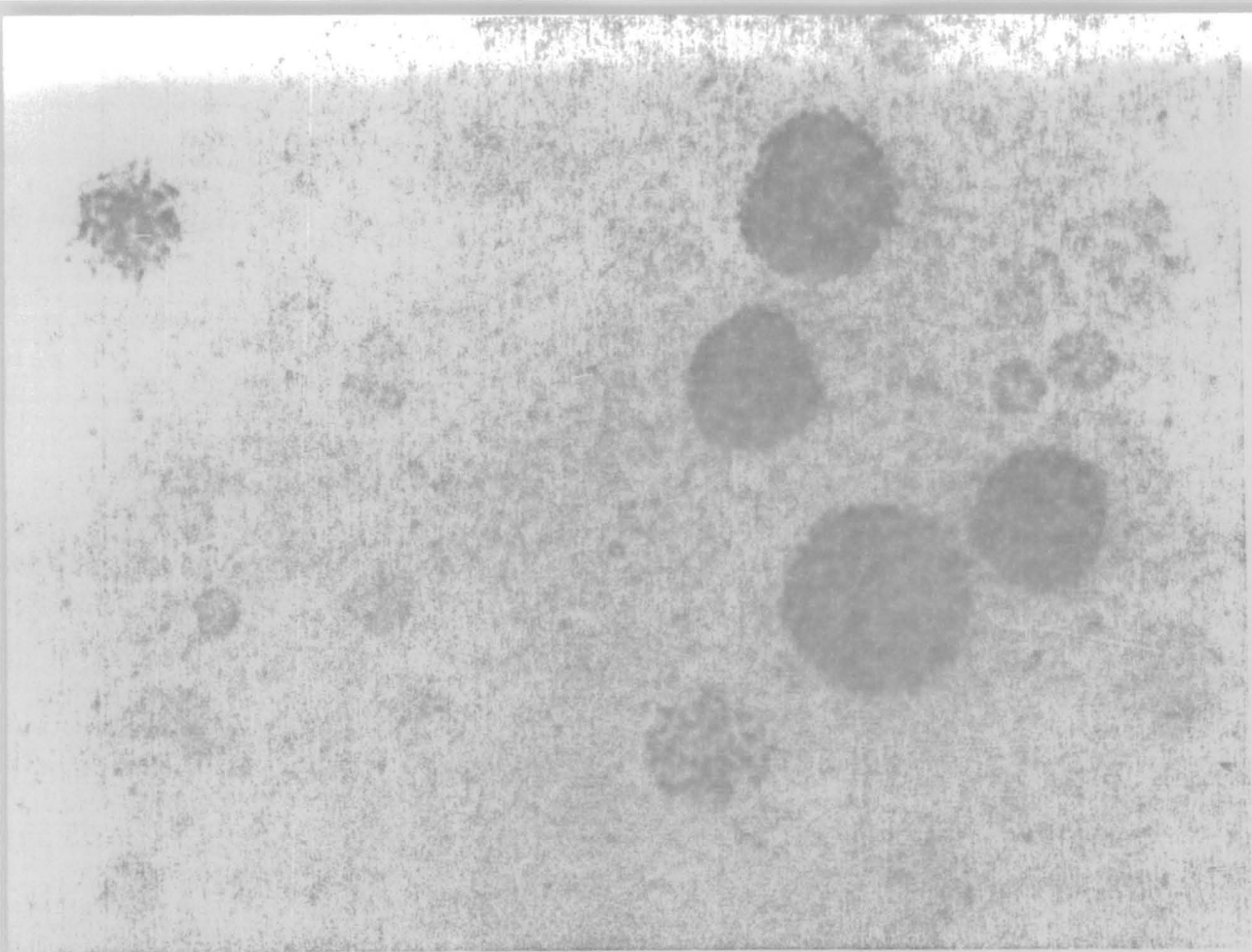


Fig R. 2 - Campo de cultivos de control a mayor aumento.

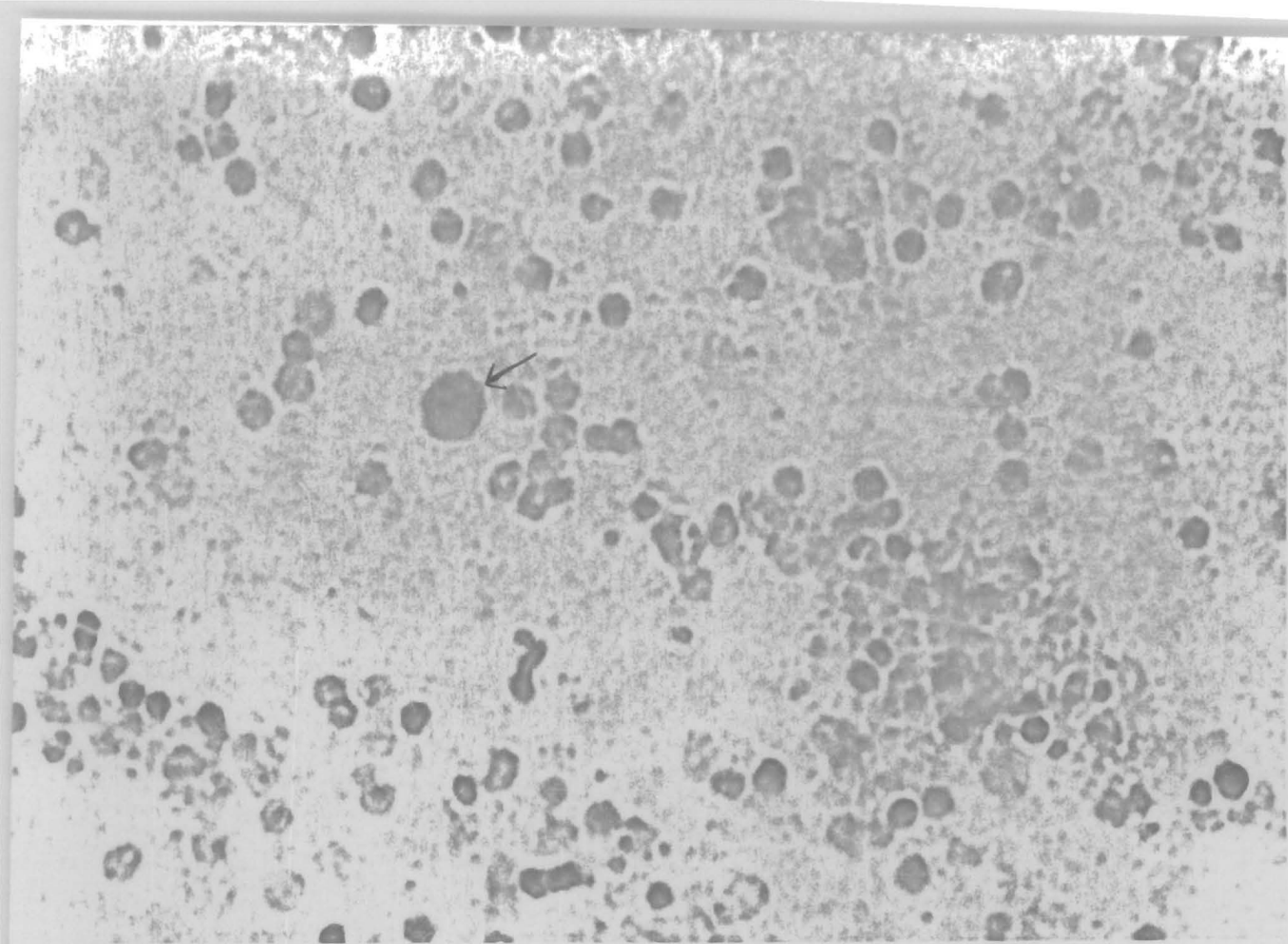


Fig. R.3. Autoradiografía de cultivo con 6-Tb.
La flecha señala al único núcleo Tb^r , con marca.

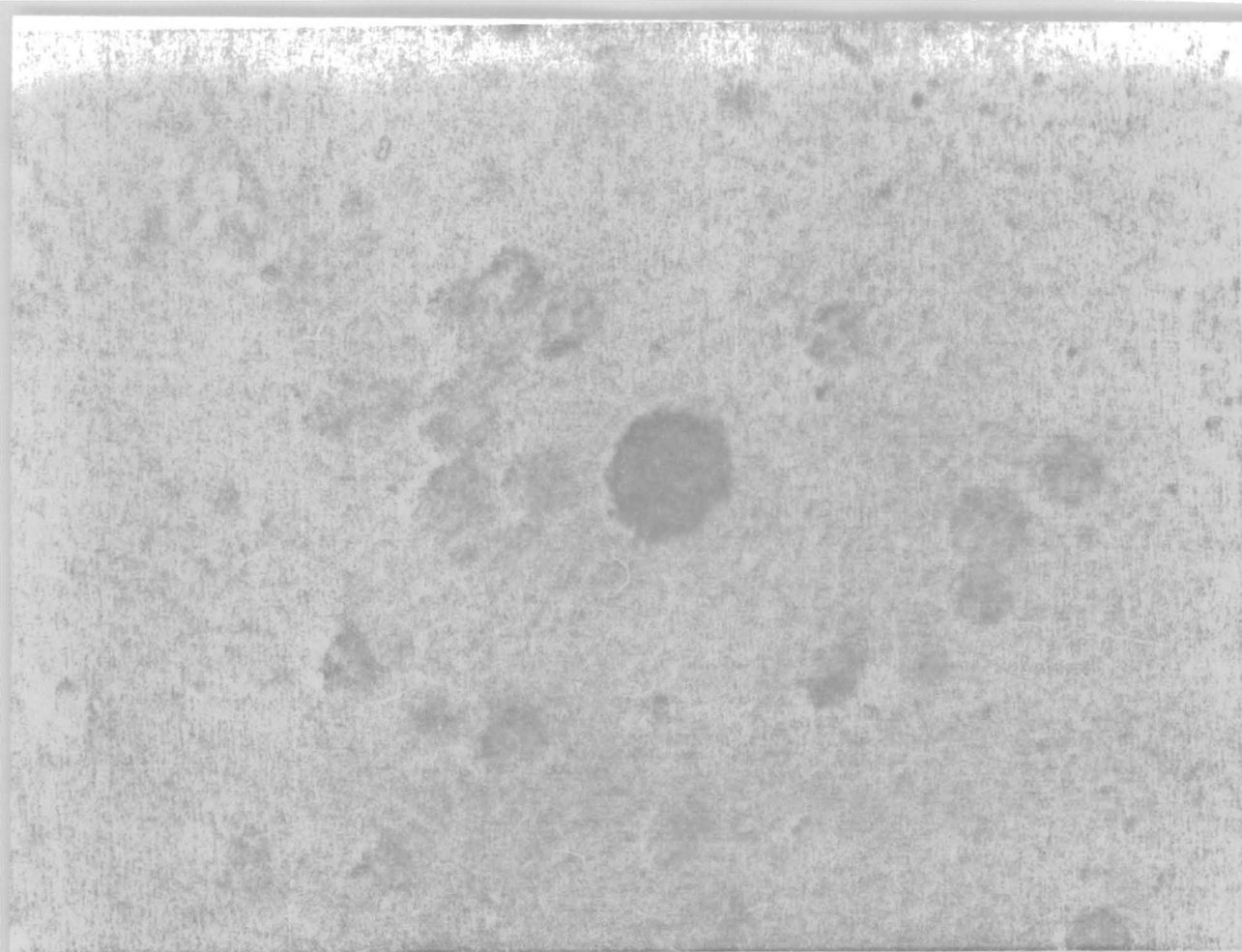


Fig. R.4. Núcleo TG1 a mayor aumento.

mutantes, por esto, el aspecto de las autorradiografías de estos cultivos es notoriamente distinto. En la figura R.3 se observa un campo de uno de estos cultivos a bajo aumento (200x); sólo se observa un núcleo con la marca autorradiográfica, el cual visto con mayor aumento (1000x) presenta las mismas características que presentan los núcleos marcados en las autorradiografías de los controles.

Fenocopias y efectos de la criopreservación.

Albertinⁱ⁾ y Sylwester reportaron en uno de sus trabajos (2) que la presencia de fenocopias en las muestras hacía variar en forma considerable las frecuencias de linfocitos-variantes encontradas, y para eliminar su interferencia sugieren el uso de la criopreservación de los linfocitos antes de la siembra.

Para estimar con qué frecuencia se presentan estas fenocopias se utilizaron linfocitos congelados de 3 donadores y se cultivaron de la manera ya señalada (véase Material y Métodos), pero la cosecha se hizo tanto a las 24 horas como a 40 horas de iniciado el cultivo, estando en presencia de ³H-tdr 24 y 16 horas respectivamente.

Los resultados obtenidos se ven en la tabla R.1 donde se comparan

TABLA R.1 Indices de marcaje (L.I.) en cultivos control
estimulados con fitohemaglutinina.

Donador	L.I.			L.I.		
	24hs. de incubación			40hs. de incubación		
DTQ	1.63	x	10^{-3}	3.6	x	10^{-1}
RMM	2.53	x	10^{-6}	4.2	x	10^{-1}
AGC	2.7	x	10^{-2}	3.6	x	10^{-1}
DTQ	$\bar{X}=9.5$	x	10^{-3}	$\bar{X}=3.8$	x	10^{-1}

los diferentes índices de marcaje (L.I.) de los 3 donadores.

La frecuencia de células activas en los cultivos de 24 horas mostró una gran variación; desde el orden de 10^{-6} (en el donador RMM) hasta 10^{-2} (en el donador AGC); en los tres casos, de cualquier forma, se encontró una frecuencia de linfocitos " adelantados" en el ciclo celular, ^g la que normalmente los linfocitos requieren de una fase llamada " lag" o de adaptación en la que no incorporan timidina tritiada; esto ocurre hasta que llegan a la fase de síntesis. La presencia de linfocitos marcados, es decir que pasaron la fase S en las 24 horas del cultivo, demuestra la existencia de fenocopias.

El índice de marcaje de los cultivos a 40 horas, por otro lado, en los tres individuos fue del orden de 10^{-1} .

La presencia de fenocopias en muestras de linfocitos congelados, a 24 horas de cultivo, nos llevó a cuestionar el efecto de ^{la} criopreservación.

Con el objetivo de entender cuál era ese efecto se cultivaron las células de un donador durante 40 horas (en ausencia y en presencia de 6-TG) directamente recién separados los linfocitos de la muestra y después de 24 horas de congelación,

El índice de marcaje (L.I.) de las células que no pasaron por la criopreservación fue de 0.2063 mientras que el de las células criopreservadas fue de 0.1010.

Así también, la frecuencia de células TG^R encontrada en la fracción sin criopreservación fue notoriamente mayor que la encontrada en la fracción que sí se congeló (Tabla R.2).

Frecuencia espontánea de linfocitos de sangre periférica resistentes a 6-TG.

Una vez establecida la metodología y utilizando la criopreservación para la eliminación de fenocopias se determinó en 18 individuos " sanos ", no expuestos a agentes ambientales no usuales en la Ciudad de México, el índice de marcaje (L.I.) con timidina tritiada y la frecuencia de linfocitos resistentes a 2×10^{-4} M de tioguanina.

En la tabla R.3 se resumen todos los parámetros que se midieron con el fin de calcular la frecuencia de células TG^R para la muestra de cada individuo. Las columnas 2 y 7 corresponden al índice de marcaje en controles y a la frecuencia de células TG^R (o Vf) respectivamente, y en las figuras R.5 y R.6 están representadas sus distribuciones.

TABLA R.2 EFECTOS DE LA CRIOPRESERVACION EN EL INDICE DE MARCAJE Y LA FRECUENCIA DE CELULAS TG^r EN LA MISMA MUESTRA DE SANGRE .

SIN CRIOPRESERVACION

<u>L.I.c</u>	<u>T</u>	<u>N</u>	<u>M</u>	<u>V_f</u>
0.1010	12.6 x 10 ⁶	1.28 x 10 ⁶	16	12.54 x 10 ⁻⁶

S/N CRIOPRESERVACION

<u>L.I.c</u>	<u>T</u>	<u>N</u>	<u>M</u>	<u>V_f</u>
0.2063	9.96 x 10 ⁶	2.1 x 10 ⁶	297	146 x 10 ⁻⁶

- L.I.c - núcleos marcados en cultivos de control / 5000 núcleos contados
- T - Total de células recuperadas de los cultivos con TG
- N - L.I.c X T
- M - Total de núcleos marcados en cultivos como 6-TG.
- V_f - M/N

DONADOR	L.I. _c	T	N	M	L.I. _m	Vf
1 J.R.L.	0.2466	7.5 x 10 ⁶	1.85 x 10 ⁶	0	0.0	0.0
2 L.O.	0.4116	5.0 "	2.06 "	0	0.0	0.0
3 R.M.M.	0.1544	2.5 "	0.386 "	0	0.0	0.0
4 R.M.M.	0.4206	7.8 "	3.28 "	3	0.3846 x 10 ⁻⁶	0.91 x 10 ⁻⁶
5 S.C.	0.4616	7.5 "	3.46 "	5	0.66 "	1.44 "
6 J.E.A.	0.3846	7.3 "	2.83 "	6	0.8219 "	2.12 "
7 M.A.A.	0.2579	7.2 "	1.85 "	4	0.555 "	2.15 "
8 E.V.	0.3213	2.5 "	0.803 "	3	1.2 "	3.74 "
9 R.D.P.	0.3688	3.5 "	1.29 "	5	1.42 "	3.87 "
10 M.C.M.	0.3656	6.3 "	2.3 "	11	1.746 "	4.78 "
11 A.V.E.	0.1375	6.0 "	0.825 "	4	0.666 "	4.84 "
12 P.O.W.	0.3376	7.5 "	2.5 "	13	1.73 "	5.3 "
13 R.G.	0.3447	6.18 "	2.08 "	17	2.75 "	8.17 "
14 F.CH.	0.1010	12.6 "	1.2756 "	16	1.269 "	12.54 "
15 D.T.Q.	0.3630	4.5 "	1.633 "	23	5.111 "	14.08 "
16 C.C.N.	0.2152	2.5 "	0.538 "	10	4.0 "	18.6 "
17 A.G.C.	0.3624	7.5 "	2.718 "	54	7.2 "	19.86 "
18 F.R.R.	0.2995	6.0 "	1.79 "	40	6.66 "	22.2 "

$\bar{X}=0.3087$
D.E.=.0995

$\bar{X}=11.88$
D.E.=14.07

$\bar{X}=2.0 \times 10^{-6}$
D.E.= 2.25×10^{-6}

$\bar{X}=6.9 \times 10^{-6}$
D.E.= 7.11×10^{-6}

L.I._c = Núcleos marcados en cultivos de control/
5000 núcleos contados.

T = Total de células recuperadas de los cultivos
con TG

N = L.I._c x T

M = Total de núcleos marcados en cultivos
con 6-TG.

L.I._m = M ÷ T

Vf = L.I._m ÷ L.I._c Vf = M ÷ N

Fig. R.5 Distribución del índice de marcaje (L. I. c) en cultivos de control

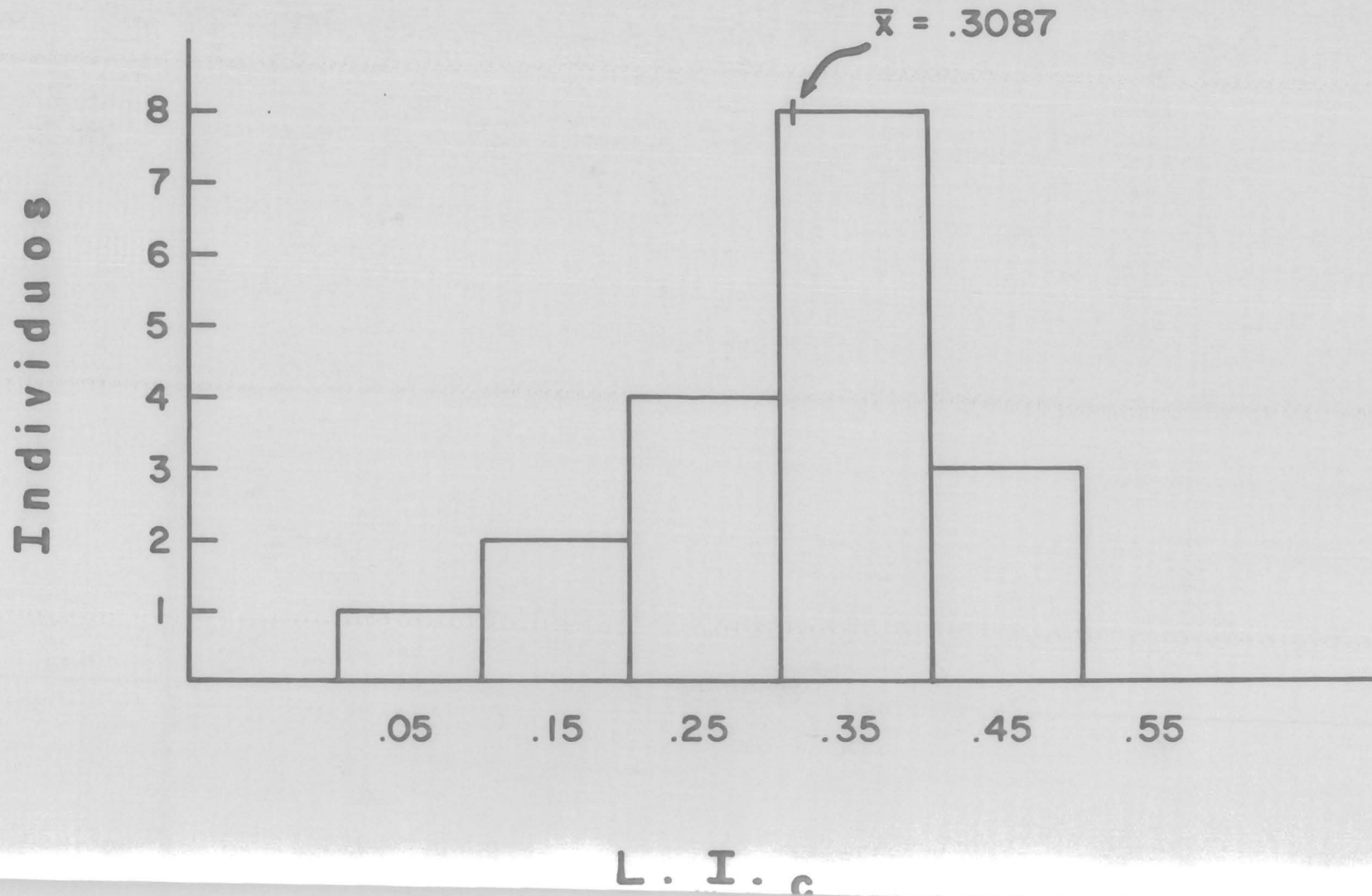
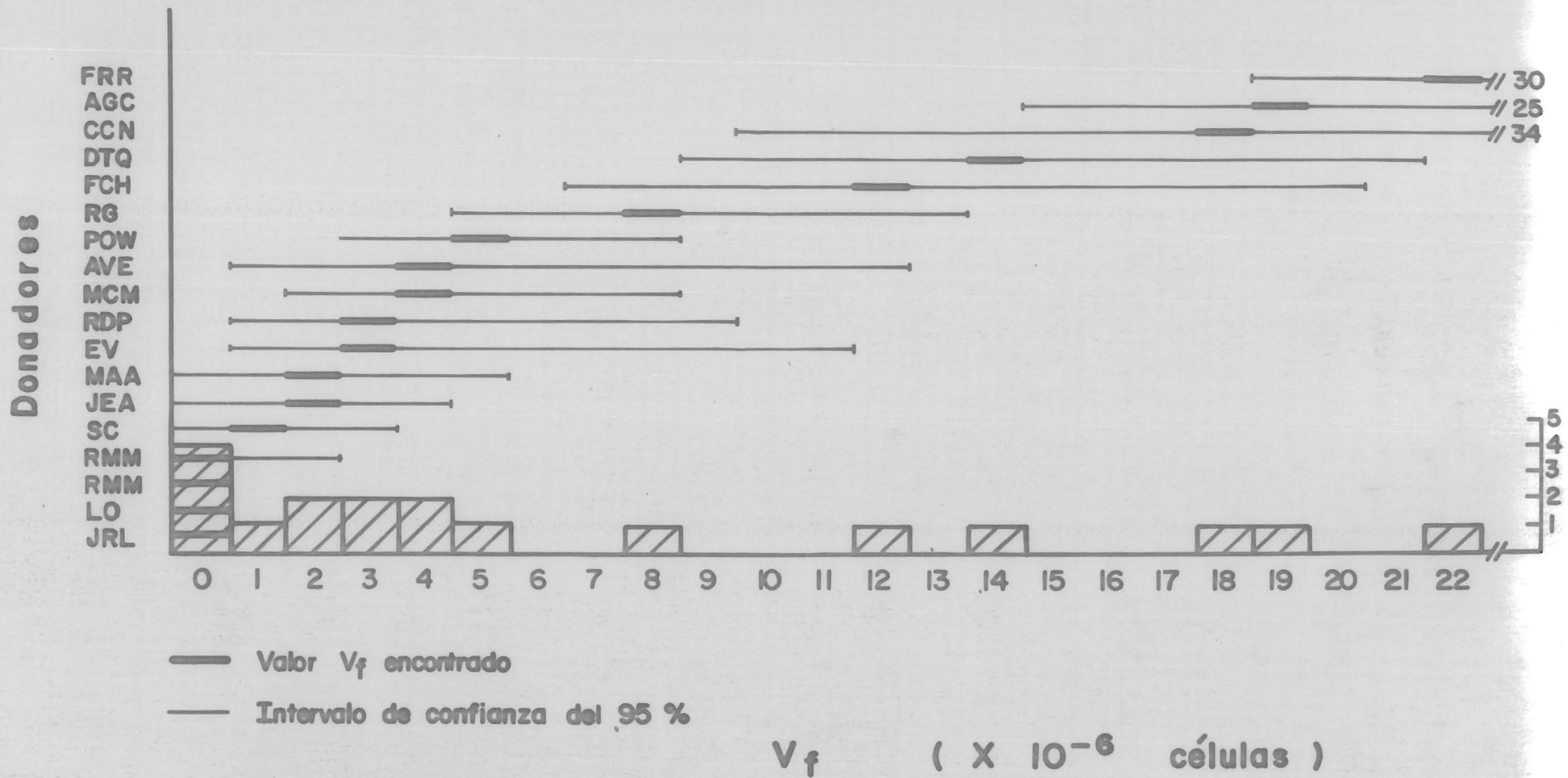


Fig. 2.6. Distribución de las frecuencias (V_f) de diferentes donadores y sus intervalos de confianza



Los índices de marcaje en ausencia de 6-TG se distribuyeron como una T de Student, con valores desde 0.1010 hasta 0.4616, - una media de 0.3087 y desviación estándar 0.0995.

Los valores de las frecuencias de células TG^x (o Vf-^{R.3} en la tabla)), por su parte, se agrupan como una distribución de Poisson con un rango desde 0.0 hasta 22.2×10^{-6} , valor medio de 6.9×10^{-6} y desviación estándar 7.11×10^{-6} . Esta distribución no es continua (fig. R.6) como sí lo es la distribución del índice de marcaje en los controles; hay más dispersión en los valores altos de la distribución, pero la mayor parte se agruparon en el lado izquierdo donde están los valores más bajos: 12 están dentro del rango 0.0 a 5.0×10^{-6} .

Cada punto representa una determinación con células de un solo individuo. En un caso (RMM) en el que se obtuvo un valor de 0.0 para la frecuencia de células TG^x se hizo un segundo muestreo, en el que se incrementó el tamaño de la muestra, y se obtuvo un valor de 0.91×10^{-6} .

Análisis estadístico.

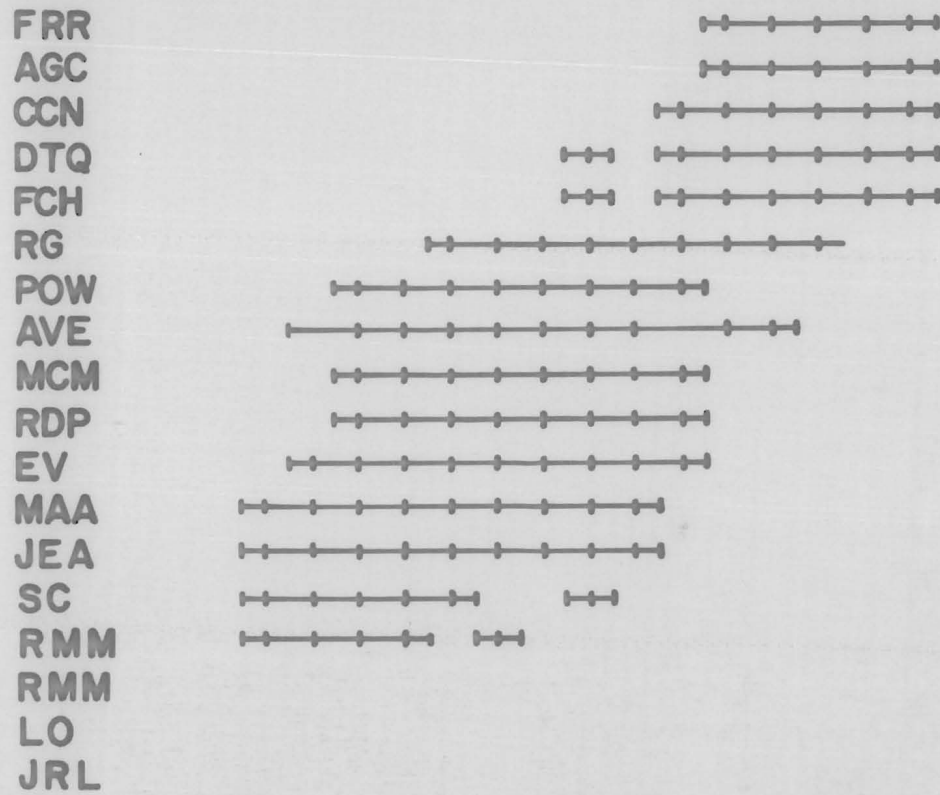
Se calculó el intervalo de confianza, del 95 %, para cada Vf encontrada, de acuerdo con la fórmula [1] descrita en

" Material y Métodos ". En la figura R.6 sobre la distribución de V_f , se representa el intervalo de confianza para cada uno de los valores.

En la figura R.7 están representadas las relaciones que fueron positivas entre cada individuo con el resto del grupo estudiado. Debido a que hubo tres frecuencias (de los donadores JRL, LO y RMM) con valor de cero, no se pudo realizar ningún análisis con ellas. Entre el resto de los individuos de la muestra se encontró que sí se parece el valor de la frecuencia de células TG^r de cada individuo con al menos 4 de los otros donadores.

intervalos de confianza del 95 % de la razón
entre dos V_f s .

Donador



JRL
LO
RMM
RMM
SC
JEA
MAA
EV
RDP
MCM
AVE
POW
RG
FCH
DTQ
CCN
AGC
FRR

Donador

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Para determinar la frecuencia de mutación de un solo gen es necesario evaluar una ~~larga~~^{amplia} muestra de individuos; por esta razón se han desarrollado sistemas de prueba con células que permiten evaluar rápidamente millones de ellas. Los resultados de estas pruebas de mutagénesis se utilizan para evaluar el riesgo que para el humano representa la exposición a agentes genotóxicos, sin embargo, los datos de sistemas in vitro son de valor limitado ya que los factores farmacocinéticos del humano son difíciles de reproducir y es por esto que tienen un gran valor potencial las pruebas que permitan evaluar mutaciones puntuales ocurridas in vivo; la enumeración de la frecuencia de mutación en el locus HGPRT en linfocitos humanos o prueba de Albertini es una prueba ^{con muchas perspectivas de} ~~que promete ser útil~~ ^{utilidad para} en la determinación de mutaciones génicas ocurridas in vivo, por lo cual nos propusimos evaluar la frecuencia de mutaciones en este locus en individuos normales.

En los primeros experimentos se trató de detectar la presencia de fenocopias y el efecto que la criopreservación ejerce sobre ellas. Se determinó su proporción en un experimento con linfocitos congelados, cosechados al cabo de 24 horas de cultivo durante las cuales estuvieron en presencia de ^3H -tdr. En los tres casos

estudiados se encontró una proporción de núcleos marcados, con valores de: 2.7/100, 1.63/1000 y $2.53/10^6$ (Tabla R.1), a lo que llamamos índice de marcaje a 24 horas (L.I.₂₄) que, como se aprecia, es muy variable. Se pensó entonces en la posibilidad de que la presencia de esas células que pasaron por la fase de síntesis en las primeras 24 horas del cultivo podrían influir en el resultado final de la frecuencia de células TG^r (V_f) y que la criopreservación no evita el que se enumeren como tales a células que son normales, sin embargo esto no es así ya que el diseño del método permite superar este problema pues el análogo radiactivo que se usa para marcarlas y reconocerlas en las autorradiografías se agrega después de las primeras 24 horas del cultivo, cuando estas fenocopias, de acuerdo con los datos obtenidos, ya pasaron por la fase de síntesis. En la tabla R.2 los datos muestran que la criopreservación no tiene el mismo efecto en los cultivos de control que en los cultivos con tioguanina pues mientras el índice de marcaje de los cultivos de control (L.I._c) disminuyó a la mitad, la cantidad de mutantes encontrada en los cultivos con tioguanina se redujo en forma geométrica, al igual que la frecuencia V_f (sus valores tras la congelación son aproximadamente la raíz cuadrada de los valores sin congelar). Una posible explicación es que las células en proliferación contenidas en la muestra de sangre sean más sensibles al efecto de agentes selectivos como la congelación y esto hace una primera eliminación de fenocopias que se refleja en la

79

disminución del índice de marcaje de los cultivos de control, así como en la cantidad de células TG^r en los cultivos con el análogo. Las células activadas *in vivo* que sobreviven a la congelación pueden detenerse en alguna etapa del ciclo celular, quizás G_1 como se ha propuesto (8), y quedan sincronizadas; al salir de esta presión de selección y entrar a la siguiente en el medio de cultivo con 6-tioguanina pueden pasar por una primera fase de síntesis en las primeras 24 horas durante las que no hay marcador radiactivo y en el siguiente ciclo el análogo tioguanina ejerce su acción inhibitoria y se efectúa entonces una segunda eliminación de fenocopias. Cabe señalar que entre las células ya proliferantes puede haber alguna o algunas que sean $HGPRT^-$.

En todo caso, la frecuencia V_f que resulta después de congelar las células se parece más a las frecuencias de células $HGPRT^-$ encontradas en cultivos de fibroblastos (10^{-6} a 10^{-5}) (53). Esta disminución en el valor V_f que resulta de la criopreservación la reporta Albertini (57 y 8) en una proporción parecida (Tabla D.1), de ahí que la haya recomendado como una opción para eliminar la enumeración de falsas mutantes en las autorradiografías. Por su parte, Sanderson y cols. (53) propusieron un método alternativo para eliminar fenocopias que consiste en buscar la concentración óptima de 6-tioguanina que asegure la inhibición de células normales y la proliferación de las mutantes, utilizando una concentra

ción 3×10^{-4} en lugar de 2×10^{-4} M que fue la usada en el presente trabajo y propuesta por Albertini (57). Las frecuencias que obtuvieron por este método que no requiere criopreservación se muestran en la Tabla D.1 y como se observa, el rango es más restringido, aunque dentro del mismo orden obtenido por otros grupos. La concentración propuesta por Albertini de 2×10^{-4} M se basa en que una concentración mayor en escala logarítmica (2×10^{-3} M por ejemplo) causó toxicidad aún en las células de individuos en el síndrome de Lesch-Nyhan que son en su totalidad HGPRT⁻ (57), y una concentración menor (2×10^{-5} M) no daba la máxima toxicidad para las células normales. En sus determinaciones Sanderson y cols. (53) no contaron con células de Lesch-Nyhan como control y la concentración que proponen como óptima es 1.4 veces mayor dentro del orden de 10^{-4} M, con base en que causa la máxima mortalidad entre las células normales. Con esta concentración la frecuencia de células resistentes a tioguanina que encontraron se parece mucho a lo que era de esperarse por los estudios con fibroblastos, sin necesidad de congelar las células, pero careciendo de un control como las células de Lesch-Nyhan, la determinación de la concentración se presta a manipulaciones de los valores basales.

TABLA D.1 FRECUENCIA DE CELULAS RESISTENTES A TIIOGUANINA (Vf)
OBTENIDAS POR DIFERENTES AUTORES EN INDIVIDUOS NORMALES.

AUTORES	Vf (X 10 ⁻⁶)	X̄ (X 10 ⁻⁶)	METODO	CRIOPRESERVACION
ALBERTINI R. (57)	25 - 318	110	AUTORRADIOGRAFIA	-
ALBERTINI R. (8)	2.0 - 8,3	2,4	AUTORRADIOGRAFIA	+
ALBERTINI R. (7)	*	3,8	CLONACION	-
SANDERSON, DEMPSEY & MORLEY (53)	1 - 10	2,9	CULTIVO CONTINUO	
DEMPSEY, MORLEY (24)	1 - 10	2,8	AUTORRADIOGRAFIA	-
VIJAYALAXMI & EVANS (65)	8.3 - 25,3	14,8	CLONACION	-
EL PRESENTE TRABAJO	0.0 - 22.2	6.9	AUTORRADIOGRAFIA	+

* EXPERIMENTO CON UN SOLO DONADOR.

De cualquier manera, ya sea que se use la criopreservación o que se busque la concentración máxima de tioguanina - en el método autorradiográfico o bien si se usa el método de clonación, todos los autores obtienen un rango más o menos amplio de valores en la frecuencia espontánea de células HGPRT⁻, que considerados en conjunto y eliminando los menos restrictivos (sin crio preservación) se ^{encuentran} ~~mueven~~ entre 0.0 y 25.3×10^{-6} (Tabla D.1).

El rango obtenido en el presente trabajo es de -- 0.0 a 22.2×10^{-6} en el que el cero representa en ciertas ~~medidas~~ las limitaciones de la técnica; en otras palabras; la prueba se - hace sobre una muestra de los linfocitos en la sangre de un individuo, aproximadamente 5.25 millones en tres cultivos con tioguanina; la mínima frecuencia, diferente de cero, que se encontró - fue de 1×10^{-6} (Tabla R.3, donador RMM), pero pudiera ser que la frecuencia en el individuo estudiado fuera mucho menor que - aquélla y ya que la recuperación de células de los cultivos alcanza ^{en} promedio sólo el 50%, la posibilidad de detectar frecuencias menores es prácticamente nula, de ahí el valor de cero. Sin embargo, para los fines de monitoreo de individuos expuestos a agentes mutagénicos estas ^{frecuencias} menores indicarían que la exposición no fue - suficiente para causar mutación.

Del total de los individuos estudiados (17 diferentes) aquéllos con una frecuencia indeterminada ($V_f = 0$) representan el 16% (J.R.L., L.O. y R.M.M.); tienen en común el vivir en la Ciudad de México y el ser adultos: son dos mujeres de 30 y 46 años y un hombre de 64 (Tabla D.2); él es exfumador y ellas nunca han fumado .

Del resto de los donadores, todos son adultos entre 23 y 47 años. En la Tabla D.2 se organizaron los datos de acuerdo con la edad, el sexo y el hábito de fumar y no se observa la existencia de una relación entre ninguno de estos parámetros con las frecuencias de células TG^R encontradas. Esto contradice lo reportado por Evans y Vijayalaxmi (65) quienes encontraron un incremento de 2.4×10^{-7} linfocitos por año en una muestra de 24 donadores entre 19 y 79 años de edad, utilizando el método de clonación; tampoco apoya la proposición de Albertini (11) de que el hábito de fumar influye en la frecuencia de células TG^R .

En la Tabla D.2 se ve que los valores medios entre hombres y mujeres son diferentes, así como la desviación estándar es más amplia en los hombres. Se aplicó la prueba estadística para comparar las dos frecuencias promedio de células TG^R y no se

encontró diferencia ($p < .05$). Cabe señalar que en la variabilidad encontrada hay otros aspectos que no se evaluaron; aun entre los individuos considerados ^dclínicamente sanos existen diferencias, es decir: estos donadores han padecido diversos tipos de enfermedades a lo largo de su vida, han tomado diversos medicamentos, se han visto expuestos a distintos agentes ambientales que pueden ser mutagénicos, naturales o no, tienen diferentes estilos de vida y regímenes alimenticios y todo esto en conjunto probablemente se refleja en las diferentes frecuencias obtenidas, las cuales, por haberse tomado la muestra en un momento en que los donadores estaban sanos y no se encontraban bajo tratamiento médico, se consideraron como normales.

Del análisis estadístico en el que se comparó la frecuencia de cada donador con la frecuencia de cada uno de los otros donadores se hizo una figura para representar en forma gráfica ^{la} de relación que guardan y tratar de establecer si alguna de estas frecuencias podía considerarse fuera de nuestra distribución como lo sugería la figura R.6 en la que se observa mucha dispersión en los valores altos de la distribución, desde 12 hasta 22×10^{-6} . Así, lo que se ve en la figura R.7 es un polígono que presenta cierta solidez entre los donadores comprendidos desde RMM hasta RG cuyas frecuencias (V_f) fueron 0.91×10^{-6} en el histograma de la

0.2×10^{-6}

EN RELACION CON LA EDAD, EL SEXO Y EL HABITO DE FUMAR.

Donador	Edad	Fumador*	Fumador ocasional **	Exfumador ***	No Fumador ****	Sexo
DTQ	23				14,08 x 10 ⁻⁶	Fem.
MCM	24				4,78 x 10 ⁻⁶	Fem.
AVE	28		4.84 x 10 ⁻⁶			Fem.
RDP	30		3.87 x 10 ⁻⁶			Fem.
RMM	30				0.0	Fem.
RMM	30				0.91 x 10 ⁻⁶	Fem.
MAA	30				2.15 x 10 ⁻⁶	Fem.
RG	33				8.17 x 10 ⁻⁶	Fem.
POW	35			5.3 x 10 ⁻⁶		Fem.
JRL	46				0.0	Fem.
CCN	47		18.6 x 10 ⁻⁶			Fem.
EV	23				3.74 x 10 ⁻⁶	Masc.
SC	23				1.44 x 10 ⁻⁶	Masc.
FCh	24	12.45 x 10 ⁻⁶				Masc.
AGC	24				19.86 x 10 ⁻⁶	Masc.
FRR	27				22.2 x 10 ⁻⁶	Masc.
JEA	30	2.12 x 10 ⁻⁶				Masc.
LO	64			0.0		Masc.
			Valor Medio (Vf)		Rango	Desviación estándar
		Mujeres	5.7 x 10 ⁻⁶		0.0 - 18.6	31.67 x 10 ⁻⁶
		Hombres	8.8 x 10 ⁻⁶		0.0 - 22.2	73.96 x 10 ⁻⁶

* Fumador - fuma una cajetilla o más a la semana.

** Fumador ocasional - fuma menos de una cajetilla al mes.

*** Ex-fumador - no ha fumado durante el último año cuando menos.

**** No fumador - no fuma.

figura R.6. Un segundo cuerpo lo constituyen los otros cinco donadores, desde FCh hasta FRR; de estos cinco donadores que mostraron correlación entre sí, tres de ellos mostraron correlación también con al menos uno de los donadores en el cuerpo principal de la figura: CCN/RG; DTG/RG, DTQ/AVE y FCh/RG, FCh/AVE; sus frecuencias son 12 , 14 y 18×10^{-6} y por esta correlación se les podría considerar parte de la distribución de valores normales. Los valores de los dos últimos donadores tienen correlación sólo con los que constituyen el segundo cuerpo del polígono (donadores AGC y FRR: 19×10^{-6} y 22.2×10^{-6}) por lo que puede ser estadísticamente válido excluirlos de la distribución de los normales.

No obstante, la validez biológica de este rechazo es muy cuestionable pues ninguno de estos individuos, de acuerdo con lo que declararon, padecía ninguna enfermedad ni estaba expuesto a agentes particularmente riesgosos. Además, el límite entre lo normal y lo anormal resulta tan sutil que el establecimiento de una distribución donde se reconozcan esos límites requerirá una muestra mayor. Diversos grupos han tratado de establecer las condiciones estándares para la utilización de la técnica autorradiográfica o de clonación en el monitoreo de individuos expuestos a agentes mutagénicos. Los valores obtenidos se han comparado con los de otros grupos de investigación (Tabla D.1) y se ha visto que los valores se repiten dentro de ciertos rangos que por esta

repetitividad se establecen como normales, y que también son comparables con los valores obtenidos en numerosos estudios in vitro de estirpes celulares en los que se provoca la mutación en condiciones controladas (3, 18, 23, 30, 32, 42, 54). Los resultados que se presentan aquí pueden sumarse a los estudios posteriores y a los de otros grupos, buscando establecer la distribución de la frecuencia espontánea de estas mutantes en las poblaciones actuales y a partir de qué valores se empezará a considerar que la frecuencia encontrada representa un riesgo para la salud.

Diversos estudios que ya se han mencionado ~~XX~~ pudieron establecer que el método es sensible para detectar la exposición ^a de mutágenos químicos fuertes (Tabla I.6 para referencias); así también estudios in vitro han mostrado que la exposición de cultivos de linfocitos a diferentes tipos de radiación producen incrementos en la frecuencia de mutantes en el locus HGPRT encontrándose relaciones dosis-efecto. Recientemente, después de detectar un incremento significativo en la frecuencia de mutantes en individuos expuestos accidentalmente a fuentes radiactivas, el sistema de Albertini ha sido propuesto como un método de alta sensibilidad para detectar la exposición a radiación (45); cabe señalar que el único método utilizado en la actualidad para la detección de exposición a radiación es la evaluación de daño citogenético por lo que el poder

detectar efectos también a través de la producción de mutaciones genéticas resulta complementario.

Por otra parte, la posibilidad de clonar a las células mutantes en el locus HGPRT ofrece la oportunidad de estudiar su ADN y compararlo con el de células normales y localizar el daño sufrido no sólo en el gen por el cual se pudieron aislar y reproducir, sino en otros genes importantes como son los que codifican para algunos marcadores de membrana como los del complejo mayor de histocompatibilidad (34). Estos son fundamentales en células que como los linfocitos T ayudadores (ver Tabla I.7 de características de células TG^r) participan en el reconocimiento antigénico y en la estimulación de las respuestas humoral y celular.

Las ventajas que ofrece el método desde el punto de vista técnico se pueden resumir como sigue; a) el sistema de prueba son células humanas de fácil obtención que circulan por todo el organismo y pueden entrar en contacto con una gran variedad de agentes, b) el fenotipo mutante es claramente reconocible y puede mantenerse in vitro, c) existe seguridad de que el fenotipo mutante se produjo por una mutación somática y d) existe seguridad de que el evento mutagénico responsable se produjo in vivo: La determinación de mutaciones puntuales en individuos expuestos a

mutágenos, aunados con estudios en las que se miden otro tipo de mutaciones como las aberraciones cromosómicas, el intercambio de cromáticas hermanas, micronúcleos y defectos en la anafase (26, 36), constituyen al linfocito de sangre periférica en el sistema más completo de monitoreo de exposición a mutágenos en humanos, pues permite la determinación de varios tipos de daño en la misma muestra.

Cabe señalar que algunos autores (50) consideran que el linfocito no es el modelo ideal para este tipo de evaluaciones por no ser representativa de todas las células del organismo; sin embargo, siendo una célula del organismo es válido considerar que el daño en los linfocitos es indicativo de riesgo potencial para el resto de las células del mismo. Pero desde otro enfoque, la producción de mutaciones específicamente en el linfocito puede ser la causa de una respuesta inmunológica inadecuada frente a un antígeno determinado, conduciendo al padecimiento de enfermedades crónico-degenerativas o infecciosas. Se sabe que una condición de inmunosupresión coloca al organismo en una situación de desventaja con respecto a su medio ambiente; el ejemplo más drástico de esto es el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) causado por un virus que ataca específicamente a los linfocitos T ayudadores. Quienes padecen esta deficiencia son atacados por hongos, bacterias, parásitos y si sobreviven a esto, al-

cabo mueren de cáncer, de una especie poco frecuente llamada sarcoma de Kaposi (49). Las mutaciones que estamos detectando ocurren en linfocitos T; no son letales ni se producen en todas las líneas, pero sí en algunas, lo cual podría llevar a una inmunosupresión parcial que merme la eficiencia de la respuesta inmunológica haciendo a los individuos afectados más susceptibles a ser dañados por determinados antígenos en particular. Esas enfermedades como ya se dijo, pueden incluir infecciones parasitarias o virales y quizás algún tipo de cáncer y enfermedades autoinmunes (22, 25, 35).

Así pues, el seguimiento de los individuos en quienes se hubieran detectado frecuencias extraordinarias de mutación, combinado con la caracterización de sus linfocitos mutantes, quizás nos diera nuevas perspectivas para explicar cómo un evento mutagénico se relaciona con la pérdida de la salud en cualquiera de sus formas. O bien, alternativamente, se pueden estudiar las células de individuos que ya padecen alguna de esas enfermedades y caracterizarlas de la misma manera y con el mismo fin.

Las posibilidades son diversas, pues también podría hacerse un ensayo parecido con los linfocitos B, lo cual ampliaría la visión del daño mutagénico, mostrándonos otro aspecto de las

consecuencias que puede acarrear para el sistema inmunológico y -
por tanto, para el organismo. La principal ventaja es que esto -
se puede hacer con células normales, tomando sólo una muestra de -
sangre.

La desventaja más importante es que para el moni-
toreo humano, la prueba de la HGPRT aún resulta laboriosa y costo-
sa, por lo que es recomendable la búsqueda de métodos alternati-
vos que sean más factibles de aplicar al estudio de poblaciones -
humanas (44).

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

1. Abbondandolo A. Prospects for evaluating genetic damage in mammalian cells in culture. Mut. Res. 42: 279 - 298 (1977).
2. Arnold W. J. and Kelly W.N. Human hypoxanthine - guanine phosphoriboyltransferase. J. Biol. Chem. 246: 7398-7404. 1971.
3. Albertini R. J. U. De Mars R. Diploid azaguanine - resistant mutants of cultured fibroblasts. Science 169 : 482, 1970.
4. Albertini R. J. U. De Mars R. Mosaicism of peripheral blood lymphocyte populations in females heterozygous for the Lesch-Nyhan mutation. Biochemical Genetics 11; 5: 397 - 411, 1974.
5. Albertini R. J. Drug resistant lymphocytes in man as indicators of somatic cell mutation. Teratogen Carcinogen Mutagen. 1, 25 - 48. 1980.
6. Albertini R. J., Allen E.F., Quinn A.S., U. Albertini M. R. Human somatic cell mutation; In vivo variant lymphocyte frequencies as determined by 6-thioguanine resistance. En: E.B. Hook & I. H. Porter (eds.) Population and Biological Aspects of Human Mutation, Birth Defects. Institute Symposium XI, Academic Press, New York . pp 235 - 263, 1981.
7. Albertini R. J. Castle K. L. U. Borcharding W. R. T-cell cloning to detect the mutant 6-thioguanine-resistant lymphocytes present in human peripheral blood. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6617 - 6621, 1982.
8. Albertini R. J. U. Sylwester D. L. 6 - thioguanine-resistant lymphocytes in human blood. En : Kilbey B.J., Legator M., Nichols W. U. Ramei C. (eds.) Handbook of - Mutagenicity Test Procedures, Cap. 15, pp. 358-372, 1984.
9. Albertini R. J., O'Neill J. P., Nicklas J. A., Heintz N. H. U. Kelleher P. C. Alterations of the hprt gene in human in vivo derived 6-thioguanine-resistant T lymphocytes. Nature 316: 369-371, 1985.

10. Albertini R. J. Somatic gene mutations *in vivo* as indicated by the 6-thioguanine resistant T_H lymphocytes in human blood. Mut. Res. 150: 411-422, 1985.
11. Albertini R. J., Sullivan L. M. & Greene C. J. Human somatic gene mutation *in vivo*. III Autoradiographic assay for T-cell mutants. Environmental Mutagenesis Vol. 8, suplemento 6, p. 3, resumen 4, 1986.
12. Bigbee W. L., Langlois R. G. & Jensen R. H. Assay of *in vivo* human somatic cell mutations-enumeration of glycoporphin gene expression loss variant erythrocytes. Environmental Mutagenesis 7 Suplemento 3: 3, 1985.
13. Bioquímica de Harper. Traducción actualizada de la 19a. edición Ed. El Manual Moderno, S. A. de C.V. Cap. 26, 1984.
14. Board of Scientific Counselors; National Toxicology Program. Report of the NTP AdHoc Panel on Chemical Carcinogenesis Testing and Evaluation, U. S. Department of Health & Human Services Public Health Service: 70-73, 1984.
15. Branscomb E. W. Mena M. C. Stanker L. H. & Jensen R. H. Progress towards a hemoglobin based, *in vivo*, somatic mutation assay. Environmental Mutagenesis 7, suplemento 3: 3, 1985.
16. Carrano A. V., Thompson L., Lindl P. & Minkler. Sister Chromatid Exchange as an indicator of mutagenesis. Nature vol. 271: 551, 553, 1978.
17. Caskey C. T. U Kruch G. D. The HPRT locus. Cell 16: 1-9, January 1979.
18. Chu & H., Brimer Y., Jacobson K. U Merriam E. V. Mammalian cell genetics I. Selection and characterization of mutations auxotrophic for L-glutamine or resistant to 8-AG in Chinese hamster cells *in vitro*. Genetics 62: 359-377, 1969.
19. Cortinas de Nava C., Ostrosky-Wegman P., Galván S. Principios de Mutagénesis y su Relación con Carcinogénesis y Teratogénesis. Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M. sin fecha.

20. Dancis J., Berman P., Jansen V. & Balis M. Absence of mosaicism in the lymphocyte in X-linked congenital hyperuricemia. Life Sci. 7: 587, 1968.
21. Dancis J. Cox R., Berman P., Jansen V. and Balis M. Cell population density and phenotypic expression of tissue culture fibroblasts from heterozygotes of Lesch-Nyhan disease (inosinate - pyrophosphorylase deficiency). Biochem Genet 3: 609, 1969.
22. Dean, J. H., Luster M. I. Boorman G. A., Chaek., Laur L. D., Luebke R. W., Lawson L. D. & Wilson R. E. Assessment of Immunotoxicity Induced by Environmental Chemicals 2, 3, 7, 8 - Tetra-chlorodibenzo-p- dioxin, Diethylstilbestrol and Benzo (a) pyrene. En; J. Hadden, L., Chedid, P. Kullen, y F. Spreti, (eds), Proceedings of the First International Conference on Immunopharmacology, julio, 1980, Brighton, Inglaterra, - Adv. Immunopharmacology. Pergamon Press, 1981.
23. De Mars R., J. L. Jackson & Biehrke-Nelson D. Mutation rates of human somatic cells cultivated in vitro. En; E. B. Hook & I. H. Porter (eds.) Population and Biological Aspects of Human Mutation, New York. pp. 209-234, - 1981.
24. Dempsey J. L. & Morley A. A. Evidence that thioguanine-resistant lymphocytes detected by autoradiography are mutant cells. Mut. Res. 119: 203-211, 1983.
25. Fischbein A., Bekesi J. G., Selikoff I. J. & Borek E. The use of immunological and molecular biological techniques in the assessment of occupational and environmental disease. En: Series F. J. & Pero R. W. (eds) Individual Susceptibility to Genotoxic Agents in the human Population: Plenum Press, 1987.
26. Ford H. J. A model for the mechanism of aneuploidy involving chromosome displacement. En: Dellarco V. L., Voytek P. E. & Hollaender A. (eds.) Aneuploidy. Etiology and mechanisms 291-295, Basic Life Sciences, Vol. 36 1985.
27. Galloway S. M. & Wolff S. The relationship between chemically induced sister-chromatid exchanges and chromatid breakage. Mutat. Res. 61: 297-307, 1979.

28. Gebhart E. Sister chromatid exchange (SCE) and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. Human Genet. 58: 235-257, 1981
29. Goldstein J. Marks J. & Gartler S. Expression of two X-linked genes in human hair follicles of double heterozygotes. Proc. Natl. Acad. Sci. 68: 1425, 1971.
30. Hsie A.W., Brimer P. A., Mitchell T. J., & Goslee D. G. The dose-response relationship for ultraviolet-light induced mutations at the HPRT locus in CHO cells. Somatic cell Genet. 1: 383-389, 1975.
31. International programme on chemical safety (IPCS). International technical report. World Health Organization 1984. 46 pp.
32. Jacob L. & De Mars R. Chemical mutagenesis with diploid human fibroblasts. En: B. Kilby (Ed.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures. Elsevier-North Holland, Amsterdam, 1977.
33. Kelly W., Greene M., Rosenbloom F., Henderson J. & Seegmiller J. Review: HG-PRT- deficiency in gout. Ann. Int. Med. 70: 155, 1969.
34. Kilby. A. E., Albertini R. J. & Krawitt E. L. HLA typing and autoantibodies in Hepatitis B surface antigen negative chronic active hepatitis. Tissue antigens (in press), 1986.
35. Knight J. G. Autoimmune diseases: defects in immune specificity rather than a loss of suppressor cells. Immunology Today 3; 12: 326-328, 1982.
36. Krpinski A. B. & Heddle J. A. Micronuclei as a rapid and inexpensive measure of radiation-induced chromosomal aberrations. En: Ishihara T. & Sasaki M. S. (eds.) Radiation Induce Chromosome Damage in Man, 93-109 Alan R. Liss, Inc. N. York, 1983.
37. Lesch M. & Myhan W. L. A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. Am J. Med. 36; 561 - 570, 1967.
38. Matter BE; Problems of testing drugs for potential mutagenicity. Mut. Res. 38; 243-258, 1976.

39. Nelson J. A., Carpenter J. W., Rose L. M. & D. J. Adamson. Mechanisms of action of 6-thioguanine, 6-mercaptopurine and 8-azaguanine. Cancer Research 35: 2872-2878, Octubre 1975.
40. Nicklas J. A., O'Neill J. P. & Albertini R. J. Use of T-cell receptor gene probes to quantify the in vivo HPRT mutations in human T-lymphocytes. Mut. Res. 173: 67-72, 1986.
41. Nyhan W. L., Pesek J., Sweetman L., Carpenter D. G. & Carter C. H. Genetics of an X-linked disorder of uric acid metabolism and cerebral function. Pediatr. Res. 1: 5, 1976.
42. O'Neill P. A., Couch D. B., Machanoff R., Sebastian J.R.S., Brimer P. A. & Hsie A. W. A quantitative assay of mutation induction at the HPRT locus in CHO cells: utilization with a variety of mutagenic agents. Mut. Res. 45: 103-109, 1977.
43. Ostrosky-Wegman P., García G., Arellano L., Espinoza J., Montero R. y Cortinas de Nava C. Genotoxicity of Antiamoebic, Anthelmintic and Antimycotic Drugs in Human Lymphocytes. En: Tice R., & Hollaender A. (eds.) Sister Chromatid Exchanges; Plenum Publishing Corporation, pp. 915-925, 1984.
44. Ostrosky-Wegman P., Montero M. R. y Cortinas de Nava C. Use of BrdU labeling in the human lymphocyte HGPRT somatic mutation assay. Environmental Mutagenesis. Vol. 8 suplemento 6, EMS Abstracts. p.63, 1986.
45. Ostrosky-Wegman P., Montero M. R., Gómez Ch. M. y Cortinas de Nava C. Posible método para la detección de exposición a radiación. XI Congreso Nacional de Genética Humana; Asociación de Genética Humana, Noviembre 12-15, 1986.
46. Palmer C. Are there "hot spots" in the human genome? Evidence from breakpoint analysis in a collaborative study of germinal chromosome rearrangement. En: Population and Biological Aspects. Academic Press, Inc. 147-165. 1981

47. Pero R. W. & Mitelman F. Another approach to *in vivo* estimation of genetic damage in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76: 462-463, 1979.
48. Perry P. y Evans H. J. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. Nature 258: 12-125, 1975.
49. Popovic M., Sangadkeran M. G., Read E. & Gallo R. C. Detection, Isolation and Continuous Production, Isolation and Continuous Production of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and Pre-AIDS, 4 Mayo 1984, Science 224, 497-500.
50. Preston R. J. Cytogenetic studies in animals. Genetic toxicology . An agricultural perspective. Ed. R.A. Flerck Flerck and Hollaender A, 21: 379-388, 1982.
51. Ramel C. The detection and control of mutagenic and carcinogenic compounds in the environment. AMBIO 7: 244; 1978.
52. Ricciuti J. C. & Ruddele F. H . Assignment of nucleoside phosphorylase to D-14 and localization of X-linked loci in man by somatic cell genetics. Nature New Biol. 241: 180-182, 1973.
53. Sanderson B. J., Dempsey J. L. & Morley A. A. Mutations in human lymphocytes: effect of X-and UV-irradiation. Mut. Res. 140: 223, 227; 1984.
54. Sato K., Slesinski R. S. & Littlefield J. W. Chemical mutagenesis at the HPRT locus in cultured lymphoblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1244-1248. 1972.
55. Seegmiller J. E., Rosenbloom F. M. & Kelley W. N. Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis. Science 155: 1682, 1967.
56. Shows T. B., and Brown J. A. Human X-linked genes regionally mapped utilizing X-autosome translocations and somatic cell hybrids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 2125-2129. 1975.
57. Strauss G. H ., & Albertini R. I. Enumeration of 6-thioguanine-resistant peripheral blood lymphocytes in man as a potential test for somatic cell mutations arising *in vivo*. Mut. Res. 61: 353-379 (1979).

58. Strauss G. H., Albertini R. J., Krusinski P. A. & Bayghman R. D. 6-thioguanine resistant peripheral blood lymphocytes in humans following psoralen long-wave U.V. light therapy. J. Invest. Dermatol. 73: 211-216, 1979.
59. Stutts. P. and Brockman R. W. A biochemical basis for resistance of L1210 mouse leukemia to 6-thioguanine. Biochem. Pharmacol. 12: 97-107, 1963.
60. Sutherland G. R., Jacky P. B., Baker E. Manuel A. Heritable fragile sites on human chromosomes: X. New folate-sensitive fragile sites: 6p23, 9p21, 9q23 and 11q23. Am. J. Hum-Genet 35: 432-437, 1983.
61. Sylwester D. & Albertini R. J. Confidence Intervals and Sample Size Calculations to compare Variant Frequencies. Env. Mut. 7, suplemento 4: 31-41, 1985.
62. Szybalsky W. Resistance to 8-azaguanine, a selective marker for a human cell line. Microbiol. Genet. Bull. 16: 30; 1958.
63. Tice R. R. & Schvartzman J. B. Sister Chromatid Exchange: A Measure of DNA lesion persistence. En: Sister chromatid exchange, 33, 45. Alan R. Liss Inc. New York, 1982.
64. Trosko J. E., Chang Ch Relationship between mutagenesis and carcinogenesis, Photochem. Photobiol. 28: 157; 1978.
65. Vijayalaxmi & H. J. Evans. Measurement of spontaneous and X-irradiation-induced 6-thioguanine-resistant human blood lymphocytes using a T-cell cloning technique. Mut. Res. 125: 87-94, 1984.
66. Vijayalaxmi & Evans H. J. Induction of 6-thioguanine resistant mutants and SCEs by 3 chemical mutagens (EMS, ENU and MMC) in cultured human blood lymphocytes. Mutat. Res. 129: 283-289, 1984.
67. Yumis J. J. & Soreug L. A. Constitutive fragile sites and cancer, Science 226: 1199-1204, Dicembre 1984.

68. Yumiss J. J. Chromosomal rearrangements, genes and fragile sites in cancer; clinical and biological implications. En: Eds. De Vita, Hellman & Rosenberg. Important Advances in Oncology 1986. Lippincott Co. Pennsylvania, Pp,93 -128, 1986.