



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

**Detección del Efecto Genético de las Sulfas, Mediante
el Análisis de Anafases en Células en Cultivo de Mamíferos**

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

ROSALBA GRANILLO NUÑEZ

México, D. F.

1982





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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

	PAG.
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	4
1) Características generales de las sulfas	4
2) Descripción de la mitosis y elementos críticos que participan en el proceso	12
3) Centrómero	16
4) Microtúbulos (MT)	20
5) Centríolo	30
SISTEMA DE ANAFASES	32
POSIBLES MECANISMOS A TRAVES DE LOS CUALES SE PRODUCEN LAS ANOMALIAS DETECTADAS EN ESTA PRUEBA	34
MATERIAL	38
a) Compuestos Químicos	38
b) Material Biológico	38
METODO	39
Crecimiento de Células	39
Solubilidad de las Drogas	39
Tratamiento	40
Tiempo de Exposición	40
Colecta de Anafases	40
Análisis de Anafases	41
RESULTADOS	42
ANALISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFIA	55

INTRODUCCION

La difusión en el ambiente de compuestos químicos, asociada al crecimiento demográfico y desarrollo tecnológico es - cada día mas evidente en nuestro país. Por lo tanto, es de suma importancia hacer estudios que permitan detectar agentes - que por su efecto mutagénico, carcinogénico o teratogénico, - pudieran constituir un riesgo para las poblaciones expuestas - sobre todo en edad reproductiva, debido al peligro de ver incrementarse las enfermedades de origen genético en las generaciones futuras.

Entre los compuestos químicos más difundidos, se encuentran los medicamentos, de los cuales dependemos constantemente ya que estamos continuamente expuestos a enfermedades. Las sulfas al igual que muchos otros medicamentos, se consumen diariamente en nuestro país en grandes cantidades, bajo prescripción médica o por automedicación. Por ello, es importante hacer estudios que determinen la capacidad de estos compuestos para - producir alteraciones.

Debido a la imposibilidad de utilizar al ser humano como sujeto de experimentación, se ha diseñado una batería de prue

bas que permite hacer una valoración del riesgo para la especie humana, derivado de la exposición a compuestos químicos ayudando a normar criterios para su uso óptimo. Estos sistemas pueden detectar el daño producido al ADN, que es el que porta la información hereditaria, ó a proteínas ligadas funcionalmente a él, tales como la tubulina de microtúbulos, histonas o protaminas y enzimas que participan en la reparación ó replicación del material genético.

Los sistemas de prueba más usuales emplean organismos tales como: virus, bacterias, hongos, plantas, insectos y mamíferos (cultivo de tejidos y organismos completos). Existe el acuerdo de que un compuesto es potencialmente peligroso, cuando ha producido alteraciones genéticas en varios organismos.

El interés del estudio de las sulfas se basa principalmente en el elevado consumo de éstas por automedicación; en los antecedentes de estudios en plantas y hongos que indican que las sulfas producen aneuploidía (1-6); además de que varios compuestos tales como Hicantona, THPS y DMSO, que alteran la segregación cromosómica tienen un grupo SO^- en su molécula, al igual que las sulfas, (7) lo que sugiere la posible interacción de este grupo con las proteínas que participan en la división celular, a través de sus grupos SH libres (7).

El propósito de este trabajo, fué determinar el efecto genético de tres sulfas: la sulfadiazina, la sulfameracina y el sulfatiazol, preferentemente a nivel de segregación cromosómica, en cultivo de células de mamífero.

GENERALIDADES

1) CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS SULFAS

ANTECEDENTES HISTORICOS

Las sulfas fueron los primeros agentes quimioterapéuticos efectivos, empleados para la prevención y cura de infecciones bacterianas en el hombre. Fue la sulfanilamida la primera en descubrirse en 1908 por Galmo, en el curso de sus investigaciones de colorantes "azo". Teniendo que pasar un cuarto de siglo, antes de usarse en infecciones bacterianas del humano.

En 1933 el primer caso clínico estudiado fué reportado por Foerster, quien dió Prontosil a niños de 10 meses de edad con septicemia estafilococal y obtuvo resultados excelentes de cura. De este año en adelante se sintetizaron un gran número de derivados de la sulfanilamida, que fueron efectivos para combatir bacterias numerosas.

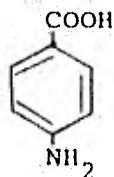
La mayoría de las sulfas son relativamente insolubles en agua, sin embargo sus sales de sodio son altamente solubles.

EFECTOS EN AGENTES MICROBIANOS

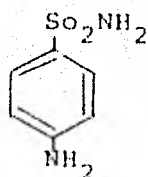
Las sulfonamidas tienen un amplio rango de actividad antimicrobiana, tanto en organismos gram(+), como gram(-); en general, ejercen únicamente un efecto bacteriostático y los mecanismos de defensa celular y humoral del huésped son esenciales para la erradicación de la infección (8, 9).

MODO DE ACCION DE LAS SULFAS

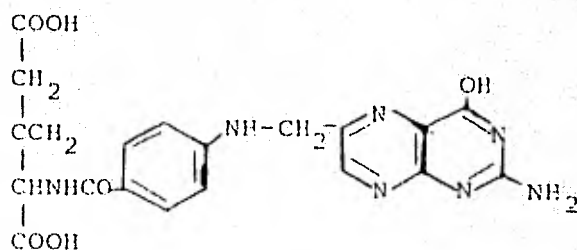
Las sulfamidas establecen competencia con el ácido p-amino benzóico (PABA) en el proceso de síntesis del ácido fólico de las bacterias, esencial para su crecimiento, ya que es el precursor de una enzima necesaria en la utilización biosintética de unidades de carbono simple (10).



a. p-aminobenzóico



Sulfanilamida



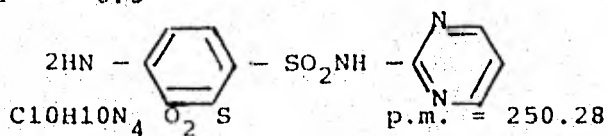
ácido fólico

Las sulfamidas no interfieren en el funcionamiento de las células de los mamíferos, ya que éstos no sintetizan el ácido fólico, adquiriéndolo como vitamina. Esta diferencia entre microorganismos y mamíferos, explica el índice terapéutico favorable de las sulfamidas para tratar diversas infecciones.

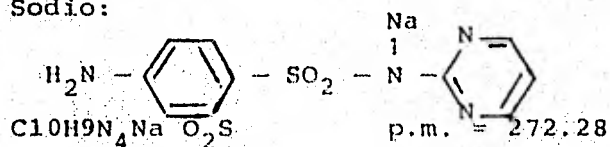
Su actividad parece ser máxima alrededor de un pka de 6.5 y menor por encima o por debajo de este valor. Como el pka de la sulfadiacina se encuentra muy cerca de este valor óptimo se consideró muy poco probable que ningún sulfamídico que actúa por competencia con el ácido p-amino benzóico pudiera tener mayor actividad que la sulfadiacina. Esto significa que las nuevas sulfamidas tienen probabilidades de presentar ventajas en cuanto a solubilidad, metabolismo intercambio renal o ausencia de propiedades sensibilizantes, pero no por tener potencia antibacteriana netamente mayor.

ESTRUCTURA QUIMICA DE LAS SULFAS

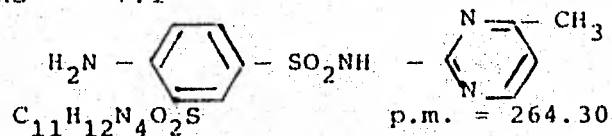
Sulfadiazina pka = 6.5



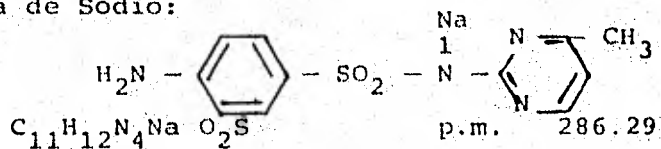
Sulfadiazina de Sodio:



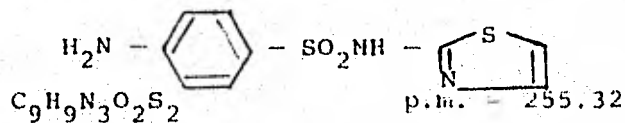
Sulfameracina pka = 7.1



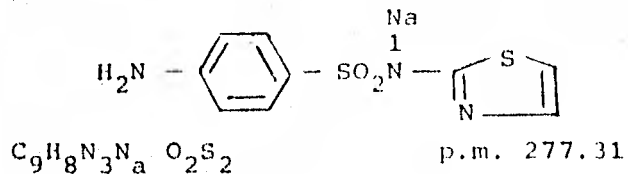
Sulfameracina de Sodio:



Sulfatiazol pka 7.1



Sulfatiazol de Sodio



METABOLISMO DE LAS SULFAS

Para causar un efecto terapéutico, la droga debe llegar al sitio de acción en concentraciones efectivas y permanecer tiempo suficiente para actuar. La concentración de la droga en los tejidos, depende de varios factores; uno de los más importantes, es la concentración en la sangre, la cual es función de la cantidad de fármaco administrado, así como de la proporción en que se absorbe, de su distribución y del porcentaje de metabolitos que se excretan.

La absorción, distribución y excreción de cualquier droga depende en gran parte, de la naturaleza lipóide del receptor celular particular por el que penetrará y de las características lipofílicas intrínsecas de cada una de ellas. Otras propiedades se determinan por su estructura química y cantidades relativas de especies no ionizadas presentes en los fluidos fisiológicos, para lo que es muy importante saber el pka del compuesto. El conocimiento del grado de ionización de una droga en un pH fisiológico, permite una predicción razonable de su distribución en tejidos y su excreción renal o reabsorción.

Dentro de las sulfonamidas, hay toda una gama en el modo de acción dependiendo de su estructura química. Las hay que

se absorben rápidamente del tracto gastro intestinal y se eliminan perfectamente a través de la orina, como la sulfacetamida - que se usa en el tratamiento de infecciones en los ojos. Encor - tramos también las que no se absorben o se absorben muy pobremente, por lo que actúan a nivel del tracto gastrointestinal, como es el caso de la sulfaguanidina y por último, tenemos el grupo - de las que se absorben totalmente del tracto gastrointestinal, - pero se excretan muy lentamente. Es en este grupo en el que se encuentran las tres sulfas que se estudiaron en este trabajo y - que son: la sulfadiazina, sulfameracina y sulfatiazol.

Sulfadiazina:

Esta sulfa se absorbe bien del tracto gastrointestinal, - a pesar del hecho de que es prácticamente insoluble en agua. Tar - da varias horas en aparecer un pico en su nivel en sangre, aún - cuando se den grandes dosis. Sin embargo, una vez alcanzado éste puede mantenerse con una dosis de 1 g cada 4 horas. En un nivel de sangre de aproximadamente 10mg%, cerca de la mitad de la sul - fadiazina se une a proteínas del plasma.

La sulfadiazina se excreta lentamente en la orina, se - acetila de un 15 a 40%, siendo su metabolito insoluble en la ori - na debido al pH ácido de ésta, de manera que alcalinizándola se -

disminuye la probabilidad de formarse cristales debido a precipitación.

De una dosis oral simple, aproximadamente el 50% se elimina a las 24 horas y de 60 a 85% de 48 a 72 horas. Cerca del 75% de una dosis administrada intravenosamente se excreta a las 24 horas.

Toxicidad: La terapia con sulfadiazina, raramente produce efectos tóxicos serios, ya que es generalmente bien tolerada, sin embargo, debe alcalinizarse la orina para evitarse cristalurria.

Sulfamericina:

Se absorbe rápida y completamente del tracto gastrointestinal. Se excreta más lentamente que la sulfadiazina; de manera que es posible tener una concentración efectiva en sangre con dosis más pequeñas que para sulfadiazina. Cerca del 50% de la droga se excreta en la orina en forma acetilada.

Toxicidad: En dosis terapéuticas ha causado hematuria y acuria en niños sobre todo menores a 6 años, debido al daño en

riñón producido por los cristales, que no se solubilizan.

Sulfatiazol:

Se absorbe rápidamente cuando se dá por vía oral, el pico de concentración en sangre es de 5 a 10 mg% obteniéndose de 4 a 6 horas. Una dosis simple se excreta casi completamente a las 24 horas, parcialmente en forma de un derivado acetilado in soluble.

Toxicidad: Los efectos tóxicos seguidos de dosis terapéuticas, son muy comunes, debido a que los derivados acetilados insolubles, causan bloqueo de los túbulos renales produciendo anuria y hematuria.

ANTECEDENTES DE DAÑO GENÉTICO.

Eigsti en 1938 encontró irregularidades mitóticas en los túbulos de polen de Iradescantia con soluciones diluidas de sulfamidas. A altas concentraciones, observó la inhibición del tubo polínico (1). Peter en 1946 reportó una contracción notoria de los cromosomas y la inhibición del huso (retroceso a interfase - después de metafase) en cebolla (2). Por otro lado Fuller I. en 1947 reportó en células de cebolla Allium cepa, poliploidía y

células binucleadas usando sulfanilamida, sulfadiazina, sulfameracina y sulfatiazol a las 48 horas de tratamiento con 0.5% de cada compuesto (3).

Bignami en 1947 reportó en Aspergillus Flavus, entrecruzamientos y no disyunción, provocadas por sulfas (4).

Aulicino F. en 1975 hizo estudios con sulfanilamida en Aspergillus flavus y reporta que produce entrecruzamientos y no disyunción (5).

Estudios más recientes muestran que varias de las sulfas producen no disyunción, como la sulfacetamida reportada por Parry J. M. (1978) en Saccharomyces cerevisiae (6).

2) DESCRIPCION DE LA MITOSIS Y ELEMENTOS CRITICOS QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO.

Dado que en este trabajo se pretende estudiar la capacidad de las sulfas de inducir anomalías anafásicas, describiremos brevemente algunos de los aspectos esenciales de la mitosis y de los elementos que intervienen en ella y pudieran verse afectados por los medicamentos.

La mitosis es el proceso de división celular encargado de mantener la estabilidad del número cromosómico en células somáticas. Su importancia radica por lo tanto en asegurar el reparto equitativo de material cromosómico a cada una de las células hijas, de manera que cada célula reciba exactamente el mismo número y clase de cromosomas que la célula madre.

La mitosis se lleva a cabo en una serie de etapas continuas conocidos como profase, metafase, anafase y telofase y representa la culminación de una serie de eventos ocurridos previamente en la célula durante la interfase. En este período la célula aumenta de tamaño, duplicando sus cromosomas mediante la síntesis de ADN, además de sintetizar los componentes necesarios para la formación del aparato mitótico.

La mitosis ocupa menos del 5% del ciclo celular en condiciones normales, y en cuanto a síntesis de ARN y proteínas, ésta se ve reducida durante el proceso de división.

PROFASE.

Es la etapa temprana de la mitosis en la que se observan los cromosomas como fibras muy delgadas las cuales se van conden-

sando hasta observarse perfectamente como estructuras dobles.

El final de la profase y principio de la metafase se conoce como prometafase y es en ésta etapa en la que desaparece la membrana nuclear y se separan los centriolos, mientras que los microtúbulos (MT) se ensamblan para constituir las fibras del huso que corren de uno a otro polo.

METAFASE

Los cromosomas perfectamente condensados se alinean en el plano ecuatorial de la célula, uniéndose a los MT por sus cinetocoros (que son estructuras densas localizados en los centrómeros).

ANAFASE

Se define como el período en que los cromosomas se mueven a lo largo de las fibras del huso hacia los polos de la célula, dando como consecuencia la separación de las cromátidas hermanas.

TELOFASE

Se describe como la etapa final de mitosis en la que se regenera la membrana nuclear alrededor del grupo cromosómico en cada polo, los cromosomas se desespiralizan para formar parte de la cromatina interfásica, los MT del cinetocoro desaparecen, permaneciendo únicamente los MT continuos que forman un paquete telofásico.

CITOKINESIS

La división celular se completa por la separación de las dos células hijas, este proceso se acompaña por el desarrollo de un surco de división entre los dos nuevos núcleos que se forman en telofase. Según Marsland y Landau (11) el surco se produce por la capacidad contráctil del protoplasma cortical en ese sitio, atribuyendo tal capacidad a la estructura llamada anillo cortical.

El aparato mitótico controla la posición del surco de división en huevos en mitosis. Algunos autores (12) mostraron que esta interacción se completa hasta un momento específico, antes del cual, la centrifugación o microcirugía para alterar la loca-

lización del aparato mitótico y ásteres, cambia la posición del surco de división, pero después de este punto tal tratamiento no lo altera, de manera que una vez que la división se ha iniciado, el proceso es independiente del aparato mitótico.

El anillo cortical está formado por un sistema de filamentos dentro del surco de división (13). Tales filamentos desaparecen en presencia de la citocalasina B, lo que sugiere que pueden ser microfilamentos formados de actina (14).

La conclusión de que un sistema contráctil está involucrado en la división se apoya además, en los trabajos reportados por Fujiwara 1976 (15) en los que demuestra la presencia de miosina en el surco de división.

3) CENTRÓMERO

El centrómero se observa claramente en los cromosomas en metafase, como una constricción primaria. En preparaciones cromosómicas, se observa que el número de fibras de cromatina en la región centromérica, se reduce con respecto al resto del cromosoma, siendo posiblemente esta reducción la que origina la constricción primaria. En cromosomas teñidos con tetraóxido de osmio, la región centromérica muestra en cada cromátida, un pequeño gránulo -

que se tiñe intensamente. Los microtúbulos se unen a éste gránulo cuyo nombre es Cinetocoro.

El cinetocoro aparece primero en profase temprana como un parche de paquetes de filamentos condensados, dispuestos - - irregularmente en una pequeña constricción a cada lado de ambas cromátidas. Según Brinkley 1970 (16), cada parche es una estructura esférica de cerca de $0.4\mu\text{m}$ de diámetro, que contiene filamentos de $5-8/\text{nm}$ de diámetro. Incluso durante la profase temprana los centrómeros hermanos están probablemente separados estructuralmente uno del otro, desarrollándose sin embargo sincrónicamente durante las etapas posteriores de la división. Al continuar la profase hay una transición en la estructura del centrómero, - desde masas densas esféricas, hasta dar bandas menos densas que - se extienden de 0.1 a 0.5μ una a cada lado de las cromátidas hermanas. En estudios hechos por Jokelainen (17) acerca de la ultraestructura centromérica, examina cinetocoros metafásicos en varios tipos celulares de rata. Independientemente del cromosoma ó tipo celular, los cinetocoros metafásicos muestran una gran similitud en estructura, dimensión, y unión al huso. Cada cromosoma presenta dos cinetocoros en forma de disco con un diámetro de $2000 - 2405\text{Å}$, compuesto de tres capas, una interior densa electrónicamente, que - está formada de fibras contiguas al cuerpo principal del cromosoma. Luego hay una capa media con la misma profundidad pero de menor -

densidad electrónica, ésta está rodeada por una capa exterior cubierta por una corona de substancia electroopaca. Las tres capas se unen a 4 - 7 microtúbulos del cinetocoro.

Este organelo tiene una profundidad de 0.3-0.45 μ , visto en la superficie del cromosoma, parece tener la forma de - bandas o de una estructura plana circular, dentro de la constricción secundaria

Existe controversia sobre la estructura detallada del cinetocoro. Ha sido interpretada generalmente en forma de discos de roscas enrolladas. Nada se sabe acerca de su composición ni de como se unen a las fibras la cromatina.

La orientación de los cinetocoros parece ser responsable de las acciones característicamente diferentes de los cromosomas en mitosis y meiosis, de manera que en mitosis los cinetocoros hermanos se encuentran mirando hacia el polo al cual van a migrar las cromátidas. En meiosis, los cinetocoros en la primera división migran juntos en cada cromosoma homólogo, encontrándose unidos del mismo lado del bivalente. Pero en la segunda división, los cinetocoros hermanos cambian su orientación hacia lados opuestos (como en mitosis). Las bases moleculares -

de este movimiento hasta ahora no se conocen. Aparte de la diferencia en orientación aparentemente no hay ninguna otra entre cinetocoros mitóticos y meióticos.

La conexión de los microtúbulos a los cinetocoros empieza aproximadamente en el momento en que se despolimeriza la membrana nuclear, quedando firmemente unidos hasta terminar la anafase (18).

Niclas y colaboradores (19), separaron un bivalente del huso girándolo 180° , observando que al unirse nuevamente se separan al polo hacia el cual mira el cinetocoro.

Se ha sugerido que el movimiento de los cromosomas se debe a que son jalados por los cinetocoros, sobre los cuales se ejerce una fuerza hacia el polo al que se dirigen. Estas fuerzas son muy fuertes al principio de la mitosis, disminuyendo en metafase y aumentando nuevamente en anafase (20). En contraste con la alineación estacionaria de los cromosomas, partículas celulares pueden moverse hacia los polos en metafase. Estos pueden incluir fragmentos de cromosoma, mitocondrias, nucleólos persistentes, los cuales posiblemente se han unido a fibras del huso, lo que sugiere que las fuerzas que jalaran actúan no sólo sobre las fibras unidas a los cromosomas, sino incluso en otras fibras (21).

La separación de las cromátidas hermanas hacia los polos, define la anafase, en la cual sólo los centrómeros muestran movimiento activo moviéndose pasivamente el resto de los cromosomas. De esta manera el papel activo del cromosoma, se usa para caracterizar cromosomas por la forma que adquieren durante la anafase, - incluyendo configuraciones no usuales adquiridas por cromosomas - anormales, tales como el producto de la fusión de 2 centrómeros.

4) MIROTUBULOS (MT)

Son organelos proteínicos, presentes en todas las células eucarióticas, (aparecen en la evolución cuando el núcleo es separado por una membrana), formados de subunidades ensambladas en estructuras tubulares elongadas, con un diámetro exterior promedio de 24nm. y una longitud indefinida, capaces de cambios rápidos por ensamblaje y desensamblaje de las moléculas proteínicas (tubulina). Son sensibles al frío, a altas presiones hidrostáticas y a algunos compuestos químicos específicos tales como colchicina, vinblastina, griseofulvina, etc. Construyen con -- otras proteínas, ensamblajes complejos como el huso mitótico, - centriolos, cilios, flagelos, axonemas, neurotúbulos, e intervienen en la forma y movilidad celular.

Los MT de la mayoría de las células tienen el mismo tama

ño y muestran un arreglo helicoidal de 13 protofilamentos, con un ángulo de inclinación de 10° - 25° .

En cuanto a forma y tamaño, los MT son largos, delgados, elásticos y no bifurcados, su diámetro es constante (diámetro exterior 24 nm, el agujero central 15 nm y la pared cerca de 5 nm de grosor).

La longitud varía considerablemente y se mide en milímetros, desde pequeños MT en las bandas marginales de los eritrocitos, hasta exceder los 10 metros en algunos axones, aunque no se ha dado una medida exacta hasta ahora.

Se han observado túbulos-C es decir incompletos, especialmente cuando se ensamblan y desensamblan los MT, se piensa que corresponden a etapas de formación (22).

Los microtúbulos no aparecen lisos, sino que tienen pequeños filamentos, los cuales pueden o no, unirlos entre sí. Estos brazos laterales están regularmente espaciados, con un rango de distancia de 4 nm a 48 nm, pudiendo o no formar puentes entre los MT. Se han observado puentes laterales en el huso mitótico entre los MT, que pueden estar relacionados con el movimiento de los cromosomas.

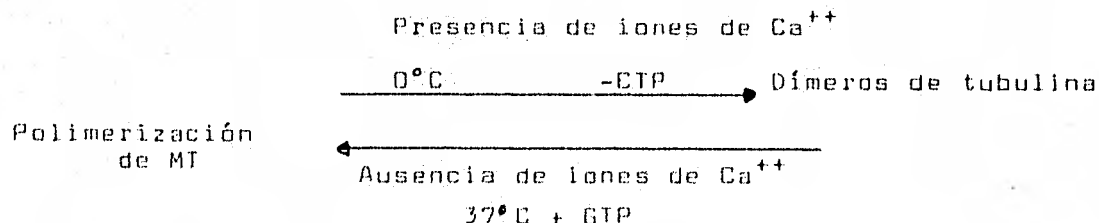
Composición Química:

ENSAMBLAJE Y DESENSAMBLAJE DE MT:

La formación de MT se controla en la célula por varios organelos o centros agrupados bajo el nombre de "centros organizadores de MT" (COMT). Estos se observan claramente después de teñir con antitubulina inmunofluorescente y son: centriolos (las regiones polares del aparato mitótico), cuerpos basales, cinetocoros y los poros de la membrana nuclear (23).

Para el ensamblaje de MT in vitro se siguen varios pasos en los que se requiere:

- 1.- Una mínima cantidad de tubulina que es alrededor de 1mg/ml.
- 2.- Nucleótidos de guanosina.
- 3.- Que los iones de Ca^{++} , se remuevan, de preferencia con un fuerte quelante EGTA, que no remueve Mg^{++} .
- 4.- La solución se calienta a 37° , a un pH óptimo de 6.9 y se mide por viscosidad (24).



Otro factor que es importante para el ensamblaje de MT, es el balance entre S-S y grupos SH- (25).

REGULACION DEL ENSAMBLAJE Y DESENSAMBLAJE DE MICROTUBULOS:

Una de las propiedades de los MT en células vivas, es su modificación en número y localización. Son independientes de la síntesis de proteínas, resultando el ensamblaje de tubulina citoplásmica con desensamblaje posterior. Es evidente que es necesaria alguna regulación y en las investigaciones con respecto a MT, se trata de averiguar como la célula no sólo controla el número de MT, sino que incluso expresa el mensaje para cuando y donde se ensamblen. Muchos de los mecanismos que parecen estar envueltos, en estos procesos dependen de las estructuras celulares que juegan un papel en la formación de MT, como son los Centros Organizadores de Microtúbulos (COMT), (26).

La cantidad de tubulina en células HeLa sincronizada previamente por aminopterina o tratamiento de hidroxiaurea, se ha medido por la unión de ³H-colchicina durante el ciclo celular. La síntesis persiste durante todo el ciclo celular, desde G₁, atravesando S hasta G₂ cuando está sobre el promedio. La cantidad media resultade un equilibrio entre síntesis y catabolismo.

DISTRIBUCION DE LAS FIBRAS DEL HUSO

Las fibras del huso se han dividido en 2 clases, por el criterio de unión al cinetocoro:

- a) Fibras continuas: que corren de polo a polo.
- b) Fibras del Cinetocoro o fibras cromosomales que corren de uno de los polos a un cinetocoro del cromosoma.

Además existen fibras que pueden unirse a otras partes del cromosoma, llamadas fibras neocéntricas.

Agregadas a las fibras del huso, se encuentran las fibras astrales, que radian desde los ásteres pero no corren a través del huso.

Las fibras del huso pueden cambiar de longitud durante la anafase. Debido a que la distancia entre los polos se incrementa con la elongación del huso, las fibras continuas incrementan su longitud, manteniéndose en un paquete compacto durante la telofase. Así mismo, al moverse los cromosomas hasta muy cerca de los polos, las fibras del cinetocoro decrecen en longitud. No se conoce aún el mecanismo por medio del cual se diferencia la actividad de unos y otros microtúbulos.

La distancia entre los polos mitóticos es de 10-30 μ y el movimiento cromosómico en anafase es de entre 2 y 60 minutos dependiendo del tipo celular del que se trate (27).

La distribución de los MT en mitosis, se determina haciendo secciones seriadas de la célula (28). En metafase, el número más grande de microtúbulos se encuentra en el plano ecuatorial, decreciendo hasta los polos.

Se han observado puentes que cruzan entre los microtúbulos en varios sistemas celulares (29). Estos puentes transversales son aproximadamente de 5 nm de diámetro y 25-26 nm de longitud. Incluso cuando estos no son evidentes, los microtúbulos del huso tienden a guardar un espacio constante, típicamente con una distancia de centro a centro aproximadamente de 50 nm., los puentes transversales pueden ser estructuras citoplásmicas como mitóticas (28).

EQUILIBRIO DINAMICO DE MICROTUBULOS Y TUBULINA

Inoué y colaboradores (30), proponen que el movimiento mitótico puede deberse a ensamblaje y desensamblaje de subunidades de tubulina ya que el aparato mitótico está en equilibrio dinámico, el cual se lleva a cabo entre microtúbulos ensamblados

y un acúmulo de tubulina libre. Este concepto se basa en la respuesta de las células mitóticas a tratamientos que destruyen microtúbulos tales como temperatura; disociándose los MT a bajas temperaturas y presión; lo que causa un decremento reversible en la birrefringencia del huso (31). La clásica interferencia con el equilibrio del huso, es la colchicina, cuya acción resulta en la consecuente pérdida del alineamiento de los cromosomas (32), causada por la disgregación de MT en subunidades libres que pueden repolimerizarse cuando la colchicina se quita del medio. Como resultado de lo anterior, su acción se expresa como un efecto venenoso, en donde los dímeros de tubulina que se han unido a la colchicina no se unen a los extremos de los MT que están en crecimiento, de manera que éstos sólo se ensamblan en el extremo que queda libre (33).

El ensamblaje y desensamblaje de los microtúbulos al parecer está regulado por una proteína, la Calmodulina que regula los niveles de calcio, siendo capaz de estimular la disgregación de los MT in vitro al incrementar los niveles de calcio (34). La calmodulina es una proteína de bajo peso molecular, es parecida a la troponina C, reguladora de calcio en el músculo. En estudios de inmunofluorescencia muestran que la calmodulina está presente en interfase en un patrón idéntico a las fibras en stress y en las células mitóticas se encuentra en el huso entre los dos po-

los, lo que eleva la posibilidad de estar involucrada en la regulación, tanto de MI como de microfilamentos (formados por actina), localizados en esta región (35-36).

MICROTUBULOS Y FILAMENTOS DE ACTINA EN EL MOVIMIENTO CROMOSOMICO.

Inoué y Sato (30), proponen que los microtúbulos no generan pero si transmiten la fuerza motriz que actúa sobre los cinetocoros de los cromosomas. Esta fuerza es generada por el movimiento en la polimerización y despolimerización, de las subunidades que forman las fibras del cinetocoro uniendo los cromosomas a los polos.

El modelo de los filamentos resbalosos, supone que en vez de movimientos coordinados a los polos, los microtúbulos adyacentes pueden resbalar sobre otros con los puentes transversales.

Por otro lado, la posibilidad de que puedan efectuarse los movimientos debido a filamentos contráctiles, se establece por demostraciones recientes de actina y miosina en el huso mitótico.

En estudios de inmunofluorescencia con anti-tubulina, se observa que el citoesqueleto citoplásmico de microtúbulos desaparece durante profase. En metafase la fluorescencia aparece primero alrededor de los cromosomas, fluoresciendo posteriormente intensamente los polos y la parte central donde se encuentran las fibras continuas y del cinetocoro. En telofase decrece notablemente la fluorescencia (37).

Estudios hechos por McIntosh y colaboradores (38), muestran que las fibras de actina se desarrollan en el huso, en profase, los filamentos citoplásmicos de actina desaparecen y el nivel de tinción amorfa en el citoplasma se incrementa. La región polar alrededor de los centriolos comienza a teñirse intensamente por actina al momento del rompimiento de la membrana nuclear, ésta se incrementa durante la prometafase y se extiende en fibras durante la metafase. Estos estudios los realizaron en células PtK1 de rata canguro, que no se redondean completamente durante mitosis, permaneciendo parcialmente aplanadas a la caja, de manera que lograron ver un máximo de 6 fibras que contenían actina por cada mitad del huso, sin embargo ya que las fibras se localizan en diferentes planos focales, sugieren un número probablemente mayor, pudiendo ser posiblemente de una fibra por cada cinetocoro.

Debido a la gran cantidad de actina amorfa, probablemente sólo una pequeña parte se asocia con el huso en forma fibrosa.

Las evidencias anteriores y el hecho de que los microfilamentos no corren en línea recta, de los cromosomas a los polos, sino que siguen la curva que marca los microtúbulos y ninguna fibra cruza la interzona, apoya la idea de que juegan un papel en el movimiento cromosómico sin participar en la elongación y además participa muy especialmente en la citocinesis, -- sin embargo no se ha podido comprobar totalmente.

Fujiwara y Pollard investigaron la presencia de miosina usando un anticuerpo que reacciona con la parte principal de la molécula, el trabajo lo realizaron en células HeLa en las que se observaron que en interfase y profase el citoplasma se tiñe uniformemente mientras que el núcleo se destiñe, en metafase y anafase se observa una tinción intensa entre los cromosomas y los polos, pero no se observan fibras, en mitosis tardía se tiñe el surco de división al igual que la actina, quedando pausable la idea de que la contracción de actinmiosina existe en mitosis (39).

5) CENTRÍOLO

Las células mitóticas tienen dos polos en el huso, que son las regiones hacia donde migran los cromosomas en anafase. Cada polo en células animales se identifica por un par de centriolos, que, en células de plantas superiores parecen estar ausentes, aunque en las inferiores sí se encuentran.

El centriolo junto con la zona pericentriolar (material que se encuentra alrededor), la cual a veces aparece como un halo de gránulos densos, se conoce como Centrosoma; la Centrósfera es la región que se encuentra alrededor del centrosoma, incluyendo microtúbulos y material de membrana. El Aster incluye la centrósfera y el arreglo radial de MT, membranas, mitocondrias y otros componentes.

El centriolo es un pequeño cilindro hueco de cerca de $0.5 - 0.7 \mu$ de longitud y 0.25μ de diámetro. La pared del cilindro consiste de 9 tripletes de microtúbulos los cuales dan la apariencia de los rayos de una rueda en un corte transversal. Los 3 microtúbulos de cada triplete están casi siempre en un mismo plano, de manera que cada triplete forma una especie de navaja que recorre toda la longitud del centriolo, en cada triplete -

el microtúbulo interior es el único circular (40).

Se encuentra una relación estructural y funcional entre centríolos y cuerpos basales que forman cilios y flagelos, mostrándose claramente por el hecho de que cuerpos basales de Chlamydomonas o Tetrahymena, tienen la capacidad de formar ásteres cuando se le inyectan a huevos de Xenopus (40).

Se han hecho varios estudios para determinar si los centríolos como los cuerpos basales tienen ácidos nucleicos (41,42), sugiriendo al principio que contenían ADN, aunque estudios posteriores citoquímicos (43) y con $^{32}P_04$, más tarde mostraron que los cuerpos basales contenían ARN con cerca de 3×10^8 daltones de material sensible a ARNasa (44).

Como producto de mitosis, cada célula hija resulta con dos centríolos, que en la siguiente G1 se reproducirán, primero se observan los centríolos hijos o procentríolos como pequeños cilindros orientados perpendicularmente a los centríolos parentales y cerca de su extremo proximal, éstos procentríolos son semejantes a los parentales, pero con la mitad de longitud (45).

La inhibición de la síntesis de proteínas con cicloheximida evita la aparición de los procentríolos, por lo que deben -

formarse a partir de nuevas proteínas, pero ya formado el pro-centríolo la cicloheximida no impide su maduración (46).

Sin embargo, al parecer sólo los centriolos parentales participan en mitosis. La migración de los centriolos es reversible, evitándose con colcemid (32).

SISTEMA DE ANAFASES

Como ya se dijo en párrafos anteriores, los sistemas biológicos que miden el riesgo para la especie humana a nivel genético producido por compuestos químicos, detectan el daño directamente en la molécula de ADN o en las proteínas ligadas funcionalmente a él, expresándose como mutaciones.

1) Mutaciones

De esta manera, definimos las mutaciones como cambios en el material hereditario (ADN), que pueden ocurrir en los genes aislados (mutaciones puntuales) ó en un conjunto de genes (mutaciones cromosómicas).

Mutaciones Génicas

a) Mutaciones por Substitución de Bases . Dentro de éste grupo encontramos las transiciones, que son cambios de bases púricas por púricas ó pirimídicas por pirimídicas y las transversiones donde se efectúa un cambio de una base púrica por pirimídica ó viceversa.

b) Corrimiento de Fase. En ésta mutación, se produce un corrimiento de la secuencia de bases, debido a la adición o eliminación de las mismas.

Mutaciones Cromosómicas

a) Rearreglos Cromosómicos. En donde podemos encontrar rupturas seguidas de una reconstitución de los fragmentos, produciéndose inversiones, translocaciones, deleciones o adquisición de genes e intercambio entre las cromátidas hermanas.

Mis-Segregación. Constituye una mala segregación de los cromosomas a la hora de separarse en mitosis o meiosis, dando como consecuencia alteraciones numéricas de los cromosomas en las células hijas. En éste caso, el daño que la origina puede ocurrir directamente en el ADN, o en componentes celulares relacionados

con él, como pueden ser los microtúbulos del huso mitótico, centriolos, proteínas de la cromatina ó diversas enzimas involucradas en su síntesis o reparación.

En relación con éste último grupo, existen varios padecimientos ocasionados por la no-disyunción cromosómica como son: el Síndrome de Down (47, +21) los síndromes de Turner (45 XO), Klineffelter (47, XXV) reportándose también en algunos procesos neoplásicos malignos y en el 30% de productos abortado en el primer trimestre de embarazo (47).

Dado que el Sistema de Anafases es un método adecuado para detectar compuestos que alteren el aparato mitótico y de manera indirecta, los compuestos que dañen al ADN, ha sido considerado valioso para determinar la capacidad de los agentes químicos de producir estas anomalías. Esta determinación se hace mediante la observación de alteraciones tales como puentes, cromosomas retardados, cromosomas pegajosos, quismas, mitosis multipolares y disgregaciones cromosómicas totales ó de un solo polo.

POSIBLES MECANISMOS A TRAVES DE LOS CUALES SE PRODUCEN LAS ANOMALIAS DETECTADAS EN ESTA PRUEBA.

PUENTES, CROMOSOMAS RETARDADOS Y CROMOSOMAS PEGAJOSOS:

Varios autores postulan que los compuestos que actúan directamente sobre el ADN producen rompimientos cromosómicos que conducen a cromosomas dicéntricos, fragmentos acéntricos y cromosomas sin la zona telomérica, éstas alteraciones en el momento de la anafase se observan como puentes, fragmentos retardados y cromosomas pegajosos respectivamente (48). En el caso de cromosomas retardados, éstos pueden producirse por alteraciones en el cinetocoro principalmente, ó por alteraciones en los microtúbulos del aparato mitótico. En este trabajo, fragmentos y cromosomas retardados, se agruparon como cromosomas retardados.

El nombre de quismas se dió arbitrariamente, debido a la semejanza de las figuras observadas en los cultivos, con las observadas en meiosis.

El posible mecanismo a través del cual se producen estas figuras, es la alteración de los telómeros, produciendo extremos pegajosos con fibras cromosómicas submicroscópicas que conectan ambas cromátidas, impidiendo que se separen en anafase completamente (49).

Al permanecer unidas ciertas porciones del cromosoma,

tal vez favorezcan la producción de recombinación entre las cromátidas hermanas, como lo sugieren trabajos realizados con sulfas en hongos tal como el Aspergillus flavus (4).

MULTIPOLARES

Las mitosis con husos multipolares pueden deberse a alteraciones de los centriolos o tal vez modificaciones del aparato mitótico producidos por agentes que dañen las proteínas de los microtúbulos (50).

DISGREGACIONES

Las disgregaciones son desórdenes de los cromosomas, observándose en los que migran a un solo polo, ó en el total de los cromosomas. En el primer caso, posiblemente por daño en uno de los centriolos, en los cinetocoros de los cromosomas que migran al mismo lado, o en los microtúbulos del cinetocoro en ese extremo.

Las disgregaciones totales, pueden deberse a alteración de ambos centriolos, de todos los cinetocoros o tal vez alteración de todos los microtúbulos, produciendo alteraciones múlti-

ples y por último, disgregación de los cromosomas en metafase, originada por las alteraciones ya mencionadas, impidiendo la separación de los cromosomas. Es importante señalar que éste último tipo de disgregación se observó en los cultivos, pero no se tomó en cuenta ya que se lleva a cabo dentro de la metafase y no en anafase.

MATERIAL

a) Compuestos Químicos

Sulfadiazina, Sulfameracina y Sulfatiazol de los laboratorios Kan, México, D.F.. Etil Metano Sulfonato (Sigma), Medio McCcys 5e modificado (Gibco), Tripsina a 0.2%, Fijador de Carnoy (metanol-ácido 3:1). Acetorceina al 2% e Hidróxido de Sodio al 10%.

b) Material Biológico

Se utilizaron células de la línea CHO (células de ovario de Hamster chino Cricetus griseus), donada por el Dr. Antonio Velázquez del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Esta línea tiene una alta eficiencia de sembrado, es de fácil manipulación, un tiempo de generación corto (12 hrs.), crecimiento indefinido, estabilidad cromosómica ($2n = 22 + -2$), fácil sincronización, tiene actividad de B-glucoronidasa, más no de enzimas microsomales (7).

METODO

Crecimiento de Células.

Las células (fibroblastos) se cultivaron en frascos Fal con T75, manteniéndose en crecimiento logarítmico alimentando cada tercer día y subcultivando a otro frasco cada vez que llegaron a confluencia, se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Para cada experimento, se tripsinizaron las células, para despegarlas del frasco sembrando 250,000 células en 0.5 ml de medio sobre un cubreobjetos de 20 x 20, previamente estéril colocándolo sobre una caja de Petri de 60 mm de diámetro. Se dejaron reposar las células durante 15 min. aproximadamente, para permitir que se pegaran al cubreobjetos.

Solubilidad de las Drogas.

La solución stock de las drogas se preparó agregando a 2.5 g de cada sulfá, 2 ml de agua destilada más 0.8 ml de una solución de NaOH al 10% para disolverlas, completando con agua destilada hasta 10 ml y filtrando a través de Millipore.

Tratamiento

Cada sulfamida se agregó a las células, tomando una alícuota de la solución stock, para tener las siguientes concentraciones finales: 100, 200, 400, 600, 800, 1,000, 5,000, y 10,000 $\mu\text{g/ml}$, completando el volumen con medio McCoy's a 5 ml por caja. Los cultivos controles recibieron 4.98 ml de medio más 0.02 ml de NaOH al 10% (que fue la máxima concentración dada a las células tratadas). Se utilizó el etil metano sulfonato como control positivo con el objeto de comparar los resultados producidos por las sulfamidas, con un agente que causa tanto daño al ADN como al aparato mitótico. Tanto los cultivos tratados como los controles, se hicieron por duplicado. Las concentraciones de las sulfamidas fueron elegidas con base en su máxima solubilidad y/o toxicidad.

Tiempo de Exposición

La exposición de las células a las soluciones de sulfamidas fue de 24 horas, para asegurarse que estuvieran en contacto con todas las fases del ciclo celular, además de asegurar un máximo de mitosis posibles.

Colecta de Anafases

Cerca de las 24 horas de cultivo, se revisaron las cajas

y en el momento en que se observó el mayor número de anafases, las células se fijaron con 2 ml de Carnoy sin retirar el medio de cultivo. Al cabo de 10 min se decantó el medio con el fijador, - agregando 5 ml de fijador dejándolos de 10 a 20 minutos aproximadamente. Se sacaron los cubreobjetos de las cajas de petri y se secaron al aire, se metieron en acetona, después en Xileno montándose inmediatamente con permount sobre portaobjetos.

Análisis de Anafases

1) Se leyeron 1,000 anafases por concentración (500 por laminilla), en cada experimento.

2) Se analizaron las anafases tomando en cuenta la distribución cromosómica normal, los puentes, cromosomas retardados, cromosomas pegajosos, quiasmas, mitosis multipolares y - cromosomas disgregados.

3) Para medir citotoxicidad, se determinó el índice mitótico sobre 1,000 células.

4) Los resultados fueron evaluados utilizando el análisis de varianza.

RESULTADOS

En la Fig. 1 se observa: (a) un aspecto general del cultivo, mostrando la cantidad de material requerido para el análisis de anafases; (b-e) las etapas de mitosis en células CHO, profase, metafase, anafase y telofase respectivamente (a un aumento mayor).

En las Figs. 2 y 3 se muestran los tipos de aberraciones que se presentan en las células en anafase, cuyos posibles mecanismos se discutieron anteriormente en el análisis del sistema.

Fig. 2 (a) vista general del cultivo; (b) anafase normal; (c-e) puentes; (f-h) cromosomas retardados y por último (i-k) cromosomas pegajosos.

Fig. 3 (a-c) quiasmas; (d-f) husos multipolares y (g-i) disgregaciones, donde (g-i) se muestran disgregaciones totales - producidas por múltiples alteraciones y (h) disgregación de un solo polo.

En la Fig 4 se muestran los resultados de los efectos de las tres sulfas (1) Sulfadiazina; (b) Sulfameracina y (c) Sulfatiazol, comparados con células control no expuestas y con células

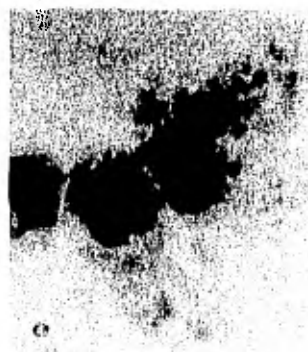
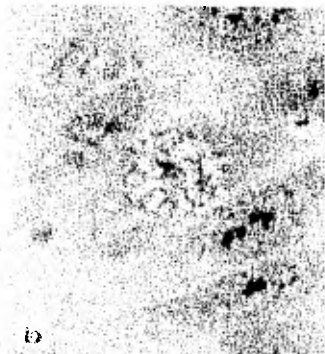
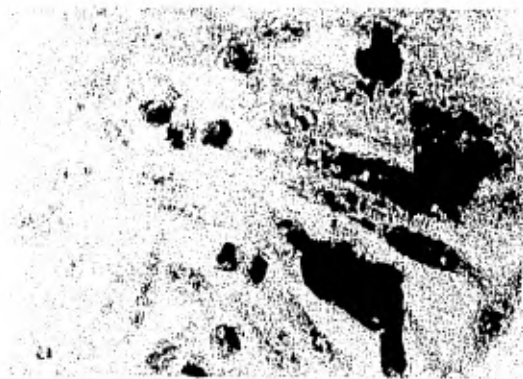








Fig. 1. General view of the spindle apparatus in different stages of the process of mitosis: a) anaphase; b) telophase; c) metaphase; d) anaphase; e) telophase.

expuestas al EMS (etil metano sulfonato) como control positivo. Los resultados se vaciaron en histogramas en donde en la abscisa se expresan las dosis empleadas en molaridad y en la ordenada el % de anafeses aberrantes.

Las barras expresan: puentes  ; c. retardados  ; c. pegajosos  ; quiasmas  ; m. multipolares  y - disgregaciones  .

Como lo muestran los histogramas, el Sulfatiazol resultó ser la sulfa que mayor incremento de aberraciones produce. A dosis similares a las del control positivo no muestra ser tóxico - ya que el índice mitótico no se vió alterado y sin embargo produjo un incremento del doble en cromosomas pegajosos, multipolares y disgregaciones, siendo aún mayor dicho incremento en quiasmas pero menor en puentes y cromosomas retardados. Las dosis más altas hasta 3.9×10^{-3} M no fueron tóxicas como lo muestra el índice mitótico (Tabla 1). Sin embargo, a partir de esta última dosis se forma una gran cantidad de cristales, posiblemente por efecto de concentración de la sulfa. Esta dosis incrementa notablemente los husos multipolares, hasta 16 veces con respecto al testigo y las disgregaciones 6.5 veces, las otras alteraciones también se incrementan pero no tan drásticamente. En la concentración de 1.9×10^{-2} M, ya no fué posible el análisis, puesto que todas las

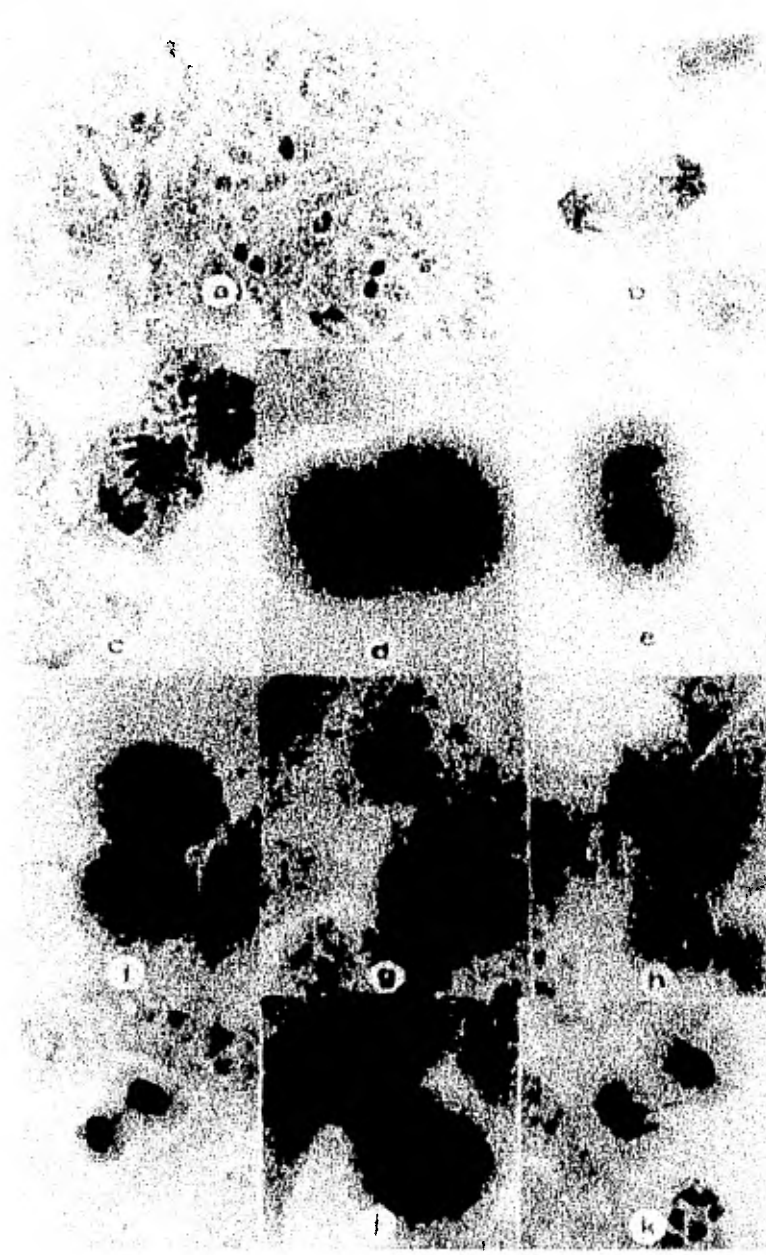
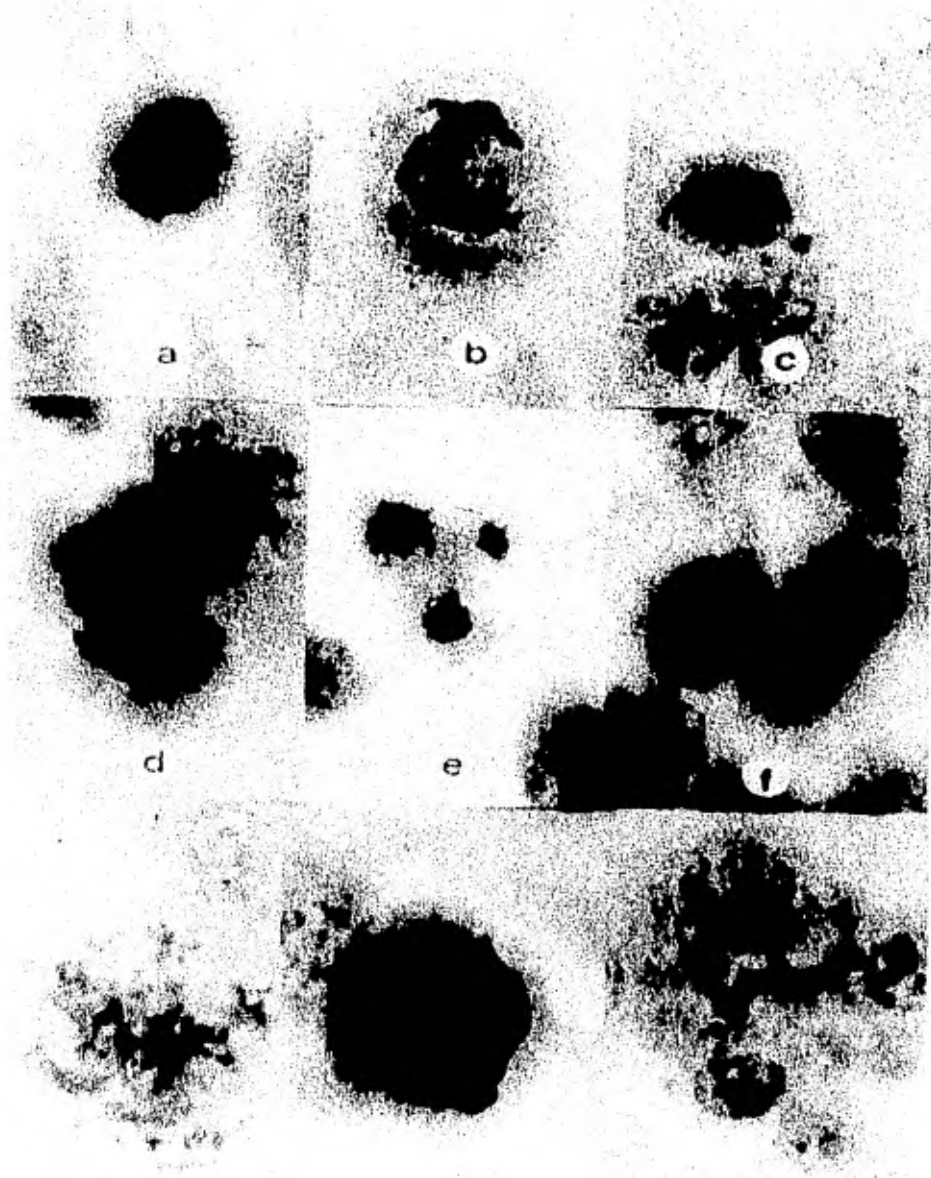


Fig. 1. a) General del mitivo; b) anafase normal; c) el puente
 2-3; d) las células retardadas; e-k) pronocemas pegajosa.



células se detuvieron en metafase, observando un efecto similar al producido por coichicina, aquí el índice mitótico se vió disminuido. La dosis mayor produjo la muerte total de las células mostrando una gran toxicidad.

Por efecto de Sulfadiazina y Sulfameracina se observa un ligero aumento en las alteraciones, de las cuales solo los cromosomas pegajosos, multipolares y disgregaciones en Sulfadiazina tienen un mayor incremento y en Sulfameracina tanto los cromosomas pegajosos como los retardados, multipolares y disgregaciones son los que aparecen en mayor frecuencia. En ambas Sulfas el índice mitótico casi no se altera ni la morfología celular, sin embargo, al igual que en Sulfatiazol, las tres últimas dosis presentan cristales en el medio.

En cada gráfica, se muestra la acción del EMS que se usó como control positivo para verificar el sistema. El efecto de este compuesto en relación con el de las sulfas, se muestra en la Fig. 5 en la que los observamos comparativamente a la misma concentración de 4×10^{-4} M. En esta gráfica observamos que sólo Sulfatiazol tiene un ligero incremento en quiasmas, multipolares y disgregaciones no siendo así en Sulfadiazina y Sulfameracina, tal incremento aplicando el análisis de varianza resultó significativo. Sin embargo, comparando con EMS, observamos que éste com-

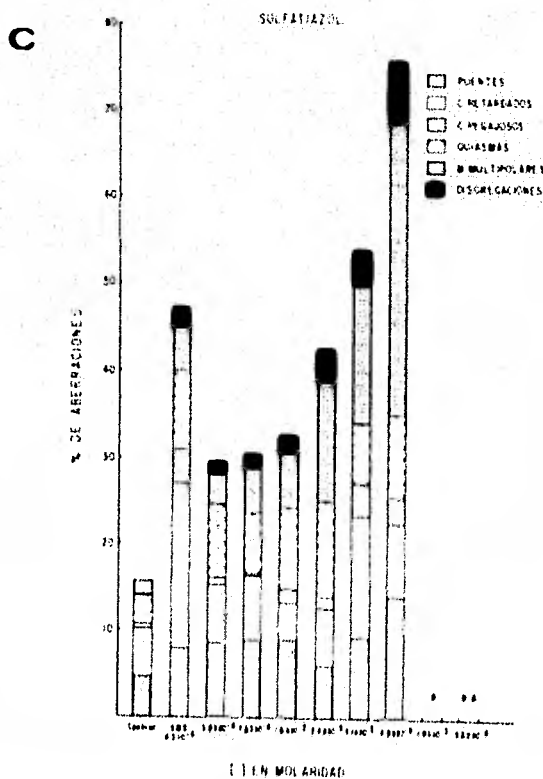
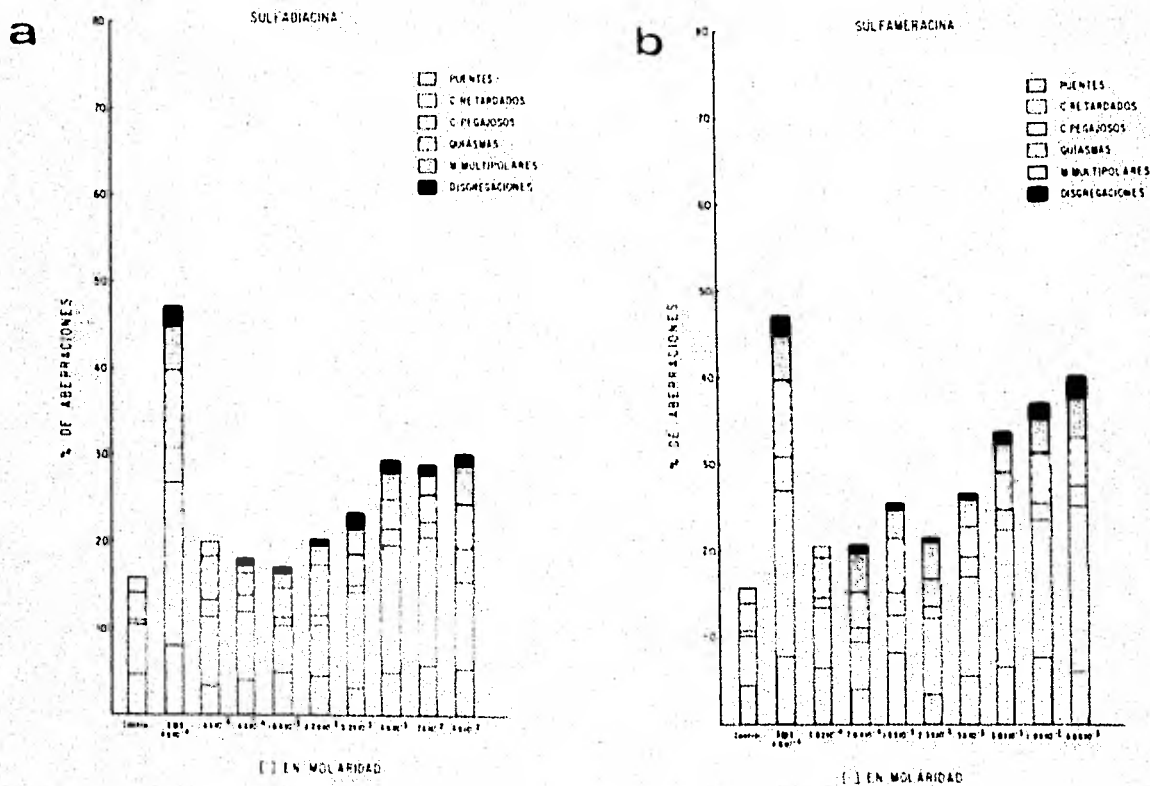


fig. 4

Fig. 4. Efecto genético producido por tres sulfas en el sistema de anafases. En la abscisa se muestran las concentraciones en molaridad y en la ordenada el % de aberraciones producidas. a) Sulfadiacina b) Sulfameracina c) Sulfatiazol.

* Las células en división se encuentran detenidas en metafase.

** Todas las células muertas.

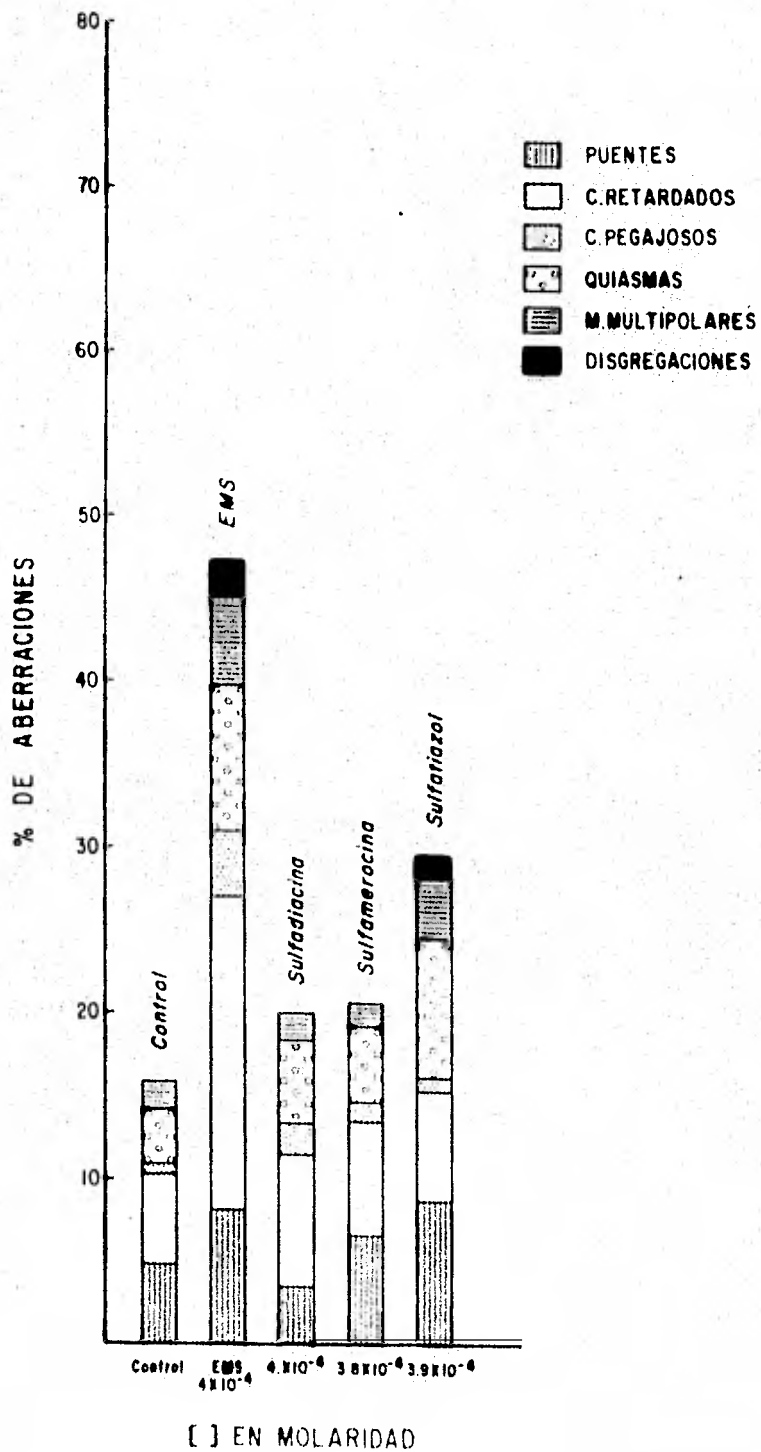


Figura 5. Se observa comparativamente el efecto del control, EMS y las tres sulfas a la misma concentración.

puesto produjo un mayor incremento en todas las alteraciones salvo en los puentes de los cuales se observa sólo un aumento ligero. En la Tabla 1 se muestra la frecuencia espontánea de aberraciones en células CHO comparándolas con EMS y con las tres sulfas.

Además se observa el % de células con dos o más aberraciones y el índice mitótico, en el control, con EMS y las tres sulfas. Nuevamente observamos que el Sulfatiazol es la sulfas que produce un mayor porcentaje de células con 2 ó más aberraciones, aunque menor al EMS el cual lo eleva casi 9 veces.

En la Fig. 6 observamos en (a) una metafase normal y en (b y c) metafases alteradas. Este tipo de metafases se observan frecuentemente en los cultivos, sobre todo en Sulfatiazol, aunque no se tomaron en cuenta en el análisis al igual que la cariólisis observada en algunas células en los cultivos de las tres sulfas (Fig. 2-k).

TABLA I. ANOMALIAS ANAFASICAS EN CELULAS DE HAMSTER CHINO EXPUESTAS A SULFADIAZINA,

SULFAMERACINA Y SULFATIAZOL.

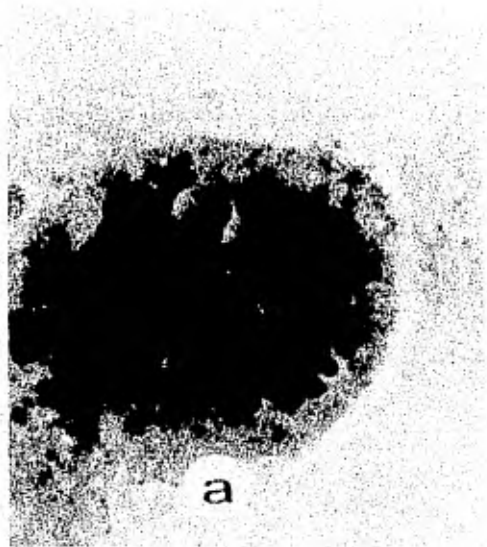
CONCENTRACION EN MOLARIDAD	P O R C E N T A J E D E C E L U L A S								INDICE MITO TICO
	NORMALES	A N O R M A L E S C O N:						20*	
		PUNTES	CR. RETARDADOS	CR. PEGAJOSOS	PSEUDO QUIASMAS	MITOSIS MUL TIPOLARES	DISREGRA CIONES		
0*	86	4.7	5.6	0.6	3.2	1.7	0	.6	6.7
4 x 10 ⁻⁴	80	3.5	8.0	1.9	5.4	1.3	0	.6	6.7
8 x 10 ⁻⁴	83	4.0	7.9	1.99	2.6	1.0	0.66	.8	6.7
1.6 x 10 ⁻³	84	5.0	5.4	1.0	3.4	1.7	0.7	1.4	5.3
2.4 x 10 ⁻³	82	4.6	5.9	0.98	5.9	2.3	0.7	1.4	5.0
3.2 x 10 ⁻³	66.7	3.2	11.0	0.79	3.6	3.2	1.6	1.6	5.3
4 x 10 ⁻³	67.4	5.0	14.7	1.93	3.5	3.2	1.2	2.2	5.1
2 x 10 ⁻²	65.3	5.7	14.9	1.76	3.09	2.6	0.9	1.4	5.0
4 x 10 ⁻²	68.4	5.4	10.0	3.9	5.0	4.7	2.5	2.2	5.0
1.8 x 10 ⁻⁴	80.3	6.6	6.9	1.2	4.6	1.4	0	2.4	5.0
7.6 x 10 ⁻⁴	79.0	4.1	5.4	1.6	4.1	4.8	0.6	2.2	6.3
1.5 x 10 ⁻³	74.4	8.3	4.3	2.6	6.3	3.4	0.6	2.4	5.1
2.3 x 10 ⁻³	78.0	3.5	8.8	1.3	3.1	4.4	0.3	1.4	5.2
3 x 10 ⁻³	70.0	5.6	11.4	2.3	3.5	3.3	0.4	2.4	5.4
3.8 x 10 ⁻³	68.5	6.6	15.6	2.3	4.3	3.8	0.8	3.2	5.4
1.9 x 10 ⁻²	63.0	7.7	15.8	1.9	5.8	4.2	1.5	3.6	5.0
1.8 x 10 ⁻²	63.9	6.1	19.0	2.4	5.5	4.8	1.2	3.2	5.0
1.9 x 10 ⁻⁴	70.2	8.7	6.7	0.8	8.4	3.9	1.1	3.4	6.2
7.8 x 10 ⁻⁴	77.6	8.9	7.5	0.3	8.9	3.6	1.2	3.4	6.0
1.6 x 10 ⁻³	67.5	8.0	5.3	1.5	9.5	6.8	1.5	3.0	6.2
2.4 x 10 ⁻³	57.0	6.0	6.6	1.4	11.0	14.4	2.9	5.2	5.7
3.1 x 10 ⁻³	45.0	9.3	14.0	3.8	6.9	10.0	3.8	5.2	5.5
3.9 x 10 ⁻³	22.0	14.0	8.5	3.0	9.6	33.9	6.6	8.2	4.5
1.0 x 10 ⁻²	*	*	*	*	*	*	*	*	4.1
3.9 x 10 ⁻²	**	**	**	**	**	**	**	**	0
DMS**	53.0	8.0	12.0	4.2	9.0	5.0	2.6	5.2	3.1

* Control

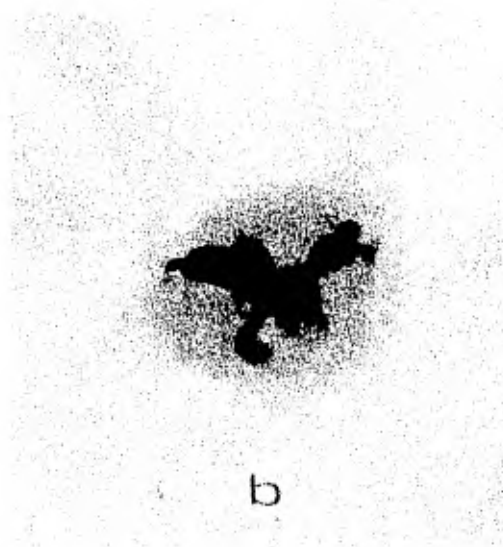
** Control positivo etilmetano sulfonato 4 x 10⁻⁴ Mol.

* Todas las células detenidas en metafase

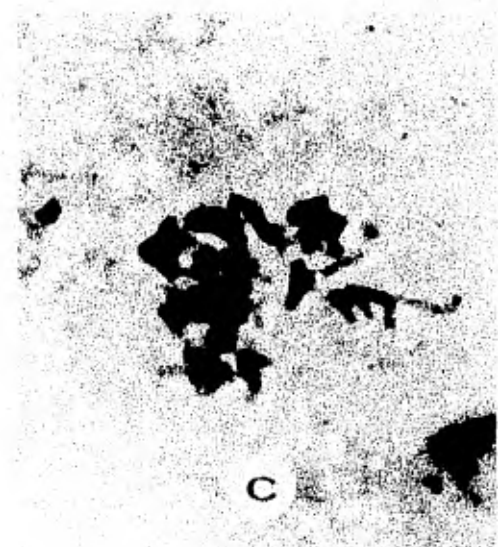
** Células muertas.



a



b



c

Figura 6. a) metafase normal, b) y c) metafases anormales.

ANALISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en éste trabajo, resumidos en la Figura 4, indican claramente que el Sulfatiazol fué el compuesto que presentó un mayor incremento en el porcentaje de mitosis multipolares y disgregaciones, desde la concentración de 3.9×10^{-4} M, siendo mayor conforme se aumentaron las concentraciones hasta llegar a 3.9×10^{-3} M, donde el incremento es bastante considerable. Este hecho y el encontrar las células en división detenidas en metafase en la siguiente concentración 1.9×10^{-2} M, sugiere que dicha sulfa está actuando fundamentalmente a nivel de la polimerización de los microtúbulos que intervienen en la formación del aparato mitótico, teniendo su efecto posiblemente sobre:

- a) los radicales SH libres de la tubulina
- b) las proteínas asociadas a los MT
- c) los centros organizadores de MT (COMT)
- d) la tubulina, precipitándola en forma de cristales.

a) Esta hipótesis se apoya en el hecho de que la tubulina que es la proteína estructural de los microtúbulos, tiene gran cantidad de SH libres que se requieren en la polimerización. Esto se ha mostrado a través de pruebas citoquímicas con naranja de -

mercurio que reacciona con los grupos sulfhidrilos, tiñendo intensamente los microtúbulos citoplásmicos, del aparato mitótico y los puentes transversales de los mismos (51). Además, a través de pruebas con tubulina purificada, se muestran, un número de residuos de sulfhidrilos de 7,2 (52).

Se sabe también que al bloquear estos grupos SH^- con inhibidores específicos como por ejemplo el cloromercurio sulfato de benceno y algunos otros venenos mitóticos (53), se impide la polimerización de la tubulina y por lo tanto la formación de los MT, provocándose aberraciones tales como las producidas por sulfatiazol, mencionadas anteriormente.

b) Existen ciertas proteínas de alto peso molecular (MAP), encontradas en preparaciones de tubulina de varias fuentes, que permanecen asociadas aún después de varios ciclos de polimerización y despolimerización (54). Si son alteradas éstas proteínas, se evita la polimerización de los MT.

Otra proteína importante en la polimerización, es la Calmodulina que regula la concentración de calcio. Al bloquear su acción se eleva el contenido de este ión, alterando la formación de los MT.

c) El efecto del sulfatiazol incluso, pudo llevarse a cabo sobre los centros organizadores de MT, evitando la formación de parte ó todos los MT. Por ejemplo, las disgregaciones de un solo polo, pueden haber tenido su origen en alteraciones de los cinetocoros, microtúbulos del cinetocoro ó el centriolo de un solo extremo, evitando así la segregación de la mitad de los cromosomas, sin alterarse aparentemente la otra mitad. En el caso de disgregación total, tales estructuras de ambos extremos pudieron verse afectadas, originándose múltiples alteraciones.

d) Existen dos alcaloides, la vinblastina y vincristina aislados de la planta Catharantus roseus, muy útiles en la quimioterapia del cáncer. Uno de los efectos de éstos alcaloides, es precipitar la tubulina intracelular en forma de estructuras cristalinas, inhibiéndose de ésta manera la polimerización de microtúbulos (55 y 56).

Este hecho es interesante, y en nuestro estudio bien pudo producirse no solo por efecto del sulfatiazol, sino incluso por el de las otras dos sulfas, ya que aunque ligero, hubo un incremento en multipolares y disgregaciones desde las concentraciones más bajas, además de disgregaciones en metafase, que no fueron valoradas.

En la gráfica del sulfatiazol observamos también, que el resto de alteraciones se ven aumentadas, aunque no conservan una linealidad con respecto al aumento de dosis. A partir de $3.1 \times 10^{-3}M$, encontramos un aumento considerable de puentes, retardados y pegajosos. Este efecto es producto de daño tal vez a proteínas cromosomales, ya que trabajos realizados en el sistema de Ames (57) que miden directamente daño al ADN, muestran resultados negativos al probar sulfas.

Los quiasmas se ven aumentados desde las dosis bajas - ($3.9 \times 10^{-4}M$) manteniéndose más o menos la misma frecuencia en el resto de las concentraciones probadas. Esta alteración se sugiere como resultado de entrecruzamiento, favorecido tal vez por la generación de extremos pegajosos los cuales probablemente impiden la separación de las cromáticas en un extremo (49).

Es interesante el hecho de que en la concentración de $1.9 \times 10^{-2}M$, todas las células que se encontraban en división - estaban detenidas en metafase sin observarse ninguna otra etapa más, por lo que posiblemente la droga afectó a las células desde las primeras horas, al igual que actúa la colchicina acumulándose el daño. De esta manera al detenerse el cultivo con el fijador, todas las células en división se encontraban en metafase, observándose además, cierto grado de toxicidad, como lo indica la dis-

minución del Índice Mitótico y su bloqueo total en la concentración de $3.9 \times 10^{-2} M$.

Las otras dos sulfas, sulfadiazina y sulfameracina tienen un efecto mucho menor, mostrando una ligera elevación en todas las anomalías. En estos dos casos no se apreció toxicidad aún en las concentraciones máximas de $4 \times 10^{-2} M$ y $3.8 \times 10^{-2} M$ respectivamente.

Es muy importante hacer notar que en la Tabla 1, se expresó el porcentaje de aberraciones de cada tipo tomando en cuenta solo una por célula, aunque estuvieran presentes dos o más. Además, en el caso de células con dos ó más aberraciones, se tomó en cuenta el que hubiera más de un tipo de aberraciones, sin considerar si éste se repetía una o más veces. De esta manera, si se analizan nuevamente los resultados de la gráfica 4 es posible que las aberraciones se vean incrementadas si se toma en cuenta las veces que se repite un cierto tipo de aberración y no tomándola como un solo evento, tal como se hizo.

Es importante señalar, que esta decisión se tomó pensando que el análisis de células con múltiples anomalías es difícil y

susceptible de mala interpretación. Por otro lado, se decidió tomar en cuenta este tipo de efecto múltiple, al interior de una célula, expresándolo (Tabla 1) como número de células con dos o más anomalías. Con ello esperamos tener una evaluación más completa de la potencia de los compuestos.

Este aspecto muy probablemente favorecería a la sulfameracina donde el número de células con dos o más alteraciones es mayor que en sulfadiazina, aunque en las gráficas se observen muy semejantes en cuanto al % de aberraciones.

Otro aspecto que muy probablemente influyó en los resultados, es el hecho de que los cultivos celulares no estuvieran sincronizados, de manera que las subidas y bajadas observadas en cada alteración pudieron deberse a que el daño se produjo en diferentes momentos del ciclo celular y al hecho de que el tratamiento fué único y continuo durante 24 horas

Por otro lado, las concentraciones usadas fueron realmente altas si comparamos con las reportadas en este sistema por otros autores (7), sin embargo, a menores concentraciones, las sulfas no tienen ningún efecto. El experimento se planeó por

ello hasta la concentración aproximada de $4 \times 10^{-3} M$ (1000 $\mu g/ml$), pero ante los resultados obtenidos con el sulfatiazol, donde la frecuencia de aberraciones se eleva considerablemente al igual que la toxicidad, decidimos probar dos concentraciones más en todas las sulfas que fueron aproximadamente de $2 \times 10^{-2} M$ y $4 \times 10^{-2} M$ (5000 $\mu g/ml$ y 10,000 $\mu g/ml$) con el objeto de encontrar el rango en el cual se observara una completa toxicidad, cosa que ocurrió con sulfatiazol, más no con sulfadiazina y sulfamerazina.

Un aspecto muy importante también, lo constituyó el hecho de encontrar cristalización a partir de 1000 $\mu g/ml$ en las tres sulfas, lo cual atribuimos fundamentalmente a la elevada concentración y posiblemente a cambios de pH que aunque no fueron muy aparentes, deben haber ocurrido. Tal cristalización hace pensar, que en estas concentraciones obviamente, no toda la sulfa penetró a la célula, por lo que las frecuencias observadas son producidas realmente por una concentración menor a la que se agregó a los cultivos.

ALTERNATIVAS

Haciendo un análisis a los resultados obtenidos en este sistema y tomando en cuenta las características del mismo, proponemos las siguientes sugerencias:

1.- Ya que es importante la sincronización de las células, sería interesante trabajar con un cultivo sincronizado dando la droga en diferentes momentos del ciclo celular, para detectar cual ó cuales de las etapas son más sensibles al compuesto. - que se esté probando y así mismo, poder determinar si el daño - producido por la droga en un momento dado trae como consecuencia la presencia de un tipo de aberración preferencial.

2.- Debido a que no se sabe el destino de las células - con una u otra aberración, se sugiere tratar las células: a) por un lapso de 2 horas, al cabo de las cuales se lavan y dejan durante 24 horas, fijándolas al término, ó b) tratarlas 24 horas con el compuesto, fijar un grupo y otro dejarlo 24 horas más y después fijarlas.

3.- En el análisis del sistema, se recomienda tomar en cuenta no solo el tipo de aberración producido, sino también la cantidad de veces en que esta se encuentre.

4.- En vista de que las células utilizadas en este trabajo (CHO) no tienen enzimas microsomales, los compuestos probables actuaron sin ser metabolizados.

Sin embargo, es posible agregar a estas células la fracción S9 microsomal de hígado de mamíferos, como la rata por ejemplo y así observar el efecto de los compuestos transformados, o bien agregar orinas de animales tratados o de humanos expuestos a fármacos ya sea a través de tratamientos médicos ó por exposición laboral.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Eigsti, O.J. A comparative study of the effects of sulfanilamide and colchicine upon mitosis of the generative cell in the pollen tube of Tradescantia occidentalis (Britton) Smyth. Genetic 27: 141-142 (1942).
- 2) Peters, J.J. Cytological effects of sulfanilamide on Allium cepa. Bot. Gaz. 107: 390-392 (1946).
- 3) Fuller, T.H. Effects of several sulfa-compounds on nuclear and cell division. Botanical Gazette. 109: 177-183 (1947).
- 4) Bignami, M., Morfugo, G., Pagliani, R., Carere, A., Conti, G. and Giuseppe, G. Non-Disjunction and crossing-over induced by pharmaceutical drugs in Aspergillus nidulans. 26: 159-170 (1974).
- 5) Aulicino, F., Torraca, A.M., Morfugo, G., Achtner, W.M., Ricciardi, E.G. Crossing-over e Non-disgiunzione indotti da Sulfanilamide in Aspergillus nidulans
- 6) Parry, J.M. The detection of chromosome non-disjunction in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Mut. Res. 53: 248 (1978).

- 7) Coutiño, R.R. Analysis of anaphase in cell culture: An adequate test system for the distinction between compounds which selectively alter the chromosome structure or the mitotic apparatus. *Environmental Health Perspectives*. 31: 131-136 (1979).
- 8) Goth, A. *Farmacología Médica, Principios y conceptos*. 6a. ed. Edit. Interamericana. pp. 554-564. México 1973.
- 9) Goodman, L.S. and Gilman, A. *Bases farmacológicas de la terapéutica*. 4a. ed. Nueva Editorial Interamericana. 1978.
- 10) Clarke, E.G.C. *Isolation and identification of drugs*. The Pharmaceutical Press. pp. 547-557. London.
- 11) Marsland, D. and Landau, J.V. The mechanism of cytokinesis: temperature-pressure studies on the cortical gel system in various marine eggs. *J. Exp. Zool.* 125: 507-539 (1960).
- 12) Hiramoto, Y. The mechanics and mechanism of cleavage in the sea urchin eggs. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 22: 311-327 (1968).
- 13) Tilney, L.G. and Marsland, D. A fine structural analysis of cleavage induction and furrowing in the eggs of Arabicia punctualata. *J. Cell. Biol.* 42: 170-184 (1969).

- 14) Schroeder, T.E. Actin and dividing cells: contractile ring filaments bind heavy meromyosin. Proc. Nat. Acad. Sci. 70: 1688-1692 (1973).
- 15) Fujiwara, K. and Pollard, T.D. Fluorescent antibody localization of miosin in the cytoplasm, cleavage furrow and mitotic spindle of human cells. J. Cell. Biol. 71: 848-875 (1976).
- 16) Brinkley, B.R. and Stubblefield, E. Ultrastructure and interaction of the kinetochore and centriole in mitosis and meiosis. Advances in Cell Biology, Vol. 1 pp. 119-185 (1970).
- 17) Jokelainen, P.T. The ultrastructure and spatial organization of the metaphase kinetochore in mitotic rat cells. J. Ult. Res. 19-44 (1967).
- 18) Nicklas, R.B. and Stachly, C.A. Chromosome manipulation. I. The mechanisms of chromosome attachment to the spindle. Chromosoma 21: 1-6 (1967).
- 19) Nicklas, R.B., Brinkley, B.R., Pepper, D.A., Kubai, D.F. and Rickards, G.K. Electron microscopy of spermatocytes previously studied in life: methods and some observations on micromanipulated chromosomes. J. Cell. Sci. 35: 87-104 (1979).

- 20) Mazia, D. Mitosis and physiology of cell division. J. Brachet and A.E. Mirsky (Ed). The Cell. Academic Press. Vol. 3 pp. 77-412 New York 1961.
- 21) Du Praw, E.J. Cell and Molecular Biology. Academic Press N.Y. 1968.
- 22) Behnke, O. Incomplete microtubules observed in mammalian blood platelets during microtubule polymerization. J. Cell Biol. 34: 697-701 (1967).
- 23) Pickett-Heaps, J.D. The evolution of the mitotic apparatus: an attempt at comparative cytology in dividing plant cells. Cytobios. 1: 257-280 (1969).
- 24) Gaskin, E., Cantor, C.R., Shelanski, M.L. Turbidimetric studies of the in vitro assembly and disassembly of porcine neurotubules. J. Mol. Biol. 89: 737-738 (1974).
- 25) The Proteins III. Neurath H. and Hill R. (ed) Academic Press. New York pags. 239-381 (1977).

- 26) Bryan, J. Some factors involved in the control of microtubule assembly in sea urchins. *Am. Zool.* 15: 649-660 (1975).
- 27) Forer, A. Chromosome movements during cell division. Lina de Faria (Ed.) *Handbook of Molecular Cytology*. North Holland, Amsterdam pp. 553-604 (1969).
- 28) Brinkley, B.R. and Cartwright, J. Ultrastructural analysis of mitotic spindle elongation in mammalian cells in vitro: direct microtubule counts. *J. Cell Biol.* 50: 416-431.
- 29) McIntosh, J.R. and Landis, S.C. The distribution of spindle microtubules during mitosis in cultured human cells. *J. Cell Biol.* 49: 468-497.
- 30) Inoué, S. and Sato, H. Cell motility by labile association of molecules. The nature of mitotic spindle fibers and their role in chromosome movements. *J. Gen. Physiol.* 50: Suppl. 259-288 (1967).
- 31) Salomon, E.D. Pressure induced depolymerization of spindle MT 1.- Changes in birefringence and spindle lengths. *J. Cell Biol.* 65: 603-614 (1975).

- 32) Brinkley, B.R., Stubblefield, E. and Hsu, T.C. The effects of colcemid inhibition and reversal on the fine structure of the mitotic apparatus of Chinese hamster cells in vitro. J. Ult. Res. 19: 1-18 (1967).
- 33) Margolis, R.L. and Wilson, L. Addition of colchicine tubuline complex to MT ends: the mechanism of substoichiometric colchicine poisoning. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74: 3446-3470 (1977).
- 34) Marcum, J.M., Dedman, J.R., Brinkley, B.R. and Means, A.R. Control of MT assembly-disassembly by calcium dependant regulator protein. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75: 3771-3775 (1978).
- 35) Welsh, M.J., Dedman, J.R., Brinkley, B.R. and Means, A.R. Calcium dependent regulator protein: localization in mitotic apparatus of eucaryotic cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75: 1867-1871 (1978).
- 36) Welsh, M.J., Dedman, J.R., Brinkley, B.R. and Means, A.R. Tubulin and Calmodulin. Effects on MT and Microfilament inhibitors on localization in the mitotic apparatus. J. Cell Biol. 81: 624-634 (1979).

- 37) Fuller, G.M., Brinkley, B.R. and Boghter, J.M.
Immunofluorescence of mitotic spindles by using monospecific antibody against bovine brain tubulin. *Science* 187: 948-950 (1975).
- 38) Cande, W.Z., Lazarides, E. and McIntosh, J.R. A comparison of the distribution of actin and tubulin in the mammalian mitotic spindle as seen by indirect immunofluorescence. *J. Cell Biol.* 72: 552-567 (1977).
- 39) Fujiwara, K. and Pollard T.D. Fluorescent antibody localization of myosin in the cytoplasm, cleavage furrow and mitotic spindle of human cells. *J. Cell Biol.* 71: 848-875 (1976).
- 40) Ross, A. The substructure of centriole subfibers. *J. Ult. Res.* 23: 537-539 (1968).
- 41) Randall, J. and Disbrey, C. Evidence for the presence of DNA at basal body sites in Tetrahymena pyriformis. *Proc. Roy. Soc. B.* 162: 473-491 (1965).

- 42) Smith-Sonneborn, J. and Plant, W. Evidence for the presence of DNA in the pellicle of Paramecium. J. Cell Sci. 2, 225-234 (1967).
- 43) Hartman, H., Puma, J.D. and Gurney, T.J. Evidence for the association of RNA with the ciliary basal bodies of Tetrahymena. J. Cell. Sci. 16: 241-259 (1974).
- 44) Heiderman, S.R., Sander, G. and Kirschner, M.W. Evidence for a functional role of RNA in centrioles. Cell 10: 337-350 (1977).
- 45) Robbin, E., Jentzsch, G. and Micali, A. The centriole cycle in synchronized HeLa cells. J. Cell. Biol. 36: 329-339 (1968).
- 46) Phillips, S.G. and Rattner, J.B. Dependence of centriole formation on protein synthesis. J. Cell. Biol. 70: 9-19 (1976).
- 47) Fabricant, J.D. Genetic studies on spontaneous abortion. Contemporary Ob/Gyn 11: 73 (1978).

- 48) Kilhman, B.A. Root tips of Vicia faba for the estudy of the induction of chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 31: 401-402 (1975)
- 49) Sen Pathak, Manley, McGill and I.C., Hsu. Actinomycin D effects in mitosis and chromosomes: Sticky chromatids and localized lesions. *Chromosoma (Berl)* 50: 79-80 (1975).
- 50) Microtubules. Dustin Pierre (ed) Spring Verlang. Berlin Heidelberg. New York pp 380 (1978)
- 51) Kawamura, R. and Katsuma D. A cytochemical of the sulphhydryl groups of sea urchin egg during the first cleavage. *J. Biophys. Biochem. Cyto.* 46: 615 (1958)
- 52) Kuriyama, R., Sakai, H. Role of tubulin -SH groups in polymerization to microtubules.
Functional -SH groups in tubulin for polymerization. *J. Biochem* 76: 651-654 (1974).
- 53) Luduena, R.F., and Wilson L. Cross-linking of tubulin evidence for the heterodimer model. *J. Cell Biol.* 63: 202 a. (1974)

- 54) Microtubules. Dustin Pierre (ed) Spring Verlog. Berlin Heidelberg. New York pp 44-70 (197A)
- 55) Bensech. K. G., Malawista, S.E., Microtubule crystals: a new biophysical phenomenon induced by Vinca alkaloids. Nature (London) 218: 1176-1177 (1968)
- 56) Microtubules. Dustin Pierre (ed) Spring Verlog. Berlin Heidelberg. New York pp. pp. 167-214 (1978)
- 57) Mc. Cann J. Choi E, Yamasaki E and Ames. B.N. Detection y Carcinogens as Mutagens in the Salmonella/ Microsome test: Assay of 300 chemicals. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72: 12, pp. 5135-5139 (1975)