

Los contaminantes ambientales y la estabilidad genética de los seres vivos*

Dr. Máximo E. Drets¹, Dr. Gustavo Folle²,
Lic. Silvia López de Griego³ y Federico Monteverde⁴

La tecnología y la industrialización modernas hacen ingresar al medio humano un considerable número de agentes que pueden poseer acción mutagénica, carcinogénica o teratogénica.

A fin de proteger las comunidades de estos riesgos, es necesario desarrollar sistemas de investigación sobre dichos contaminantes así como formar recursos humanos especializados.

En el presente artículo se discuten algunos aspectos del problema describiéndose brevemente las principales aberraciones cromosómicas inducidas por agentes mutagénicos y un modelo biológico para experimentación con metil p-benzoquinonas volátiles de origen animal capaces de inducir alteraciones cromosómicas en células humanas y de ratón así como la metodología analítica empleada. Se realizan algunas consideraciones biológico-evolucionarias sobre la acción de las p-benzoquinonas en la naturaleza y la guerra química entre las especies.

Se proporciona una breve información sobre otras acciones realizadas en el país y en América Latina destinadas al desarrollo de la Genética Toxicológica.

INTRODUCCION

Desde el descubrimiento de Muller (1) sobre la acción mutagénica de las radiaciones y el de Auerbach y Robson (2) de que las sustancias químicas también son capaces de provocar cambios genéticos se ha establecido que las alteraciones cromosómicas inducidas pueden producir un serio impacto en los seres vivos, en particular en el hombre, por su acción perjudicial en la salud, la económica de la comunidad y en el medio que habita.

Este problema se ha acentuado progresivamente a medida que el proceso de industrialización de los países fue volcando al medio nuevas moléculas de síntesis. Se estima que, en la actualidad, hay más de 100.000 sustancias químicas de origen antropogénico en el ambiente humano cuya conducta biológica no es posible predecir fácilmente.

El elevado consumo actual de drogas, aditivos de alimentos, pesticidas, sustancias químicas de uso industrial y los diversos desechos resultados de los procesos de manufactura que ingresan en el medio humano, ha tomado urgente la identificación, estu-

PALABRAS CLAVE:

Contaminación ambiental; contaminantes ambientales; aberraciones cromosómicas.

* La presente contribución incluye parte del contenido de los trabajos de la División que merecieron el Premio de la Academia Nacional de Medicina (1984) y el Premio "Claude Bernard" (1986).

- 1) Jefe de la División Citogenética Humana y Microscopía Cuantitativa (DCHMC) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).
- 2) Ayudante de Investigación de la DCHMC del IIBCE.
- 3) Licenciada en Biología. Becaria de la DCHMC del IIBCE.
- 4) Analista programador. Becario de la DCHMC del IIBCE.

dio y seguimiento de aquellos agentes que pueden poseer acción mutagénica, carcinogénica o teratogénica. En este sentido, los nuevos procedimientos de examen de dichos agentes han permitido realizar un enfoque amplio de las lesiones genéticas inducidas a nivel molecular en particular como productores de alteraciones específicas en la molécula portadora de la información genética constituyente de las estructuras nucleares: el ácido desoxirribonucleico (ADN).

El hombre ha estado expuesto en forma permanente a agentes genotóxicos, inclusive aquellas sustancias que siempre han existido en la naturaleza y que probablemente debèn haber alterado su dotación hereditaria a lo largo del tiempo.

Hoy en día, al contrario de lo ocurrido en tiempos pretéritos, la fracción de población expuesta a los agentes físicos y químicos potencialmente mutagénicos o carcinogénicos se ha tornado muy grande. Además, se ha ampliado mucho el espectro de agentes de riesgo genético que pueden ingresar, en forma directa o indirecta, al medio humano ya sea por el aire, el agua, el suelo o por los alimentos consumidos por el hombre lo que ha agravado notablemente el problema.

Dicho ingreso es, por lo general, poco evidente en un análisis superficial del problema ya que se trata de aditivos de alimentos, contaminaciones mínimas de pesticidas poderosos o sustancias químicas de origen industrial incluyendo trazas de productos de síntesis o impurezas originadas por degradación de compuestos manufacturados.

Estas sustancias pueden ser transportadas, eventualmente, a grandes distancias de su sitio original de producción lo que puede poner en riesgo comunidades o países enteros totalmente ajenos a las fuentes responsables de producción, lo que complica adicionalmente el grave problema actual de la contaminación ambiental y la interrelación de los países.

En este sentido, los recientes accidentes en plantas termonucleares y químicas son un claro ejemplo de diseminación masiva en regiones muy extensas, o aún continentes enteros, de sustancias capaces de lesionar el genotipo de las especies.

La importante fuga de elementos radiactivos originada por la explosión y fusión parcial de un reactor de la central nuclear de Chernobyl, URSS, ocurrida en abril de 1986, provocó no sólo una intensa contaminación en una vasta región del oeste de la URSS sino que determinó una amplia diseminación de productos radioactivos que alcanzó la mayoría de los países europeos.

El costo en vidas humanas de Chernobyl refleja en forma parcial la verdadera magnitud de los efectos de esta catástrofe nuclear. Basta mencionar que, pese a la evacuación de los habitantes del área afectada

(aprox. 100.000 personas), miles de individuos deberán ser estudiados periódicamente a fin de detectar en forma precoz la aparición de diversos tipos de leucemias y cancer inducidos por la exposición a las radiaciones ionizantes como ocurrió en los sobrevivientes de Nagasaki e Hiroshima. A esto se agrega las incalculables pérdidas a nivel agropecuario provocadas por la contaminación del suelo y de cursos de agua que afectó al continente europeo.

La contaminación total del Rhin por productos químicos debido al incendio de plantas químicas de Suiza y el caso extremo de la región industrial de Cubatão en San Pablo, Brasil, considerada la región más contaminada del mundo, constituyen elocuentes ejemplos de la dimensión actual del problema de la contaminación del ambiente humano por sustancias químicas de alto riesgo.

SIGNIFICADO BIOLÓGICO DE LOS AGENTES MUTAGÉNICOS Y LA GENÉTICA TOXICOLÓGICA

El riesgo potencial que implica la exposición de los seres vivos a los agentes mutagénicos posee claros fundamentos a saber:

- 1) alteran en forma permanente el genotipo humano o el de otras especies animales o vegetales;
- 2) perturban la formación normal de embriones humanos o de otros animales;
- 3) incrementan la tasa de mutación somática lo que se expresa como cánceres de diverso tipo, en particular en las poblaciones humanas.

Las alteraciones congénitas o la aparición de cáncer en las poblaciones son fácilmente detectadas a nivel médico o visualizables por el público general ya que, al provocar alteraciones orgánicas importantes, es sencillo demostrar que nuestra propia generación es la afectada.

Menos evidente para el pueblo o aún para las autoridades sanitarias es la producción de mutaciones genéticas o sea la inducción de cambios hereditarios permanentes provocadas por la adición de agentes mutagénicos de cualquier tipo en el medio en que vivimos.

La dificultad para detectar dichas mutaciones perjudiciales y relacionarlas con un determinado agente radica en el hecho de que esos cambios hereditarios aparecen en generaciones posteriores lo que, obviamente, limita que el observador pueda detectarlos, ya que su sobrevivencia media es precisamente el período de ocurrencia del cambio.

La producción de dicho daño genético representa, por tanto, un problema médico-sanitario y sociopsico-económico de la mayor importancia para las

poblaciones por la carga que significan las malformaciones congénitas, el retardo mental, las enfermedades hereditarias y el cáncer determinadas por las mutaciones inducidas.

Es claro, entonces, que somos responsables de la estabilidad genética de nuestros descendientes y de las generaciones por venir como simples usuarios y trasmisores del reservorio génico de nuestra especie.

El riesgo que presentan las sustancias creadas por la ciencia contemporánea y las manufacturadas por la tecnología actual se relaciona con el poder que poseen nuestras células de poder reparar o no el daño que provocan a nivel del núcleo celular.

Los mecanismos evolucionarios y selectivos que operan en las diversas especies que pueblan el mundo que conocemos han originado sistemas de protección celular para todos aquellos agentes que siempre estuvieron presentes en el medio. Pero, evidentemente, las células humanas y las de otras especies no poseen sistemas completamente eficientes en la mayoría de los casos para reparar el daño inducido por aquellas moléculas de síntesis que ha creado el hombre en el laboratorio y las cuales no existían previamente en la naturaleza.

Aún cuando no es imaginable ni económico investigar todas las posibilidades de acción física, química o biológica de una nueva sustancia, tanto en personas, animales, plantas, microorganismos o, globalmente, en comunidades o en ciertas regiones, debido a sus propios efectos o a sus interacciones con otras ya presentes, potenciando o reduciendo su acción original, es absolutamente necesario que los países dispongan de áreas de estudio, centros de investigación y personal preparados para realizar dichos análisis.

El interés de disponer de un sistema de esta naturaleza ha determinado que surgiera una nueva disciplina científica en el área de la bio-medicina denominada Genética Toxicológica. Esta es una ciencia que se ocupa precisamente del estudio y seguimiento de los agentes que pueden provocar alteraciones de la dotación hereditaria de los seres vivos.

LA INDUCCION DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS

Tanto los mutágenos como los agentes carcinogénicos o teratogénicos están estrechamente relacionados por su acción directa sobre los cromosomas. La capacidad que poseen de fracturar al cromosoma se denomina clastogénesis, un término propuesto por la genetista Margery Shaw en 1970 (3), quien empleó la raíz griega "clastos" que significa fracturar o romper para crear este término cuya aceptación es ahora universal en los medios especializados.

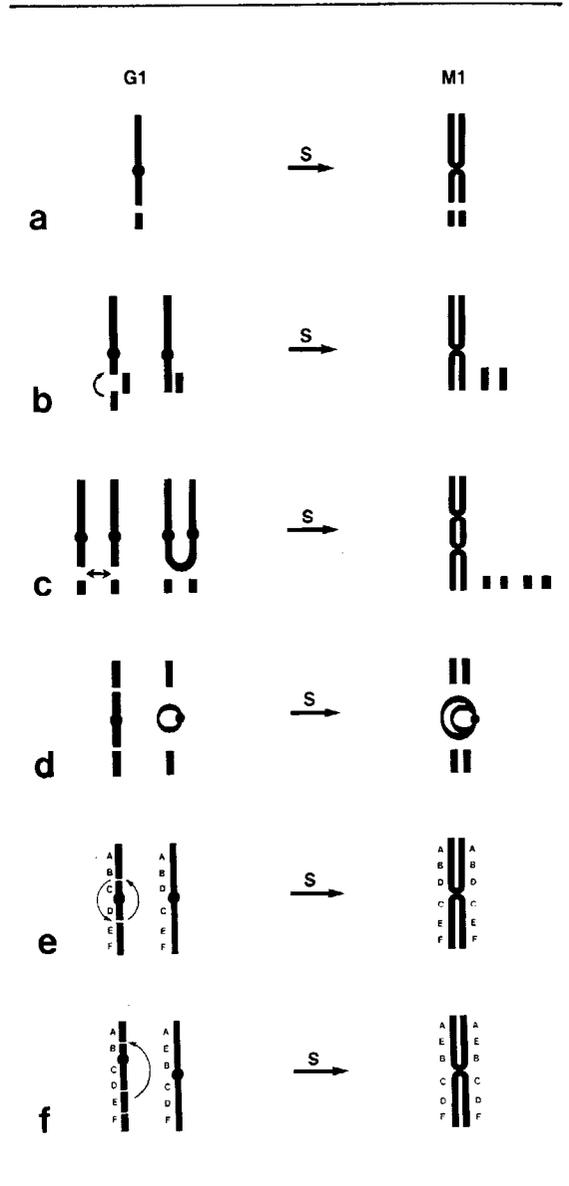


FIGURA 1
Representación esquemática de algunas aberraciones: a) fractura cromosómica; b) deleción intersticial; c) dicéntrico; d) anular céntrico; e) inversión pericéntrica y f) transposición. La letra S simboliza el período replicativo del ADN. En M1 se presentan las configuraciones que poseen las aberraciones cromosómicas en la mitosis subsiguiente al daño inducido durante la fase G1.

Conviene exponer ahora, en forma sucinta, las principales anomalías cromosómicas estructurales inducidas en células de organismos superiores provocadas por la acción de agentes mutágenicos.

Las diversas manifestaciones citogenéticas del daño inducido pueden ser clasificadas en aberraciones de cromosoma (Fig. 1) y aberraciones de cromátida

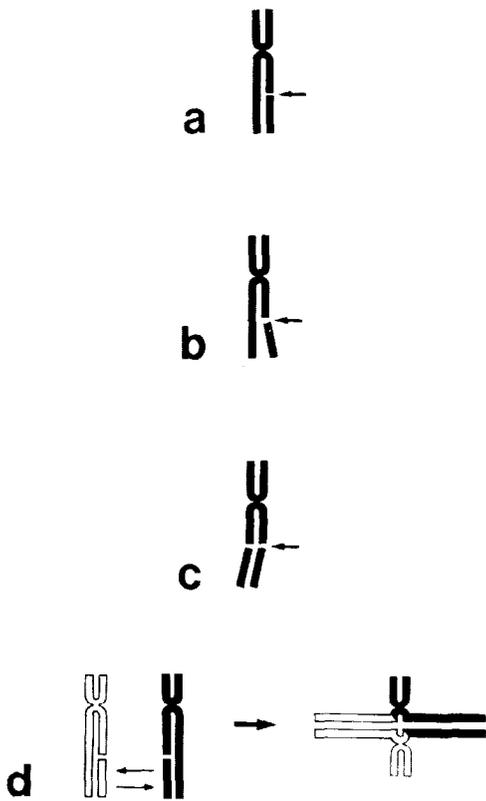


FIGURA 2

Aberraciones de cromátida: a) "gap" o región acromática; b) fractura de cromátida; c) fractura de isocromátida y d) configuración cuatrirradianal resultante de una translocación recíproca entre dos segmentos de cromátida.

(Fig. 2) de acuerdo a si éstas se producen respectivamente en forma previa o posterior al proceso de replicación del segmento cromosómico afectado.

Las aberraciones cromosómicas se observan habitualmente en células cuyo contenido cromosómico ha sido dañado durante el período inicial de la interfase del ciclo celular (G1) y que se manifiestan como fracturas o intercambios previamente a la replicación del ADN. Pueden ser clasificadas de la siguiente manera:

a) Delección terminal. Esta aberración implica una fractura simple del cromosoma con pérdida del segmento distal al sitio de ruptura bajo la forma de un fragmento acéntrico (Fig. 1, a). Las delecciones intersticiales, en cambio, se producen por un fenómeno de doble fractura del brazo cromosómico con pérdida del segmento intercalar y posterior reunión de los segmentos proximal y distal a las zonas de fractura (Fig. 1, b).

b) Los cromosomas dicéntricos representan una de las alteraciones estructurales de mayor significación para la detección del daño citogenético. Este reordenamiento se produce por un proceso de fractura e intercambio entre dos cromosomas generando una estructura anómala caracterizada por la presencia de dos centromeros y fragmentos acéntricos (Fig. 1, c; Fig. 3, a). En ocasiones pueden detectarse cromosomas policéntricos, producto del reordenamiento de tres o más cromosomas, en células irradiadas.

c) Los cromosomas anulares con centromero (céntricos) (Fig. 1, d; Fig. 3, b) se originan como consecuencia de una doble fractura cromosómica (una en cada brazo) con reunión de los extremos proximales produciendo, al mismo tiempo, fragmentos

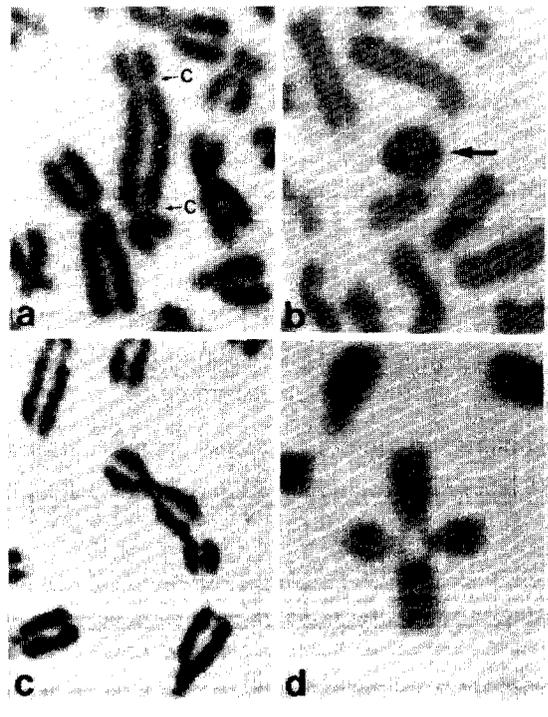


FIGURA 3

Aberraciones cromosómicas y de cromátida inducidas por radiaciones ionizantes. a) dicéntrico (la letra C indica el centromero); b) anular (flecha) c) fractura de cromátida y d) cuatrirradianal. Las barras representan 5 um.

acéntricos. Los cromosomas anulares acéntricos se forman por un mecanismo similar pero, en este caso, los puntos de fractura se localizan en el mismo brazo y el cromosoma en anillo no posee centromero.

d) Las inversiones peri y paracéntricas son reordenamientos de los cromosomas generados por un mecanismo de doble fractura (simple en los casos de inversiones terminales) con giro de 180 grados del segmento intercalante y reunión de sus extremos al resto del cromosoma lo que provoca una alteración en el ordenamiento lineal de la información genética. La existencia o no de centromero en el segmento invertido diferencia respectivamente, las inversiones pericéntricas (Fig. 1, e) de las paracéntricas.

e) Las translocaciones son, asimismo, cambios estructurales en los cuales un segmento cromosómico puede cambiar de posición dentro del cromosoma (transposición; Fig. 1, f) o ser trasladado a otro cromosoma (inserción). En las translocaciones recíprocas se produce un intercambio de segmentos entre dos cromosomas homólogos o no homólogos. Este tipo de reordenamientos da origen, entre otras anomalías, a los cromosomas denominados marcadores presentes en las células de ciertas neoplasias como, por ejemplo, en la leucemia mieloide crónica la cual se caracteriza por presentar el cromosoma Philadelphia (Ph) resultado habitualmente por una translocación entre los cromosomas 9 y 22.

Es importante destacar que las inversiones y traslocaciones no siempre modifican en forma evidente la morfología cromosómica lo que impide, en ocasiones, su correcto reconocimiento. En este sentido, es conveniente realizar su análisis mediante el empleo de las técnicas de bandeamiento cromosómico disponibles actualmente que permiten detectar rearrreglos en la localización de regiones específicas de los cromosomas.

Las aberraciones de cromátida son características del daño genético inducido en una cromátida durante la replicación del material hereditario o incluso, posteriormente, en el transcurso de la fase G2. Los cambios estructurales que es posible evidenciar en este tipo de anomalías cromosómicas son las siguientes:

a) La lesión acromática o "gap" corresponde a una zona estrechada y débilmente teñida de la cromátida que, en general, no supera en extensión el ancho de la cromátida involucrada (Fig. 2, a). Ocasionalmente, es posible detectar la presencia de finos filamentos de cromatina en esta región conectando los segmentos proximal y distal de la cromátida.

b) La fractura de cromátida implica una ruptura de la continuidad de la misma con desplazamiento del segmento distal al sitio de la lesión (fig. 2, b; Fig. 3, c) dando origen a un cromosoma deficiente

en información genética y un fragmento acéntrico. Esta aberración constituye una de las lesiones inducidas con mayor frecuencia por los mutágenos químicos.

c) Las fracturas y "gaps" de isocromátidas (Fig. 2c) son similares en sus características a las lesiones anteriores pero presentan la particularidad de producirse en regiones localizadas al mismo nivel en ambas cromátidas. La fractura de isocromátida es difícil de diferenciar citogenéticamente de la fractura de cromosoma aunque se originen en fases diferentes del ciclo celular.

d) La inducción de intercambios de cromátidas resulta de un fenómeno de traslocación recíproca en el cual existe transferencia de segmentos de cromátida entre dos cromosomas ya duplicados. Esta alteración se evidencia a nivel metafásico por una configuración trirradial o cuatrirradial (Fig. 2d; Fig. 3d). Los intercambios entre cromosomas homólogos se observan raramente en células normales pero son frecuentes en células de pacientes afectados por el síndrome de Bloom o en células sometidas a ciertos agentes mutagénicos como lo es el caso de la mitomicina C.

e) Las deleciones intersticiales, inversiones y las configuraciones anulares constituyen otro grupo de aberraciones de cromátida capaces de ser inducidas por agentes mutagénicos.

Los fragmentos acéntricos originados en las aberraciones antes detalladas (tanto cromosómicas como de cromátida) pueden sufrir retraso anafásico y ser eliminados o quedar incluidos en los núcleos de las células hijas. Los fragmentos que son excluidos de los núcleos telofásicos pueden dar origen a micronúcleos observables a nivel citoplásmico en las células hijas interfásicas (Fig. 4a).

Por otra parte, tanto las radiaciones ionizantes como los mutágenos químicos pueden inducir, además de alteraciones estructurales, variaciones en el número cromosómico total de la célula, es decir, aneuploidías y poliploidías, a partir de núcleos diploides normales. En este sentido, debe recordarse que tanto en las neoplasias espontáneas como en las inducidas son características las heteroploidías.

MUTAGENESIS EXPERIMENTAL EN LABORATORIOS DE PAISES EN DESARROLLO

El objetivo final del estudio de cualquier mutágeno ambiental es estimar su capacidad de alterar la constitución genética de células somáticas o germinales humanas. Aún cuando el empleo de microorganismos para ensayos de agentes mutagénicos es, por supuesto, más eficiente y económico, las células de organismos superiores, por ej. las de los mamíferos, poseen una estructura y fisiología diferentes. Ade-

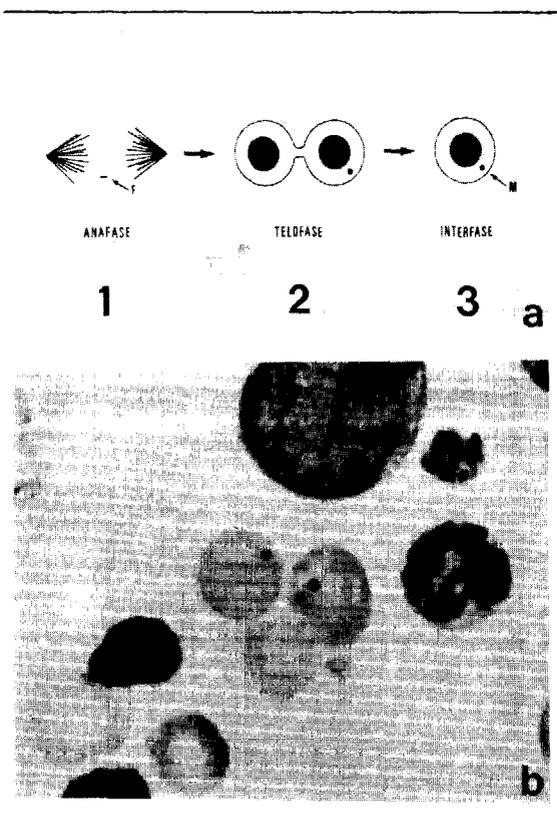


FIGURA 4

a) Representación esquemática de la formación de un micronúcleo: 1) retraso anafásico de un fragmento cromosómico; 2) durante la telofase el fragmento se rodea de membrana nuclear en forma independiente del núcleo y 3) célula interfásica con un micronúcleo a nivel citoplásmico.
b) Eritrocitos policromatófilos presentando micronúcleos en un extendido de médula ósea de ratón tratado con un agente mutagénico.

más, debido al hecho de que las mutaciones ocurridas en forma de aberraciones cromosómicas comprende una gran parte de la carga genética del ser humano, se torna fundamental que el sistema de examen de dichas sustancias incluya células humanas y de otros mamíferos, ya que, en última instancia, dichos estudios están dirigidos principalmente al hombre.

Debido a que la capacidad de investigación a nivel internacional para ensayar la actividad mutagénica de los nuevos compuestos introducidos en el mercado es limitada y no sobrepasa por lo general 500 por año, deben considerarse algunos aspectos esenciales para desarrollar con eficiencia un nuevo laboratorio en esta área a saber:

1) No conviene repetir la evaluación ya realizada en centros de mayor desarrollo con un potencial económico y facilidades instrumentales superiores a las que pueden disponerse en nuestro país;

2) paralelamente a la iniciación de dichas investigaciones deben formarse nuevos recursos humanos de modo de poder establecer, a mediano plazo, grupos de estudio de mutágenos u otros agentes genotóxicos estrechamente relacionados con las necesidades locales.

Por tanto, un laboratorio con recursos humanos y materiales reducidos que intente inaugurar estudios en estas áreas debe inclinarse por modelos experimentales simples y originales de modo de lograr proyección nacional y colocarse en un plano internacional competitivo. Un enfoque de desarrollo como el referido origina, según nuestra experiencia, un estímulo de trabajo y una fuente de inspiración, en particular para los colaboradores jóvenes.

En general la actividad mutagénica se examina a cuatro niveles diferentes, a saber: 1) microbiano; 2) células cultivadas in vitro; 3) ensayos in vivo en animales de laboratorio y, finalmente, 4) aspectos epidemiológicos y evaluación de riesgos genéticos en seres humanos. Estos niveles se denominan corrientemente primarios, secundarios, etc., significando la complejidad biológica del material estudiado en la prueba.

La detección de micronúcleos inducidos en eritrocitos policromatófilos de médula ósea de ratón (4) es uno de los tests más utilizados para el estudio de la acción de mutágenos in vivo. Este es un método relativamente sencillo que permite el análisis de un gran número de células en forma rápida y sin dificultades de interpretación debido a que los micronúcleos son los únicos corpúsculos de cromatina presentes en dichas células luego de la expulsión del núcleo eritrocitario (Fig. 4b).

Otro de los sistemas de prueba accesible y económico para el citogenetista es el cultivo de leucocitos humanos periféricos. La forma más simple es realizar cultivos no sincronizados. En este sistema sólo cabe la objeción de que deben emplearse, por lo general, muestras de diferentes individuos. No obstante, la relativa baja inversión que implica su realización lo torna el sistema de elección para laboratorios pequeños.

UN MODELO PARA EXPERIMENTACION EN MUTAGENESIS

En la División de Citogenética Humana y Microscopía Cuantitativa del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable se seleccionó un modelo experimental propio de desarrollo de la disciplina que cumple con las premisas señaladas y que está orientado, en esta etapa, por lo menos a la investigación en los niveles secundario y terciario anotados. La introducción de la Genética Toxicológica en nuestro país, a través de esta actividad, se inserta en un proceso más vasto de progresos ocurridos en el

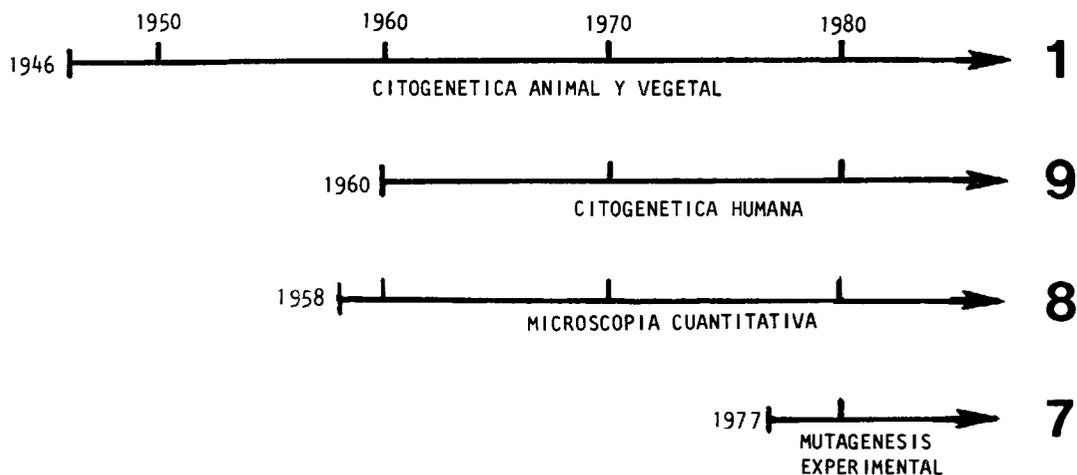


FIGURA 5
Cronología de la evolución de los estudios citogenéticos en el Uruguay. La flecha señala la iniciación de cada disciplina.

área de la Citogenética y comenzados en 1946 cuando el Prof. Francisco A. Saez se radica en el Uruguay e inaugura en nuestro país los estudios citogenéticos en plantas y animales (Fig. 5).

Se comenzó, de este modo, la investigación, hace ya más de diez años, de la acción citogenética de tres metil p-benzoquinonas volátiles segregadas naturalmente por un arácnido de aspecto un tanto extraño denominado *Acanthopachylus aculeatus* (Fig. 6).

Este animal se halla con frecuencia en el territorio de Uruguay y áreas fronterizas de países limítrofes. Es aún muy común hallarlo debajo de piedras o maderos en los jardines de las casas de áreas suburbanas de Montevideo. La secreción, de color amarillento es debida a la forma para- del núcleo de las benzoquinonas que la componen, posee un intenso olor y se caracteriza por ser altamente volátil a la temperatura ambiente. Estable y cols. (5) descubrieron hace años que cantidades mínimas de la secreción transportada por el aire son bacteriostáticas contra agentes Gram+ y Gram- y provocan la lisis de protozoarios in vitro. Además, Fieser y Ardao (6) identificaron y sintetizaron dichas p-benzoquinonas (Fig. 7) y Freyre y cols. (7) demostraron que el contacto directo produce una irritación cutánea intensa en seres humanos y necrosis por inyección subcutánea repetida en animales de laboratorio.

Saez y Drets (8) emplearon muestras recientes de dicha secreción para tratar, por inmersión, células meristemáticas de la raíz de la cebolla común (*Allium cepa*). Además, forzaron a respirar la secreción, durante período de tiempo cortos a ortópteros introduciéndolos en un recipiente cerrado que contenía una cápsula con la secreción recientemente extraída del arácnido. Este fue el primer sistema de



FIGURA 6
Acanthopachylus aculeatus Kirby, 1819, secretando metil p-benzoquinonas (flecha).

prueba descrito en la literatura, de un clastógeno volátil introducido por vía respiratoria en ortópteros, sistema que ahora se ha difundido tanto.

Tanto las células vegetales como las del ortóptero mostraron importantes alteraciones inducidas caracterizadas por grados variables de adhesión y coalescencia y fragmentación cromosómica, diplocromosomas, puentes anafásicos, translocaciones y poliploidía.

En la fase de investigación actual, el sistema experimental consistió en exponer linfocitos humanos a diversas dosis de las benzoquinonas para estudiar su

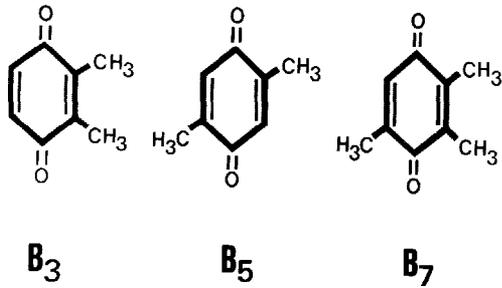


FIGURA 7
Estructura química de las tres metil p-benzoquinonas (B₃, B₅ y B₇) secretadas por *A. aculeatus*

acción in vitro o inyectar ratones para investigar los efectos in vivo. Los resultados obtenidos nos permitieron realizar una primera publicación sobre el asunto (9) en donde describimos múltiples efectos inducidos en linfocitos humanos estimulados por la fitohemaglutinina a saber, numerosas fracturas cromosómicas, de cromátida (Fig. 8a), gaps, acortamiento y fragmentaciones cromosómicas, y formación de trirradiales, cuatrirradiales simétricos y asimétricos, anulares y aneuploidías (Fig. 8b-e). Se pudo establecer, asimismo, que existe una relación entre dosis y tiempo de exposición. Un asunto interesante fue la inducción de un claro bandedo producido in vivo en cromosomas humanos señalando una acción directa del compuesto. Se investigó con detenimiento el bandedo inducido y, según datos preliminares obtenidos con el sistema de exploración que exponemos más adelante en esta presentación, los patrones obtenidos eran semejantes a los inducidos

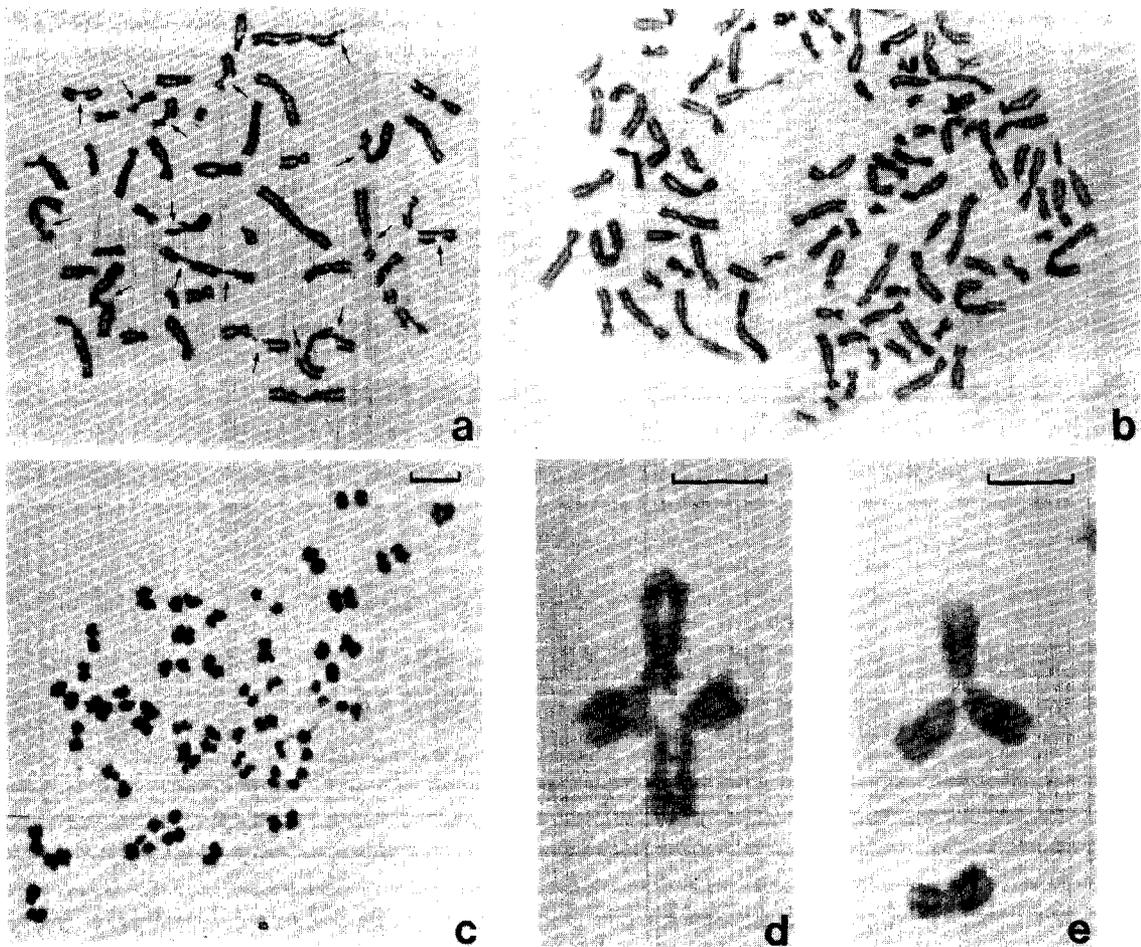


FIGURA 8
Aberraciones cromosómicas inducidas por la B₃ en cultivos de linfocitos humanos: a) metafase con múltiples fracturas de cromátida (flechas); b) metafase poliploide; c) acortamiento cromosómico extremo; d) configuración cuatrirradial y e) trirradial. Las barras corresponden a 5 μ m.

habitualmente por los procedimientos de bandeado G salinos o proteolíticos.

Los experimentos in vivo inyectando ratones con las metil p-benzoquinonas confirmaron ampliamente estos resultados. Así se observaron múltiples gaps y fracturas y efectos citotóxicos tales como coalescencias, pulverizaciones y detención de la mitosis.

Otro efecto interesante fue la producción de micronúcleos de diverso tipo. Obviamente, algunos de ellos se relacionan con la capacidad de las metil p-benzoquinonas de provocar la salida de material nuclear al citoplasma o de inducir puentes cromatínicos en estadios ana-telofásicos. La rara diversidad de las configuraciones micronucleares determinaron que se realizaran investigaciones adicionales en nuestro laboratorio sobre este problema en los dos últimos años (10).

Algunas observaciones adicionales sugieren que el acortamiento extremo de los cromosomas inducido por las benzoquinonas puede estar estrechamente relacionado con la formación de un número de micronúcleos entre otros mecanismos de producción. En este sentido, publicamos (11) el hallazgo de que, por lo menos una de las metil p-benzoquinonas (B3), produce un extraordinario acortamiento que semeja una real fragmentación cromosómica (Fig. 8c). Este es un proceso progresivo que se evidencia claramente en estadios ana-telofásicos donde los cromosomas mantienen su forma básica ya que se les puede cariotipar en forma inequívoca.

El interés de estas observaciones radica en que los citogenetistas de los servicios de seguimiento de clastógenos ambientales habitualmente registran la presencia de fragmentos cromosómicos para evaluar la acción potencial de un compuesto. Este aporte llama entonces la atención a los investigadores sobre la posible existencia de la inducción de dicho acortamiento cromosómico extremo que simula un proceso de fragmentación, lo que daría lugar a una errónea interpretación durante dicha evaluación.

Otro hallazgo interesante, originado por la acción de las metil p-benzoquinonas en células humanas, fue la inducción del aumento de intercambios de cromátidas hermanas (ICH). Este fenómeno citológico fue observado inicialmente por Taylor (12) en células vegetales de *Bellevalia* mediante la incorporación en el cromosoma de timidina tritiada detectada mediante autorradiografía. Este hecho observable al microscopio, se corresponde a nivel molecular con los intercambios producidos entre loci homólogos de dos moléculas de ADN durante el proceso de replicación (Fig. 9).

En 1973, Latt (13) demostró que la incorporación del análogo de base bromo-deoxi-uridina (BrdU), en sustitución de la timidina normal, disminuía marcadamente la fluorescencia del colorante Hoechst

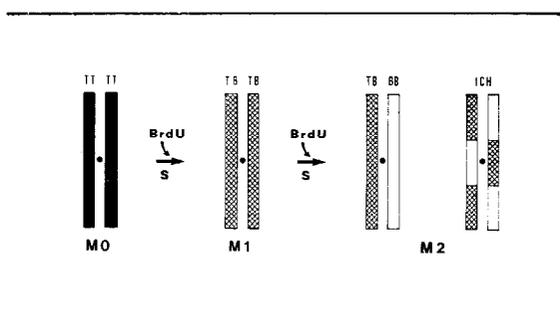


FIGURA 9

Diagrama de la detección de intercambios entre cromátidas hermanas mediante la incorporación del análogo de base bromo-deoxi-uridina (BrdU) durante dos períodos de síntesis de ADN.

TT: cromátidas conteniendo solo timidina;
TB: cromátida sustituida unifilarmente con BrdU;
BB: cromátida sustituida bifilarmente con BrdU;
M0, M1 y M2 corresponden respectivamente a la mitosis previa y subsiguiente a la incorporación de bromo-deoxi-uridina.

33258. Por lo tanto, cuando las células en cultivo cumplían dos rondas replicativas en presencia de BrdU y se teñían posteriormente con dicho colorante, la cromátida sustituida bifilarmente con BrdU mostraba una fluorescencia menos intensa que la cromátida sustituida en forma unifilar. La diferenciación así obtenida hace posible la detección del intercambio entre cromátidas hermanas. Debido a que el método desarrollado por Latt sólo permite observaciones temporarias con el microscopio de fluorescencia, a causa de la atenuación del fluorocromo por la luz ultravioleta empleada, se desarrollaron posteriormente nuevas técnicas que utilizan el colorante de Giemsa lo que permite obtener preparaciones permanentes para el análisis de ICH, las cuales, por otra parte, se pueden estudiar con un microscopio óptico corriente.

El test de ICH ha sido empleado extensamente como método de alta sensibilidad para la detección de mutágenos ambientales y monitoreo de poblaciones de individuos expuestos, pues la mayoría de los agentes químicos genotóxicos son capaces de incrementar selectivamente el fenómeno de intercambio entre las cromátidas hermanas de los cromosomas como expresión del daño que provoca a nivel molecular en el ADN.

Considerando la alta sensibilidad de este método para la detección de agentes genotóxicos, decidimos aplicarlo en cultivo de linfocitos humanos para estudiar el efecto de uno de los componentes de la secreción de *A. aculeatus* sobre el intercambio de cromátidas hermanas.

Se estudió, de este modo, un total de 152 metafases humanas expuestas a la acción de la 2,3 dimetil p-benzoquinona (B3), el componente principal de la secreción del arácnido, y un número idéntico de controles. Los intercambios fueron contados, locali-

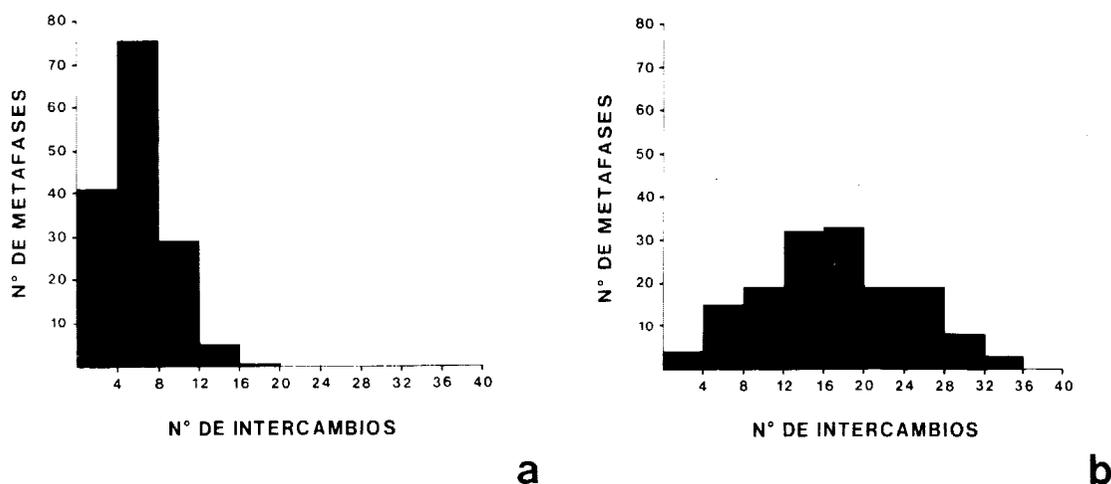


FIGURA 10
 Diagrama de barras que presenta la distribución de las metafases control (a) y tratadas (b) de acuerdo al total de ICHs detectado en cada metafase (n = 152).

zados en cada brazo cromosómico y asignados al grupo cromosómico correspondiente.

El recuento de los ICH en las células tratadas con B3 reveló un considerable incremento de intercambios en relación a los detectados en las células control (2516 vs. 814) que habían sido incorporadas sólo con BrdU. Las metafases control mostraron valores de ICH que oscilaron entre 0 y 20 por metafase ($\bar{x} = 5.33$) (Fig. 10a). Las metafases tratadas (Fig. 10b), en cambio, presentaron valores de ICH entre 0 y 36 ($\bar{x} = 16.53$). El estadístico t mostró que las diferencias halladas eran significativas ($t = 18.49$; $p < 0.001$) lo que confirma otras observaciones citológicas de que la metil p-benzoquinona analizada es un agente mutagénico (Fig. 11a).

La Tabla 1 presenta el número de intercambios observados en cada grupo cromosómico humano (control y B3) con los porcentajes correspondientes. Como puede apreciarse, la mayoría de los grupos cromosómicos tratados muestran, promedialmente, una triplicación de los valores de ICH con respecto a los controles. Por otra parte, la distribución de ICH en los brazos cromosómicos fue semejante en el grupo tratado y control correspondiendo un 75% a los brazos largos y un 25% a los brazos cortos.

El análisis de la frecuencia de ICH en relación a la longitud relativa de cada grupo cromosómico realizado mediante la prueba de chi cuadrado (asumiendo que la frecuencia de intercambios es proporcional a la longitud cromosómica) demostró que tanto las células tratadas como los controles poseían una frecuencia de ICH mayor a la esperada en los grupos A y B y menor a la esperada en los grupos E, F y G.

Finalmente, debido a la acción combinada de la B3

como clastógeno e inductor de ICH fue posible observar, en células humanas, algunas metafases que presentaban simultáneamente fracturas y reordenamientos de cromátida, así como intercambios entre cromátidas hermanas (Fig. 11b y c). Es de interés destacar que solamente en un 20% de los casos analizados existió coincidencia en la localización cromosómica de las fracturas y los sitios de intercambio.

LA CITOGENETICA AUTOMATIZADA EN AUXILIO DE LOS PROBLEMAS EN MUTAGENESIS

El lugar del cromosoma donde se producen los intercambios de cromátida hermanas y los sitios de fragilidad cromosómica están estrechamente relacionados con la estructura íntima molecular y la organización estructural del cromosoma. Dicha organización, presente en todo tipo de cromosoma y que refleja el ordenamiento génico, aparece a nivel del microscopio como bandas coloreables tanto con fluorocromos como por tinción con el colorante de Giemsa.

Los métodos de bandeado cromosómico han resultado de la mayor utilidad para el investigador y para el clínico pues permiten detectar un elevado número de entidades hereditarias relacionadas con la variación del tamaño, posición y número de dichas bandas. En este sentido, publicamos el primer mapa completo de la distribución de dichas bandas en cromosomas humanos (14).

Aún cuando los métodos de bandeado proporcionan una poderosa arma para el estudio detallado del cromosoma normal o alterado todas las interpretacio-



FIGURA 11

- a) Metafase correspondiente a una célula expuesta a la B3 (10 ug/ml) durante 90 min, presentando 28 intercambios entre cromátidas hermanas. Las flechas indican los puntos de intercambio.
 b) y c) Reordenamientos cromosómicos inducidos por la B3 con diferenciación de cromátidas hermanas. Se ilustran una estructura trirradial y un reordenamiento cuadrirradial. Las barras corresponden a 5 um.

nes se han basado, hasta la fecha, en apreciaciones microscópicas subjetivas. A fin de superar esta dificultad, elaboramos un nuevo método de localización cuantitativa para detectar la posición relativa de las bandas a lo largo de los brazos cromosómicos (15).

Este método fue aplicado para desarrollar un programa de computación (2) capaz de detectar y analizar

cuantitativamente las bandas de los cromosomas humanos en forma automática haciendo empleo de los sistemas de microscopía fotométrica de exploración bajo comando computacional.

Esta metodología nos permitió expandir las facilidades instrumentales disponibles en la división destinadas a este tipo de estudios constituyendo, en la actualidad, la única unidad de este tipo existente en el país y una de las más completas de América Latina por su versatilidad analítica. Nuestro instrumento está compuesto de cinco partes fundamentales, a saber: 1) un microscopio con platinas electromecánicas de exploración del objeto; 2) un cabezal fotométrico; 3) un instrumento electrónico de medida; 4) una fuente de luz estabilizada, y 5) una computadora, todo lo cual está conectado "on line" para un análisis automático e interactivo con el usuario (Fig. 12).

El sistema es capaz de exhibir en la pantalla gráfica de colores de la terminal de la computadora todo el cariotipo humano bandeado o cromosomas individuales, solos o combinados, en tres grados de condensación (metafase, prometafase media y prometafase temprana), cuyas imágenes responden a las normas descriptivas internacionales de los cromosomas humanos normales (17). A su vez, pueden aparecer graficados cromosomas reales explorados por el sistema exhibiendo los valores de localización relativa de las bandas, lo que aumenta notablemente la precisión del estudio cromosómico (Fig. 13).

Estrechamente relacionado con la detección cuantitativa de las bandas está el problema de la detección de los intercambios de cromátidas hermanas como señalamos anteriormente. Hemos escrito un programa para nuestro sistema (SCE.FOR) para abordar este problema, el cual también ha demostrado su utilidad y precisión (18). La figura 14 muestra un ejemplo de la exploración de un cromosoma real con intercambios de cromátidas hermanas inducidos en células expuestas a la luz ultravioleta.

Como la localización de los intercambios también es expresada en unidades relativas, los puntos de intercambio pueden ser comparados con la posición de las bandas por lo que, estimamos, todo el conjunto metodológico e instrumental disponible en nuestra división permite ahondar en problemas estructurales cromosómicos en relación a la acción de los agentes genotóxicos como así en ciertos síndromes clínicos hereditarios.

ALGUNOS ASPECTOS BIOLÓGICOS GENERALES DE LAS METIL P-BENZOQUINONAS

La secreción del *A. aculeatus*, denominada por Estable y cols. (5) con el término de Gonileptidina, nombre derivado de la antigua clasificación del animal, se segrega espontáneamente o por presión del

TABLA 1

Distribución de los intercambios entre cromátidas hermanas en los diferentes grupos de cromosomas humanos con sus correspondientes porcentajes en células tratadas (B3) y controles

GRUPO	Par No.	Control		B3	
		ICH	%	ICH	%
A	1 - 2 - 3	219	26.905	717	28.498
B	4 - 5	134	16.462	387	15.381
C	6 - 12 + X	310	38.083	932	37.043
D	13 - 15	90	11.057	287	11.407
E	16 - 18	41	5.036	148	5.882
F	19 - 20	11	1.351	19	0.756
G	21 - 22 - Y	9	1.106	26	1.033
Total		814	100.000	2.516	100.000

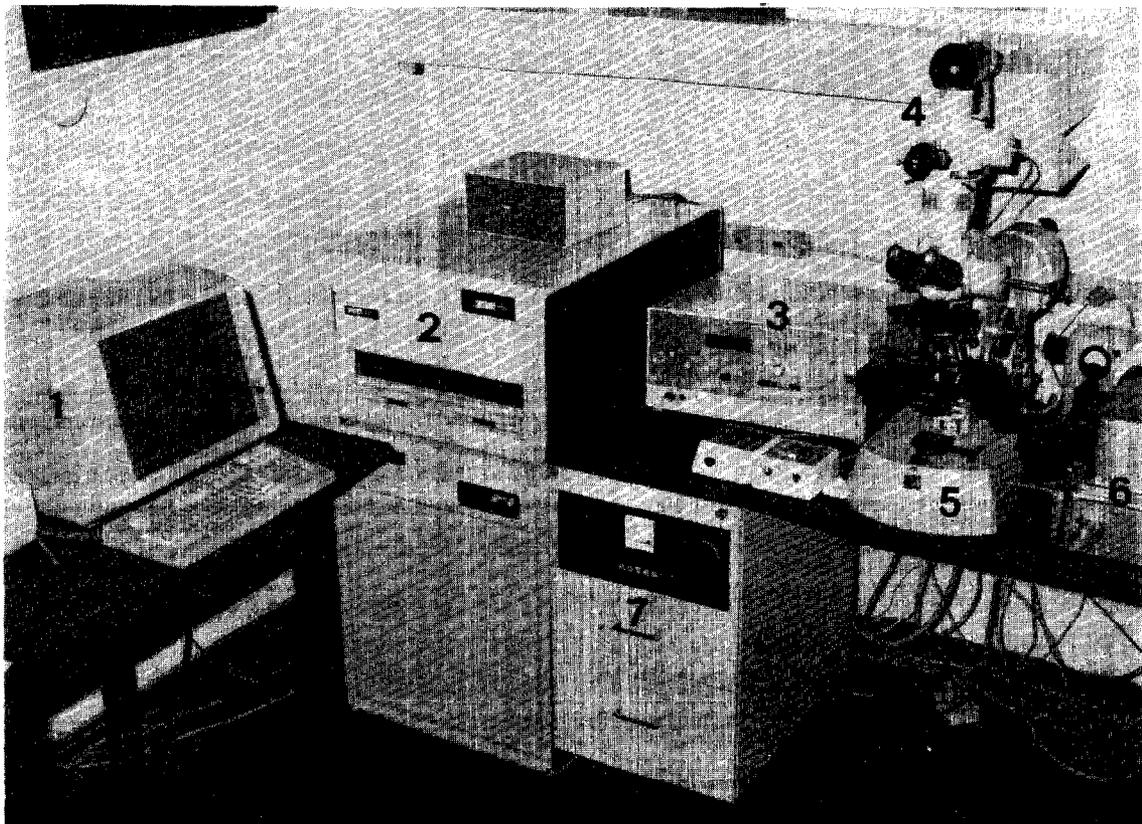


FIGURA 12

Vista parcial del sistema microfotométrico de exploración computarizado disponible en la División de Citogenética Humana y Microscopía Cuantitativa del IIBCE. 1) Terminal gráfica Tektronix 4107 de colores 2) Computadora Digital PDP 11-23; 3) Módulos electrónicos de comando y de medida del sistema fotométrico; 4) Cabezal fotométrico MP01 de Zeiss; 5) Fotomicroscopio 11 Zeiss con platina electromecánica de exploración; 6) Monocromador Perkin-Elmer; 7) Unidad de comando del Fotomicroscopio.

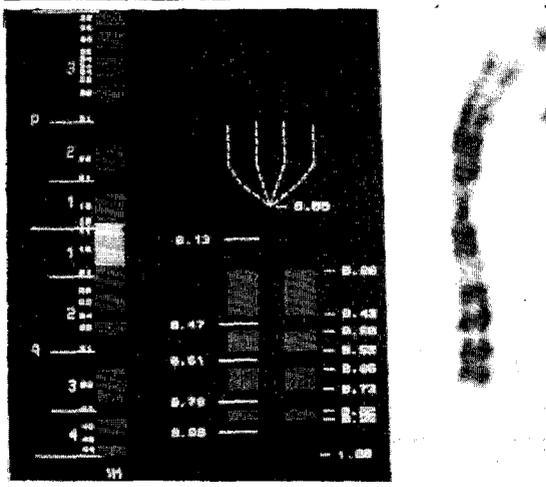


FIGURA 13

Izquierda. Cromosoma homólogo del par No. 1 humano generado en la terminal gráfica de la computadora. El tamaño de las bandas (representadas en color rojo) así como los parámetros de referencia graficados responden a las normas internacionales actuales (ISCN, 1981). El cromosoma ilustrado corresponde al estadio de metafase (M). Centro. Imagen gráfica obtenida mediante exploración del brazo largo del cromosoma humano normal No. 1 ilustrado a la derecha. Los valores que aparecen en la cromátida de la derecha corresponden a las regiones delimitantes entre banda e interbanda detectadas por el microfotómetro. Las líneas y los valores graficados en la cromátida de la izquierda representan los picos de densidad máxima de cada banda calculados en sus posiciones relativas por el sistema.

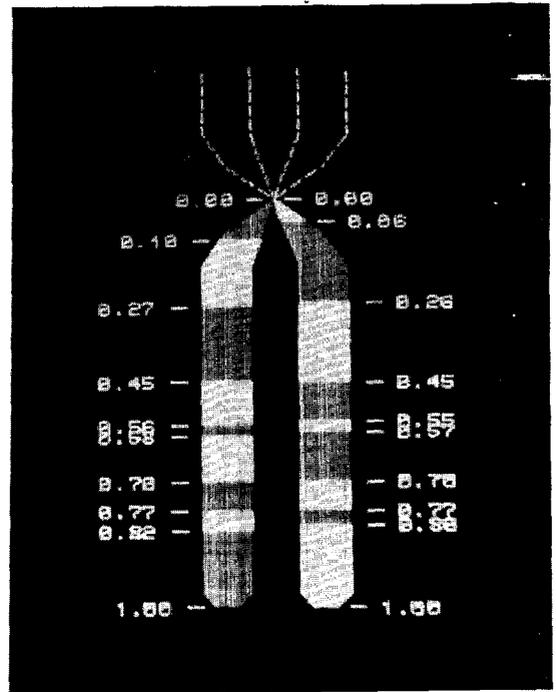


FIGURA 14

Exploración de un cromosoma con intercambios de cromátidas hermanas. Cada cromátida fue explorada separadamente. Los valores generados por la computadora corresponden a las posiciones relativas de los sitios de intercambio detectados a lo largo del brazo cromosómico. Nótese la precisa detección lograda en un número de puntos de intercambio en ambas cromátidas.

céfalotorax apareciendo a la altura del par número 1 escurriéndose pasivamente por los surcos laterales (Fig. 6).

La capacidad de secreción de estas estructuras defensivas no es privativo del *Acanthopachylus* sino que se observa también en otros opiliónidos. Existen por lo menos otras 16 especies de opiliónidos en el Uruguay cuyas secreciones aún no han sido investigadas del punto de vista de su poder clastogénico (19). Por otra parte, las metil p-benzoquinonas no son las únicas sustancias que componen las secreciones emitidas por los opiliónidos ya que por lo menos se han detectado doce compuestos diferentes.

La secreción de metil p-benzoquinonas tampoco es un hecho característico de los opiliónidos sino que existe un número de otros arácnidos, insectos y termitas que también producen derivados quinónicos, lo que torna dichas sustancias de amplia difusión en el reino animal. Casos singulares de secreción lo constituyen algunas especies como los "bombardeer beetles", unos pequeños coleópteros que proyectan su secreción contra su enemigo adoptando posiciones especiales durante su defensa y la emisión de la secreción (20).

Es de interés destacar que el *Acanthopachylus* vive asociado formando colonias compuestas por 50 a 300 individuos en algunas épocas del año dependiendo, probablemente, de la temperatura y la humedad ambiental, ya que también vive libre o enterrado en el suelo y, quizá, de su comportamiento reproductivo (Fig. 15). Es clásica la observación de que el área donde se hallan las colonias de opiliónidos está libre de otros animales y "aséptica" como se cita desde hace años (21).

La singularidad del comportamiento de este animal y el poder clastogénico de su secreción, que es capaz de alterar el contenido nuclear de células vegetales, insectos y mamíferos por diversas vías experimentales, nos ha permitido emitir la hipótesis de que la diseminación continuada a lo largo del tiempo de las metil p-benzoquinonas en el nicho donde vive el animal, pudiera contribuir a aumentar la tasa de mutación en otros organismos en estas áreas. De este modo, la guerra química entre las especies, un concepto no bien demostrado hasta la fecha, pudiera desempeñar un papel adicional en los procesos mutacionales y evolucionarios que ocurren espontáneamente en la naturaleza (9, 19).



FIGURA 15

Colonia de *A. aculeatus* formada espontáneamente en el Laboratorio. En su medio natural, estos arácnidos forman colonias y los sitios que habitan se hallan, por lo general, libres de otros animales. En algunas ocasiones es posible observar otro opiliónido (*Pachyloides thorelli thorelli*) compartiendo el mismo nicho ecológico. Fotografía gentileza del Prof. R. Capocasale, Div. de Zoología Experimental, IIBCE

ACCIONES PARA EL DESARROLLO DE LA GENÉTICA TOXICOLÓGICA EN AMÉRICA LATINA

En la última década se ha incrementado el interés en desarrollar investigaciones en el área de la Genética Toxicológica particularmente en América Latina debido a la creciente industrialización de nuestros países, lo que ha aumentado notablemente los riesgos de contaminación ambiental, causantes de mutaciones y cánceres en las poblaciones.

En este sentido, se ha desarrollado, durante este período, en la región una serie de cursos de entrenamiento de postgrado con el auspicio del Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente con la finalidad de formar investigadores especializados en dicha área.

Estas actividades científicas fueron precedidas por los primeros cursos sobre Genética Toxicológica para investigadores de primera línea interesados en esa disciplina, organizados por el Prof. M. Legator de la Universidad de Texas en Galveston, Texas, USA (1976-1977). El Dr. Legator ha sido el creador en los Estados Unidos de Norteamérica de la primera Cátedra de Toxicología y Epidemiología Ambiental que se instaló en la Facultad de Medicina de Galveston. A partir de esa fecha, se desarrollaron cursos sobre la misma área en San Pablo, Brasil (1977), en Concepción, Chile (1978), en La Plata y Buenos Aires, Argentina (1978), Antioquía, Colombia (1979), Lima, Perú (1980) y en la ciudad de México y Coahuila, México (1981), y en Montevideo (1986).

Asimismo, se fundó en México (1980) la Asociación Latinoamericana de Mutagénesis, Carcinogénesis y

Teratogénesis Ambiental (ALAMCTA), habiendo esta entidad auspiciado ya algunos esfuerzos destinados a la promoción de este tipo de estudios.

Toda esta actividad desplegada, ha puesto de manifiesto en forma muy evidente la necesidad, interés y urgencia existentes en la región en la formación de recursos humanos y el desarrollo de investigaciones propias que reflejen las necesidades y estrategias de los países en cuanto al grave problema de la contaminación ambiental, el proceso de industrialización y la detección de los agentes genotóxicos.

Dentro del marco de desarrollo e integración regional, los investigadores de la División de Citogenética Humana y Microscopía Cuantitativa del Instituto de Biología Clemente Estable y del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular de La Plata, Argentina, han acordado organizar, bajo los auspicios de Unesco, una Reunión Preparatoria Inter-Regional destinada a la redacción de un Proyecto de Desarrollo Multinacional denominado "Sistema Interamericano de Genética Toxicológica" que operará en América Latina los próximos años.

El Proyecto abarcará:

- a) Investigación básica a través del financiamiento de proyectos bi o multinacionales que involucren países de la región;
- b) Formación de recursos humanos de alto nivel científico y tecnológico mediante becas, pasantías, estadías de perfeccionamiento, cursos de postgrado, entrenamientos tecnológicos, participación y promoción de simposios, talleres de trabajo, grupos de discusión y evaluación y otros eventos científicos relacionados.
- c) Desarrollo de sistemas educativos sanitarios de información y prevención poblacional.
- d) Desarrollo de sistemas de detección y monitoreo de contaminantes genotóxicos ambientales particularmente orientados a la actividad industrial y a los grupos humanos más expuestos.
- e) Promoción y auspicio de la enseñanza de las diversas áreas de la Genética Toxicológica a nivel universitario contribuyendo a la creación de cátedras con dicha finalidad, cursos de especialización y ciclos de conferencias con la participación de especialistas de la región.
- f) Asesoramiento a los Gobiernos a fin de contribuir al desarrollo de una legislación apropiada, por lo general no disponible en la región y semejante a la ya existente en los países industrializados, destinada a la protección y prevención de nuestras comunidades. Esta actividad incluirá la organización de Seminarios Internacionales sobre los aspectos legales con la participación de juriconsultos expertos en la materia.

El proyecto implica la realización de una reunión de trabajo Inter-Regional Preparatoria que se llevará a cabo en Montevideo, Uruguay, en noviembre 16-21, 1987, e integrada por un panel de especialistas y miembros designados por las agencias auspiciantes destinada a elaborar el Proyecto por el cual se establecerá el "Sistema Interamericano de Genética Toxicológica" que actuará en la región.

Dicho Panel estará compuesto por siete investigadores latinoamericanos, dos investigadores de los Estados Unidos de Norteamérica y tres investigadores de Europa aparte de representantes de Organismos Internacionales, habiéndose designado el Instituto, por ser nuestra división la responsable del Proyecto, el órgano encargado de la organización y ejecución de la reunión.

REPERCUSION PREVISTA DEL PROYECTO

La progresiva asociación de los países al Sistema Interamericano de Genética Toxicológica, ya manifestada por el auspicio previo al Proyecto por parte de Argentina, Chile, Colombia, Ecuador y Perú permitirá una más estrecha cooperación en los programas de investigación que se están llevando a cabo en la región así como lograr una real integración de nuestras universidades, centros de investigación, y científicos al posibilitarse una efectiva e intensa interacción de los recursos humanos disponibles con los especialistas de otras áreas cumpliendo con las recomendaciones realizadas durante la Reunión Intergubernamental de Expertos de Alto Nivel sobre Cooperación Regional en Asuntos Ambientales en América Latina y el Caribe que se llevó a cabo en Montevideo del 6 al 8 de abril de 1987.

Por otra parte, se contribuirá en forma efectiva en el auspicio y establecimiento de mecanismos legales de protección de nuestras comunidades de los agentes

genotóxicos. En relación a este aspecto, nuestra división ya ha estructurado y propuesto una reunión de Expertos para abordar el tema "Ética, Genética y la Ley" (Ethics, Genetics and the Law) que se desarrollará en Montevideo en 1989-90 con la participación de expertos de América Latina, Europa y los Estados Unidos.

Se aguarda, por tanto, un intenso período de actividades en el área de la Genética Toxicológica las cuales contribuirán en el desarrollo científico de nuestro país, al representar un área significativa de investigación y de entrenamiento de postgrado, lo que resaltarán de considerable importancia en el marco del Programa de Desarrollo en Ciencias Básicas (PEDECIBA) recientemente instituido en el Uruguay.

CONCLUSION

Los estudios cromosómicos han demostrado ser extraordinariamente informativos y de la mayor importancia para el desarrollo de sistemas de investigación de la acción de agentes mutagénicos. Es pues urgente que los países latinoamericanos en proceso de industrialización dispongan de unidades nacionales capacitadas para llevar a cabo investigaciones básicas en esta área y que realicen análisis coordinados a nivel continental con otros centros científicos orientados a la detección, seguimiento y protección de los contaminantes ambientales de alto riesgo genético de modo de poder asesorar con precisión a las autoridades responsables y a los grupos humanos expuestos.

Correspondencia:

Dr. Máximo Drets
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Av. Italia 3318
Montevideo - Uruguay

Résumé

La technologie et l'industrialisation modernes comportent un nombre considérable d'agents qui peuvent avoir une action mutagenique, carcinogénique ou teratogène sur l'humanité.

C'est pour protéger les communautés de ces risques, qu'il faut développer des méthodes de recherche de ces contaminants et créer des équipes humaines spécialisées.

Dans cet article, on expose quelques aspects du problème tout en décrivant les principales aberrations chromosomiques causées par des agents mutagéniques et un modèle biologique pour expérimenter avec du metil-p-benzoquinones volatiles d'origine animal, capables de produire des altérations chromosomiques aux cellules humaines et de souris; on explique aussi la méthodologie analytique employée. On fait d'ailleurs quelques considérations biologiques-évolutives sur l'effet des p-benzoquinones sur la nature et la guerre chimique entre les espèces.

On donne une brève information sur d'autres activités réalisées au pays et en Amérique Latine qui visent au développement de la Génétique Toxicologique.

Summary

Modern technology and industrialization introduce into the human environment a considerable number of agents that may possess a mutagenic, carcinogenic or teratogenetic action.

In order to protect communities from such risks it is necessary to develop research systems on such contaminants as well as specialized human resources.

The present article discusses some aspects of the problem with a brief description of the main chromosomal aberrations induced by mutagenic agents and a biological model for experimentation with volatile methyl p-benzoquinones of animal origin capable of inducing chromosomal alterations in human and mouse cells as well as the analytic methodology employed. A number of biológico-evolutionary considerations are set out regarding the action of p-benzoquinones in nature and the chemical war between species.

A brief information is supplied on other actions carried out both in this country and in Latin America aimed at the development of Toxicologic Genetics.

Bibliografía

1. **MULLER, HJ:** Artificial transmutation of the gene. *Science*, 1927; 66: 84-87.
2. **AUERBACH, C; ROBSON, JM:** Chemical production of mutations. *Nature*, 1946; 157: 302.
3. **SHAW, MW:** Human chromosome damage by chemical agents. *Ann. Rev. Med.*, 1970; 21: 409-432.
4. **SCHMIDT, W:** The micronucleus test for cytogenetic analysis. **In:** Hollaender, A, ed. *Chemical Mutagens*. New York, Plenum, 1974; 4: 31-53.
5. **ESTABLE, C; ARDAO, MI; PRADINES-BRASIL, N; FIESER, LF:** Gonyleptidine. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955; 77, 4942.
6. **FIESER, LF; ARDAO, MI:** Investigation of the chemical nature of Gonyleptidine. *J. Am. Chem. Soc.*, 1956; 78: 774-781.
7. **FREYRE, HA; ROVIRA, M; ARDAO, MI:** Toxicidad de metil-1,4 benzoquinonas y metil-1,4 benzohidroquinonas. *Arch. Soc. Biol. (Montevideo)*, 1958; 24: 82-88.
8. **SAEZ, FA; DRETS, ME:** The action of Gonyleptidine on the mitotic and meiotic chromosomes and on the interphase nucleus. *Portugaliae Acta Biol.*, 1958; 5: 287-296.
9. **DRETS, ME; FOLLE, GA; AZNAREZ, A:** Clastogenic action of a dimethyl p-benzoquinone of animal origin. *Mutation Research*, 1982; 102: 159-172.
10. **LOPEZ DE GRIEGO, S; BELTRAMI, S:** Types and frequencies of micronuclei induced by methyl p-benzoquinones in human lymphocytes. *Environmental Mutagenesis*, 1987. (En consideración)
11. **DRETS, ME:** Extreme chromosome shortening induced in human lymphocytes by 2,3 dimethyl p-benzoquinone resembling fragmentation. *Brief Communication. Environmental Mutagenesis*, 1983; 5: 923-927.
12. **TAYLOR, JH:** Sister chromatid exchanges in tritium labelled chromosomes. *Genetics*, 1958; 43: 515-529.
13. **LATT, SA:** Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973; 70: 3395-99.
14. **DRETS, ME; SHAW, MW:** Specific banding patterns of human chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971; 68: 2073-2077.
15. **DRETS, ME; SEUANEZ, H:** Quantitation of heterogeneous human heterochromatin: microdensitometric analysis of C- and G-bands. **In:** Coutinho, EM; Fuchs, F, eds. *Physiology and genetics of reproduction*. New York, Plenum, 1974; pt. A: 29-52.
16. **DRETS, ME:** Bandscan - A computer program for on-line linear scanning of human banded chromosomes. *Comp. Progr. Biomed.*, 1978; 8: 283-294.
17. **ISCN (1981):** An international system for human cytogenetic nomenclature. High-resolution banding. Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. *Cytog. Cell. Genet.*, 1981; 31: 1-23.
18. **DRETS, ME; MONTEVERDE, FJ:** Automated cytogenetics with modern computerized scanning microscope photometer systems. **In:** Obe, G; Basler, A, eds. *Cytogenetics: Basic and Applied Aspects*. Berlin, Springer-Verlag, 1987. En Prensa.
19. **FOLLE, GA; LOPEZ DE GRIEGO, S:** Clastogenicity of methylated p-benzoquinones: Chemical warfare in nature? **In:** Obe, G; Basler, A, eds. *Cytogenetics: Basic and Applied Aspects*. Berlin, Springer-Verlag, 1987. En Prensa.
20. **EISNER, T; JONES, TH; ANESHANSLEY, DJ; TSCHINKEL, WR; SILBERGLIED, RE; MEINWALD, J:** Chemistry of defensive secretions of bombardier beetles (Brachinini, Metriini, Ozaenini, Paussini). *J. Insect. Physiol.*, 1977; 23: 1383-1386.
21. **THOMSON, RH:** Naturally occurring quinones. London, Butterworths, 1957; 302 p.