

Trabajo de Revisión

Toxicología Experimental

Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos *in vitro*

Daniel Francisco Arencibia Arrebola ¹, Luis Alfredo Rosario Fernández ²

¹Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia

²Licenciado en Microbiología.

Centro de Química Farmacéutica (CQF), Calle 200 y Avenida 21, Atabey, Playa, Apartado Postal 16042, Ciudad de La Habana, Cuba.

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola.

Email: darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

Las investigaciones relacionadas con el tema de la genotoxicidad adquieren cada día mayor importancia a nivel mundial, debido al creciente deterioro del ambiente al que se encuentra expuesto el hombre moderno. Existen tres razones fundamentales que justifican la preocupación por la exposición del hombre a los agentes mutagénicos. Primero, el incremento en el grado de mutación de las células germinales (óvulos, espermatozoides y sus precursores) lo cual puede provocar un aumento de la incidencia de las enfermedades genéticas en futuras generaciones. Segundo, la existencia de una estrecha relación entre la inestabilidad genómica de células somáticas con el cáncer y las enfermedades degenerativas crónicas. Tercero, el origen ambiental del cáncer. Ello orienta a la utilización de ensayos a corto plazo los cuales, informan en poco tiempo acerca de la actividad mutagénica de dichas sustancias y en algunos casos brindan información suficiente para establecer los niveles de seguridad para el hombre. En estos ensayos de genotoxicidad se emplea un gran número de sistemas biológicos dentro de los cuales se encuentran: virus, bacterias, hongos, cultivos de células eucariotas, plantas, insectos y mamíferos. Para lo cual nos trazamos como objetivo de este trabajo dar una versión actualizada sobre los ensayos de toxicidad *in vitro* y dentro de esta rama en particular ahondar sobre el uso del ensayo cometa y el ensayo de micronúcleos.

Palabras clave: Genotoxicidad; ensayo de cometa; ensayo de micronúcleos; *in vitro*; actualización.

Abstract

Current about comet and micronuclei assays *in vitro*.

The research related with the genotoxicity topic acquire every day bigger importance at world level, due to the growing deterioration of the environment that is exposed the modern man. Three fundamental reasons exist that justify the concern for the exhibition from the man to the mutagenics agents. First, the increment in the degree of germinal cells mutation (ova, sperms and their precursors) that which can cause the increase of the genetic illnesses incidence in the future generations. Second, the narrow relationship existence among the uncertainty of somatic cells genomic with cancer and chronic degenerative illnesses. Third, the environmental origin of the cancer. It bears to the use of short term assays and they inform in little time about the mutagenic activity of this substances, in some cases they offer enough information to establish the levels of security for the man. These genotoxicity assays used a great number of biological systems inside which are: virus, bacterial, fungus, eukaryote cells cultivations, plants, insects and mammals. For that which we trace ourselves as objective of this work to give a current version on the *in vitro* toxicity assays and inside this branch to deepen on the use of the comet and micronucleis assays.

Key words: Genotoxicity, comet assay, micronuclei assays, *in vitro*, current.

Introducción

La genética toxicológica tiene sus inicios en el año 1927, cuando Mueller demuestra la capacidad de los rayos X para inducir mutaciones en *Drosophila melanogaster*. Años más tarde en 1949, Auebach descubre las propiedades mutagénicas del gas mostaza, descubrimiento que permitió incrementar el concepto de mutagénesis.

Durante las décadas del 50 y 60 se alcanzan la mayor parte de los conocimientos básicos acerca de la estructura y replicación del ADN, código genético, los mecanismos de la síntesis proteica y la reparación del ADN. No en vano, esta época se describe como la edad de oro de la Genética Molecular.

La sociedad de Mutagénesis Ambiental es fundada en 1969, debido a la preocupación de muchos investigadores por el impacto genético que podría acarrear la proliferación de contaminantes químicos en el ambiente, producto de la actividad humana. Es en este mismo año que es reconocida la Toxicología Genética, como disciplina científica.

Décadas más tarde, el desarrollo de la denominada tecnología del ADN recombinante ofreció metodologías que han resultado fundamentales en el conocimiento directo de la estructura y configuración del genoma, la identificación de genes específicos, la determinación de las alteraciones generadas en la información genética y su relación con la inducción del cáncer y otras enfermedades de base genética.^{1,2}

Las investigaciones relacionadas con el tema de la genotoxicidad adquieren cada día mayor importancia a nivel mundial, debido al creciente deterioro del ambiente al que se encuentra expuesto el hombre moderno.^{3,4} Existen tres razones fundamentales que justifican la preocupación por la exposición del hombre a los agentes mutagénicos. Primero, el incremento en el grado de mutación de las células germinales (óvulos, espermatozoides y sus precursores) lo cual puede provocar el aumento de la incidencia de las enfermedades genéticas en futuras generaciones. Segundo, la existencia de una estrecha relación entre la inestabilidad genómica de células somáticas con el cáncer y las enfermedades degenerativas crónicas. Tercero, el origen ambiental del cáncer.⁵⁻⁷

Es conocido por la comunidad científica que la introducción en el mercado de un gran número de nuevos productos ha tenido una doble consecuencia en nuestro entorno. Aunque muchos de estos compuestos han contribuido a mejorar la calidad de vida, otros están relacionados con determinados riesgos por su toxicidad.⁸ La legislación actual exige que, previamente al registro y comercialización, se evalúe la seguridad de todo tipo de producto, por lo que resulta imprescindible utilizar ensayos de toxicidad predictivos, con el fin de anular o minimizar el uso de compuestos en los que la relación riesgo / beneficio los declare indeseables para la sociedad.^{7, 9}

La gran cantidad de nuevos productos que son anualmente lanzados al mercado dificulta su total evaluación empleando ensayos en roedores por ser estas pruebas muy largas y costosas. Ello orienta a la utilización de ensayos a corto plazo los cuales, informan en poco tiempo acerca de la actividad mutagénica de dichas sustancias y en algunos casos brindan información suficiente para establecer los niveles de seguridad para el hombre.⁷ En estos ensayos de genotoxicidad se emplea un gran número de sistemas biológicos dentro de los cuales se encuentran: virus, bacterias, hongos, cultivos de células eucariotas, plantas, insectos y mamíferos. Se han propuesto más de 200 ensayos de genotoxicidad, de los cuales se ha obtenido mucha información importante.¹⁰

Para lo cual nos trazamos como objetivo de este trabajo dar una versión actualizada sobre los ensayos de toxicidad *in vitro* y dentro de esta rama en particular, ahondar sobre el uso del ensayo cometa y el ensayo de micronúcleos.

Desarrollo

1. Estudios genotóxicos *in vitro*.

Las pruebas de genotoxicidad son ensayos que evidencian las alteraciones causadas al material genético, de manera directa o indirecta, por agentes ambientales, tanto en células somáticas como germinales.¹⁰ La adecuada determinación de las actividad genotóxica exige la disponibilidad de métodos de detección específicos.^{7,11} El primer paso para realizar los estudios de evaluación genotóxica es la ejecución de ensayos *in vitro* que permiten evaluar el potencial mutagénico de los compuestos químicos en breve tiempo. Estos ensayos de genotoxicidad a corto plazo resultan de gran utilidad porque permiten detectar mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas, daño primario a la estructura del ADN, transformaciones celulares u otras afectaciones, los cuales son inducidos por compuestos químicos o físicos que abundan en el ambiente.¹²

La evaluación genotóxica para compuestos de nueva síntesis y fitofármacos es de carácter obligatorio a nivel internacional.¹³ La diversidad de efectos deletéreos a los que está expuesto el material hereditario es imposible de detectar a través de un único sistema de ensayo. El amplio espectro de mutaciones que pueden originarse no sería abarcado en un ensayo aislado y ofrecería un resultado poco preciso. Resulta imprescindible usar un grupo de ensayos *in vitro* e *in vivo* que permitan una correcta extrapolación del efecto genotóxico de la sustancia de interés para poder predecir con certeza un posible efecto carcinogénico del compuesto en estudio y realizar una correcta extrapolación de los hallazgos detectados, al hombre.

2. Linfocitos humanos.

Los linfocitos humanos periféricos representan una población celular en la cual el ADN está predominantemente en la etapa pre-sintética del ciclo celular (fase G₀). El 0.2% o menos de los linfocitos periféricos se encuentran en el ciclo celular auto-sintético y estas células probablemente provienen del grupo de grandes células linfoides representando linfocitos estimulados o células plasmáticas inmaduras. Las células de este grupo pueden dar lugar a las mitosis raras encontradas ocasionalmente en la sangre periférica. Los linfocitos

humanos poseen un núcleo denso y citoplasma escaso. Tienen un diámetro de alrededor de 6 μm y un volumen estimado de 110 μm^3 . Se distinguen dos tipos principales de linfocitos, las células T y las células B. Ambos tipos de células se originan a partir de células madre incompetentes que se encuentran en el saco vitelino y eventualmente están ubicadas en la médula ósea. Estas células madre indiferenciadas, migran hacia el timo y otros órganos linfoides primarios, se multiplican allí y probablemente por mutaciones somáticas, dan lugar a los linfocitos de "larga vida" que circulan por el torrente sanguíneo.¹⁴

Sobre la base de sus marcadores de superficie, las células T y B comprenden una mezcla de células vírgenes (no estimuladas) y de memoria (estimadas) con diferentes expectativas de vida, así como, con roles diferentes en el proceso inmunológico.¹⁵

El número total de linfocitos en un adulto saludable puede ser aproximadamente 500 x 10⁹, alrededor del 2% (10 x 10⁹) están presentes en la sangre periférica y el resto se ubican en otros tejidos con concentraciones particulares en el timo, nodos linfáticos, el tejido linfático del intestino, el bazo y la médula ósea.

El tiempo de vida de un linfocito es variable y la definición de expectativa de vida significa que la célula muere o se divide. Al nacer más del 90% de las células T son células vírgenes o no estimuladas, en la adultez este valor cae al 50% por conversión en células memoria o estimuladas.

Las células no estimuladas se dividen cada 3.5 años, mientras que las de memoria se dividen como promedio cada 22 semanas. Las células de memoria pueden revertir a fenotipo no estimulado pero solo después de 3.5 años como promedio, siendo de memoria. Una célula de memoria tiene 8 veces más posibilidades de dividirse que de revertir a la clase no estimulada.

Los linfocitos con daño estable declinan muy lento, lo cual conlleva a bajos estimados de sus tasas de muerte. El tiempo promedio de muerte de una célula T es estimado en alrededor de 20 años y este valor se aplica a las células virgen y de memoria.¹⁴

Novell (1960) fue el primero en demostrar que los linfocitos humanos periféricos pueden ser estimulados por la fitohemaglutinina (FH) *in vitro*, mientras que Cartairs (1962) demostró que los "linfocitos pequeños" son las células diana para la iniciación mitogénica por

la FH. Las células T, mayormente los subtipos CD4 y CD8 resultan ser las células mejor estimuladas por la FH *in vitro* y son empleadas en múltiples estudios biológicos.¹⁶

La FH es una proteína derivada de la planta de frijol *Phaseolus vulgaris*, que estimula un amplio espectro de células T (mitógeno). Bajo la influencia de este mitógeno, los linfocitos son transformados a células blastoides y el volumen de toda la célula se incrementa. Los volúmenes citoplasmático y nuclear se incrementan de $\approx 50 \mu\text{m}^3$ a $350 \mu\text{m}^3$ y de $\approx 50 \mu\text{m}^3$ a $170 \mu\text{m}^3$ respectivamente, después de la estimulación. Durante este período de 48 horas, la cantidad de heterocromatina decrece del 70% al 13 %.

Los medios de cultivo más comunes que se utilizan para el cultivo de estas células son: Hams F10, Hams F12, RPMI (Roswell Park Memorial Institute, RPMI-1640), medio TC-199 o medio mínimo esencial (MEM).

Para interpretar las aberraciones cromosómicas inducidas *in vivo* en humanos, resulta de gran importancia conocer si el grupo de linfocitos periféricos pertenece al grupo de redistribución, lo cual significa que los linfocitos son capaces de dejar la sangre y pasar al bazo, los nódulos linfáticos y otros tejidos y volver a incorporarse a la sangre. El tiempo promedio que un linfocito del grupo de redistribución está presente en la sangre es aproximadamente 30 minutos. Se ha estimado que cerca del 80% de los linfocitos (400×10^9), pertenecen al grupo de redistribución y que el tiempo total de recirculación es de cerca de 12 horas. En este sentido los linfocitos con aberraciones cromosómicas que han sido inducidas en cualquier parte del cuerpo estarán eventualmente en la sangre periférica, entonces, empleando los linfocitos de sangre periférica como modelo experimental no solo puede detectarse el daño cromosómico que ha sido inducido en los linfocitos en la sangre periférica, sino también aquellos que han sido inducidos en cualquiera de los órganos donde estas células se distribuyen en el cuerpo.¹⁴

3. Fracción Microsomal Hepática (S₉).

Todas las sustancias genotóxicas no son activas por si mismas. Algunas de estas deben ser convertidas en intermediarios reactivos capaces de interactuar con los sitios nucleofílicos de los constituyentes celulares y otras macromoléculas, valiéndose para ello de

reacciones de activación, catalizadas por sistemas enzimáticos celulares. Estos compuestos son denominados genotóxicos indirectos.

Las sustancias genotóxicas que poseen propiedades intrínsecas necesarias para interactuar con blancos celulares críticos e iniciar procesos genotóxicos se denominan genotóxicos directos.

Los compuestos genotóxicos indirectos por el metabolismo de organismos susceptibles, pueden no ser activados en aquellos sistemas biológicos que carezcan de las enzimas necesarias para convertirlos en sus formas genotóxicas. Las enzimas que intervienen en el metabolismo de estas sustancias los activan e inactivan por mecanismos de toxificación o detoxificación respectivamente.^{6,17, 18}

Los ensayos genotóxicos *in vitro* carecen de un sistema de activación metabólica como lo constituye el hígado en los organismos superiores. Con el objetivo de mimetizar la función metabolizadora de este órgano, en los ensayos *in vitro* se utiliza una fracción microsomal hepática (S9), la cual contiene enzimas de fase I fundamentalmente, que permite predecir el posible comportamiento del compuesto a evaluar a su paso por la vía hepática.

En la obtención de la fracción microsomal S9 han sido utilizadas diferentes especies de roedores, especialmente las líneas de ratas Sprague-Dawley y Wistar, ya que estas son de fácil manipulación, obtención y su hígado presenta un buen tamaño.

En la preparación de la mezcla de activación metabólica se utilizan como cofactores el NADP y la glucosa-6-fosfato, sustrato de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Se plantea además que la adición de otros cofactores como: riboflavina, NAD y el ATP, aumentan la actividad mutagénica de algunos compuestos.¹⁹

4. Ensayo Cometa.

Ostling y Johanson en el año 1984, fueron los primeros en desarrollar una técnica de electroforesis en microgeles para detectar el daño al ADN a nivel de células individuales.²⁰ En esta técnica las células son embebidas en agarosa y son añadidas en láminas de microscopio para ser sometidas a una electroforesis neutral, tras la lisis en presencia de sales y detergentes. Las células con una elevada frecuencia de rupturas de doble cadena (RDC) mostraron una significativa migración del ADN hacia el ánodo.

Las condiciones neutrales limitaron grandemente la utilidad del ensayo es por esto que en 1988, Singh y colaboradores introdujeron una técnica en microgeles que involucra la electroforesis en condición alcalina (pH 13) para detectar el daño al ADN en células individuales.²¹ En estas condiciones de pH la incrementada migración del ADN es asociada con elevados niveles de rupturas de simples cadenas (RSC) asociadas con sitios de reparación por escisión incompletos y sitios lábiles al álcali (SLA). Como la mayoría de los agentes genotóxicos inducen en mayor magnitud RSC y / o SLA que RDC, esta versión del ensayo tiene mayor importancia en la identificación de los agentes genotóxicos.

Dos años más tarde Olive en el año 1990, introdujo otra versión alcalina de este ensayo, en la cual la electroforesis del ADN se ejecuta a pH 12.3, con esta variante se detectan SLA convertidos en RSC.²²

En general el principio básico del ensayo, es la migración del ADN en una matriz de agarosa bajo condiciones de electroforesis. Luego, al ser observada la célula al microscopio (por fluorescencia o por tinción con plata del material nuclear), presenta la apariencia de un cometa, con una cabeza (región nuclear) y cola (formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección del ánodo) por lo que este ensayo es también conocido como ensayo Cometa, debido al patrón de migración del ADN que se produce en las células dañadas.

La detección de la migración del ADN alterado depende de varios parámetros, tales como: la concentración de la matriz de agarosa, el pH, la temperatura y duración del desenrollamiento, voltaje, amperaje y duración de la electroforesis.²³

El protocolo de este ensayo ha quedado bien establecido para detectar daño al ADN, específicamente aquellos producidos por las rupturas de cadena, la formación de sitios lábiles al álcali, los entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteínas y más recientemente para la evaluación de los mecanismos de reparación de daño oxidativo en el ADN en células eucariotas obtenidas tanto de estudios *in vivo* como *in vitro*.²⁴⁻²⁶

El uso de determinadas enzimas o anticuerpos permiten usar el ensayo Cometa en la determinación de mecanismos específicos de acción genotóxica, dentro de ello se encuentra el uso de las enzimas endonucleasa III o FPG para la detección del daño oxidativo en las

bases pirimidínicas o púricas respectivamente²⁷ así como el uso de anticuerpos específicos de lesión para detectar el daño inducido por la radiación UV.²⁸

La versión acelular o subcelular del ensayo Cometa resulta de gran interés en los estudios de toxicología genética. En esta variante del ensayo el tratamiento se realiza sobre el ADN desnudo, por tanto una alteración en la migración del ADN bajo estas condiciones indica que la sustancia de prueba es capaz de inducir daño al material genético independiente a la citotoxicidad y al efecto que puedan ejercer las barreras biológicas.^{23, 26}

Casi desde sus inicios el ensayo se empleó en el estudio de los procesos de reparación lo cual solo implicaba incubar un tiempo sin el agente inductor del daño, recientemente ha sido desarrollada una variante novedosa para medir la reparación.²⁹

Si bien desde 1993 se publicaron estudios empleando este ensayo para la detección de apoptosis cuantificando las células altamente dañadas (más del 85 % del ADN migrado), este tipo de daño se observaba con 5 minutos de tratamiento con H₂O₂ en frío y en el tiempo 0 después de irradiar a altas dosis.^{23,26} En los años posteriores se publicaron dos métodos que eliminando el paso de electroforesis e incrementando el % de la agarosa han logrado obtener mejor correlación con otros ensayos específicos de detección de apoptosis.³⁰

En el ensayo cometa una incrementada migración del ADN (cometas categoría 4) puede además, estar asociada con la fragmentación del ADN que tiene lugar durante los procesos de necrosis o apoptosis.³¹ En estos casos se deben realizar ensayos de reparación para determinar si el daño es reversible y ensayos específicos para discernir si en el daño genotóxico el proceso de apoptosis está involucrado.²⁶ Roser y colaboradores en el año 2001, demostraron que el radio apoptosis / cometa puede variar en función del tipo celular, la preparación celular, tipo de compuesto y la concentración estudiada.³²

Comparado con otros ensayos de genotoxicidad, el ensayo Cometa se distingue por su: 1) Demostrada sensibilidad para detectar bajos niveles de daño al ADN (0.01 Gy), 2) Rápida realización (resultados en pocos días), 3) Análisis de los datos a nivel de células individuales, 4) Requiere un pequeño tamaño de muestra (pocas células), 5) Flexibilidad y bajo costo, 6) Aplicable a cualquier población de células eucariotas.^{23, 26} Este grupo de

ventajas justifica su amplio uso en la evaluación genotóxica *in vitro*, de químicos industriales, agroquímicos, fármacos, así como, en el biomonitorio ambiental y humano.²⁴⁻²⁶

5. Ensayo de Micronúcleos.

Heddle (1973) y Schmid (1975) fueron los primeros investigadores que de manera independiente propusieron que: un ensayo alternativo y simple para determinar el daño cromosómico *in vivo* era el conteo de micronúcleos (MN) en poblaciones celulares en división.

Los MN son expresados en células en división que contienen rupturas de cromosomas por pérdida de los centrómeros (fragmentos acéntricos) y / o pérdida de cromosomas completos, en ambos casos son incapaces de viajar con el resto de los cromosomas a través del huso mitótico, a los polos del núcleo celular durante la anafase de la división celular. En la telofase las estructuras cromosómicas son envueltas por la membrana nuclear y, tanto los cromosomas completos, como los fragmentos de cromosomas retardados, asumen gradualmente la morfología de un núcleo en interfase con la excepción de que son más pequeños que el núcleo principal de la célula, de aquí el término de MN.³³

En ocasiones son observados, además, puentes nucleoplásmicos entre los núcleos de las células binucleadas. Estos se originan de cromosomas dicéntricos y proveen una medida complementaria del reordenamiento cromosómico.³³

Teniendo en cuenta que los MN solo pueden ser expresados en células eucariotas en división; que el ensayo no puede ser usado cuantitativamente en poblaciones celulares que no se estén dividiendo o en aquellas donde la cinética de división no sea bien conocida y que las células se dividen a diferentes tasas *in vivo* e *in vitro* dependiendo de diferentes condiciones fisiológicas, genéticas y de micronutrientes.

Se requería contar con un método que pudiera distinguir dentro de una población celular, las células que no se dividen de las células que están en mitosis, y dentro de estas últimas las que hayan completado una división nuclear. En respuesta a esta problemática numerosos métodos fueron propuestos basados en la citometría de flujo y el marcaje del ADN, pero el método que ha encontrado mayor aceptación debido a su simplicidad y confiabilidad respecto a sus efectos sobre el daño genético en la línea germinal es el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citoquinesis (MNBC).

En el ensayo de MNBC las células que han completado una división nuclear son bloqueadas durante la citoquinesis usando la citocalasina-B (cit-B) y son consecuentemente identificadas por su apariencia binucleada.³³

La cit-B es un inhibidor de la polimerización de la actina, proteína requerida para la formación del anillo de microfilamentos que constriñe el citoplasma entre los núcleos hermanos durante la citoquinesis.³⁴ El uso de la cit-B permite la acumulación de la mayoría de las células en división en la fase binucleada dentro de la población celular en división, a pesar de su grado de sincronía y la proporción de células en división.

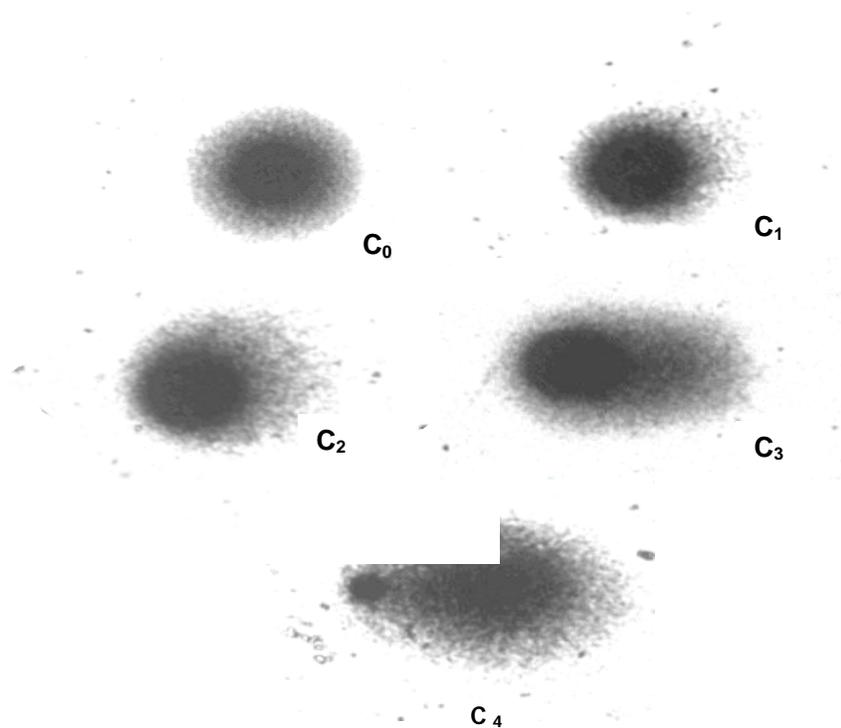
Los MN son contados solo en las células binucleadas, lo cual permite realizar comparaciones confiables de daño cromosómico entre poblaciones celulares que difieren en la cinética de división nuclear. El método fue inicialmente desarrollado para linfocitos humanos en cultivo,^{35, 36} pero más tarde fue adaptado a otros tipos de cultivos celulares como son los de tumores sólidos y los de médula ósea.

Recientemente ha sido propuesto que el ensayo de MN sea usado en lugar del análisis de metafases para el ensayo de genotoxicidad de nuevos agentes químicos.³³ Esta propuesta esta basada en el grupo de ventajas que tiene el ensayo de MN sobre el análisis de metafases. Dentro de ellas se distinguen las siguientes: los micronúcleos en las células en interfase pueden ser contados mucho más objetivamente que las aberraciones cromosómicas en células en interfase; no hay un requerimiento riguroso para el entrenamiento detallado del personal competente para este ensayo; esto permite mayor rapidez en el conteo de las preparaciones, además, como se pueden contar miles de células por tratamiento eso le imparte mayor poder estadístico al ensayo. Por otra parte como los micronúcleos pueden contener cromosomas completos, se pueden detectar agentes inductores de aneuploidía, los cuales son muy difíciles de estudiar en el ensayo de aberraciones cromosómicas convencionales.³³

El ensayo de MNBC en linfocitos humanos puede realizarse a partir de un cultivo de linfocitos aislados de sangre periférica o pueden obtenerse de un cultivo de sangre completa. En los ensayos de genotoxicidad *in vitro* se debe tener en cuenta que cada compuesto químico debe ser estudiado por su potencial genotóxico en las diferentes etapas del ciclo

celular. Como los linfocitos de sangre periférica humana se encuentran en la fase G₀ cuando son colectados, ellos son ideales para la determinación del daño en esta etapa. Sin embargo, como se espera que las células sean más sensibles a los efectos genotóxicos durante las fases S1, G2 y M es esencial exponer los cultivos celulares cuando la mayoría de las células se están dividiendo.³³

Figura 1. Diferentes niveles de daño al ADN (0-4) que pueden ser detectados con el ensayo cometa.



Referencias Bibliográficas

1. Rossner P, Binková B, Radim J. The influence of occupational exposure to PHAs on the blood plasma levels of levels of p53 and p21waf1 proteins. *Mutat. Res* 2003; 535: 87-94.
2. Rodin S.N, Rodin A.S. On excess of G : T transversions in the p53 gene in lung cancer cell lines. *Mutat Res* 2004; 545: 141-144.
3. Mahata J, Zbasu A, Ghoshal S.k, Sarkar J.N, Poddar G. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal. India. *Mut. Res* 2003; 534: 133-143.
4. Rajaguru P, Suba S, Palanivel M, Kalaiselvi K. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environmental and Molecular mutagenesis* 2003; 41: 85-91.
5. Rojas A, Ojeda M.E, Barraza X. Congenital malformations and pesticide exposure. *Rev. Med. Chile* 2000; 128: 399-404.
6. Hecht S.S. Tobacco smoke carcinogens and breast cancer. *Environmental and molecular Mutagenesis* 2002; 39: 119-126.
7. Mortelmans K, Rupa D. Current Issues in genetic Toxicology Testing for Microbiologist. *Advances in Applied Microbiology* 2004; 56: 379-397.
8. Barrueco C, Guadaño A, Caballo C, Herrera A, Valcarse E, de la Peña E. Evaluación Mutagénica y Genotóxica de los productos Químicos. En: de la Peña, E; Burguete, I; Guadaño, A. *Evaluación Mutagénica y Genotóxica*. Ed: Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental, 1999; p. 271-282.
9. Stoneham M, Goldacre M, Seagroatt V, Gill L. Olive oil diet and colorectal cancer: an ecological study and a hipótesis. *Journal Epidemiol* 2000; 134: 756-760.
10. Hoffman G. R. Genetic Toxicology. Cassaret and Doull's: The basic science of poisons. Chapter 9, Fifth edition, 1996; p. 269-300.
11. García-Peñalver L, Sureiro R.A, Garrido M. J. Rápida detección de compuestos mutagénicos directos en *Salmonella typhimurium* TA 100 aplicando una técnica de

- impedancia eléctrica. En: Xa Reunión Científica de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental, 2000; p.109-112.
12. Felton J. S, Knise M, Salmon C.P, Malfatti M.A, Kulp K.S. Human exposure to heterocyclic amine food mutagens / carcinogens: Relevance to breast cancer. *Environ and Molec. Mutagen* 2002; 39: 112-118.
 13. Curbelo A, Remigio A. C, Pérez G, Fernández N, Rivero Y, Bada A. M, Ruiz T, Ocaña R. Evaluación genotóxica in vivo de dos insecticidas biológicos con el ensayo de micronúcleos. En: 4to Taller Nacional y 2do Taller Internacional sobre Mutagénesis, Teratogénesis y Carcinogénesis Ed: CNIC, 2001; p.30-31.
 14. IAEA. A manual. Technical Reports Series No 405, Ed: Internacional Atomic Energy Agency, Viena, 2001;p.13-14.
 15. Wuestermann P.R, Cronkite E.P. Physiological and pathophysiological aspects of the immune system contributing to a biomathematical model of lymphocytes. *Stem Cells* 1995; 13(1):268-275.
 16. Darroudi F, Meijers C.J, Hadjidekove V, Natarajan A. Detection of aneugenic and clastogenic potential of x-rays, directly-and indirectly-acting chemicals in human hepatoma (Hep G2) and peripheral blood lymphocytes, using micronucleus assay and FISH with a DNA centromeric probe. *Mutagenesis* 1996; 11:425-433.
 17. Fujita K, Kamataki T. Predicting the mutagenicity of tobacco-related N-nitrosamines in humans using 11 strains of *Salmonella typhimurium* YG7108, each coexpressing a form of human cytochrome P450 along with NADPH-cytochrome P450 reductase. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2001; 38: 339-346.
 18. Edenharder R, Sager J.W, Glatt H, Muckel E, Platt K.L. Protection by beverages, fruits, vegetables, herbs, and flavonoids against genotoxicity of 2-acetylaminofluorene and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo (4, 5-b)pyridine (PHIP) in metabolically competent V79 cells. *Mut. Res* 2002; 421: 57-72.
 19. Motelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella / microsome mutagenicity assay. *Mut. Res* 2000; 455: 29-60.

20. Ostling O, Johanson K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1984; 123: 291-298.
21. Singh N.P, McCoy M.T, Tice R.R, Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res* 1988; 175: 184-191.
22. Olive P.L, Banath J.P, Durand R.E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "comet" assay. *Radiat. Res* 1990; 122: 86-94.
23. Tice R.R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J.C, Sasaki Y.F. The single cell gel /comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2000; 35:206-221.
24. Hartmann A, Plappert U, Poetter F, Suter W. Comparative study with the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Mutat. Res* 2003; 536:27-38.
25. Hartmann A, Schumacher M, Plappert-Helbig U, Lowe P, Suter W, Mueller L. Use of the alkaline in vivo comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis* 2004; 19:51-59.
26. Collins A.R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology* 2004; 26: 249-259.
27. Collins A. R, Dusinska M, Gedik C.M, Stetina R. Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker?. *Environmental Molecular Mutagenesis* 1996; 104 (S3): 465-469.
28. Sauvaigo S, Serres C, Signorini N, Emonet N, Richard M. J, Cadet J. Use of single-cell gel electrophoresis assay for the immuno-flourescent detection of specific DNA damage. *Analytical Biochemistry* 1998; 259: 1-7.
29. Collins A.R, Dusinska M, Horvathova E, Munro E, Savio M, Stetina R. Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured in vitro with the comet assay. *Mutagenesis* 2001; 16(4): 297-301.

30. Singh N.P. A simple method for accurate estimation of apoptosis. *Exp. Cell Res* 2000; 256: 328-337.
31. Meintieres S, Nessler F, Pallardy M, Marzin D. Detection of ghost cells in the standard alkaline comet assay is not a good measure of apoptosis. *Envir. Mol. Mutat* 2003, 41:260-269.
32. Roser S, Pool-Zobel B.L, Rechkemmer G. Contribution of apoptosis to responses in the comet assay. *Mutat Res* 2001; 497: 169-175.
33. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 2000; 455:81-95.
34. Cartairs K. The human small lymphocyte – Its possible pluripotential quality. *Lancet* 1962; 829-832.
35. Fenech J, Morley A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 1985; 147:29-36.
36. Fenech J, Morley A.A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of in vivo ageing and low-dose x-irradiation. *Mutat Res* 1986; 161:193-198.

Recibido: 07/09/09

Aceptado: 08/09/09