

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



MICRONUCLEOS (MN) E INTERCAMBIO DE CROMATIDES
HERMANAS (ICH) COMO PRUEBAS INDICADORAS
DE LA ACCION MUTAGENICA DE DIAZEPAM Y
DEL DIFENILHIDANTOINATO DE SODIO.

TESIS

QUE CON OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN GENETICA

PRESENTA:

BIOL. GRACIELA GUADALUPE VALENCIANO CEDILLO

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1995

TM
QH465

.C5
V3

C.1

TM

QH465

.C5

V3

C.1

TM

QH465

.C5

V3

C.1

TM

QH465

.C5

V3

C.1

TM

QH465

.C5

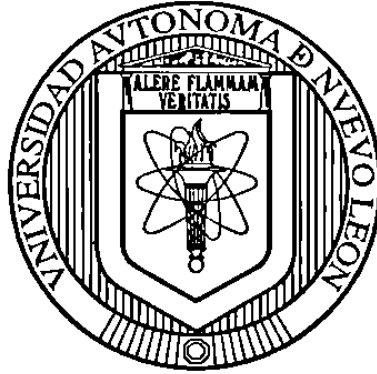
V3

C.1



1080072460

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**MICRONÚCLEOS (MN) E INTERCAMBIO DE CROMATIDES HERMANAS
(ICH) COMO PRUEBAS INDICADORAS DE LA ACCIÓN MUTAGÉNICA DE
DIAZEPAM Y DEL DIFENILHIDANTOINATO DE SODIO.**

**TÉSIS
QUE CON OPCIÓN AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN GENÉTICA
PRESENTA**

BIÓL. GRACIELA GUADALUPE VALENCIANO CEDILLO

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1995

TM
QH465
.C5
V3



(72460)



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

MICRONUCLEOS (MN) E INTERCAMBIO DE CROMATIDES HERMANAS (ICH) COMO PRUEBAS INDICADORAS DE LA ACCION MUTAGENICA DEL DIAZEPAM Y DEL DIFENILHIDANTOINATO DE SODIO.

TESIS

QUE CON OPCION AL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN GENETICA

PRESENTA

BIOL. GRACIELA GUADALUPE VALENCIANO CEDILLO

COMISION DE TESIS :

PRESIDENTE : _____
M.C. CARLOS H. LEAL GARZA

SECRETARIO : _____
M.C. ELVA IRENE CORTES GUTIERREZ

VOCAL : _____
DR. RAUL GARZA CHAPA.

MONTERREY N.L.

MAYO DE 1995.

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

GRACIELA CEDILLO DE VALENCIANO

CARLOS VALENCIANO SOLIS

Gracias por su ejemplo.

A MI ESPOSO:

ING. JESUS RODRIGUEZ FEMAT

Por tu confianza, apoyo y por tu amor.

A MIS HIJOS:

ERICKA GRACIELA RODRIGUEZ VALENCIANO

JESUS EDUARDO RODRIGUEZ VALENCIANO

Por venir a colmar de alegrías a mi vida.

Gracias a Dios que me mando a mis hijos

como dos regalos, y sin merecerlos.

A MIS HERMANOS:

FRANCISCO JAVIER VALENCIANO CEDILLO

CARLOS VALENCIANO CEDILLO

LAURA MARINA VALENCIANO CEDILLO

ARTURO VALENCIANO CEDILLO

JUAN ALBERTO VALENCIANO CEDILLO

NORAYMA ELIZABETH VALENCIANO CEDILLO

Gracias por su confianza.

AGRADECIMIENTOS

PARA MIS GRANDES MAESTROS : M.C. CARLOS H. LEAL GARZA que con su experiencia en Citogenética fue guiándome en las diferentes etapas de realización de esta investigación, brindándome su valioso apoyo, gracias por crear un estupendo ambiente de trabajo, por ser un líder que con su alegría el trabajo siempre lo torno agradable, por ser un excelente ser humano, GRACIAS.

Dr. RAUL GARZA CHAPA, Por sus consejos, por su ejemplo de trabajo, dedicación y por la revisión de este trabajo de tesis.

PARA TODOS MIS MAESTROS.

Para mis compañeros y amigos especialmente para: **M.C. ELVA IRENE CORTEZ GUTIERREZ** que en una forma desinteresada me ayudo a terminar este trabajo, con su amistad y empuje me estimuló a continuar en los momentos de desanimo, por su honestidad y por su manera de ser en general, gracias.

Q.C.B MARIA DE LOS ANGELES ROJAS por su valiosa cooperación en la técnica de tinción de micronúcleos y por su agradable simpatía.

L.C.B. SUSANA BACA SEVILLA por su apoyo en el manejo de mamíferos y por su comprensión.

M.C. RICARDO CERDA FLORES Por su valiosa cooperación en las pruebas estadísticas.

M.C.H. ANTONIO LUNA DE LA ROSA. Por su valiosa cooperación en la elaboración de las fotografías aquí incluidas.

INGENIERO ALFONSO RODRIGUEZ DEL ANGEL (Director de la preparatoria #2) por su apoyo .

M.C. ZACARIAS JIMENEZ, M.C. JOSE LUIS RAMIREZ, M.C. ADRIANA ZAMPAYO, Q.C.B. ANTONIO NARRO, BIOL. ANTONIO REYES, Q.B.P. GUILLERMO GONZALEZ a todos y cada uno de los que integran el personal del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del I.M.S.S. Por su compañerismo y por su apoyo, gracias.

Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste del I.M.S.S. Monterrey N.L., a la Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L., a la Preparatoria No. 2 de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-BrdU.....	5-Bromodeoxiuridina
DS.....	Desviación estándar
FPG.....	Colorante fluorescente mas giemsa
ICH.....	Intercambio de Cromátides Hermanas
DFH.....	Difenilhidantoinato de Sodio
n.....	Tamaño de la población
U.V	Luz ultravioleta
r.p.m.....	Revoluciones por minuto
ADN.....	Acido desoxiribonucléico
MN.....	Micronúcleos
PM.....	Prueba de micronúcleos
MMC.....	Mitomicina C
mg/ml.....	Miligramos por mililitros
NaCl.....	Cloruro de Sodio
t.....	"t" de student
M.....	Machos
H.....	Hembras
Er.....	Eritrocitos
EPC.....	Eritrocitos policromáticos

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

- CUADRO # 1 Intercambio de cromátides hermanas (ICH) por célula de médula ósea de ratones tratados con tres dosis de difenilhidantoinato de sodio y de los grupos control, para ambos sexos.
- CUADRO # 2 Intercambio de cromátides hermanas (ICH) por célula de médula ósea de ratones tratados con tres dosis de diazepam y los grupos control, para ambos sexos.
- CUADRO # 3 Frecuencia de micronúcleos (MN) por célula de médula ósea de ratones tratados con tres dosis de diazepam y de los grupos control, para ambos sexos.
- CUADRO # 4 Frecuencia de eritrocitos (Er), eritrocitos policromáticos (EPC) y micronúcleos (MN) en médula ósea de ratones tratados con tres dosis de diazepam y de los grupos control, para ambos sexos.
- CUADRO # 5 Comparación de los resultados obtenidos en las pruebas de micronúcleos (MN) e intercambio de cromátides hermanas (ICH) en ratones tratados con diazepam.
- FIGURA # 1 Intercambio de cromátides hermanas (ICH) en metafases obtenidas de médula ósea de ratón.
- FIGURA # 2 Preparación directa de médula ósea de ratón mostrando los micronúcleos en eritrocitos policromáticos teñidos con eosina-azul de metileno.

I N D I C E

	PAG.
RESUMEN.....	1
I.- INTRODUCCION	4
II.- ANTECEDENTES	8
A.- Intercambio de Cromátides Hermanas.....	8
B.- Micronúcleos.....	11
C.- Difenilhidantoinato de Sodio.....	14
D.- Diazepam.....	17
III.- MATERIAL Y METODOS	19
A.- PRUEBA DE INTERCAMBIO DE CROMATIDES HERMANAS (ICH)	
a) Administración de la 5-Bromodeoxiuridina....	21
b) Administración de los compuestos a evaluar (DFH y DIAZEPAM).....	21
c) Aplicación de la Colchicina.....	22
d) Obtención de células metafásicas a partir de médula ósea.....	22
e) Tinción diferencial de las cromátides hermanas.....	23
f) Criterio experimental para la cuantificación de ICH.....	24
g) Análisis estadístico.....	25
B.- PRUEBA DE MICRONUCLEOS	
a) Administración de los compuestos.....	25
b) Obtención de médula ósea.....	26
c) Preparación de laminillas.....	27
d) Tinción de la médula ósea.....	27

e) Análisis de laminillas.....	28
f) Análisis estadístico.....	28

IV.- RESULTADOS

A.- INTERCAMBIO DE CROMATIDES HERMANAS

a) Comparación de las frecuencias de ICH en ratones tratados con distintas dosis de DFH....	29
b) Efecto del sexo sobre la frecuencia de ICH en ratones tratados con distintas dosis de difenilhidantoinato de sodio.....	30
c) Comparación de las frecuencias de ICH en ratones tratados con distintas dosis de diazepam y los controles positivo y negativo.....	31
d) Efecto del sexo sobre la frecuencia de ICH en ratones tratados con distintas dosis de diazepam.....	32

B.- PRUEBA DE MICRONUCLEOS

a) Comparación de las frecuencias de micronúcleos en ratones tratados con distintas dosis de diazepam, con sus respectivos controles positivo y negativo.	33
b) Efecto del sexo sobre la frecuencia de micronúcleos en ratones tratados con distintas dosis de diazepam.....	34
c) Eritropoyesis en ratones tratados con distintas dosis de diazepam y en controles positivo y negativo.....	36
d) Efecto del sexo en la eritropoyesis de ratones tratados con diferentes dosis de diazepam.....	36

C.- SENSIBILIDAD DE LA PRUEBA DE MICRONUCLEOS (MN) Y LA TECNICA DE INTERCAMBIO DE CROMATIDES HERMANAS (ICH) EN RATONES TRATADOS CON TRES DOSIS DE DIAZEPAM	38
--	----

V.- DISCUSION

A.- PRUEBA DE INTERCAMBIO DE CROMATIDES HERMANAS EN RATONES TRATADOS CON DIFENILHIDANTOINATO DE SODIO.

- a) Frecuencia de ICH en ratones tratados con distintas dosis de DFH..... 40
- b) Efecto del sexo sobre la frecuencia de ICH en ratones tratados con distintas dosis de difenilhidantoinato de sodio..... 41

B.- PRUEBA DE MICRONUCLEOS

- a) Frecuencias de micronúcleos en ratones tratados con distintas dosis de diazepam con sus respectivos controles positivo y negativo..... 41

C.- COMPARACION DE LAS DOS TECNICAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO (ICH) Y (PM) 46

VI.- CONCLUSIONES 49

VII.- LITERATURA CITADA 50

VIII.- APENDICE 58

RESUMEN

Un número considerable de agentes químicos a los que está expuesta la población son mutagénicos, ellos podrían estar determinando en gran medida la aparición de anormalidades genéticas. Por lo tanto es necesario la identificación de aquellos compuestos que lo sean y su consiguiente eliminación.

La importancia del presente trabajo estriba en la evaluación de la posible actividad mutagénica de dos agentes químicos anticonvulsivantes, difenilhidantoinato de sodio DFH y el Diazepam, los cuales son fármacos ampliamente difundidos en la población. Para evaluar la actividad mutagénica se utilizaron dos pruebas citogenéticas: Prueba de Intercambios entre Cromátidas Hermanas (ICH) y Prueba de Micronúcleos (PM).

Para el análisis del efecto del DFH y el Diazepam por medio de las pruebas citogenéticas arriba mencionadas en sistemas *in vivo*, se utilizó un gran total de 90 ratones de la línea Balb-C entre 8 a 12 semanas de edad. 30 de estos ratones (15 machos y 15 hembras) fueron divididos en 5 grupos para cada sexo, 3 grupos fueron inyectados intraperitonealmente con una dosis única de DFH a concentraciones de 1, 10 y 20 mg/kg. Los dos grupos restantes sirvieron como controles negativo (inyectados con suero fisiológico) y positivo (inyectados con Mitomicina-C a una concentración de 0.5 mg/kg). Otros 30 ratones fueron agrupados de la misma manera pero aplicándoles en dosis única 0.1, 0.2 y 0.4

mg/kg de Diazepam, y los grupos control negativo y positivo recibieron suero fisiológico y mitomicina C respectivamente. Por cada ratón, se analizarón de 25 a 50 metafases obtenidas de la médula ósea usando la técnica de tinción diferencial para intercambios de cromátides hermanas. Los valores promedio de ICH para cada grupo de tratamiento y de los controles negativo y positivo fueron comparados entre si mediante la prueba estadística de ANOVA ($p < 0.05$). El análisis de la frecuencia de ICH en ratones tratados con DFH mostró un incremento significativo a concentraciones de 10 (5.41 ± 1.71) y 20 mg/kg (5.75 ± 2.23) al compararlo con el control negativo (4.26 ± 1.29). La frecuencia de ICH en ratones tratados con Diazepam mostró un incremento significativo en las concentraciones 0.2 y 0.4 mg/kg (4.06 ± 1.79 y 4.43 ± 1.62 respectivamente) al ser comparados con el control negativo (3.57 ± 1.50). De acuerdo al sexo, el análisis de ICH en ratones tratados con DFH y Diazepam mostró una correlación positiva en los ratones machos, es decir que al aumentar las concentraciones de DFH y Diazepam se incrementó la frecuencia de ICH. Para la prueba de micronúcleos los 30 ratones restantes se agruparon de la misma forma que los experimentos anteriores. Por cada ratón, fueron analizados 2000 eritrocitos policromaticos de médula ósea teñidos con Wright-Giemsa. Un incremento significativo χ^2 ($p < 0.05$) en el porcentaje de eritrocitos policromaticos micronúcleados fué observado en ratones tratados

con Diazepam a 0.1 (2.06%), 0.2 (2.03%) y 0.4 mg/kg (2.18%) al compararlo con el control negativo (1.02%). De acuerdo al sexo, el efecto del Diazepam sobre la frecuencia de micronúcleos mostró la misma susceptibilidad entre machos (2.12%) y hembras (1.88%). En conclusión usando las pruebas de ICH y PM fue posible detectar efectos mutagénicos del DFH y el Diazepam; Sin embargo es importante continuar con este tipo de estudios para poder determinar el posible potencial mutagénico de estos fármacos sobre los humanos.

I.-INTRODUCCION

A partir del hallazgo de que algunos compuestos químicos producidos y usados por el hombre, resultaron ser mutagénicos en experimentos con sistemas biológicos subhumanos, surge una nueva área en la Toxicología, llamada comunmente Toxicología Genética o Genética Toxicológica, esto debido a la posibilidad de que tales compuestos pudieran representar un riesgo potencial para la producción de mutaciones génicas o anormalidades cromosómicas en células somáticas en las generaciones contemporáneas, o en futuras generaciones por la producción de mutaciones en células gaméticas.

Siendo más de 50,000 los compuestos producidos y difundidos por la industria, además de los que año tras año se introducen, se hace necesario el establecimiento de pruebas rápidas, sencillas y eficaces para identificar aquellos compuestos que tengan la capacidad de inducir mutaciones, para poder lograr la prevención de los posibles efectos adversos sobre la población humana.

Dichas alteraciones o mutaciones pueden resultar de la acción directa de los agentes químicos sobre el material genético o sobre componentes celulares funcionalmente ligados a él, como son los organelos que participan en la división celular (centríolos y microtúbulos), las proteínas de la cromatina o las enzimas que

contribuyen a la duplicación o reparación del ADN.

Para estimar el riesgo que un compuesto dado representa para el hombre, él mismo sería el sistema biológico ideal para determinar y cuantificar dicho riesgo; sin embargo, los requisitos éticos y económicos, así como la duración de los estudios, dificultan la investigación en los seres humanos. Por esto mismo, los experimentos en sistemas biológicos no humanos resultan valiosos en la evaluación de los efectos genéticos de los agentes químicos por su capacidad de reproducción, facilidad de realización, relativa economía y corta duración.

Dentro de los sistemas biológicos no humanos más comúnmente utilizados para identificar mutágenos, se encuentran los virus, bacterias, hongos, plantas, insectos, cultivo de células de mamíferos, y mamíferos en general, entre estos los ratones son una de las especies más utilizadas en los cuales se pueden identificar alteraciones a nivel de mutación génica, rearrreglos cromosómicos tanto numéricos como estructurales, además de la transmisión de mutaciones a los descendientes.

Algunas técnicas citogenéticas como la prueba de Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) Perry and Wolff (1974), y la Prueba de Micronúcleos (PM) Schmid (1975), son muy valiosas para la

detección y la cuantificación de mutagenicidad. El presente trabajo está enfocado hacia la evaluación mutagénica, para dos fármacos anticonvulsivantes de uso común; Difenilhidantoinato de sodio (DFH) y el Diazepam, utilizando dichas técnicas citogenéticas.

HIPOTESIS

En base a la información anterior se plantearon las siguientes hipótesis:

- 1.- Debido a su estrecha relación con eventos mutacionales, los niveles de Intercambios de Cromátides Hermanas (ICH) y los micronúcleos (MN), serán más elevados en los ratones tratados con diazepam y difenilhidantoinato de sodio (DFH), que en los ratones del grupo control negativo.
- 2.- La susceptibilidad de los ratones a la actividad mutagénica del diazepam y difenilhidantoinato de sodio varía con el sexo de los mismos.

OBJETIVOS

Para apoyar o refutar estas hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.- Detectar la presencia y frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos jóvenes de médula ósea de ratones tratados y sus respectivos grupos control mediante la tinción

con eosina-azul de metileno.

- 2.- Determinar la frecuencia de Intercambios de Cromátides Hermanas (ICH) en metafases obtenidas de médula ósea de ratones tratados y grupo control, mediante la prueba de tinción diferencial (ICH).
- 3.- Comparar las frecuencias de micronúcleos e intercambio de cromátides hermanas en ratones tratados con los del grupo control mediante pruebas estadísticas.
- 4.- Relacionar estos parámetros citogenéticos con el sexo y la dosis aplicada con la finalidad de observar si existen diferencias con respecto a una población testigo.
- 5.- Comparar la sensibilidad de las pruebas de MN e ICH para detectar actividad mutagénica.

II.- ANTECEDENTES

El estudio e identificación precisa de los cromosomas en general dió paso a una nueva rama específica de la Genética, la Citogenética que ha sido aplicada para la caracterización de cromosomopatías y en la detección de daños cromosómicos inducidos por diversos agentes químicos, entre estos los medicamentos antiepilépticos. Recientemente se han desarrollado diversas técnicas citogenéticas que permiten analizar con más sensibilidad la actividad mutagénica de algunos compuestos químicos, éstas son la prueba de Intercambio entre Cromátides Hermanas (ICH) y la Prueba de Micronúcleos (PM).

A.- INTERCAMBIO DE CROMATIDES HERMANAS

Los Intercambios entre Cromátides Hermanas (ICH) fueron primeramente descritos por Taylor (1957), al trabajar con cultivos de células vegetales marcadas con timidina tritiada y utilizando técnicas autorradiográficas, él observó que entre las cromátides hermanas ocurrían intercambios recíprocos de segmentos cromosómicos, pero con este tipo de técnicas el análisis detallado era muy limitado, ya que el poder de resolución de ésta técnica no era el adecuado. Zakharov y Egolina (1972) encontraron que si a las células animales en cultivo se les permitía duplicar su ADN dos veces en presencia de la base análoga 5-bromodeoxiuridina

(BrdU) los cromosomas tendrían una cromátide unifilariamente sustituida con BrdU y su cromátide hermana estaría doblemente sustituida, esto le confiere a las cromátides cierta característica ya que mediante una tinción con el colorante Giemsa podemos diferenciar las cromátides por su tinción, una se tiñe débilmente y la otra con más intensidad. Posteriormente Latt (1973), obtuvo una diferenciación más contrastante en cromosomas teñidos con el fluorocromo Hoechst 33258. Sin embargo, la combinación de ambas técnicas llamada FPG (colorante Fluorescente mas Giemsa realizada por Perry y Wolff en 1974, permitió la detección de los ICH con una gran resolución, además de que no se requería un microscopio de fluorescencia, ni microfotografías para su observación.

La prueba de intercambios entre cromátides hermanas ha sido frecuentemente utilizada en sistemas *in vitro*, pero recientemente se ha logrado utilizar en algunos mamíferos en sistemas *in vivo*.

Murty y Col. (1977) concluyeron que los ICH constituyen el sistema de prueba más sensible para determinar los efectos de mutágenos y/o carcinógenos, fundamentándose en que las concentraciones de las mismas requeridas para inducir ICH son menores que las necesarias para inducir aberraciones cromosómicas. El alto poder de resolución de este método abre un nuevo campo de

investigación en mutagenicidad, basado en que algunas sustancias sospechosas de ser mutagénicas, podrían elevar el número de ICH aún a concentraciones que no eran activas en la producción de anomalías cromosómicas detectadas por otras pruebas.

Se ha establecido que el número promedio de ICH puede variar debido a distintos factores tales como los medicamentos, como el busulfan, ciclofosfamida, mitomicina C, melphalan, Lamberts (1978); bebidas alcohólicas, Butler (1981); síndrome de Bloom, Latt (1981); algunos hábitos personales como el fumar, Parodi (1982); el consumo de té, café, cocoa, Renner (1982). También se han encontrado frecuencias elevadas de ICH en ciertas enfermedades virales como herpes, hepatitis e influenza, Crossen (1982); enfermedades en las que se presenta un defecto en el sistema de reparación del ADN y son personas predispuestas a procesos cancerosos como leucemias, linfomas, cáncer mamario y melanomas cutáneas, Murty (1982), Anemia de fanconi y ataxia telangiectasia, Latt 1981 y Galloway (1985). A factores como la edad Das B (1985). Exposición a ciertos metales y sustancias como el óxido de etileno Soper (1984), al plomo, Leal-Garza y col.(1986), el antifertilizante Gosipol, Leal-Garza y col (1990) , el monómero cloro-vinilo, Fucié A. y col (1992), , pueden también aumentar la frecuencia de los ICH en distintos sistemas biológicos de prueba.

El método de BrdU-Giemsa para la detección de ICH, permite también estudiar la cinética del ciclo celular en cultivos de linfocitos; las metafases en primera división no tienen tinción diferencial, mientras que las células cultivadas por dos ciclos completos en presencia de BrdU muestran una tinción diferencial, es decir los cromosomas presentan una cromátide pálida y la otra oscura y las metafases en tercera división muestran un 75% de sus cromátides pálidas (Figura 2).

B.- PRUEBA DE MICRONUCLEOS

El origen de la llamada "Prueba de micronúcleos" (PM), se inició por los trabajos de Boller y Schmid (1970), quienes realizando estudios hematológicos observaron que en médula ósea de hamsters chinos tratados con el mutágeno Trenimon, la anomalía nuclear más frecuente, fácil de contar y que mostró un alto grado de correlación con aberraciones cromosómicas, fue la aparición de micronúcleos en eritrocitos jóvenes (eritrocitos policromáticos) después de la expulsión del núcleo principal. Otros estudios realizados por Matter y Schmid (1971), en varias especies de mamíferos, incluyendo un primate y utilizando el mismo mutágeno demostraron la simplicidad y aplicabilidad de esta técnica, haciendo hincapié que el uso de esta prueba puede ser una herramienta muy valiosa en experimentos de mutagenicidad.

., Schmid (1971), Miller (1973), Schmid (1975), Matter (1975),

concluyeron que los micronúcleos son cuerpos de inclusión citoplasmática, formados por fragmentos cromatínicos y pocas veces de cromosomas completos rezagados y que su presencia en las células refleja la presencia de aberraciones cromosómicas que ocurrieron durante la mitosis celular.

Matter y Schmid (1971), Headle (1973), y Schmid (1975), realizaron una descripción detallada de la metodología de la PM, basándose en los siguientes principios y observaciones; las fracturas en los cromosomas originan fragmentos acéntricos los cuales al no tener sitio de unión con el huso acromático, no son llevados hacia los polos opuestos de la célula, donde debería formar parte del núcleo de alguna de las dos células hijas resultantes de la división celular, si no que son incluidos en las células hijas, formando uno o varios núcleos secundarios, mucho más pequeños que el núcleo principal, lo que motivó a denominarlos Micronúcleos (Schmid, 1975).

Estos micronúcleos son fácilmente detectados por su tinción diferencial, ya que toman una tonalidad azul intensa en eritrocitos jóvenes derivados de médula ósea, (Figura 1). La prueba de micronúcleos, es un método de análisis citogenético que puede utilizarse tanto *in vivo* como *in vitro*. Fue ideada para la identificación de agentes químicos con efectos clastogénicos, es decir, a aquellos agentes capaces de producir fracturas a los

cromosomas. Diversos trabajos muestran lo útil de la prueba y su importancia dada su simplicidad, fácil conteo y amplio espectro de aplicabilidad.

Weber y Col (1975), describieron los efectos producidos por algunos agentes alquilantes, como la trietilenmelamina y trimetilfosfato, en donde observaron que éstos producían una frecuencia elevada de aberraciones cromosómicas utilizando para sus experimentos células de médula ósea de ratones. Matter y Schmid (1976), realizaron experimentos utilizando compuestos inductores de aberraciones cromosómicas, como la ciclofosfamida, mitomicina C, colchicina, etilmetano-sulfonato y ciertas drogas citotóxicas como las utilizadas en quimioterapia contra el cáncer, y mostraron que la frecuencia de micronúcleos aumentaba con estas drogas.

Jenssen y Ramel (1980), con el objeto de evaluar la utilidad de la PM como un ensayo rápido para la detección de carcinógenos realizaron una revisión de la literatura y encontraron un total de 143 agentes químicos que habían sido probados con ésta técnica, y se demostró que la mayoría de ellos producían un aumento en la frecuencia de los micronúcleos, cuando eran aplicados a los sistemas de prueba tanto *in vivo* como *in vitro*.

Se ha establecido que el número de micronúcleos en

eritrocitos policromáticos jóvenes en los humanos también puede variar debido no solo a la inducción por agentes químicos sino también a otros factores: como en algunas enfermedades como la anemia perniciosa, Jensen M.K. (1977). hábitos personales, como el fumar y el consumo de bebidas alcohólicas e infecciones virales, Stich y Rosin (1984). También es aumentado el número de MN en las enfermedades hereditarias tales como el síndrome de Bloom, Rosin y German (1985)., en ciertas dietas alimenticias, Picker y Fox (1986)., la edad de los individuos, Chakrabarti and Duttakk (1988)., en las terapias antileucémicas (quimio y radioterapia) Migliore L. y col.(1991), y también puede variar el número de MN por las radiaciones producidas por aparatos de uso común actualmente como el horno de microondas, Garaj-Vrhovac y Horvat (1992).

En base a la información anterior, se puede concluir que el análisis de micronúcleos ofrece un método sencillo, económico y efectivo para investigar y evaluar la respuesta celular al efecto de mutágenos y/o agentes carcinógenos.

C.- DIFENILHIDANTOINATO DE SODIO (DFH)

El DFH es un fármaco primario usado para el tratamiento de casi toda clase de epilepsia, su farmacocinética es modificada por

su hidrosolubilidad limitada y por su eliminación que depende de la dosis. Su distribución es amplia en todos los tejidos y se excreta sin modificación menos del 5% del DFH por la orina, el resto es metabolizado principalmente por enzimas microsomales hepáticas presentando una vida media plasmática de 24 Hrs. el metabolito principal es el derivado para-hidroxifenilo, el cual representa alrededor de un 60 % a 70% de una dosis única, otros metabolitos derivados son el dihidroxicatecol, 3-metoxi, y el dihidrodiol.

En el estudio realizado por Bartsch (1975), al analizar metafases de linfocitos en cultivos de 72 Hrs. provenientes de niños bajo terapia con DFH, y al compararse con un grupo control, no se encontraron diferencias significativas en cuanto al número de aberraciones cromosómicas, bajo la hipótesis de que en 72 hrs. de cultivo, éste puede favorecer la duplicación de células normales y por consiguiente, reducir la posibilidad de encontrar células afectadas, se realizó un estudio similar con la diferencia de que las personas bajo terapia al DFH eran personas adultas y sus linfocitos fueron cultivados por 48 hrs. y al realizar los análisis correspondientes se encontró un incremento significativo de aberraciones cromosómicas en los pacientes que estuvieron en contacto con el medicamento.

En un estudio efectuado directamente sobre células obtenidas de médula ósea, los resultados encontrados son negativos en cuanto

a anomalías cromosómicas., Alving y Jensen (1976).

Alving y Jensen (1977) sugieren que los individuos jóvenes (niños), presentan una mayor capacidad de reparación de daño al ADN, y por ende las anomalías cromosómicas no son aumentadas significativamente.

Estudios *in vitro* en linfocitos humanos en cultivo, tratados con DFH, y realizados por Hunke (1978), revelaron que la frecuencia de ICH se eleva al incrementar la concentración del medicamento presente en el medio de cultivo en concentraciones que de 10 a 100 mg/ml.

Esser y colaboradores (1981), informan lo contrario en estudios realizados en niños bajo terapia con la droga, ya que los resultados obtenidos al analizar aberraciones cromosómicas en cultivos de 48 horas de linfocitos aunque sus frecuencias eran algo elevadas sobre el grupo control 3.05% y 1.4% respectivamente, sin embargo esta diferencia no fué estadísticamente significativa.

En dos trabajos que tratan acerca de las frecuencias de ICH en linfocitos de niños bajo terapia con DFH, en los cuales la metodología y parámetros utilizados fueron muy semejantes, y se realizaron en niños cuyo período de tratamiento era en promedio de 2.6 años y la edad estaba en un rango de 11 años, a ellos se les extrajo una muestra sanguínea la cual se depositó en un medio de cultivo para linfocitos durante 72 horas en presencia de BrdU. Al finalizar el tiempo de cultivo se realizaron las preparaciones

cromosómicas correspondientes y al analizar las frecuencias de ICH, Habendank y Col.(1982), informan de un incremento de ICH sobre un grupo control sin exposición al medicamento, contrario a los resultados obtenidos por Hunke y Col.(1978), quienes no encontraron diferencias significativas.

D.- DIAZEPAM

El diazepam es un excelente relajante muscular, además tiene propiedades sedativas y es usado como un agente antiepiléptico. Soraya Dhillon y col (1981), concluyeron que el diazepam es extensivamente metabolizado por demetilación e hidroxilación, originando los siguientes metabolitos, N-demetildiazepam, 3-hidroxdiazepam y el oxazepam. Estos metabolitos son conjugados con el ácido glucurónico y excretados en la orina.

Además de estos estudios a nivel bioquímico, se han realizado otros a nivel citogenético como los de Hsu. y Col (1981), quienes usaron el diazepam como bloqueador mitótico para inducir aneuploidía en células diploides de hámster chino y encontraron que el diazepam en una concentración de 100 mg/10 ml de medio de cultivo de células de hamsters era bloqueada completamente la división mitótica en metafase, y además concluyeron que este bloqueo puede ser inhibido cuando el diazepam es removido del

medio de cultivo, si la acción de este agente no era mayor de dos horas, pero cuando la acción del medicamento era prolongada por espacio de siete horas, al recuperarse la población celular presentaba un alto nivel de cromosomas rezagados, produciendo células aneuploides.

Posteriormente Shore y col.(1983), concluyeron que el diazepam en el humano puede atravesar la placenta de madres expuestas a éste durante el trabajo de parto. También cuando las madres fueron expuestas a diazepam al final del primer trimestre de gestación presentaron altas concentraciones del N-dimetildiazepam.

Renaul y Col (1989) realizaron un estudio *in vitro* en donde aplicaron distintas concentraciones de diazepam, encontrando que este medicamento es un inhibidor específico de la proliferación celular en concentraciones activas de 10 a 100 mg/ml.

Bao T. Van y Cols. (1992) reportaron efectos clastogénicos en el humano por altas dosis de diazepam.

III.- MATERIAL Y METODOS

Para obtener resultados positivos para ambas pruebas (PM e ICH) es decir tener una producción alta de micronúcleos y de intercambios de cromátides hermanas en las células de los animales de experimentación, se usó la droga Mitomicina C a una concentración de 0.5 mg/Kg de peso cuyo potencial mutagénico y carcinogénico es ya conocido, facilitando de esta manera la estandarización de los dos métodos citogenéticos utilizados en este estudio. Los resultados obtenidos con este mutágeno a razón de 0.25 ml/g de peso sirvieron como **testigo positivo**.

Al grupo llamado **testigo negativo** se les administró un volúmen equivalente de solución salina.

Compuestos a evaluar:

Diazepam:

En base a la dosis terapéutica utilizada en el humano se eligieron las siguientes dosis de diazepam : 0.1, 0.2 y 0.4 mg/kg de peso. Las dosis a probar fueron disueltas en solución salina estéril (0.9% de NaCl) y administradas a los ratones con una jeringa estéril de 1 ml a razón de 0.25 ml, por vía intraperitoneal y a dosis únicas.

Difenilhidantoinato de Sodio:

En base a la dosis terapéutica utilizada en el humano, se eligieron las siguientes dosis de DFH: 1, 10 y 20 mg/kg de peso. Las dosis a probar fueron disueltas en solución salina estéril (0.9% de NaCl) y administradas a los ratones con una jeringa estéril de 1 ml a razón de 0.25 ml/g de peso, por vía intraperitoneal y a dosis únicas.

Material Biológico.

Ratones machos y hembras de la línea Balb C, con una edad aproximada de ocho a doce semanas, los cuales desde su nacimiento estuvieron bajo condiciones de Bioterio.

A.- PRUEBA DE INTERCAMBIOS ENTRE CROMATIDES HERMANAS (ICH)

Esta prueba se realizó *in vivo*, con una población total de 60 ratones, 30 machos y 30 hembras.

Tres ratones machos y tres hembras fueron incluidos como control positivo. El grupo control negativo también incluyó tres ratones hembras y tres ratones machos. Los ratones restantes se dividieron en dos grupos según el sexo, y cada grupo se subdividió en tres, formados por tres ratones cada uno de ellos, correspondiendo un grupo a cada concentración del compuesto a probar.

El procedimiento técnico de la prueba de ICH implica:

- a) Administración de las 5-bromodeoxiuridina
- b) Administración de los compuestos a evaluar (DFH, DIAZEPAM)
- c) Aplicación de colchicina
- d) Obtención de células metafásicas a partir de médula ósea.
- e) Tinción diferencial de las cromátides hermanas
- f) Criterio experimental para la cuantificación de ICH
- g) Análisis estadístico

Administración de la 5-bromodeoxiuridina:

A cada ratón se le aplicó 0.25 ml de una solución de 5-bromodeoxiuridina a una concentración de 20 mg/ml disuelto en carbono activado. La administración se realizó con una jeringa de tuberculina estéril vía intraperitoneal.

Administración de los compuestos a evaluar (DFH, Diazepam):

Nueve horas después de la aplicación de la 5-bromodeoxiuridina se administraron las diferentes dosis de diazepam y de difenilhidantoinato de sodio. Para lograr los máximos efectos del tratamiento se dejó actuar el fármaco por 10 horas.

Aplicación de la Colchicina:

La colchicina fue diluida en agua destilada para tener una concentración de 1 mg/ml. A los ratones se les administró 0.25 ml de solución de colchicina por vía intraperitoneal con una jeringa de tuberculina estéril. Dos horas después de la aplicación, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical.

Obtención de células metafásicas a partir de médula ósea:

Para la obtención de metafases se requiere primeramente extraer la médula evitando que ésta se coagule, para lo que es necesario:

- Extraer rápidamente la médula
- Recibir la muestra en un tubo de centrifuga con una solución de suero fetal de ternera, ya que al recibir la médula directamente en la solución hipotónica generalmente se forman residuos fibrosos que después dificultan la observación de las metafases.
- Centrifugar la suspensión de células de médula ósea a 1500 rpm durante 10 minutos.
- Extraer cuidadosamente el sobrenadante, con una pipeta Pasteur y se procede a colocar la solución hipotónica (KCl a una concentración de 0.75 M) resuspender bien y dejar en reposo la suspensión celular por 20 minutos.
- Para interrumpir la acción de la solución hipotónica, se centrifuga la suspensión a 1500 rpm durante 10 minutos.

- Retirar el sobrenadante dejando la muestra en un volumen de 0.5 ml.
- Se le añade a la muestra 2 ml de solución fijadora de reciente preparación, y que en este caso fue preparado con una proporción de (3:1 alcohol metílico absoluto y ácido acético glacial hasta un volumen de 5 ml).
- Se centrifuga la suspensión celular a 1500 rpm durante 10 minutos, se remueve el sobrenadante dejando 0.25 ml de líquido, se añade nuevamente la solución fijadora y se prosigue a realizar los mismos pasos hasta que se observe la suspensión de células limpia y clara.
- Enseguida, se desecha el sobrenadante dejando solamente 0.3 ml de la solución fijadora en donde son resuspendidas las células sedimentadas, se toma la suspensión con una pipeta Pasteur y en portaobjetos limpios, se dejan caer sobre cada uno de ellos 2 gotas de la muestra desde la altura de 30 cm. y se secan estas laminillas agitándolas al aire.

Tinción Diferencial de las Cromátides Hermanas:

- Teñir las laminillas con fluorocromo Hoechst 33258 a una concentración de 10^{-5} M durante 20 minutos.
- Lavar con agua destilada y secar al aire.
- Se agrega a la superficie de la preparación una gota de buffer Mc Ilveine (PH=8.0) y se coloca un cubreobjetos para uniformizar la

reacción, posteriormente sellar con esmalte.

- Incubar las laminillas a 50°C y a la vez exponerlas a luz UV. (360 nm) a una distancia aproximada de 5 cm. por 30 minutos.
- Remover cuidadosamente el cubreobjetos, enjuagar la preparación con agua destilada y secar al aire.
- Teñir con Giemsa al 4% en buffer de fosfatos 0.1 M (PH 6.8) alrededor de 20 minutos, hasta observar una buena diferenciación de las cromátides. Finalmente lavar con agua destilada y secarlas al aire.
- Se colocan las laminillas en Xilol durante cinco minutos.
- Montar en resina para ser analizadas al microscopio con aumento seco débil y seco fuerte, así como también con el objetivo de 100X utilizando aceite de inmersión.

Criterio Experimental para la Cuantificación de ICH:

Se tiñen de tres a cinco preparaciones de cada ratón y se procede a escoger la de mejor coloración. El análisis microscópico de las laminillas, es primero al objetivo de 10X, con la finalidad de seleccionar la preparación con mejor tinción y en mejor estado morfológico de los cromosomas.

Con el objetivo de 100X, los cromosomas metafásicos se observan con una cromátide teñida fuertemente y la otra cromátide pálida, observandose claramente los puntos de intercambios entre cromátides hermanas las cuales fueron cuantificadas en un total de

25 a 50 metafases por ratón. La observaciones fueron realizadas siguiendo el método de doble ciego.

Análisis Estadístico:

Para analizar las frecuencias de ICH por metafase en los ratones tratados con los anticonvulsivantes DFH y Diazepam, y en los controles positivo y negativo, los resultados fueron agrupados por sexo y dosis utilizadas para compararlos entre sí mediante las pruebas estadísticas de "t" de Student y Análisis de varianza (ANOVA), ($p < 0.05$).

B).- PRUEBA DE MICRONUCLEOS (PM)

Para esta prueba *in vivo*, se trabajó con un total de 30 ratones machos y 30 ratones hembras.

Los grupos y subgrupos de ratones formados de acuerdo al sexo y dosis fueron los mismos que para la prueba de ICH.

El procedimiento técnico de esta prueba (PM) implica los siguientes pasos:

Administración de los compuestos:

Las dosis a probar fueron administradas de acuerdo a la metodología previamente descrita. A las 24 horas después de la

aplicación de la dosis, los ratones fueron sacrificados por medio de dislocación cervical.

Obtención de Médula Osea:

Recién sacrificado el ratón ambos fémures fueron removidos rápidamente. Utilizando un bisturí se realizan incisiones a nivel del músculo femoral y el fémur es desarticulado de la pelvis y tibia, haciendo uso de una gasa y solución salina, se quita el exceso del músculo presente en cada uno de los fémur extraídos, el fémur limpio es cuidadosamente cortado por sus extremos proximal y distal con una hoja de bisturí y depositado en un tubo de centrífuga con 5 ml de suero fetal de ternera previamente preparado. Son tomados 2.5 ml del suero fetal con una jeringa desechable y la aguja de la jeringa es insertada en el extremo distal del fémur, el cual es completamente sumergido y oprimido en la pared de un tubo de centrífuga, el suero es pasado por la jeringa y ésto hace que la médula ósea sea recuperada en el tubo de centrífuga.

Esta operación se repite con el otro fémur del mismo ratón, utilizando los 2.5 ml del suero restante, de esta manera las células de la médula ósea se observan como una fina suspensión en el suero. Estos pasos deben realizarse lo más rápidamente posible para evitar la coagulación y deterioro de las células de médula ósea dentro de los fémures.

Preparación de Laminillas.

La muestra de células medulares es resuspendida vigorosamente con una pipeta pasteur y después la suspensión celular es centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm, posteriormente con la misma pipeta se elimina el sobrenadante dejando sólo el paquete celular.

Este último paso se repite hasta que la suspensión se vea de una tonalidad clara, con la misma pipeta se deja caer una gota en el extremo de un portaobjetos limpio y colocado en un ángulo de 45 grados para que la solución se extienda, estas preparaciones se dejan secar al aire a temperatura ambiente.

Tinción de la Médula ósea:

En el presente trabajo, las tinciones se realizaron con el colorante Eosina-azul de metileno según la fórmula de Wright y de acuerdo al siguiente procedimiento:

- 1.- Preparación del colorante: agregar 0.3 g de colorante Wright (Harleco) en 100 ml de alcohol metílico absoluto más 1 ml de glicerina; dejar reposar por siete días, agitar y filtrar antes de su uso.
- 2.- Teñir las laminillas con el colorante Eosina-azul de metileno por dos minutos.
- 3.- Lavar con agua destilada y secar al aire.
- 4.- Aclarar con xilol durante 10 minutos y montar en resina.

Análisis de las Laminillas:

El análisis microscópico se realizó con los aumentos dados por el objetivo de 100x, los eritrocitos policromáticos jóvenes se observan con un tinte rosa pálido y los micronúcleos fueron fácilmente detectados por su coloración contrastante azul intenso. Por cada ratón se analizaron 2,000 eritrocitos jóvenes anucleados, para el conteo de micronúcleos se consideró el número de células micronucleadas del total y no el número de micronúcleos por célula.

Análisis Estadístico:

Los resultados obtenidos, se agruparon de acuerdo al sexo y a las dosis utilizadas del fármaco. El análisis estadístico se realizó con la prueba de X^2 ($p < 0.05$). comparándose entre si las frecuencias obtenidas para cada grupo.

IV.- RESULTADOS

Con el objeto de determinar si los fármacos (Diazepam y el Difenilhidantoinato de Sodio) presentaban efectos mutágenos y/o clastogénicos, sobre células de médula ósea de ratón y si este efecto estaba relacionado con el sexo de los ratones estudiados, se compararon estas poblaciones con los controles positivo y negativo, encontrándose los siguientes resultados:

A.- INTERCAMBIO DE CROMATIDES HERMANAS (ICH)

a) Comparación de las frecuencias de ICH en ratones tratados con distintas dosis de DFH y con sus respectivos controles positivo y negativo.

El efecto del DFH en la inducción de ICH comparado con el grupo control negativo (suero fisiológico) y el control positivo (Mitomicina C) se presenta en el Cuadro No. 1. Donde puede observarse que la media de ICH/célula en la población total es de 5.20 ± 1.86 por metafase. La frecuencia de ICH se incrementa tanto en machos como en hembras (M+H) al aumentar la dosis de DFH. La frecuencia de ICH a la concentración de 1 mg/kg (4.60 ± 1.62) se observó ligeramente incrementada cuando se le compara contra el grupo control negativo (4.26 ± 1.29), sin embargo no resultaron estadísticamente diferentes. La diferencia en la producción de ICH

en las dosis de 10 (5.41 ± 1.71) y 20 mg/kg de peso (5.75 ± 2.23), con respecto al control negativo (4.26 ± 1.29) y entre ellas resultaron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$), pero su efecto es menor que el producido por la Mitomicina C (5.97 ± 1.74).

b) Efecto del sexo sobre la frecuencia de ICH en ratones tratados con distintas dosis de difenilhidantoinato de sodio.

En el mismo Cuadro 1, se muestra la frecuencia de ICH en ratones machos y hembras, tratados con distintas dosis de DFH. La media de ICH para la población total de ratones hembras resultó ser significativamente mayor (5.38 ± 2.16) que en la de machos (5.01 ± 1.46). De acuerdo a las diferentes dosis de tratamiento en ratones hembras, se observa que la media de ICH por metafase se incrementa al aumentar la dosis de DFH. La media de ICH a la concentración de 1 mg/kg (4.84 ± 1.46) fué ligeramente mayor a la del grupo control negativo (4.45 ± 1.57) pero no resultó ser estadísticamente diferente. Los incrementos en la producción de ICH a las dosis de 10 (5.89 ± 2.10) y 20 mg/kg de peso (5.91 ± 2.85), resultaron significativos al compararlos con la dosis de 1 mg/kg (4.84 ± 1.46) y con el grupo control negativo (4.45 ± 1.57). El efecto del DFH sobre la frecuencia de ICH a las concentraciones de 10 (5.89 ± 2.10) y 20 mg/kg de peso (5.91 ± 2.85) resultó muy similar al producido por la Mitomicina C (5.80 ± 2.13).

En los ratones machos también se observó un incremento

significativo de ICH / metafase al aumentar la dosis de DFH. La media de ICH a la concentración de 1 mg/kg (4.36 ± 1.74) fué estadísticamente igual al grupo control negativo (4.06 ± 0.85). El aumento en la producción de ICH a las dosis de 10 (4.89 ± 0.94) y 20 mg/kg de peso (5.59 ± 1.29), resultó significativo al compararlo con la dosis de 1 mg/kg (4.36 ± 1.74) y con el grupo control negativo (4.06 ± 0.85), pero su efecto es menor que el producido por la Mitomicina C (6.14 ± 1.19).

De acuerdo a las diferentes dosis aplicadas y al sexo, se encontró un incremento significativo de ICH en hembras tratadas con la dosis 10 mg/kg (5.89 ± 2.10) al compararla con la frecuencia de ICH obtenida en machos tratados con la misma dosis (4.89 ± 0.94).

El efecto de la Mitomicina C sobre la frecuencia de ICH resultó ser ligeramente mayor en machos (6.14 ± 1.19) con respecto a las hembras (5.80 ± 2.13), pero el análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre estos grupos.

El grupo control negativo tratado con suero fisiológico no mostró diferencias significativas en la frecuencia de ICH entre machos (4.06 ± 0.85) y hembras (4.45 ± 1.57).

c) Comparación de las frecuencias de ICH en ratones tratados con distintas dosis de diazepam y controles positivo y negativos.

El efecto del diazepam en la inducción de ICH comparado con el grupo testigo negativo y el grupo testigo positivo se muestran

en el Cuadro N° 2, en el cual puede observarse que la media de ICH en la población total (M+H) es de 4.50 ± 2.19 por metafase. La frecuencia de ICH se incrementa a medida que aumenta la dosis aplicada, encontrándose una diferencia significativa entre las dosis 0.2 (4.06 ± 1.79) y 0.4 mg/kg de peso (4.43 ± 1.62) de Diazepam con respecto al testigo negativo (3.57 ± 1.50); estas dosis revelaron frecuencias de ICH estadísticamente menores a las producidas por la Mitomicina C (7.04 ± 2.20).

d) Efecto del sexo sobre la frecuencia de ICH en ratones tratados con distintas dosis de diazepam.

En el Cuadro N° 2, se muestra la frecuencia de ICH en ratones hembras y machos tratados con distintas dosis de Diazepam. La media de producción de ICH para la población de ratones machos resultó ligeramente mayor pero no significativamente diferente (4.69 ± 2.35) que la de las hembras (4.31 ± 2.00). De acuerdo a las diferentes dosis de Diazepam aplicadas a ratones machos, se observa que la media de ICH por metafase se incrementa significativamente a medida que aumenta la dosis aplicada, (3.33 ± 1.66 , 4.20 ± 1.85 , 4.87 ± 1.62 respectivamente), en los ratones hembra, las frecuencias de ICH muestran el mismo comportamiento presente en machos (3.52 ± 1.46 , 3.92 ± 1.73 , 3.99 ± 1.51 respectivamente) pero no se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias de ICH de las tres dosis aplicadas.

De acuerdo a las diferentes dosis aplicadas y al sexo, se encontró un incremento significativo de ICH en los machos tratados con Diazepam a una concentración de 0.4 mg/kg de peso (4.87 ± 1.62), con respecto a las hembras tratadas con la misma dosis (3.99 ± 1.51).

El efecto producido por la Mitomicina C sobre la frecuencia de ICH en los dos grupos (machos y hembras) resultó estadísticamente mayor que el de las tres dosis estudiadas y se observa ligeramente incrementado en machos (7.48 ± 2.22) con respecto a hembras (6.59 ± 2.10). El grupo control negativo tratado con suero fisiológico no mostró diferencias significativas de ICH entre los sexos, (3.58 ± 1.66) en machos y (3.56 ± 1.28) en hembras.

B.- PRUEBA DE MICRONUCLEOS.

a) Comparación de las frecuencias de Micronúcleos (MN) en ratones tratados con distintas dosis de diazepam, con sus respectivos controles positivo y negativo.

El efecto de las diferentes dosis de diazepam sobre la producción de micronúcleos comparado con los grupos testigo negativo (suero fisiológico) y testigo positivo (Mitomicina C), se

presenta en el Cuadro N° 3, en el cual puede observarse que la media de MN en la población total es de 1.99%. La frecuencia de de células micronucleadas (MN) se observa ligeramente incrementada a medida que se aumenta la dosis de Diazepam, encontrandose diferencias significativas a partir de la dosis más baja (0.1 mg/kg, 2.06%) con respecto al control negativo (suero fisiológico 1.02%), sin embargo, al comparar entre si el efecto de las tres dosis de diazepam utilizadas (0.1, 0.2 y 0.4 mg/kg de peso) sobre la frecuencia de MN (2.06%, 2.03%, y 2.18% respectivamente) no se encontraron diferencias significativas entre ellas.

El efecto producido por la Mitomicina C sobre la frecuencia de MN resultó estadísticamente mayor (3.05%) que el producido por las tres dosis de diazepam estudiadas (0.1, 0.2 y 0.4 mg/kg de peso) (2.06%, 2.03%, y 2.18% respectivamente).

b) Efecto del sexo sobre la frecuencia de micronúcleos en ratones tratados con distintas dosis de Diazepam.

En el mismo Cuadro N° 3, se muestran las frecuencias de MN en ratones tratados con distintas dosis de Diazepam de acuerdo al sexo. El porcentaje de producción de MN para los ratones machos fué significativamente mayor (2.12%) que el de las hembras (1.88%). De acuerdo a las diferentes dosis de tratamiento, en ratones machos se observa que el porcentaje de células

micronúcleadas se incrementa (1.98%, 2.19%, 2.31%) al aumentar la dosis de Diazepam (0.1, 0.2 y 0.4 mg/kg de peso respectivamente), encontrándose diferencias significativas a partir de la dosis más baja (0.1 mg/kg) de Diazepam con respecto al control negativo (suero fisiológico 1.35%). Al comparar entre si el efecto de las tres diferentes dosis de diazepam utilizadas sobre la frecuencia de MN no se encontraron diferencias significativa entre ellas. El efecto de las diferentes dosis de diazepam utilizadas en ratones hembras (0.1, 0.2 y 0.4 mg/kg.) sobre las frecuencias de MN mostró un comportamiento muy similar al observado en ratones machos (2.13%, 1.92%, 2.07% respectivamente), encontrándose diferencias significativas a partir de la dosis más baja de Diazepam utilizada (0.1 mg/kg) con respecto al control negativo (0.76%). Al comparar entre si el efecto de las tres diferentes dosis de diazepam utilizadas sobre la frecuencia de MN no se encontró diferencia significativa entre ellas.

El efecto producido por la Mitomicina C sobre la frecuencia de MN en machos y hembras resultó estadísticamente mayor que el producido por las tres dosis estudiadas, y se observa ligeramente incrementado en ratones hembras (3.10%) con respecto a los machos (2.99%). El grupo control negativo tratado con suero fisiológico mostró un incremento significativo de MN en ratones machos (1.35%) al ser comparados con las hembras (0.76%).

c) Eritropoyesis en ratones tratados con distintas dosis de Diazepam.

El efecto del Diazepam en la eritropoyesis comparado con los testigos positivo y negativo se muestran en el cuadro N° 4, en el cual puede observarse que los valores promedios de Epc/Er (Eritrocitos policromáticos / Eritrocitos totales) en la población total es de 0.38. Los valores de la relación Epc/Er en los tres grupos tratados con Diazepam (0.39, 0.42, 0.39, respectivamente) muestran valores muy similares al control negativo (0.43).

El efecto producido por la Mitomicina C sobre los valores de la relación de Epc/Er resultó estadísticamente menor (0.27) que las tres dosis de diazepam estudiadas (0.39, 0.42, 0.39, respectivamente).

d) Efecto del sexo en la eritropoyesis de ratones tratados con diferentes dosis de Diazepam.

En el mismo Cuadro N° 4, se muestran los valores de la relación Epc/Er en ratones tratados con distintas dosis de Diazepam de acuerdo al sexo. Los valores promedios de la relación Epc/Er resultaron ligeramente mayores en hembras (0.41) que en machos (0.35). De acuerdo a las diferentes dosis de tratamiento (0.1, 0.2 y 0.4 mg/kg de Diazepam), en ratones hembras los valores promedios de Epc/Er (0.42, 0.49, 0.42 respectivamente) no

mostraron diferencias significativas al ser comparadas con el grupo control negativo 0.47. Este mismo comportamiento fue observado en ratones machos al comparar estadísticamente los valores de Epc/Er obtenidos en las tres dosis de diazepam estudiadas (0.37, 0.34, 0.37) con el grupo control negativo (0.38).

Los valores de la relación promedio de Epc/Er de acuerdo a las diferentes dosis aplicadas y al sexo, mostraron un incremento significativo en los ratones hembras tratados con las tres dosis estudiadas (0.1, 0.2 y 0.4 mg/kg) (0.42, 0.49, 0.42) al ser comparados con los resultados obtenidos en los ratones machos tratados con las mismas dosis (0.37, 0.34, 0.37 respectivamente).

Los valores de Epc/Er en el grupo control negativo tratado con suero fisiológico resultó significativamente mayor en las hembras (0.47) que en los machos (0.38).

El efecto de la Mitomicina C sobre los valores de la relación Epc/Er es muy similar en ambos sexos, 0.27 en machos y 0.26 en hembras.

C.- SENSIBILIDAD DE LA PRUEBA DE MICRONUCLEOS (MN) Y LA TECNICA DE INTERCAMBIO DE CROMATIDES HERMANAS (ICH) EN RATONES TRATADOS CON TRES DIFERENTES DOSIS DE DIAZEPAM.

En el cuadro N° 5, se resumen los resultados del efecto del Diazepam sobre la frecuencia de ICH y MN :

1. Con las dos pruebas citogenéticas (MN y ICH) fueron detectadas diferencias significativas entre las dosis aplicadas y los dos controles (positivo y negativo), aunque con la prueba de ICH no fué posible detectar la diferencia significativa entre la dosis más pequeña (0.1 mg/kg de peso, 3.42 ± 1.56) y el grupo control negativo (3.57 ± 1.50).
2. En cuanto al sexo, la población total de machos reveló un incremento significativo en la frecuencia de ICH (4.69 ± 2.35) al compararlas con la hembras (4.31 ± 2.0). La frecuencia de ICH en machos mostró un incremento significativo a partir de la dosis intermedia 0.02 mg/kg de peso (4.20 ± 1.85) con respecto al grupo control negativo (3.58 ± 1.66), mientras que la frecuencia de MN reveló una diferencia significativa unicamente entre la dosis mayor 0.4 mg/kg de peso (2.31%) y el control negativo (1.35%). En los ratones hembras la frecuencia de MN mostró un incremento significativo a partir de la dosis más pequeña 0.1 mg/kg de peso (2.13%), al compararla con el control negativo (0.76%),

mientras que con la prueba de ICH solamente se detectaron diferencias significativas de las tres dosis estudiadas (3.52 ± 1.46 , 3.92 ± 1.73 , 3.99 ± 1.51 respectivamente) al ser comparadas con control positivo (6.59 ± 2.10).

3. De acuerdo a las diferentes dosis aplicadas y al sexo, con la prueba de ICH fué posible detectar diferencias significativas entre machos y hembras tratados con 0.4 mg/kg de peso de diazepam (4.87 ± 1.62 , 3.99 ± 1.51) y con Mitomicina C, (7.48 ± 2.22 , 6.59 ± 2.10 respectivamente), mientras que las frecuencias de MN solamente revelaron diferencias significativas entre sexos en los ratones del control negativo tratados con suero fisiológico (1.35% en machos y 0.76% en hembras).

V.- DISCUSION

A.- PRUEBA DE INTERCAMBIO DE CROMATIDES HERMANAS (ICH).

a) Frecuencias de ICH en ratones tratados con distintas dosis de DFH.

Los resultados aquí obtenidos, muestran un incremento significativo en las frecuencias de intercambios de cromátides hermanas (ICH) en médula ósea de ratones tratados con DFH (10 y 20 mg/kg de peso); estos hallazgos están de acuerdo con lo informado para pacientes epilépticos bajo terapia con DFH, Habedank y col. (1982), Kulkarni P. y col. (1984), Schaumann y col. (1985). Sin embargo otros estudios citogenéticos en cultivo de células de humano y de ratón tratadas con DFH, indican que hay un aumento en las aneuploidías, pero no en aberraciones cromosómicas estructurales, Oliveira and Machado (1987). Otros trabajos informan de un incremento significativo del efecto citogenético a dosis bajas de DFH, sin embargo, a dosis altas de la droga no es posible detectar ningún daño mediante la prueba de micronúcleos, Montes de Oca y col. (1984); una explicación para estos resultados, es que a altas dosis de DFH, el sistema enzimático involucrado en la biotransformación, es inhibido y no son formados los metabolitos intermedios, los cuales probablemente sean los responsables de los efectos mutagénicos. Sezzano and col. (1982).

b) Efecto del sexo sobre la frecuencia de ICH en ratones tratados con distintas dosis de DFH.

En nuestro estudio se encontró una diferencia significativa entre sexos, cuando se considera a la población total, las hembras mostraron un incremento en la frecuencia de ICH al ser comparados con los machos. Sin embargo los ratones machos presentaron una correlación positiva y significativa entre la frecuencia de ICH y las dosis de DFH; Lo anterior apoya los informes que señalan que los ratones machos son más susceptibles que las hembras a los efectos genotóxicos de determinados compuestos, por ejemplo en el benzeno, esto es debido probablemente a la influencia de las hormonas sexuales sobre el metabolismo del agente genotóxico. Luke and Tice (1988).

c) Frecuencias de ICH en ratones tratados con distintas dosis de Diazepam.

Nuestros resultados muestran un incremento en la frecuencia de ICH a medida que aumenta la dosis de diazepam a partir de la segunda dosis en comparación con el control negativo.

Algunos investigadores han reportado incrementos significativos en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de pacientes en sistemas *in vitro* Stenchever M.y col.1970. Sin embargo otros estudios demuestran que la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas en linfocitos de pacientes

tratados con una simple dosis no muestran incremento significativo
, Husum B. y col. 1983.

**d) Efecto del sexo sobre la frecuencia de ICH en ratones
tratados con distintas dosis de diazepam.**

Al analizar la población total de ratones la media de producción de ICH para los ratones machos resultó ligeramente mayor pero no significativamente diferente que las hembras. Analizando por separado las poblaciones se observó que la media de ICH por metafase se incrementa significativamente a medida que aumentan las dosis aplicadas.

De acuerdo a las diferentes dosis aplicadas y al sexo, se encontró un incremento significativo de ICH en los machos tratados con Diazepam a una concentración de 0.4 mg/kg de peso con respecto a las hembras tratadas con la misma dosis. Nuestros resultados nos indican la posibilidad de que los ratones machos de la línea estudiada (BalbC) sean más sensibles al diazepam que los ratones hembras de la misma línea.

Divoll MDJ. 1983 no reporta cambios significativos al efecto de la droga por el factor edad o sexo. La farmacocinética, el metabolismo, dosis, predisposición genética y la especie son factores importantes que se deben de considerar para los estudios de genotoxicidad *in vivo*.

a) Frecuencias de micronúcleos en ratones tratados con distintas dosis de diazepam.

En cuanto a la prueba de micronúcleos, el incremento del porcentaje de eritrocitos micronucleados se observó en todas las dosis utilizadas con respecto al grupo control negativo, pero no se encontró diferencia significativa entre las distintas dosis, esto se observó tanto al analizar a la población total de ratones utilizados, como al analizarlos tomando en cuenta el sexo del ratón.

Es importante recalcar que con esta prueba se encontraron incrementos significativas en la frecuencia de MN desde la dosis más baja utilizada .

Cuando una sustancia incrementa la frecuencia de eritrocitos micronucleados, indica que la sustancia puede interferir con la división nuclear en eritroblastos de médula en los cuales, fragmentos de cromatina o cromosomas retardados en anafase fallaron para ser incorporados dentro de un núcleo hijo.

Agentes químmicos, los cuales rompen cromosomas o interfieren en el

ensamble o el funcionamiento del huso acromático, son conocidos como inductores de micronúcleos como resultado de fragmentos

acentricos retardados o rezagados en el período de anafase.

Das RK. y col 1977. Reportaron un incremento significativo en la frecuencia de MN a dosis 20 o 40 mg/kg de diazepam el estudio realizado en células de médula ósea de ratón. En contraste resultados negativos también han sido reportados en médula ósea de ratón después de una inyección intraperitoneal Xu W. 1990 y Alder ID.1991.

b) Efecto del sexo sobre la frecuencia de MN en ratones tratados con distintas dosis de Diazepam.

El porcentaje de producción de MN para los ratones machos fué significativamente mayor que el de las hembras. Estos resultados nos hacen suponer que los ratones machos son más sensibles a la droga y por lo mismo se refleja una mayor producción de efectos clastogénicos. Se han realizado trabajos tanto *in vivo* como *in vitro* para estudiar el posible efecto clastogénico que pudiera ejercer el diazepam por ejemplo el de Bao van T., y Imrch E. 1992 quienes reportan que el diazepam a altas dosis en el humano puede incrementar el rango de aneuploidia y efectos clastogenicos en linfocitos y esto pudiera tener alguna importancia médica.

c) Eritropoyesis en ratones tratados con distintas dosis de Diazepam.

Nuestros resultados no revelaron ninguna correlación entre el efecto de las distintas dosis de diazepam y los valores de Eritrocitos policromáticos / Eritrocitos normocromáticos, lo cual nos indica que la droga a las tres dosis utilizadas no afecta el proceso de división celular. Sin embargo Anderson y col. 1981 reportó el efecto del diazepam sobre el ciclo celular, específicamente sobre la función centriolar, esto es importante ya que el mismo autor correlaciona el fenotipo del huso monopolar con la habilidad del diazepam para inducir aneuploidia cromosómica.

d) Efecto del sexo en la eritropoyesis de ratones tratados con diferentes dosis de Diazepam.

Los valores de la relación promedio de Epc/Er de acuerdo a las diferentes dosis aplicadas y al sexo, mostraron un incremento significativo en los ratones hembras tratados con las tres dosis estudiadas al ser comparados con los resultados obtenidos en los ratones machos . Estos resultados revelan, que los ratones machos probablemente son más susceptibles al efecto del diazepam sobre el proceso de la división celular que las hembras. Sin embargo no se han encontrado informes que pudieran apoyar nuestros resultados.

D.- SENSIBILIDAD DE LA PRUEBA DE MICRONUCLEOS (MN) Y LA TECNICA DE INTERCAMBIO DE CROMATIDES HERMANAS (ICH) EN RATONES TRATADOS CON TRES DIFERENTES DOSIS DE DIAZEPAM.

Las frecuencias de ICH y MN en ratones tratados con Diazepam se encontraron incrementadas significativamente, evidencia que haría pensar en la existencia de un agente clastogénico que también induzca ICH. Sin embargo, los mecanismos de formación de ICH, difieren de los mecanismos para producir aberraciones cromosómicas, que dan lugar a la formación de micronúcleos. Esto se apoya en que algunos agentes como los rayos X y el antibiótico bleomicin pueden producir micronúcleos, sin inducir ICH, Gebhart and Kappaup (1978). Además, en la anemia de Fanconi, en donde las aberraciones cromosómicas espontáneas (fracturas) son muy elevadas, los ICH presentan una frecuencia normal, Latt and col. (1975).

Lo que sí es posible afirmar, es que la producción de micronúcleos e ICH pueden ser considerados como índices de mutación real, aunque los mecanismos de formación de los ICH no están completamente dilucidados. Una circunstancia que podría ser considerada como desventaja de la prueba de ICH, es la utilización de la sustancia 5-BrdU, la cual es utilizada y requerida como pretratamiento de la prueba, ya que se ha demostrado que su incorporación por sí misma y a altas

concentraciones pueden inducir ICH. Hsu and Somers (1961). No obstante, dicen que la concentración de 5-BrdU (5 ug/mg) usada para lograr diferenciación de cromátides hermanas, ha sido considerada como bastante baja para evitar los problemas de inducción de ICH y producción de aberraciones cromosómicas.

De acuerdo a la información anterior sobre la susceptibilidad de estas dos pruebas citogenéticas podemos resumir lo siguiente:

Prueba de micronúcleos (PM)

1. La formación de micronúcleos depende no solamente de la producción de fracturas cromosómicas, sino también de la frecuencia de división celular, porque si se dividen pocas células in vivo en presencia de algún agente clastogénico se formarán pocas células micronucleadas.
2. La PM, es un método citogenético in vivo práctico que detecta agentes clastogénicos, así como aquellos capaces de dañar la formación del huso acromático.
3. El número contable de células es ilimitado.
4. El nivel de micronúcleos espontáneos, es bajo.
5. No requiere de ningún pretratamiento especial con algún posible mutágeno (BrdU, FdU, Colchicina, etc.)
6. La prueba de MN colateralmente puede indicar alteraciones en la eritropoyesis.

Prueba de intercambio de cromátides hermanas (ICH)

1. Es el método citogenético más sensible para la detección de sustancias mutagénicas y/o carcinógenas *in vivo* aún a concentraciones muy bajas.
2. Los ICH son inducidos con muy bajas dosis de mutágeno y como son perfectamente distinguibles con muy baja frecuencia de error, la validez estadística aumenta.
3. Es de fácil realización y altamente reproducibles.

VI.- CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados y discusiones anteriormente descritos, es posible concluir lo siguiente:

1. Las pruebas de PM y de ICH, son dos métodos citogenéticos prácticos y eficientes en la detección de agentes químicos mutagénicos en sistemas in vivo.
2. El DFH presenta un efecto mutagénico medible por un aumento en la frecuencia de ICH en médula ósea de ratón en un sistema in vivo, a dosis: 10 a 20 mg/kg de peso.
3. El Diazepam presenta un efecto clastogénico y mutagénico medible por un incremento en las frecuencias de MN y ICH en médula ósea de ratón en un sistema in vivo, a dosis: 0.1, 0.2, y 0.4 mg/kg de peso.
4. El Diazepam no presenta ningún efecto importante en la eritropoyesis a las tres dosis estudiadas.(0.1, 0.2, y 0.4 mg/kg de peso).
5. Posiblemente los ratones machos de la línea BalbC de 8 a 12 semanas de edad sean más susceptibles que las hembras de la misma línea y edad al efecto mutagénico y clastogénico del DFH y del Diazepam.

LITERATURA CITADA

- ALVING, J. JENSEN M. y MEYER, H. 1976:
Diphenylhydantoin and Chromosome Morphology in man and rat.
Mutation Research 40: 169-173.
- ALVING, J. M. K. JENSEN, H. MEYER. 1977:
Chromosome studies of bone marrow cells and peripheral blood
lymphocytes from diphenylhydantoin treated patients.
Mutation Research. 361-366
- ALDER, I., KLIESCH U., VAN-HUMMELEN P., VOLDERS M., (1991)
Mouse micronucleus test with known and suspect spindle poison;
results from two laboratories.
Mutagenesis, 6 (1), 47-53.
- ANDERSON L., LEHTO V., STENMAN S., BADLEY A., 1981:
Diazepam induces mitotic arrest at prometaphase by inhibiting
centriolar separation.
Nature (London), 291, 247-248.
- BAO VAN T. IMRECH E. y CZEIZEL A. . 1992:
Cytogenetic effects of diazepam in peripheral lymphocytes of
self-poisoned persons.
Mutation Research, 298; 131-137.
- BARTSH., H. D; 1975: Cytogenetic testig of antiepileptic drugs
in human patients.
Mutation Research; 29: 27-281.
- BOLLER K. y W. SCHMID, 1970:
Chemische mutagenese beim sauger, das knochenmark deschinesischen
hamsters als in vivo test system hamatologische befunde mach behano
lung mit trenimon.
Human. Genetik, II: 34-54.
- BUTLER, M. G. 1981:
Increase de frequency of sister chromatid in alcoholics.
Mutation Research; 85: 71-76.
- CARRANO A. V. THOMPSON, L. M.: P.A. MINKLER J.L. 1978:
Sister Chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis.
Nature. 271: 551-553.

- CROSSEN, P.E. 1972:
SCE in Lymphocytes.
150 fifth Avenue, New York. 175-193.
- CHAKRABARTI, R.N. y DUTTA K.1988:
Micronucei test in routtine smears frome uterine cervix.
Eur. J. Gynaec. Oncol. 5: 370-372.
- DAS, R.K.; Kar, R.N. 1977:
Diazepam induced bone marrow chromosome breakages in mice,
Mammal CHrom Newslett, 18,73.
- DAS, B.C. 1985:
Baseline frequency of sister chromatid exchanges (SCE) in new born lymphocytes and its relation ship to in vivo again in human.
Mutation Research. 144:85-88.
- DHILLON S. Y RICHENS A. 1981:
Farmacokinetics of diazepam in epileptic patients and normal volunteers following intravenous administration. Clin. Pharmacology. 12: 841-844.
- DIVOLL M. GREENBLATT D.J., OCHS H.R. SHADER R.I. 1983
Absolute bioavailability of oral and intramuscular diazepam: efects of age and sex.
Anesth. Analg., 62, 1-8.
- ESSER, K.J. KOLTAREK F.; HABEDANK M. MUHLER U, y MUHLER E. 1981:
Chromosomal investigations in epileptic children during long term therapy with phenytoin or primidone.
Hum. Genet. 56: 340-345.
- FRANK D.N. TRZOS R.J. y GOOD P.J. 1978:
A comparision of two methods for evaluating drug induced chromosome alterations.
Mutation Research. 56: 311-317.
- FUCIE A., GARAJ-VRHOVAC V. y SkARA M. 1992:
The persistence of sister- chromatid exchange frecuencies in men occupationally exposed to vinyl chloride monomer.
Mutation Research, 281 129-132.
- GALLOWAY, S.M: EVANS, H.J. 1985:
Sister chromatid exchanges in human chromosomes from normal individuals and patients with ataxia telangiectasia.
Cytogenetic Cell genet. 15: 17-29.

- GARAJ-VRHOVAC V., FUCIC A. y HOVART D. 1992:
The correlation between the frequency of micronuclei and specific chromosome aberrations in human lymphocytes exposed to microwave radiation in vitro.
Mutation Research, 281: 129-132.
- GEBHART, E. AND H. KAPPAUF, 1978:
Bleomycin and SCE in human lymphocyte chromosomes.
Mutation Research. 58: 121-124.
- HABENDANK, M. 1982:
Increased sister chromatid exchanges in epileptic children during long term therapy with phenytoin.
Hum. Genet. 61: 71-72.
- HEDDLE, J.A. 1973:
A rapid in vivo test for chromosomal damage.
Mutation Research. 18: 187-190.
- HERHA, J; OBE G. 1976:
Chromosomal damage in epileptics on monotherapy with carbamazepine and diphenylhydantoin.
Hum. Genet. 34: 255-263.
- HUNKE, M.H. y CARPENTER M.J. 1978:
Effects of diphenylhydantoin on the frequency of sister chromatid exchanges in human lymphocytes,
Am. J. Hum. Genet. 30 .(Abstract 83A).
- HUSUM B. NIEBUHR E. y AKSEL J. 1985:
SCE in lymphocytes of patients treated with single, large doses of diazepam
Mutation Research, 155,71-73.
- HSU, T.C. y SOMERS C.E. 1961:
Effect of 5-bromodeoxyuridine.
- HSU T.C., JAN C. SHIRLEY L. 1983:
Effects of diazepam on diploid Chinese hamster cells.
Mutation Research. 122: 201-209.
- ISHII, Y; y BENDER M. A. 1978:
Factors influencing the frequency of mitomycin C Induced sister-chromatid exchanges in 5-bromodeoxyuridine substituted human lymphocytes in culture.
Mutation Research. 51: 411-418.

- JAMES, J. MC.GREGOR. 1987:
Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes.
Mutation Research. 189: 103-112.
- JENSEN M.K. 1977:
Cytogenetic finding in pernicious anemia comparison between results obtained with chromosome studies and the micronucleus test.
Mutation Research 45(2) : 249-252.
- JENSSEN, D. y RAMEL C. 1980:
The micronucleus test as part of a short-term Mutagenicity test program for the predication of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested.
Mutation Research. 75: 191-201.
- JERINA, D.M. y DALY, J. 1974:
Arene oxides: A new aspect of drug metabolism.
Science. 185: 573
- KATO, H. 1974:
Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BrdU-labeling method.
Nature (London), 251: 70-72.
- KASTENBAUM M.A. y BOWMAN K.O. 1970:
Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies.
Mutation research. 9: 527-549.
- KULKULKARNI, P.S.: MONDKER, U.P. 1984:
Chromosomal studies of peripheral blood from epileptic patients treated with phenobarbital and/or diphenylhydantoin.
Fd. Chem. Toxic- 122: 1009,19.
- KNUUTILA, S.; SIIMES, M.: SIMELL, O.: TAMMISTO, P. y WEBBER, T. 1977:
Long term use of phenytoin: Effects on bone marrow chromosomes in man.
Mutation Research. 43: 309-315.
- LAFI A., PARRY E. M. y PARRY J.M. 1987:
The effects of benzodiazepines upon the fidelity of mitotic cell division in cultured chinese hamster (MTR01223).
Mutation Research 189: 319-332.
- LAMBERT, B.K. HANSSON: J. LINDSTEN: M. STEN y WERELIUS B. 1976:
Bromodeoxyuridine induced SCE in human lymphocytes. Hereditas. 83: 163 - 174.

LAMBERTS B. 1978:

Sister chromatid exchanges in lymphocyte culture of patients receiving chemotherapy for malignancy disorders.
Cancer Treat. Rev. 62: 350-352.

LATT, S.A. 1973:

Microfluorometric detection of desoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes.
Proc. Nat. Acad. Sci. 15: 11-55.

LATT, S.A., STETTEN G., SUERGENS L.A., BUCHANAN G.R., y GERALD P.S., 1975:

Induction by alkylating agents of SCE and chromatid breaks in fanconis anemia.
Proc. Nat. Acad.SCI: 72: 4066-4070.

LATT, S.A. SHRECH, R.R. 1980:

Sister chromatid exchanges analysis.
Hum. Gen. 32: 297-313.

LATT, S.A. 1981:

Sister chromatid exchanges formation.
Ann Rev. SCI-15: 11-55.

LEAL GARZA, C.H. Garza Chapa R. 1986:

Frecuencia de intercambio de cromátides hermanas (ICH) en obreros expuestos a plomo.
Arch Invest. Med. Vol. 17, No. 3: 267-276.

LEAL-GARZA C., GONZALEZ-GARZA T. y VALENCIANO CEDILLO G. 1990:

Frecuencia de Intercambio de Cromatides Hermanas (ICH) en ratones tratados con gosipol.
Arch. Invest. Méd (México), 21:217.

LUKE, G.A. TICE R.R., y DREW, R.T. 1988:

The effect of exposure regimen and duration on benzene induced bone-marrow damage in mice. I. Sex Comparision in DBA/2 mice.
Mutation Research; 203; 251.

MAIER, P. y SCHMID W. 1976:

Ten model mutagens evaluated by the micronucleus test.
Mutation Research. 40: 325-338.

MARTZ, F., GAILINGR, C. y BLAKE, D.A. 1977:

Phenytoin teratogenesis: Correlations between embyropathic effect and covalent binding of putative arene oxides metabolite in gestational tissue.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 203-231.

- MATTER, B.E. y SCHMID W. 1971:**
Trenimon induced chromosomal damage in bone marrow cells of six mammalian species evaluated by the micronucleus test.
Mutation Research. 12: 417-425.
- MATTER B.E. y GRANWILER J. 1975:** The micronucleus test a simple model, in vivo for the evaluation of drug induced chromosome aberration. Comparative studies with thirteen compounds.
Mutation Research. 29: 198-199.
- MIGLIORE L., PARRINI M. y LOPRIENO N. 1991:**
Micronucleated lymphocytes in people ocupationally exposed to potential environmental contaminant: The age effect.
Mutation Research 256, 13-20.
- MIGLIORE L., GUIDOTTI P., FAVRE C. 1991:**
Micronuclei in lymphocytes of young patients under antileukemic therapy.
Mutation Research, 263; 243-248.
- MILLER R.C. 1973:**
The micronucleus test as in vivo cytogenetic method Environ. Health Persp. 167-170.
- MONTES DE OCA LUNA, R.; LEAL GARZA, C.H. y BACA SEVILLA S. 1984:**
The effect of diphhenylhydantoin on the frequency of micronuclei in bone marrow polychromatic erythrocytes of mice.
Mutation Research. 141-183.
- MORALES RAMIREZ, P. 1980:**
Analysis in vivo of sister chromatid exchange in mouse bone marrow and salivary-gland cells.
Mutation Research. 74: 61.
- MURTY U.V.S.; MITRA A. B. LUTHRA, V.K. SINGH I. P. 1986:**
Sister chromatid exchanges in patients with precancerous lesions of cervix uteri.
Hum. Genet. 72: 37-42.
- OLIVEIRA DE, A.R. y MACHADO-SANTELLI, G.M. 1987:**
Diphenylhydantoin and mitotic spindole abnormalities in cultured mouse and human cells.
Mutation Research. 187: 91.
- PARODI, S. 1982:**
Increased in sister chromatid exchanges in the peripheral lymphocytes of cigarette smokers.
Tumor. 68: 287-289.

PERRY P. WOLFF, S. 1974: New giemsa method for the differential staining of sister chromatids
Nature 251: 156-158.

PICKER J.D. y FOX D.P. 1986:
Do cured foods produce micronuclei in buccal epithelial cells.
Mutation Research. 171: 185-188.

RENAULT J.Y., MELCION C. y CORDIER A. 1989:
Limb Bud Cell Culture for in vitro teratogen Screening: Validation of an improved Assessment Method Using 51 compounds.
Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis 9: 83-96.

RENNER H.W. 1982:
Sister chromatid exchanges induced by methylxanthines contained in coffee, tea and cocoa.
Experientia. 38: 600.

ROSIN M.P. y GERMAN J. 1985:
Evidence for chromosome instability in vivo in bloom syndrome: Increased numbers of micronuclei in exfoliated cells.
Hum. Genet. 71: 187-191.

ROSSI, V. y CARANTI, S. 1987:
Correlations between embryotoxic and genotoxic effects of phenytoin in mice.
Teratogen. Carcinogen and Mutagen. 7: 159-163.

SEZZANO, P. RAIMONDI, A.; ARBOIX, M. y PANTOROTTO C. 1982:
Mutagenicity of diphenylhydantoin and some of its metabolites towards *Salomonella typhimurium* strains
Mutation Research 103: 219.

SCHAUMANN, B.; JOHNSON, S.B.; WANG, M.; y VAN BRUNT, S. 1985:
Sister chromatid exchanges in adult epileptic patients on phenytoin therapy.
Environ, Mutagen. 7: 711,19

SCHMID, W.D., ARAKAKI T., BRESLAN N.A., y CULBERSTON J.C. 1971:
Chemical mutagenesis, the chinese hamster bone marrow as an in vivo test system. I. cytogenetic results in basic aspects of the methodology, obtained with alkylating agents.
Hum. Gen. 11: 103-118.

SCHMID, 2. 1975:
The micronucleus test
Mutation Research. 31: 9-15

- SHORE C.O., VORHEES C.V., BORNSCHEIN R.I. y STEMMER K. 1983:
Behavioral consequences of prenatal diazepam exposure in rats.
Neurobehav, Toxicol-Teratol 5: 565-570.
- SOLOMON, E. y BOBROW M. 1975:
Sister chromatid exchanges a sensitive assay of agents damaging
human chromosomes.
Mutation Research. 30: 273-278.
- SOPER, A. 1984:.
Sister chromatid exchanges in asociation with ocupational
exposure a ethilen oxyde.
Mutation Research. 129: 89-102.
- STENCHEVER M., FRANKEL R.B., JAVIS J.A. 1970:
Effect of diazepam on chromosomes of human leukocytes in vivo,
Am.J. Obstet Gynecol. 107, 456-460.
- STICH H.F. y ROSIN M. P. 1984:
Micronuclei in exfoliates human cells as a tool for studies in
cancer risk and cancer intervention.
22: 241-253.
- TAYLOR, J.H. y WOODS, P.S. 1957:
Organization and duplication of chromosomes as revealed by
autoradiographic studies using tritium-labelled thymidine,
Proc. Nat. Acad. Sci. 43: 122-128.
- WEBER E., BIDWELL K., OWDS M., y LEGATOR S., 1975:
And evaluation of the micronuclei test using triethylene melamine
trimethylphosphate, hycanthone and niridazole.
Mutation Research. 28: 101-106.
- XU W., 1990, ALDER I.D. 1991:
Clastogenic effects of known and suspected spindle poisons studied
by chromosome analysis in mouse bone marrow cells.
Mutagenesis, 6(1): 47-53.
- ZAKHAROV, A. EGOLINA, N.A. 1972:
Differential spirilization along mammalian mitotic chromosomes I.
BrdU revealed differentiation in chinese hamster chromosomes.
Chromosomes. 38: 341-365.

VIII.- A P E N D I C E

CUADRO 1

Intercambio de cromátides hermanas (ICH) por células de médula ósea de ratones tratados con tres dosis de difenilhidantoinato de sodio y de los grupos control, para ambos sexos.

DOSIS (mg/kg)	SEXO	ICH/CEL ($\bar{X} \pm D.E.$)	No. DE CELULAS ANALIZADAS	ICH/CEL (M+H) ($\bar{X} \pm D.E.$)
Control Negativo (NaCl 0.85%)	M (1)	4.06 ± 0.85	70	4.26 ± 1.29 (A)
	H (I)	4.45 ± 1.57	75	
1	M (2)	4.36 ± 1.74	75	4.60 ± 1.62 (B)
	H (II)	4.84 ± 1.46	75	
10	M (3)	4.89 ± 0.94	70	5.41 ± 1.71 (C)
	H (III)	5.89 ± 2.10	75	
20	M (4)	5.59 ± 1.29	70	5.75 ± 2.23 (D)
	H (IV)	5.91 ± 2.85	75	
Control Positivo MMC (0.5 mg/kg)	M (5)	6.14 ± 1.19	73	5.97 ± 1.74 (E)
	H (V)	5.80 ± 2.13	75	
Población Total Ma- chos.		5.01 ± 1.46	358	
Población Total Hem- bras.		5.38 ± 2.16	375	
Población Total (M + H)		5.20 ± 1.86	733	

M = Machos	Significancia por grupos de tratamiento:
H = Hembras	(M) = 1=2≠3=4=5 (p < 0.05)
D.E. = Desviación Estándar.	(H) = I=II≠III=IV=V (p < 0.05)
	(M+H) = A=B≠C=D=E (p < 0.05)

CUADRO 2.

Intercambio de cromátides hermanas (ICH) por células de médula ósea de ratones tratados con tres dosis de Diazepam y de los grupos control, para ambos sexos.

DOSIS (mg/kg)	SEXO	ICH/CEL ($\bar{X} \pm D.S$)	No.DE CELULAS ANALIZADAS	ICH/CEL, (M+H) ($\bar{X} \pm D.E.$)
Control Negativo (NaCl 0.85%)	M (1)	3.58 ± 1.66	150	3.57 ± 1.50 (A)
	H (I)	3.56 ± 1.28	150	
0.1	M (2)	3.33 ± 1.66	150	3.42 ± 1.56 (B)
	H (II)	3.52 ± 1.46	150	
0.2	M (3)	4.20 ± 1.85	150	4.06 ± 1.79 (C)
	H (III)	3.92 ± 1.73	150	
0.4	M (4)	4.87 ± 1.62 *	150	4.43 ± 1.62 (D)
	H (IV)	3.99 ± 1.51	150	
Control	M (5)	7.48 ± 2.22 *	150	7.04 ± 2.20 (E)
Positivo MMC (0.5 mg/kg)	H (V)	6.59 ± 2.10 *	150	
Población Total Ma- chos.		4.69 ± 2.35	750	
Población Total Hem- bras.		4.31 ± 2.00	750	
Población Total (M + H)		4.50 ± 2.19	1500	

M = Machos

H = Hembras

D.E. = Desviación
Estándar.

* = Significativo

Significancia por grupos de tratamiento:

(M) = 1 = 2 ≠ 3 ≠ 4 ≠ 5 (p < 0.05)

(H) = I = II = III = IV ≠ V (p < 0.05)

(M+H) = A = B ≠ C = D ≠ E (p < 0.05)

CUADRO 3

Porcentaje de células con micronúcleos (MN) por célula en médula ósea de ratones tratados con tres dosis de Diazepam y de los grupos control, para ambos sexos.

DOSIS (mg/kg)	SEXO	MN (%)	MN (%) (M+H)
Control Negativo (NaCl 0.85%)	M (1)	1.35 *	1.02 (A)
	H (1)	0.76	
0.1	M (2)	1.98	2.06 (B)
	H (II)	2.13	
0.2	M (3)	2.19	2.03 (C)
	H (III)	1.92	
0.4	M (4)	2.31	2.18 (D)
	H (IV)	2.07	
Control Positivo MMC (0.5 mg/kg)	M (5)	2.99	3.05 (E)
	H (V)	3.10	
Población Total Ma- chos.		2.12	
Población Total Hem- bras.		1.88	
Población Total (M + H)		1.99	
M = Machos		Significancia por grupos de tratamiento:	
H = Hembras		(M) = 1 ≠ 3 = 2 = 4 ≠ 5	(p < 0.05)
* = Significativo		(H) = I ≠ II = III = IV ≠ V	(p < 0.05)
		(M+H) = A ≠ B = C = D ≠ E	(p < 0.05)

CUADRO 4

Frecuencia de EPC/6000 Eritrocitos (Er), eritrocitos policromáticos (EPC) y micronúcleos en médula ósea en ratones tratados con tres dosis de diazepam y los grupos control para ambos sexos.

DOSIS (mg/kg)	SEXO		EPC/6000 (M+H)	EPC/12000 (M+H)	% EPC	% EPC (M+H)
Control Negativo (NaCl 0.85%)	M	(1)	2287 *	5160	0.38	0.43
Diazepam 0.1	H	(1)	2873		0.47	
	M	(2)	2262 *	4796	0.37	0.39
	H	(II)	2534		0.42	
0.2	M	(3)	2093 *	5051	0.34	0.42
	H	(III)	2598		0.49	
0.4	M	(4)	2243 *	4795	0.37	0.39
	H	(IV)	2552		0.42	
Control Positivo MMC (0.5 mg/kg)	M	(5)	1667	3276	0.27	0.25
	H	(V)	1609		0.26	
Población Total Ma- chos.			10552 *		0.35	
Población Total Hem- bras.			12526		0.41	
Población Total (M + H)					0.38	

M = Machos

H = Hembras

* = Significativo

Significancia por grupos de tratamiento:

(M) = 1 ≠ 2 = 3 = 4 ≠ 5 (P < 0.05)

(H) = I ≠ II = III = IV ≠ V (P < 0.05)

(M+H) = A ≠ B = C = D ≠ E (P < 0.05)

CUADRO 5

Comparación de los resultados obtenidos en las pruebas de micronúcleos (PM) e Intercambio entre Cromátides hermanas (ICH), en ratones tratados con Diazepam.

DOSIS (mg/kg)	SEXO	ICH/CEL (X ± D.E.)	ICH/CEL (M+N) (X ± D.E.)	MN %	MN (M+H) %
Control	M (1)	3.58 ± 1.66	3.57 ± 1.50 (A)	1.35*	1.02 (A)
Negativo (NaCl 0.85%)	H (1)	3.56 ± 1.28		0.76	
Diazepam 0.1	M (2)	3.33 ± 1.66	3.42 ± 1.56 (B)	1.98	2.06 (B)
	H (II)	3.52 ± 1.46		2.13	
0.2	M (3)	4.20 ± 1.85	4.06 ± 1.79 (C)	2.19	2.03 (C)
	H (III)	3.92 ± 1.73		1.92	
0.4	M (4)	4.87 ± 1.62	4.43 ± 1.62 (D)	2.31	2.18 (D)
	H (IV)	3.99 ± 1.51		2.07	
Control	M (5)	7.48 ± 2.22 *	7.04 ± 2.20 (E)	2.99	3.05 (E)
Positivo MMC (0.5 mg/kg)	H (V)	6.59 ± 2.10 *		3.10	
Población Total Ma- chos.		4.69 ± 2.35 *		2.12	
Población Total Hem- bras.		4.31 ± 2.00		1.88	
Población Total (M + H)		4.50 ± 2.19		1.99	

M = Machos

H = Hembras

* = Significativo

D.E.= Desviación
Estándar.

(p < 0.05) grupos de tratamiento:

PARA ICH (M): 1 = 2 ≠ 3 ≠ 4 ≠ 5

(H): I = II = III = IV ≠ V

(M+H): A = B ≠ C = D ≠ E

PARA MN (M): 1 ≠ 3 = 2 = 4 ≠ 5

(H): I ≠ II ≠ V = III = IV

(M+H): A ≠ B = C = D ≠ E



FIGURA # 1. INTERCAMBIO DE CROMATIDES HERMANAS (ICH) EN METAFASES OBTENIDAS DE MEDULA OSEA.

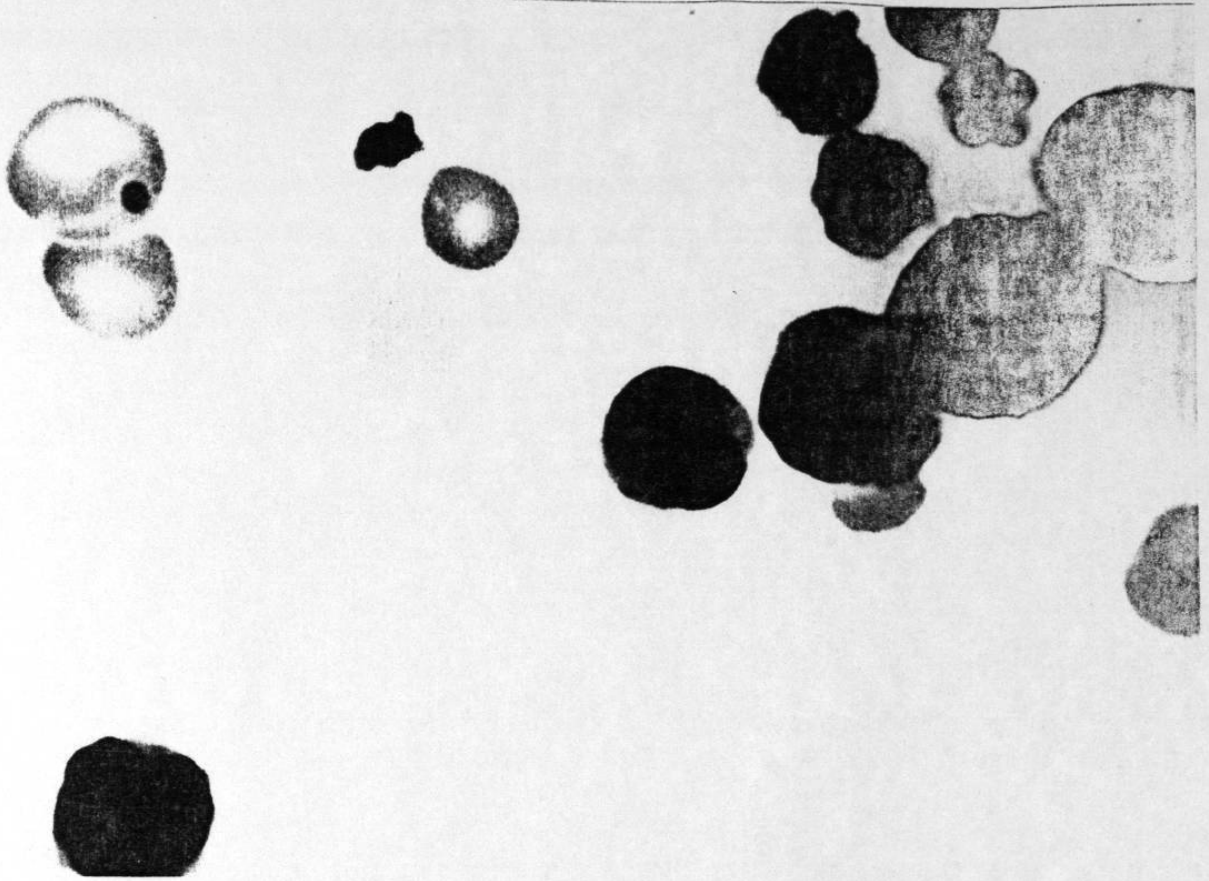


FIGURA # 2. PREPARACION DIRECTA DE MEDULA OSEA DE RATON MOSTRANDO LOS MICRONUCLEOS EN ERITROCITOS POLICROMATICOS TEÑIDOS CON EOSINA-AZUL DE METILENO.

