
VI REUNION CIENTIFICA DE LA SEMA



Alcobendas, Madrid

7-9 de Septiembre, 1995

Organizado por:
J.M. García Sagredo
Genética Médica



Libro de resúmenes

1 Programa

2 Ponencias

3 Comunicaciones

VI REUNION CIENTIFICA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MUTAGENESIS AMBIENTAL

Alcobendas (Madrid), 7 al 9 de Septiembre de 1.995

**Organizado por el Servicio de Genética Médica
del Hospital Universitario Ramón y Cajal**

Comité organizador

Presidente: José Miguel García Sagredo

Vocales: Carlos san Román Cos-Gayón
María Teresa Ferro Delgado
María del Carmen Sánchez Hombre
Isabel Vallcorba Gómez del Valle
Mónica Resino Troncoso
Yolanda Vázquez Mazariego
Ana López-Yarto Elejabeitia
Fe García Santiago

*Reunión reconocida de Interés Sanitario por
el Ministerio de Sanidad y Consumo*

Patrocinado por:

Consejería de Educación y Cultura de la Comunidad de Madrid

Ayuntamiento de Alcobendas

Colaboran:

Laboratorio Italfármaco

Pacisa - Zeiss

INDICE

Programa	4-4
Presentación y Mesa Redonda	10-28
Comunicaciones	27-50
Índice de autores	51

SEDE DEL CONGRESO

CASA DE CULTURA, ALCOBENDAS

(Calle Mariano Sebastian Izuel 11-13, Autobus 151 o 154 en Plaza de Castilla de Madrid, junto al hotel)

PROGRAMA CIENTIFICO

Jueves, 7 de Septiembre

16.00 Entrega de la documentación

18.00 **Mesa redonda** sobre GLPs:

Moderador: C. Barrueco

Participantes:

M. Abuín, Dir. Gral. Farmacia, Ministerio de Sanidad

M. Martinez Almagro, Instituto Carlos III

M.T. López Esteban, Instituto Nacional de Consumo

M.C. García Moreno del Río, Instituto Nacional de Consumo

Comunicación a la Mesa Redonda:

1. Implantación de sistemas de calidad en laboratorios de ensayo.

García Moreno del Río MC. y López Esteban MT. Madrid.

19.00 Recepción en el Ayuntamiento de Alcobendas

Viernes, 8 de Septiembre

9.00 Apertura oficial del Congreso

9.15 **1ª sesión:**

Moderador: R. Marcos

I Ponencia: Biomonitorización de poblaciones humanas expuestas a agentes genotóxicos ambientales. B. Sinués. F. Medicina, Zaragoza

10.00 Comunicaciones a la ponencia:

1. Efecto de la edad en la inclusión de los cromosomas sexuales en micronúcleos de linfocitos humanos.
Catalán J., Autio K., Sorsa M., Norppa H. Zaragoza.
2. Biomonitorización citogenética de pacientes tratados con el isótopo radiactivo yodo-131.
Gutierrez S., Carbonell E., Galofré P., Xamena N., Creus A. y Marcos R. Barcelona.
3. Biomonitorización en un grupo de trabajadores de gasolineras.
Pitarque M., Carbonell E., Lapeña N., Marsá M., Torres M., Creus A., Xamena N. y Marcos R. Barcelona.
4. Evaluación del daño genético inducido por cinco herbicidas en linfocitos humanos utilizando el ensayo single-cell gel electrophoresis (SCGE) o ensayo del "Cometa".
Ribas G., Frenzilli G., Barale R. y Marcos R. Barcelona.
5. Actividad genotóxica de efluentes líquidos provenientes de la industria de la celulosa en Chile.
Venegas W., Alarcón M., Hermosilla I., Duk S., Weigert G., García M. Concepción (Chile).
6. Evaluación de las condiciones más eficientes para el análisis de micronúcleos.
Sánchez Hombre MC., Vallcorba I., Vázquez Mazariego Y., López-Yarto A., Ferro MT y García Sagredo JM. Madrid.

11.15 Pausa café

11.45 2ª Sesión:

Moderador: J.M. García Sagredo

Ponencia: Fluorescence in situ hybridization (FISH) a practical tool for the detection of structural and numerical chromosome abnormalities. M. Bauchinger, Institut für Strahlenbiologie, Neuherberg, Alemania.

12.45 Comunicaciones a la ponencia:

1. Molecular cytogenetic analysis of the influence of culturing on the frequency and content of micronuclei in immunomagnetically sorted human T-cells.
Surrallés J., Falck G. and Norppa H. Helsinki, Finlandia.
2. Chromosome painting en dosimetria biológica: Evaluación de la capacidad de analizar anomalías cromosómicas estables utilizando diferentes parejas de sondas.
Vallcorba I., López-Yarto A., Sánchez Hombre MC., Resino M., Ferro MT. y García Sagredo JM. Madrid.

13.15 Comunicaciones libres:

1. Papel protector de las alquitrasferasas en la mutagénesis por cloroetilnitrosoureas en *Escherichia coli*.
Ferrezuelo F., Abril N., Prieto-Alamo MJ. y Pueyo C. Córdoba.
2. Espectro de mutación inducido por CCNU en el gen LACI de *Escherichia coli*: papel de la actividad 06-alquilguanina-DNA alquiltransferasa.
Jurado J., Ferrezuelo F. y Pueyo C. Córdoba.
3. Espectro de mutación inducido por AFB1 en el gen LACI de *Escherichia coli*: comparación de la activación in vitro (mezcla S9) con el ensayo a través de hospedador.
Prieto-Alamo MJ., Abril N., Jurado J. y Pueyo C. Córdoba.
4. Detección del efecto mutagénico en el control y la seguridad de los alimentos.
Moya P., Salas J., González T. y Saraza R. Madrid.

14.00 Comida de trabajo

16.00 **3ª Sesión**

Moderador: Dr. Elina Valcarce de Angulo, Subdirec. de Sanidad Ambiental, M. de Sanidad y Consumo

Mesa Redonda sobre Evaluación genotóxica en el marco de los métodos complementarios y alternativos a la experimentación animal.

Coordinador: Dr. Eduardo de la Peña de Torres

Plaguicidas

A. Herrera Sebastian, Subdirec. Sanidad Ambiental, M. de Sanidad y Consumo

Productos químicos

C. Caballo, Subdirec. de Sanidad Ambiental, M. de Sanidad y Consumo

Medicamentos

E. García Alvarez, Laboratorios Almirall SA, Barcelona

Cosméticos

C. Barrueco Fernandez-Cuervo, Centro Nacional de Alimentación, Instituto de Salud Carlos III

Riesgo ocupacional

A. Huici Montagud, Centro Nacional de Condiciones de Trabajo, Barcelona

Contaminantes ambientales

A. Guadaño Larraruri, Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Madrid

18.00 Pausa café

18.30 Asamblea de la SEMA

19.00 *Visita al Jardín Botánico de Alcobendas*

21.00 *Cena de Gala ofrecida por el Ayuntamiento de Alcobendas*

Sábado, 9 de Septiembre

9.15 4ª Sesión:

Moderador: F. Cortés

Ponencia: Elementos transponibles y mutación. N. Xamena, UAB, Barcelona

10.00 Comunicaciones a la ponencia y comunicaciones libres:

1. Escisión del retrotransposón copia del alelo w^a mediante choque térmico.
Baldrich E., Velázquez A., Creus A., Marcos R., Xamena N. y Cabré O.
Barcelona.
2. Caracterización y ampliación del análisis molecular de revertientes de la cepe white-spotted-1 de *Drosophila melanogaster* obtenidos por exposición a agentes alquilantes.
Soriano S., Velazquez A., Creus A., Marcos R., Cabré O. y Xamena N.
Barcelona.
3. Análisis de reversiones inducidas en el mutante white-ivory de *Drosophila melanogaster*.
Suárez S., Cabré O., Velazquez A., Creus A., Marcos R. y Xamena N.
Barcelona.
4. Estudio del efecto genotóxico de distintos inhibidores de las topoisomerasas en el ensayo smart de *Drosophila*.
Torres C., Xamena N., Creus A. y Marcos R. Barcelona.

11.00 Pausa café

11.30 5ª Sesión:

Moderador: M.A. Comendador

Comunicaciones libres:

1. Seis compuestos productores de especies reactivas de oxígeno ensayados con el Test w^* .
Gaivao I. y Comendador MA. Oviedo.

2. ¿Es el ensayo white-ivory de *Drosophila melanogaster* una herramienta útil en la detección de efectos genotóxicos?
Ferreiro JA., Consuegra S., Sierra LM. y Comendador MA. Oviedo.
3. El ensayo white-ivory de *Drosophila melanogaster* bajo condiciones de reparación deficientes.
Ferreiro JA., Sierra LM. y Comendador MA. Oviedo.
4. N-Etil-N-Nitrosourea (ENU), hipermutabilidad y la mutación MUS308.
Tosal L., Comendador MA. y Sierra LM. Oviedo.
5. Daño cromosómico inducido por endonucleasa de restricción y su modulación mediante ligasa del fago T4 en células CHO electroporadas.
Piñero J., Ortiz T., Daza P. y Cortés F. Sevilla.
6. Potenciación del daño cromosómico y muerte celular por inhibidores de topoisomerasas en células CHO pretratadas con 5-Azacitidina.
Cortés F., Piñero J., López-Baena M. y Ortiz T. Sevilla.

13.00 **Ponencia:** Toxicidad reproductiva: Campos electromagnéticos ambientales y desarrollo embrionario. J. Leal, H. Ramón y Cajal, Madrid

13.45 Clausura de la Reunión

14.00 Comida de trabajo

BÍOMONITORIZACIÓN DE POBLACIONES HUMANAS EXPUESTAS A AGENTES GENOTÓXICOS AMBIENTALES.

Sinués B. y Lanuza J., Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Zaragoza.

Las alteraciones a nivel del DNA juegan un importante papel tanto en la activación de protooncogenes como en la inactivación de los genes encargados de la inhibición tumoral. Así pues, se acepta que el daño cromosómico, como acontecimiento mutacional, puede actuar sobre cualquiera de los tres pasos aceptados del proceso de carcinogénesis (iniciación, promoción y progreso tumoral). Sin embargo, el proceso primero y esencial es la iniciación, que deriva de la reacción de los compuestos genotóxicos nucleofílicos con el ADN. La magnitud del daño genético dependerá de la dosis de xenobiótico y de su disposición por el individuo, que junto con la eficiencia y tipo de reparación del ADN determinarán el daño genotóxico final.

Según las estimaciones procedentes de los estudios epidemiológicos, al menos el 75-80% de los casos de cáncer están causados por factores ambientales y, por lo tanto, hay que considerarlos, en principio, susceptibles de prevención. La monitorización biológica de la exposición humana a carcinógenos supone un puente entre las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos, permitiendo superar algunas de las limitaciones de los estudios *in vitro* e *in vivo* en animales de experimentación. Por otra parte, la incorporación de los métodos de biomonitorización, también llamados de "experimental del cáncer", a los estudios epidemiológicos "convencionales" permite la obtención de pruebas determinantes de la relación causa-efecto y la detección del riesgo carcinogénico con exposiciones mucho menores desde el punto de vista cuantitativo y temporal. Estas técnicas informan además de la magnitud real de la exposición al agente genotóxico, es decir, aquél que está en contacto con las estructuras celulares (condicionado por los procesos toxicocinéticos de absorción y metabolismo). Así, con un *riguroso diseño*, son capaces de identificar, dentro de la población, los grupos de mayor riesgo bien por circunstancias genéticas individuales o por una particular idiosincrasia metabólica.

Los principales métodos de biomonitorización pueden medir efectos biológicos precoces, la dosis interna recibida o la dosis biológica efectiva. Para el primer objetivo, se utilizan tests citogenéticos a corto plazo, como aberraciones cromosómicas, intercambios entre cromátides hermanas o micronúcleos, en cultivos de linfocitos de sangre periférico, ya que el daño genotóxico en estas células refleja

los acontecimientos genotóxicos de las células diana. La dosimetría interna puede realizarse midiendo directa o indirectamente la concentración de las sustancias o sus metabolitos en los fluidos corporales, o bien mediante el análisis de la mutagenicidad urinaria.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que existen factores genéticos que conjuntamente con los ambientales determinan que exista una superior predisposición a altas exposiciones (incluso para dosis menores) en determinados individuos, convirtiéndolos en sujetos con superior riesgo neoplásico. En efecto, la dosis que llega a los tejidos diana depende del metabolismo enzimático. Algunas enzimas presentan distribuciones muy heterogéneas en su dotación llegando incluso a ser polimórficas. Entre estas actividades polimórficas presentan especial importancia la N-acetiltransferasa y las oxidaciones vía P450 tales como CYP1A2 y CYP2D6.

Nuestro grupo, dentro del campo de la biomonitorización humana, ha evaluado la exposición a agentes físicos (radiación, medios de contraste radiológico), químicos (tabaco, heroína, distintos fármacos, exposiciones ocupacionales), biológicos (VIH, virus de la hepatitis B), así como enfermedades crónicas (insuficiencia renal, diabetes, déficit de hormona de crecimiento). Los estudios de biomonitorización humana son de especial importancia en el caso de exposiciones a fármacos, ya que éstos pasan a ser evaluados en el ser humano (ensayos clínicos fase I) cuando aún no se han obtenido los resultados de genotoxicidad *in vitro* y en animal de experimentación (fase preclínica).

Dada la importancia de factores genéticos en la exposición a sustancias genotóxicas, resulta de especial interés para nosotros, dentro de la epidemiología experimental del cáncer, la asociación de fenotipos y genotipos metabólicos con biomarcadores de genotoxicidad. Actualmente, nuestra atención se centra en la exposición humana a arilaminas y su relación con actividades metabólicas determinadas genéticamente.

FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDISATION (FISH), A PRACTICAL TOOL FOR THE DETECTION OF STRUCTURAL AND NUMERICAL CHROMOSOME ABERRATIONS

M. Bauchinger, Institut für Strahlenbiologie, GSF-Forschungszentrum Neuherberg 85758, Oberschieflheim, Germany

Exposure of mammalian cells in vitro and in vivo to ionising radiation or chemical substances may induce structural and numerical chromosome aberrations. Various experimental systems have been developed allowing for aberration screening as well as for an identification of the underlying mechanisms, such as clastogenicity or irregular distribution of chromosomes caused by spindle damage. Scoring of dicentricies (and ring chromosomes) has proven to be particularly useful in radiological protection for biodosimetry. Various chromosome banding techniques are available and in practical use for prenatal diagnosis as well for the analysis of karyotypic changes in human neoplasia.

The recently developed method of non-isotopic fluorescence in situ hybridisation (FISH) has opened new perspectives to facilitate and to improve cytogenetic analyses in these working fields. Using probes to chromosome-specific repeated DNA sequences, whole chromosome-specific or region-specific probes or specific locus probes, corresponding target sequences can be reliably detected in metaphase preparations and interphase nuclei of fresh and archived material, e.g. paraffin-embedded tissues.

In this contribution, the main principles of FISH will be reviewed. Examples from own experimental experience will be demonstrated to show the potential of this molecular biological technique for the detection of structural and numerical chromosome abnormalities in mutagenicity testing, tumour cytogenetics and biodosimetry of human accidental radiation exposure.

PARTICIPACIÓN DE EXPERTOS ESPAÑOLES EN EL PROGRAMA DE LA OCDE SOBRE LINEAS DIRECTRICES RELATIVAS A GENOTOXICIDAD

Dra. Elina Valcarce. Coordinadora Nacional de Métodos de Ensayo. Subdirec. General de Sanidad Ambiental, Dirección General de Salud Pública. Ministerio de Sanidad y Consumo

En el Programa de actividades que se llevan a cabo en el seno de la OCDE para poner al día o elaborar nuevas líneas Directrices, se está realizando una revisión de algunos de los métodos de ensayo de Genotoxicidad y, con este fin, se recurre a los expertos nacionales de los países miembros.

En Junio de 1994, a través de la Coordinadora Nacional de Métodos de Ensayo se pidió la opinión y los comentarios sobre los métodos que se citan a continuación; las peticiones se hicieron teniendo en cuenta la especialización que, dentro de la Genotoxicidad, tienen los diferentes Grupos de Trabajo y expertos consultados.

Métodos de ensayo sobre los que se pidieron comentarios:

1. Propuestas para reemplazar las Líneas Directrices 471 y 472: "Reverse Mutation Assay Using Bacteria"
2. Propuesta para poner al día la Línea Directriz 473: "*In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test"
3. Propuesta para poner al día la Línea Directriz 474: "Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test"
4. Propuesta para poner al día la Línea Directriz 475: "Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test"
5. Propuesta para poner al día la Línea Directriz 476: "*In vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test"
6. Propuesta para poner al día la Línea Directriz 483: "Mammalian Germ-Cell Chromosome Aberration Test"

7. Propuesta de una nueva Línea Directriz: "Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In vivo*."
8. Propuesta de una nueva Línea Directriz: "Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*"

Se recibieron comentarios de todas las propuestas, excepto de las correspondientes a los métodos : 6. Propuesta para poner al día la Línea Directriz 483 "Mammalian Germ-Cell Chromosome Aberration Test" y 7. Propuesta de una nueva Línea Directriz: "Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In vivo*."

Los expertos y Grupos de Trabajo consultados fueron:

Dr. J.M. García Sagredo del Hospital Ramón y Cajal de Madrid.
Dra. C. Barrueco del Instituto de Salud Carlos III.
Dr. R. Marcos de la Universidad Autónoma de Barcelona.
Dr. F. Cortés de la Universidad de Sevilla.
Dra. C. Pueyo de la Universidad de Córdoba.
Dra. M. Llagostera de la Universidad Autónoma de Barcelona.
Dra. C. Caballo de la Dirección General de Salud Pública. Ministerio de Sanidad y Consumo,
Dra. A. Herrera de la Dirección General de Salud Pública. Ministerio de Sanidad y Consumo.
Dr. M.A. Comendador de la Universidad de Oviedo.
Dr. de la Peña del Instituto de Ciencias Medioambientales. CSIC.

Antes del 15 de Agosto, tal y como se había solicitado por la OCDE, se enviaron los comentarios recibidos, tras elaborar una propuesta unitaria por cada método, como una Posición Nacional, con vistas a la preparación de una Reunión de Expertos en el mes de Septiembre.

La reunión de Expertos en Toxicología Genética tuvo lugar en Roma, del 19 al 23 de Septiembre, en el Instituto Superior de Sanidad del Ministerio de Sanidad Italiano. Asistieron 31 expertos de 11 países: Alemania, Canadá, Dinamarca, España, Estados Unidos, Francia, Italia, Japón, Países Bajos, Reino Unido, Suiza, así como representantes de la Comisión de la Unión Europea, de la industria (BIAC) y del

Secretariado de la OCDE. Para representar a España fueron nominados la Dra. Angustias Herrera de la Dirección General de Salud Pública del Ministerio de Sanidad y Consumo y el Dr. Ricardo Marcos de la Universidad Autónoma de Barcelona.

El propósito de la reunión era:

- discutir los aspectos científicos y técnicos de las propuestas de los ocho métodos de ensayo;
- considerar los comentarios recibidos de los Estados miembros y del BIAC;
- modificar las propuestas si se consideraba apropiado; y
- alcanzar un consenso sobre todos los detalles de las propuestas de las Líneas Directrices para someterlas sucesivamente a las Reuniones de Coordinadores Nacionales y a la Reunión Conjunta del Grupo de Productos Químicos y Comité de Gestión, para su aprobación y subsecuente adopción como Líneas Directrices OCDE.

El informe provisional de esta Reunión de Expertos fue presentado en la 5ª Reunión de Coordinadores Nacionales de Métodos de Ensayo celebrada en París en Octubre de 1994; en él se indicaba a los coordinadores que las modificaciones introducidas en las propuestas de Líneas Directrices se someterían a una última revisión siguiendo el proceso escrito iniciado, para siete de ellas; recomendando que, por el momento, no se continúe con la discusión sobre la propuesta del método "**Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in Drosophila melanogaster**".

Posteriormente, y para realizar esta última revisión, la OCDE envió directamente las propuestas a los expertos nominados, con el fin de que se revisasen, y comprobar si se habían tenido en cuenta todos los acuerdos o si había algún error.

Las versiones finales de los métodos se presentarán probablemente en la 6ª Reunión de Coordinadores Nacionales, que se celebrará durante el próximo mes de Diciembre; de ser así, desde esta Coordinación General se enviarán a todos los expertos consultados una copia de los mismos.

Para terminar, como Coordinadora Nacional quiera agradecer la colaboración de todos los expertos que han hecho posible que nuestro país haya participado en una actividad científica de tanta proyección internacional e incrementado nuestra presencia en las iniciativas de un organismo tan prestigioso como la OCDE.

Madrid, Agosto de 1995.

EVALUACION GENOTOXICA EN EL MARCO DE LOS METODOS COMPLEMENTARIOS Y ALTERNATIVOS A LA EXPERIMENTACION ANIMAL

Eduardo de la Peña de Torres* Laboratorio de Genotoxicología y Mutagénesis Ambiental CSIC. Centro de Ciencias Medioambientales. Serrano 115 dpdo. 28006 Madrid. Fax: 91.5640800. E-mail: EPENA@PINARI.CSIC.ES

En la experimentación toxicológica existe una tendencia al menor uso de animales de experimentación y ello ha contribuido y coincidido con el desarrollo exponencial de los ensayos de genotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*.

Las alternativas a la experimentación animal esta constituida por los métodos, sistemas y modelos siguientes: 1) métodos y técnicas *in vitro*, que utilizan cultivos embriones, órganos, células agregadas o dispersas, células aisladas, y organismos inferiores, bacterias, algas y levaduras; 2) modelos de predicción teórica, relación estructura actividad y farmacotoxicocinética; y 3) modelos técnicos: modelos mecánicos, sistemas audiovisuales, simulación por computadora, y sistemas de realidad virtual.

Estos sistemas *in vitro*, tanto los que utilizan células humanas como células de mamífero, poseen un evidente valor predictivo sobre los ensayos *in vivo* en animales y de los estudios en humanos, por ello su aplicación permite una drástica reducción del número de animales empleados, reducción del estrés a que estos puedan estar sometidos, e incluso, permiten su reemplazamiento, lo que constituyen las conocidas tres R de la experimentación animal.

El elevado número de ensayos de genotoxicidad y su desarrollo a lo largo de años, ha motivado que dichos ensayos sean los únicos que están reconocidos, homologados y estandarizados, no siendo necesaria su validación, en la mayoría de los casos; proceso de validación que han de cumplimentar los nuevos métodos *in vitro*, tanto métodos toxicológicos como farmacológicos, que son candidatos a complementar, e incluso sustituir, a los ensayos *in vivo*.

* Organizador del ICLAS/CSIC Working Group on Complementary Methods. 27-30 abril, 1995. Talavera de la Reina. España..

PLAGUICIDAS

Herrera A. Ministerio de Sanidad y Consumo. Subdirección General de Sanidad Ambiental, Madrid.

La Directiva 91/414/CEE del Consejo relativa a la comercialización de productos fitosanitarios, establece las normas uniformes en los Estados miembros sobre los requisitos y procedimientos para la autorización de productos fitosanitarios, que garanticen un nivel elevado de protección de la salud y del Medio Ambiente.

En lo relativo a la Genotoxicidad se expondrán los ensayos que se exigen actualmente para evaluar una sustancia activa para su autorización y comercialización en el Mercado Europeo, y que están contenidos en la Directiva 94/79/CEE de la Comisión que modifica el Anexo II de la Directiva 94/414/CEE.

PRODUCTOS QUÍMICOS

Covadonga Caballo Díéguez. Subdirección Gral. de Sanidad Ambiental. Ministerio de Sanidad y Consumo.

En 1992 se modificó por séptima vez la Directiva 67/548/CEE, dando lugar a lo que conocemos como "séptima enmienda", Directiva 92/32/CEE; en ella figuran tres niveles de notificación para productos químicos nuevos, dependiendo de la cantidad anual puesta en el mercado.

En lo que se refiere a ensayos de Genotoxicidad, en el nivel básico las sustancias deberán presentar dos ensayos, uno bacteriológico (mutación inversa) y otro para detectar defectos o daños cromosómicos. En función de los resultados obtenidos, de la cantidad de sustancia a comercializar, de las propiedades específicas y de la utilización prevista de la sustancia, se realizarán ensayos suplementarios que servirán para clasificar al producto químico en cuanto a su Genotoxicidad.

COSMETICOS

Dra. Carmen Barrueco Fdez-Cuervo y Lcda. M^a del Mar Díaz Llorente. Centro Nacional de Alimentación. Instituto de Salud Carlos III.

El cosmético es toda sustancia o preparado destinado a ponerse en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano, con el fin exclusivo o principal de limpiarlas, perfumarlas, modificar su aspecto, corregir olores corporales, protegerlas o mantenerlas en buen estado.

Los cosméticos son productos de uso diario en cualquier sociedad civilizada avanzada, de ahí la necesidad de garantizar al consumidor la inocuidad de los mismos mediante estudios toxicológicos previos a su comercialización y uso.

El gran desarrollo que ha sufrido la industria cosmética en los últimos años, probablemente, haya contribuido al enorme dinamismo de su reglamentación.

Un repaso a la legislación existente en las Comunidades Europeas en materia de cosméticos nos lleva a la Directiva marco 76/768/CEE con sus seis modificaciones posteriores (Directivas del Consejo 79/661/CEE, 82/368/CEE, 83/574/CEE, 88/667/CEE, 89/679/CEE y 93/35/CEE) y sus diecisiete adaptaciones de los Anexos al progreso técnico (Directivas de la Comisión 82/147/CEE, 83/191/CEE, 83/341/CEE, 83/496/CEE, 84/415/CEE, 85/391/CEE, 86/179/CEE, 86/199/CEE, 87/137/CEE, 88/233/CEE, 89/174/CEE, 90/121/CEE, 91/184/CEE, 92/8/CEE, 92/86/CEE, 93/47/CEE y 94/32/CEE).

La incorporación de España a la CEE obliga a la armonización de la legislación española de cosméticos con esta directiva y sus posteriores modificaciones, lo cual ha quedado recogido en la reglamentación técnico--sanitaria de productos cosméticos.

La directiva 93/35/CEE establece que la evaluación de la seguridad de un producto cosmético para la salud humana se llevará a cabo de conformidad con los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio establecidas en la directiva 87/18/CEE para las sustancias químicas. Para ello, el fabricante del producto tendrá en cuenta el perfil toxicológico de los ingredientes, su estructura química y el nivel de exposición. En dicha directiva se contempla, en lo referente a ingredientes o combinaciones de ingredientes, la necesidad de prohibir las experimentaciones con animales es estudios

toxicológicos a partir del 1 de Enero de 1998 siempre que existan métodos alternativos validados.

La directiva 86/609/CEE, relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, exige que "un experimento no debería realizarse si se dispone de otro método, científicamente satisfactorio, para obtener el resultado buscado y que no implique el uso de animales". También, exige que siempre que sea necesaria la utilización de animales en un experimento, "se use el menor número" y "se les origine el menor daño posible".

De todo esto se deduce que la investigación toxicológica, actualmente está encaminada al desarrollo de métodos "in vitro". No se pretende, sin embargo, sustituir un ensayo particular "in vivo" por otro "in vitro" sino desarrollar una batería de ensayos "in vitro" que permita obtener nuevos datos sobre el modo de actuación de los productos, con el fin de contribuir a una mejor evaluación del riesgo que pueda derivarse de su uso.

Para que los ensayos "in vitro" puedan sustituir a los realizados con animales, primero deben ser validados y luego, aceptados por las autoridades legislativas.

En el proceso de validación de un ensayo hay que demostrar la reproducibilidad y la relevancia del mismo para una propuesta específica.

Dentro de este contexto, los únicos ensayos "in vitro" aceptados y requeridos por la legislación son los ensayos de genotoxicidad, aunque eso no quiera decir que la investigación se haya detenido en este punto. Prueba de ello son las propuestas de modificación de las líneas directrices de la OCDE para ensayos ya aceptados. Por otro lado, dentro de este campo, se siguen desarrollando nuevos métodos que precisan ser validados. La investigación, por tanto, está en continuo movimiento.

No obstante, los ensayos de genotoxicidad ya han demostrado su validez, en el curso de los años, contribuyendo a cambiar la clasificación toxicológica de las sustancias químicas.

A modo de ejemplo, podemos citar, en el campo de los cosméticos, el caso del captan que, en un principio aparecía en la lista de conservantes provisionalmente admitidos (Directivas del Consejo 82/368/CEE y de la Comisión 86/199/CEE) y ahora ocupa el

número 370 de la lista de sustancias que no pueden contener los productos cosméticos (Directiva de la Comisión 87/137/CEE), debido, fundamentalmente, a haber sido detectado como agente mutagénico en ensayos "in vitro".

En resumen, la investigación sobre búsqueda de nuevos métodos "in vitro" está apoyada por los organismos nacionales e internacionales debido a las normativas de próxima aplicación en el campo de la cosmética. Dicha investigación está orientada hacia la comprensión de los mecanismos implicados a nivel molecular, celular y de tejidos y, aquí es donde los ensayos de genotoxicidad deben contemplarse como básicos dentro de las baterías propuestas para la realización de una evaluación toxicológica.

- Directiva 75/318/CEE relativa a los métodos de ensayo y análisis
- Directiva 75/324/CEE relativa a los métodos de análisis
- Directiva 84/139/CEE por la que se modifica la Directiva 75/318/CEE relativa a los métodos de ensayo y análisis
- Decisión 84/139/CEE del Consejo por la que se modifica una Ley de ensayos toxicológicos en virtud del apartado 4 del artículo 1 de la Directiva 75/318/CEE de los métodos de ensayo y análisis

España:

- Ley 20/1986, Básica de Alimentos Tóxicos e Irritantes
- Real Decreto 2347/1986 por el que se aprueba el Reglamento para la ejecución de la Ley 20/1986
- Orden de 1 de octubre de 1986 por la que se determinan los métodos de determinación de los alimentos tóxicos e irritantes
- Resolución de 28 de abril de 1986, por la que se aprueba el Plan Nacional de Alimentos Peligrosos, que establece las prioridades y criterios de actuación en la 1ª fase de publicación de alimentos en la Directiva 84/139/CEE relativa a los métodos de ensayo y análisis

De acuerdo con la Directiva 84/139/CEE, se requerirá por razones técnicas, cualquier ensayo que figure en una lista que se elaborará con arreglo al procedimiento establecido en el artículo 14 de la Directiva 75/318/CEE y cuando éste sea la única información disponible según se refieren a la actividad que los productos y el procedimiento de los ensayos de la presente Directiva, cuando

CONTAMINANTES AMBIENTALES: RESIDUOS TOXICOS Y PELIGROSOS.

Ana Guadaño Larrauri. Centro de Ciencias Medioambientales. CSIC. Madrid

En la caracterización de los contaminantes se requiere, entre otros criterios, la evaluación mutagénica de los mismos. Dentro de la contaminación ambiental uno de los temas prioritarios es la contaminación del suelo, del agua y del aire a causa de la generación de residuos tóxicos y peligrosos. Resulta por tanto esencial, el establecimiento de una regulación adecuada y específica para la gestión de este tipo de residuos, que garantice que su eliminación y recuperación se controle eficazmente.

La legislación básica sobre residuos tóxicos en la UE y en España es la siguiente:

UE:

- Directiva 78/319/CEE, relativa a los residuos tóxicos y peligrosos
- Directiva 91/689/CEE, relativa a los residuos peligrosos
- Directiva 94/31/CEE, por la que se modifica la Directiva 91/689/CEE, relativa a residuos peligrosos.
- Decisión 94/904/CEE del Consejo por la que se establece una lista de residuos peligrosos en virtud del apartado 4 del Artículo 1 de la Directiva 91/689/CEE del Consejo relativa a residuos peligrosos.

España:

- Ley 20/1986, Básica de Residuos Tóxicos y peligrosos
- Real Decreto 833/1988, por el que se aprueba el Reglamento para la ejecución de la anterior Ley
- Orden de 1 de octubre de 1989, por la que se determinan los métodos de caracterización de los residuos tóxicos y peligrosos
- Resolución de 28 de abril de 1995, por la que se aprueba el Plan Nacional de Residuos Peligrosos, que incorpora las prioridades y criterios establecidos en la UE, en particular lo contenido en la Directiva 91/689, relativa a residuos peligrosos.

De acuerdo con la Directiva 91/689/CEE, se entenderá por residuo peligroso, "cualquier residuo que figure en una lista que se elaborará con arreglo al procedimiento establecido en el artículo 18 de la Directiva 75/442/CEE y tomando como base los Anexos I (categorías de residuos según su naturaleza o la actividad que los produce) y II (constituyentes de los residuos) de la presente Directiva; además

tales residuos deberán tener una o más propiedades de las enumeradas en la lista del Anexo III".

La lista a la que se hace mención aparece publicada en la Decisión 94/904/CEE del Consejo. En el Anexo III de la Directiva 91/689/CEE, aparecen las características "cancerígeno", "teratogénico" y "mutagénico" para cuya asignación se aplican criterios adicionales que reflejan los descubrimientos más recientes y que figuran en la Guía para la clasificación y etiquetado de sustancias y preparados peligrosos del Anexo VI (parte 11 D) de la Directiva 67/548/CEE, modificada por la Directiva 93/21/CEE de la Comisión.

ELEMENTOS TRANSPONIBLES Y MUTACIÓN

Xamena, N.

Unitat de Genètica, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

Los elementos genéticos transponibles (TEs) juegan un papel relevante en la denominada mutagénesis insercional (alteraciones en la estructura del genoma causadas por la incorporación de secuencias extrañas de ADN). Identificados por primera vez a principios de los 50 por Barbara McClintock en maíz, los TEs se han encontrado en todos los organismos analizados, tanto procariotas como eucariotas.

La inserción de TEs en el genoma, que generalmente ocurre de un modo inespecífico, puede causar la alteración de la expresión génica tanto si ésta se da en la región estructural como en la reguladora del gen afectado. En los organismos eucariotas se ha comprobado que la inserción *de novo* de los TEs está implicada en la génesis de alteraciones genéticas heredables y en la transformación neoplásica.

Aunque no se poseen suficientes datos para estimar la contribución relativa de los TEs a la tasa de mutación espontánea en los organismos superiores, se sabe que son la causa principal de mutación espontánea en *Drosophila* y levaduras.

Las frecuencias de escisión, inserción o de transposición de los TEs, así como la expresión de los mismos, pueden verse afectadas por la exposición de los organismos a ciertas condiciones ambientales o como consecuencia de determinados cruces.

Drosophila es un sistema ideal para el estudio de la mutagénesis asociada a los TEs; de ahí que nuestro grupo de Mutagénesis haya seleccionado *Drosophila melanogaster* como organismo de estudio y el locus *white* como sistema genético específico para estudiar la respuesta de mutantes insercionales, caracterizados por la presencia del elemento *copia* u otros elementos *copia-like* (una clase de retrotransposones de características similares a las de los retrotransposones *virus-like* de mamíferos, implicados en muchas alteraciones humanas), a situaciones de estrés químico o físico.

Aunque, en algunos casos, los revertientes obtenidos tras la exposición a la situación de estrés muestran claramente la escisión del elemento, hemos encontrado situaciones en las que su escisión no provoca la reversión al fenotipo salvaje y en las que los fenotipos parcialmente revertientes mantienen inserto el elemento en su posición original. Estos cambios fenotípicos no asociados a la escisión del elemento pueden deberse a la acción de alelos mutantes de otros loci que modifican la expresión de alelos caracterizados por la inserción de TEs. El estudio de loci modificadores y de los mecanismos de interacción con los alelos insercionales puede ser necesario para la elucidación de la base molecular de la mutagénesis asociada a los TEs.

CAMPOS ELECTROMAGNETICOS AMBIENTALES Y DESARROLLO EMBRIONARIO PRECOZ: REVISION DE LOS DATOS.

Jocelyne Leal, Servicio de Bioelectromagnetismo, Departamento de Investigación, Hospital Ramón y Cajal, Madrid

Los campos electromagnéticos (CEMs) ambientales son esencialmente de frecuencias extremadamente bajas (ELF; 5-300 Hz) o muy bajas (VLF; 300 Hz-30 kHz). En relación con el desarrollo tecnológico de nuestras sociedades, las formas de ondas de CEMs más comunes en el ambiente son las sinusoidales y las pulsadas. Pero recientemente los teléfonos móviles-celulares han producido en el ambiente un incremento de campos de radiofrecuencias (10 kHz-300 MHz) y microondas (300 MHz- 300 GHz) que están en estudio tanto en Europa como en los Estados Unidos para conocer sus posibles efectos sobre la salud.

Estudios experimentales sobre CEMs de ELF-VLF y embriones de pollo, ratas, ratones, erizos de mar, tritones etc., han mostrado que la exposición in vivo durante las fases precoces del desarrollo puede ser teratogénica. La exposición puede provocar resorciones placentarias y/o muerte temprana, malformaciones o retraso del desarrollo. Pero estos efectos son dependientes de las características del CEM aplicado y de los organismos. Puede haber un cambio del desarrollo embrionario según (1) la frecuencia, la forma de la onda, la densidad del flujo magnético, la aplicación continua o intermitente del CEM; (2) el valor del campo magnético constante ambiental asociado y (3) la especie biológica, el estado fisiológico de los embriones y su orientación. Estos múltiples factores determinantes para la respuesta biológica explican los resultados aparentemente contradictorios obtenidos, hace más de 10 años, en diferentes laboratorios. Estudios sobre células amnióticas humanas expuestas a campos sinusoidales de 50 Hz de frecuencia y diferentes densidades de flujo magnético han mostrado incrementos de aberraciones cromosómicas, siendo el tipo predominante los "gaps". Los campos ELF-VLF del tipo de los emitidos por ciertos ordenadores de tubos catódicos se han visto efectivos en ratones (resorciones o malformaciones en organismos vivos) lo que ha justificado estudios epidemiológicos sobre el desarrollo fetal en mujeres trabajando con ordenadores. Los mecanismos en estudio de las interacciones CEMs-sistemas biológicos hacen intervenir el CM estático local, induciendo modificaciones de los flujos iónicos a través de la membrana celular o de las asociaciones iones-receptores membranales.

El conjunto de los estudios ha justificado la resolución del Parlamento Europeo (A3-023 8/94) que pide el uso de ordenadores cumpliendo con la legislación sueca, de campos inferiores a 0,25 mT (rango 5Hz-2kHz), así como el fomento de la investigación en este tema. Siendo muy complejo, se ha considerado como tema de investigación prioritario por la Comunidad Europea.

IMPLANTACION DE SISTEMAS DE CALIDAD EN LABORATORIOS DE ENSAYO.

García Moreno del Rio, M.C. y López Esteban, M.T. Departamento de Garantía de Calidad. C.I.C.C. (I.N.C.) MISACO. Avd. Cantabria s/n. 28042-MADRID.

La implantación del Sistema de Calidad en los laboratorios es un requisito imprescindible para facilitar la aceptación mutua de los datos generados en los mismos. Este requisito deberán cumplirlo tanto aquellos laboratorios que dedican su actividad al control oficial de productos alimenticios (Directiva 93/99/CEE), como aquellos que realicen ensayos sobre productos químicos de conformidad con la Directiva 67/548/CEE.

Con objeto de facilitar orientación práctica y detallada de como ha de realizarse esta Implantación tanto en uno como otro campo existen una serie de normas (normas UNE 66501, EN 45.001) para ser aplicadas en el primer caso y los principios de la B.P.L. en el segundo.

Los laboratorios dedicados al control oficial de los productos alimenticios que cumplan las normas establecidas, podrán ser acreditados por los organismos con capacidad de acreditación según la norma UNE 66502 (EN 45002).

Los laboratorios que dedican su actividad a ensayos no clínicos efectuados con fines reglamentarios, de productos farmacéuticos, cosméticos, aditivos alimentarios, aditivos para piensos, plaguicidas y demás productos químicos con el objeto de determinar sus efectos en las personas, los animales y el medio ambiente, deberán cumplir los requisitos establecidos en el Real Decreto 2043/1994, de 14 de octubre, sobre inspección y verificación de Buenas Prácticas de Laboratorio que transpone las Directivas 88/320/CEE y 90/18/CEE.

Estos laboratorios deberán pasar inspecciones y verificaciones que se realizan a fin de determinar la medida en que las instalaciones de ensayo y los estudios de laboratorio satisfacen los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio.

Cuando el resultado de la inspección y verificación de Buenas Prácticas de Laboratorio sea satisfactorio, la autoridad competente por razón de materia, certificará la declaración de un laboratorio que afirme, que tanto los ensayos realizados, como el

propio laboratorio, son conformes a los principios de Buenas Prácticas de Laboratorio.

Cuando los trabajos tanto de control como de investigación se realizan en los laboratorios que tienen implantados estos Sistemas de Calidad, no se presentan normalmente problemas de rigor científico, ya que los estudios están avalados por efectuarse bajo normas estrictas con Unidad de Garantía de Calidad que vela por su correcta aplicación.

El problema se plantea cuando es necesario que estos trabajos sean subcontratados bien a otros laboratorios, Centros de Servicios a las OPI sin la infraestructura necesaria para realizarlos según las exigencias anteriormente expuestas. Estos laboratorios tendrán que dejar de realizar este tipo de estudios si no toman conciencia de la necesidad de implantación de dichas normas.

Es por tanto una tarea urgente a desarrollar por estos Centros para dar salida a esta situación y evitar que trabajos de experimentación e investigación sean efectuados fuera de nuestras fronteras.



EFFECTO DE LA EDAD EN LA INCLUSION DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES EN MICRONUCLEOS DE LINFOCITOS HUMANOS

Catalán, J.¹; Autio, K.²; Sorsa, M.² y Norppa, H.²

¹Dpto. de Anatomía, Embriología y Genética. Universidad de Zaragoza. Zaragoza (España).

²Finnish Institute of Occupational Health. Helsinki (Finlandia).

Dos fueron los principales objetivos del presente estudio: 1) Analizar el efecto de la edad y del sexo en la frecuencia de micronúcleos (MN) que contienen cromosomas enteros en humanos, y especialmente en aquellos que contienen los cromosomas X e Y; 2) Estudiar la segregación que experimentan los cromosomas sexuales en células binucleadas, y como afecta la edad a dicha segregación.

En total se analizaron 14 personas, 4 mujeres y 10 hombres, distribuidos equitativamente en dos grupos de edades: menores de 30 años y mayores de 50 años. Los linfocitos aislados de sangre periférica se cultivaron durante 65 h tanto en ausencia como en presencia (6 $\mu\text{g/ml}$) de Citocalasina-B (Cyt-B). El contenido de los MN se estudió mediante hibridación *in situ* utilizando sondas de ADN centromérico específicas, capaces de detectar cualquier cromosoma humano, el cromosoma X y el cromosoma Y. Para cada persona y sonda de ADN se estudiaron 100 MN. Además la segregación de los cromosomas sexuales se estableció a partir de 2000 células binucleadas por individuo.

Los resultados obtenidos señalan que no existe efecto de la edad ni sobre la frecuencia de MN, ni sobre el porcentaje de MN que contienen cualquier cromosoma humano, ni sobre el porcentaje de los que contienen el cromosoma X. En los hombres, la edad tiene un efecto altamente significativo sobre el porcentaje de MN que contienen el cromosoma Y. En relación al sexo, las mujeres tienen una frecuencia de MN y un porcentaje de MN que contienen el cromosoma X significativamente mayor que los hombres. Sin embargo no se encontraron diferencias entre los sexos respecto al porcentaje de MN que contienen cualquier cromosoma humano.

Los cultivos tratados con Cyt-B mostraron una mayor frecuencia de MN que los no tratados sólo en los hombres mayores. Diferencias entre ambos tipos de cultivos se dieron en las mujeres en relación al porcentaje de MN que contienen cualquier cromosoma humano, y en los hombres respecto al porcentaje de los que contienen el cromosoma X.

Los errores producidos en la segregación de los cromosomas sexuales en células binucleadas fueron similares en hombres y mujeres, y tampoco pudieron detectarse diferencias entre grupos de edades. La mayor parte de las anomalías se refieren a ganancias o pérdidas de un cromosoma X, mientras que errores equivalentes en el cromosoma Y de los hombres son muy escasos.

BIOMONITORIZACIÓN CITOGENÉTICA DE PACIENTES TRATADOS CON EL ISÓTOPO RADIATIVO YODO-131

Gutiérrez S, Carbonell E, Galofré P¹, Xamena N, Creus A y Marcos R.

Unitat de Genètica, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra. ¹Servei de Medicina Nuclear, Ciutat Sanitària i Universitària Vall d'Hebron, Pg. Vall d'Hebron 119, 08035 Barcelona.

El isótopo radiactivo 131 del yodo (¹³¹I) se encuentra en el medio ambiente como resultado de explosiones o accidentes nucleares y de su utilización en medicina e investigación biomédica. En medicina nuclear el ¹³¹I es usado en el tratamiento de carcinomas de tiroides e hipertiroidismo y, a pesar de las ventajas de su utilización, puede producir efectos secundarios adversos en los individuos tratados, a causa de la emisión de radiación ionizante por parte del yodo-131 a tejidos sanos. Para determinar los posibles efectos genotóxicos relacionados con la exposición terapéutica al yodo-131 hemos llevado a cabo un seguimiento citogenético mediante el análisis de la frecuencia de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica en dos grupos: a) un grupo de 56 pacientes que presentaron cáncer de tiroides y recibieron una dosis promedio de $211,64 \pm 20,73$ mCi de ¹³¹I por administración oral como tratamiento después de una extirpación total del tiroides. En este grupo, el análisis se desarrolló durante el control anual de los pacientes cuya última dosis terapéutica les fue administrada entre 1 y 6 años antes del presente estudio. Paralelamente al grupo expuesto, se estudió un grupo control formado por 70 individuos sanos, sin ninguna exposición a fuentes radiactivas u otras genotoxinas conocidas; b) un grupo de 9 pacientes con cáncer de tiroides en los que el estudio citogenético se hizo una semana antes del tratamiento con ¹³¹I y una semana después. Para el grupo a) los resultados no muestran diferencias significativas ni en la frecuencia de células binucleadas con micronúcleos (BNMN), ni en el índice de proliferación celular con bloqueo de la citocinesis (CBPI) entre los pacientes (BNMN = $25,89 \pm 1,69$; CBPI = $2,05 \pm 0,02$) y los controles (BNMN = $23,99 \pm 1,36$; CBPI = $2,06 \pm 0,02$); además no se encontró ninguna relación entre la frecuencia de BNMN y la dosis total administrada, si bien se detectó que la frecuencia de BNMN en los pacientes que habían recibido la última dosis durante los tres años anteriores al presente estudio era significativamente más elevada que la de los pacientes que la habían recibido con anterioridad. Para el grupo b) el valor medio de BNMN antes del tratamiento fue de $22,00 \pm 3,04$ mientras que, una semana después, incrementó significativamente hasta $38,89 \pm 5,55$. Estos resultados indican que el tratamiento radiactivo induce un aumento significativo del daño genético, detectado por el ensayo de micronúcleos en linfocitos; si bien un período comprendido entre 1 y 3 años parece ser suficiente para la dilución o eliminación de este daño.

BIOMONITORIZACIÓN EN UN GRUPO DE TRABAJADORES DE GASOLINERAS

Pitarque M., Carbonell E., Lapeña N.¹, Marsá M.¹, Torres M.¹, Creus A., Xamena N. y Marcos R.

Unitat de Genètica, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

¹Centre de Seguretat i Condicions de Salut en el Treball, Generalitat de Catalunya, Barcelona.

La presencia de contaminantes derivados del petróleo en el medio ambiente es muy extensa, de manera que las poblaciones humanas están potencialmente expuestas a sus efectos. Los estudios epidemiológicos realizados en poblaciones expuestas a vapores de petróleo indican que existe un incremento en la incidencia de algunos tipos de cáncer y de enfermedades respiratorias no malignas, relacionado con la exposición.

Para aumentar nuestro conocimiento sobre el riesgo asociado a la exposición a gasolina, hemos llevado a cabo la biomonitorización de un colectivo de trabajadores de gasolineras. Se han analizado las frecuencias de micronúcleos (MN) y de intercambios entre cromátidas hermanas (SCE) en linfocitos de sangre periférica, comparándose los valores obtenidos en el grupo de trabajadores expuestos con los de un control concurrente. El grupo expuesto estaba formado por 50 hombres empleados en 11 estaciones de servicio del área metropolitana de Barcelona, mientras que el control estaba formado por 43 hombres cuya actividad laboral se desarrolla en el campus de la U.A.B. en Bellaterra, sin indicios de exposición previa a agentes genotóxicos.

De cada gasolinera se tomaron muestras ambientales durante 16h de algunos hidrocarburos aromáticos, mediante el uso de monitores de vapores orgánicos (3M). La media de los niveles de benceno, tolueno y xilenos en el lugar de trabajo fue de $0,91 \pm 0,14$ mg/m³, $1,58 \pm 0,18$ mg/m³ y $0,89 \pm 0,11$ mg/m³, respectivamente. Otra estima de la exposición se obtuvo midiendo los siguientes metabolitos: fenol, ácido hipúrico y ácido metil hipúrico en orina, después de 8h de exposición. Además, dado que algunos componentes de la gasolina pueden provocar alteraciones sanguíneas, se realizaron análisis hematológicos.

En lo referente a los parámetros citogenéticos, no se observan diferencias significativas en la frecuencia de células binucleadas con micronúcleos (BNMN) entre los trabajadores ($17,72 \pm 1,33$) y los controles ($20,81 \pm 1,41$). Sin embargo, existe un ligero aumento, aunque significativo, de la frecuencia de SCE asociado con la exposición a gasolina ($8,05 \pm 0,28$) vs ($7,03 \pm 0,22$).

EVALUACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO INDUCIDO POR CINCO HERBICIDAS EN LINFOCITOS HUMANOS UTILIZANDO EL ENSAYO *SINGLE-CELL GEL ELECTROPHORESIS* (SCGE) O ENSAYO DEL "COMETA"

Ribas G.¹, Frenzilli G.², Barale R.² y Marcos R.¹

¹Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra. ²Dipartimento di Scienze dell' Ambiente e del Territorio, Università di Pisa, Italia.

En los últimos cuarenta años los pesticidas han jugado un papel fundamental en el aumento de la producción agrícola; sin embargo, estos compuestos pueden dar lugar a serios problemas de salud pública, incluido el riesgo de inducir cáncer.

Los herbicidas son pesticidas diseñados para destruir tipos específicos de plantas y están representados por un amplio espectro de clases químicas que pueden actuar sobre diferentes rutas metabólicas. La elevada reactividad biológica de estos compuestos hace que puedan llegar a interactuar con el ADN, produciendo daño genético. Así, para evaluar la posible genotoxicidad de algunos herbicidas hemos usado el ensayo *single-cell gel electrophoresis* (SCGE) o ensayo del cometa en linfocitos humanos.

Este ensayo es una técnica eficaz para la detección de roturas de la(s) cadena(s) de ADN, de sitios alcali-lábiles o de cambios estructurales en la cromatina en células eucariotas. Es un ensayo rápido y sencillo, de fácil visualización, muy sensible a un amplio espectro de genotoxinas y que requiere un número muy pequeño de células.

En este trabajo hemos analizado la genotoxicidad de cinco herbicidas: alacloro (AL), atrazina (AZ), hidrazida maleica (HM), paraquat (PQ) y trifluralina (TF). El estudio se ha llevado a cabo con y sin activación metabólica animal debido a la información contradictoria existente sobre las propiedades genotóxicas de los metabolitos de estos herbicidas.

Nuestros resultados muestran que la exposición a los herbicidas probados produce un incremento significativo del daño en el ADN, medido según la longitud de la cola del cometa. Sin embargo, con la excepción de la HM, todos los herbicidas muestran una menor migración de ADN cuando el tratamiento se realiza en presencia de la fracción S9, lo cual parece indicar que se trata de genotoxinas directas. Además, nuestros datos muestran que aunque la HM parece ser ineficaz a pH neutro, su genotoxicidad aumenta significativamente al disminuir el pH.

Así pues, nuestro trabajo confirma la sensibilidad del ensayo SCGE en la detección de la genotoxicidad de los herbicidas estudiados y contribuye con nueva información a su posible validación futura.

ACTIVIDAD GENOTOXICA DE EFLUENTES LIQUIDOS PROVENIENTES DE LA INDUSTRIA DE LA CELULOSA EN CHILE.

Venegas, W., Alarcón, M., Hermosilla, I., Duk, S., Weigert, G., García, M. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

El río Bío Bío, que recorre una de las hoyas hidrográficas más importantes de Chile, presenta concentraciones de algunos agentes químicos que sobrepasan los valores considerados aceptables, para los ambientes acuáticos continentales. Este recibe la descarga de muchos efluentes industriales, entre los que se encuentran los de 5 industrias de la celulosa y el papel que se caracterizan por los elevados volúmenes de agua utilizados para sus procesos industriales. El río Bío Bío es la fuente principal de abastecimiento de agua potable para una población cercana a un millón de personas en la VIII Región de Chile.

A objeto de evaluar el efecto genotóxico de los efluentes líquidos de tres industrias de la celulosa y de las aguas superficiales del río, obtenidas cerca de su desembocadura a la altura de la ciudad de Concepción, se utilizaron los siguientes bioensayos de respuesta rápida: a) Test de micronúcleos *in vivo* en larvas premetamórficas del anfibio anuro endémico de Chile *Caudiverbera caudiverbera*. b) Inducción *in vitro* de aberraciones cromosómicas en metafase, anafase y telofase, en células de la línea CHO. Para los estudios *in vivo* una muestra mensual de cada efluente y de agua superficial fue analizada por un período de 2 años.

Todos los efluentes estudiados mostraron efecto genotóxico, sin embargo hay grandes diferencias en el daño genético inducido por cada una de ellos, estas diferencias podrían deberse a los diferentes métodos de obtención de la celulosa, en efecto, unas utilizan el sistema Kraft convencional y otras son plantas Kraft modernas. Las aguas superficiales dieron efectos genotóxicos negativos, salvo para las muestras obtenidas en los meses del período estival, en donde el volumen de agua del río disminuye notablemente permaneciendo constante el volumen de efluentes descargado por estas industrias. Los análisis químicos realizados en paralelo a los bioensayos revelaron la presencia de una variedad de compuestos organoclorados que se caracterizan por sus efectos genotóxicos y teratogénicos.

FONDECYT 91-0366 ; 92-0285 y DIUC 93.31.49-1.3 ; 943375-1

EVALUACION DE LAS CONDICIONES MAS EFICIENTES PARA EL ANALISIS DE MICRONUCLEOS

Sánchez Hombre MC, Vallcorba I, Vázquez Mazariego Y, López-Yarto A, Ferro MT y García Sagredo JM.

Servicio de Genética Médica, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid.

Un eficiente ensayo de micronúcleos (MN) debe de contar con una proporción alta de células binucleadas con respecto a las células polinucleadas y mononucleadas, junto con una baja cantidad de micronúcleos en los controles negativos.

Con el fin de averiguar las condiciones de trabajo adecuadas en nuestro laboratorio con respecto a la eficiencia de la técnica de MN en linfocitos periféricos humanos, hemos realizado un estudio en el que se combinan diferentes concentraciones de Citocalasina B con diferentes tiempos de cultivo. A su vez, dado que recientes publicaciones hacen referencia a posibles diferencias en la cantidad de MN entre varones y hembras, hemos realizado un estudio paralelo analizando las condiciones de trabajo anteriormente citadas en ambos sexos.

Para ello, se ha utilizado sangre periférica de donantes sanos, no fumadores y sin tratamiento farmacológico previo, estudiándose la tasa de MN con las siguientes condiciones:

hembras		varones	
citocal.B	cultivo	citocal.B	cultivo
3 µg/ml	68 h	3 µg/ml	68 h
3 µg/ml	70 h	3 µg/ml	70 h
3 µg/ml	72 h	3 µg/ml	72 h
6 µg/ml	68 h	6 µg/ml	68 h
6 µg/ml	70 h	6 µg/ml	70 h
6 µg/ml	72 h	6 µg/ml	72 h

En cada experimento se han analizado la proporción de células mono-, bi- y polinucleadas, así como la tasa de MN en células binucleadas.

Las condiciones de trabajo mas eficientes en nuestro laboratorio han resultado ser la concentración de citocalasina B de 6 µg/ml con un tiempo de cultivo de 68 h. Por último queremos reseñar que no hemos encontrado diferencias significativas entre varones y hembras.

MOLECULAR CYTOGENETIC ANALYSIS OF THE INFLUENCE OF CULTURING ON THE FREQUENCY AND CONTENT OF MICRONUCLEI IN IMMUNOMAGNETICALLY SORTED HUMAN T-CELLS

Surrallés, J., Falck, G. and Norppa, H.

Laboratory of Cellular and Molecular Toxicology, Department of Industrial Hygiene and Toxicology, Finnish Institute of Occupational Health, Helsinki, Finland.

The micronucleus (MN) assay together with centromeric fluorescence *in situ* hybridization (FISH) appears to be a suitable method to detect aneuploidy/clastogenicity induced by both *in vitro* and *in vivo* exposures to genotoxins. However, some confounding factors can influence the baseline level of aneuploidy/clastogenicity, among them proliferation kinetics and different sensitivity to genotoxic agents between various lymphocyte subsets. These factors may limit the use of the MN assay for biomonitoring purposes. Apparently, the kinetic problem of the MN assay can easily be circumvented by restricting the scoring to binucleated cells induced by cytochalasin-B (Cyt-B). However, the question whether Cyt-B itself induces MN with whole chromosomes (above all X-chromosomes), remains unknown. In this poster we present original data on the suitability of using uncultured cells and FISH to detect chromosome damage. To avoid the problem of comparing different lymphocyte subpopulations, immunomagnetically sorted pure T-cells were examined. Our results on 5 middle-age female donors clearly show the conversion of *in vivo* preexisting DNA lesion to chromosome fragments after the cell cycle is completed. Thus, the level of chromosome fragment containing MN is 2.8 fold (72h-cultured T-cells) and 4.5 fold (72h-cultured T-cells treated with Cyt-B) increased when compared to uncultured cells. Mononucleated 72h-cultured T-cells yielded lower frequencies of chromosome fragment containing MN as compared to Cyt-B treated cells, probably due to the inclusion of undivided cells in the scoring. More surprising are the results concerning the level of whole chromosome containing MN since almost all the increase in this type of MN during culture can be attributed to micronucleation of the X-chromosome. This effect was enhanced by Cyt-B, where more than 80% of whole chromosome containing MN harboured X-chromosomes. Therefore, chromosome damage observed in cultured lymphocytes differs both quantitatively and qualitatively from that seen in uncultured cells. This newly introduced analysis of MN in uncultured immunomagnetically sorted T-cells could represent an interesting alternative to the conventional analysis of cultured cells.

CHROMOSOME PAINTING EN DOSIMETRIA BIOLOGICA: EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE ANALIZAR ANOMALIAS CROMOSOMICAS ESTABLES UTILIZANDO DIFERENTES PAREJAS DE SONDAS.

Vallcorba I, López-Yarto A, Sánchez Hombre MC, Resino M, Ferro MT y García Sagredo JM.

Servicio de Genética Médica, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid.

Con el fin de evaluar si la capacidad y sensibilidad de detectar aberraciones cromosómicas con la técnica de *chromosome painting* es independiente o no del tipo específico de sondas utilizadas, hemos diseñado el siguiente trabajo: después de una exposición in vitro de linfocitos humanos a rayos gamma a dosis de 0.3 y 1 Gy de Co⁶⁰, se cultivaron durante 48 h. Las preparaciones cromosómicas que se obtuvieron se hibridaron con dos librerías de sondas biotiniladas de cromosomas enteros y se detectaron con avidina marcada con fluoresceína.

Se han usado, por parejas, librerías de sondas para los cromosomas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 13, 16 y 18, buscando aberraciones cromosómicas estructurales, principalmente translocaciones.

Con el fin de comparar la tasa de translocaciones detectada con los diferentes pares de sondas, los datos se han normalizado usando una fórmula que considera la cantidad de genoma *pintado* en cada caso. Los resultados finales se han evaluado mediante regresión logística incondicional.

Nuestros resultados muestran que se puede usar cualquier combinación de sondas de *painting* para analizar la tasa de aberraciones cromosómicas inducidas ya que, después de la corrección de los resultados armonizando estos de acuerdo a las sondas cromosómicas utilizadas, hemos observado que la tasa de translocaciones se mantiene dosis-dependiente y bastante homogénea dentro de cada una de las dosis de radiación independientemente de las sondas usadas. Sin embargo, la utilización de sondas de cromosomas pequeños no es recomendable dado el gran número de células que habría que analizar debido a la pequeña cantidad de genoma *pintado* y a que es más difícil observar las translocaciones en los cromosomas pequeños.

Agradecimiento: Este trabajo se ha realizado gracias a la ayuda Fondo de Investigaciones Sanitarias (FISS 93/662).

PAPEL PROTECTOR DE LAS ALQUILTRANSFERASAS EN LA MUTAGENESIS POR
CLOROETILNITROSOUREAS EN *Escherichia coli*

Ferrezuelo F., Abril N., Prieto-Alamo M.J. y Pueyo C.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, Avenida de
Medina Azahara s/n, Córdoba (España).

Las cloroetilnitrosoareas son drogas quimioterapéuticas que se han venido empleando durante las 3 últimas décadas en el tratamiento de diversos tipos de cáncer. La actividad antitumoral de estos compuestos se asocia a los daños que inducen en el ADN. Las cloroetilnitrosoareas son agentes alquilantes bifuncionales de una alta reactividad química, que generan en el ADN diferentes tipos de monoadductos así como enlaces cruzados intra e intercatenarios. Este último daño se correlaciona con los efectos citotóxicos y la actividad antineoplásica de estos compuestos, mientras que ciertos monoadductos, como O⁶-2-cloroetilguanina, parecen ser responsables de la inducción de mutaciones puntuales.

E. coli posee dos actividades alquiltransferasas (ATAs): la proteína Ogt de expresión constitutiva y la proteína inducible Ada, que además de reparar las principales lesiones mutagénicas (O⁶-alquilguanina y O⁴-alquiltimina) es el regulador positivo de su propia síntesis. La reparación de las lesiones mutagénicas se lleva a cabo mediante la transferencia del grupo alquilo del aducto a un residuo de cisteína de la propia proteína en una reacción suicida. Estudios previos han demostrado que las ATAs de mamíferos juegan un papel importante en la modulación de los efectos citotóxicos y las acciones mutagénicas de las cloroetilnitrosoareas.

El objetivo de nuestro trabajo ha sido estudiar el papel de las ATAs en la mutagenicidad de la CCNU (1-(2-cloroetil)-3-ciclohexil-1-nitrosoareas) y BCNU (1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosoareas) en la bacteria *E. coli*. Para ello se ha comparado las respuestas mutagénicas de estirpes deficientes en una o ambas ATAs con la del correspondiente parental silvestre y las de estirpes que sobreexpresan distintas ATAs procarióticas y eucarióticas; asimismo se ha analizado el efecto de la respuesta adaptativa.

Nuestros resultados demuestran que la proteína Ogt protege de la acción letal y mutagénica de las cloroetilnitrosoareas. Por el contrario, Ada no desempeña ningún papel, incluso en condiciones de inducción de la respuesta adaptativa. La sobreproducción de la proteína Ogt suprime los efectos mutagénicos y letales de CCNU y BCNU en una estirpe totalmente deficiente en ATAs, confirmando el papel protector de dicha proteína. Este papel concuerda con resultados anteriores de nuestro grupo de investigación que asignan a la proteína Ogt un papel preponderante en la eliminación de grupos alquilo voluminosos. La ATasa humana muestra una eficacia similar a la de la proteína Ogt en la protección de la mutagenicidad bacteriana por CCNU: la sobreexpresión de estas proteínas suprime, respectivamente, el 87% y el 93% de las mutaciones directas inducidas por el compuesto.

Financiación: AMB93-1439-CE (CICYT) y EV5V-CT92-0227 (CE)

ESPECTRO DE MUTACION INDUCIDO POR CCNU EN EL GEN *LACI* DE
ESCHERICHIA COLI: PAPEL DE LA ACTIVIDAD O6-ALQUILGUANINA-DNA
ALQUILTRANSFERASA

Jurado J, Ferrezuelo F, y Pueyo C

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba
Avda Medina Azahara s/n, 14071-CÓRDOBA

1-(2-chloroetil)-3-ciclohexil-1-nitrosourea (CCNU) o lomustina es un medicamento de amplio uso en el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Desafortunadamente, además de sus propiedades anticancerígenas, las 2-cloroetilnitrosoureas tienen actividad mutagénica y existen pruebas de su carcinogenicidad en animales. Las 2-cloroetilnitrosoureas son agentes alquilantes bifuncionales muy reactivos que producen no sólo monoadductos, como los agentes monofuncionales, sino también derivados cíclicos y enlaces cruzados inter e intracatenarios. La alquilación de la posición O6 de la guanina produce una reorganización a la posición N1 de la molécula de guanina que propicia la formación de un enlace cruzado con la posición N3 de la citosina de la cadena opuesta. Este enlace tiene efecto letal y constituye la base de la capacidad terapéutica de las 2-cloroetilnitrosoureas. Las O6-alquilguanina-DNA alquiltransferasas (ATasas) de mamíferos interfieren con el efecto citotóxico terapéutico de las cloroetilnitrosoureas reconociendo y eliminando el grupo cloroetilo de la posición O6 de la guanina en una acción suicida. El objetivo de este trabajo ha sido determinar el espectro de mutación de la CCNU y estudiar el posible papel de la actividad ATasa en la especificidad mutagénica de dicho compuesto. Para ello se han comparado los espectros de mutación de bacterias ATasa⁺ y ATasa⁻, obtenidos a una dosis 1mM de CCNU.

Se han secuenciado un total de 245 mutaciones independientes LacI^d. Todas las mutaciones fueron sustituciones y la mayoría (95%) GC>AT, indicando que las mutaciones inducidas por CCNU tienen su origen en la replicación errónea de la O6-cloroetilguanina. La distribución de transiciones GC>AT inducidas por CCNU se vio significativamente ($P=0.01^{**}$) afectada por la presencia de actividad DNA-alquiltransferasa. En el espectro obtenido en la estirpe ATasa⁻ se observó que las guaninas flanqueadas por pares AT son 2,8 veces más susceptibles de mutar que aquellas que tienen un par GC en alguno de sus lados. Esta tendencia desapareció en el fondo genético ATasa⁺. Este resultado sugiere que las O6-cloroetilguaninas contiguas a algún par GC son mejor sustrato de las DNA-alquiltransferasas bacterianas que aquellas rodeadas por pares AT. Nuestro grupo ha encontrado esta misma tendencia en la reparación de las lesiones inducidas por EMS lo cual indica que la CCNU se comporta como un compuesto etilante simple.

En resumen, este trabajo aporta pruebas de que la actividad O6-alquilguanina-DNA alquiltransferasa desempeñan un papel relevante en la eliminación de las lesiones responsables de las transiciones GC>AT inducidas por CCNU, influenciando la secuencia de DNA, y probablemente también la cadena, en la que preferentemente se localizan estas mutaciones.

Financiación: AMB93 -1439-CE (CICYT) y EV5V-CT92-0227 (CE)

ESPECTRO DE MUTACIÓN INDUCIDO POR AFB1 EN EL GEN *LACI* DE
ESCHERICHIA COLI :COMPARACIÓN DE LA ACTIVACION *IN VITRO* (MEZCLA
S9) CON EL ENSAYO A TRAVÉS DE HOSPEDADOR

Prieto-Álamo MJ, Abril N, Jurado J., y Pueyo C

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba
Avda Medina Azahara s/n, 14071-CÓRDOBA

Los mecanismo moleculares de mutagénesis muestran gran similitud en todos los seres vivos, justificando el amplio uso de los ensayos bacterianos de mutagénesis en la evaluación genotoxicológica de contaminantes ambientales. No obstante, con frecuencia se formula la reserva de la representatividad de los homogenados de hígado de mamífero en los ensayos con activación metabólica de la capacidad de activación/desactivación de este órgano en animales vivos.

En este trabajo se compara el espectro de mutación obtenido mediante el ensayo *in vivo* a través de hospedador (HMA) con el que se obtiene al tratar las bacterias en el tubo de ensayo en presencia de mezcla S9, con el fin de comprobar si el ensayo bacteriano *in vitro*, de considerables ventajas prácticas, refleja la activación metabólica *in vivo*. Para ello se ha utilizado un carcinógeno hepático de la importancia ambiental de la aflatoxina B1 (AFB1) como mutágeno de referencia, una bacteria (*E. coli* UC998) deficiente en el mecanismo de reparación por escisión y portadora del plásmido pKM101 como estirpe indicadora de mutagenicidad, y el gen *lacI* como blanco genético de las mutaciones. En el HMA se trataron ratas con 10 mg de AFB1 por kg de peso; en el tratamiento *in vitro* la dosis fue de 2,5 μ M de AFB1. En ambos casos se aislaron en Pgal mutantes que sintetizaban β -galactosidasa constitutivamente (LacI⁺ o LacO⁺), con posterioridad se identificaron entre ellos por complementación aquellas mutaciones que afectaban a los 200 primeros pares de bases del gen *lacI* (mutantes LacI dominantes: LacI^d).

Se han secuenciado un total de 233 mutantes independientes, sin encontrarse diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ambos espectros de mutación, concluyéndose, al menos en lo que respecta a la AFB1, que la activación *in vitro* por S9 refleja fielmente la capacidad de activación de los animales vivos. Las sustituciones representaron >90% de las mutaciones. La mayoría de las sustituciones afectaron a pares G:C de acuerdo con el hecho de que la AFB1 activada reacciona principalmente con residuos de guanina. Dichas mutaciones se distribuyeron en 38 de los 52 sitios G:C en los que, según estudios previos, se produce por mutación fenotipo LacI^d. La mayoría de las sustituciones en G:C fueron transversiones GC>TA, con punto caliente en la posición 92 que en ambos espectros acumuló alrededor del 10% del total de mutaciones. No obstante, también se observó un número significativo de cambios GC>AT y GC>CG que podrían explicarse por la incorporación de diferentes bases frente a sitios AP durante la síntesis de ADN propensa a error. De acuerdo con esta explicación, las proporciones observadas se ajustaron a las esperadas según la regla de Kunkel. El análisis de la secuencia que flanquea el par G:C mutado, reveló que existe una tendencia a mutar las G flanqueadas por pares G:C, resultados que concuerdan con datos previos que muestran que las guaninas rodeadas por secuencias ricas en pares A:T no son blanco preferido de acción de la AFB1.

Financiación: AMB93 -1439-CE (CICYT) y EV5V-CT92-0227 (CE)

DETECCION DEL EFECTO MUTAGENICO EN EL CONTROL Y LA SEGURIDAD DE LOS ALIMENTOS.

Moya, P.; Salas, J.; González, T. y Saraza, R. Servicio de Productos Alimenticios C.I.C.C. (I. N.C.) MISACO. Avd. Cantabria s/n. 28042-MADRID.

Los productos alimenticios sometidos a procesos tecnológicos industriales, o incluso caseros, presentan sustancias que solas o con determinados contaminantes (plaguicidas, antibióticos o residuos de tratamientos) producen actividad mutagénica. Estos productos alimenticios son objeto de denuncia por parte de los consumidores al presentar alteración de sus caracteres organolépticos, sin embargo, su análisis microbiológico y físico-químico es correcto, cumpliendo la reglamentación vigente.

A nivel legislativo existen Directivas comunitarias que establecen la obligatoriedad de comercializar solo productos seguros, garantizando la protección de la salud de los consumidores -mediante controles oficiales eficaces de los productos alimenticios, para ello, se deben establecer normas de calidad y métodos de análisis, que lleven a una situación de igualdad ante la ley, pudiendo utilizar métodos alternativos, exclusivamente, cuando sea necesario para la salud pública. (Dir. 89/397; 92/59 y Dic. 92/C332/03.)

Lo anteriormente expuesto nos lleva a considerar la necesidad de establecer una metodología para la detección de sustancias mutagénicas en el análisis de alimentos, para ello consideramos necesario:

1. Creación de un Grupo de Trabajo en la SEMA para la realización de métodos fiables y viables.
2. Métodos alternativos de cuantificación y detección de las sustancias mutagénicas.
3. Propuesta a nivel comunitario de tales métodos, a través de la Sociedad Europea de Mutagénesis Ambiental, en cumplimiento de las Directivas mencionadas.

ESCISIÓN DEL RETROTRANSPOSÓN *COPIA* DEL ALELO w^a MEDIANTE CHOQUE TÉRMICO

Baldrich E., Velázquez A., Creus A., Marcos R., Xamena N. y Cabré O.
Unitat de Genètica, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona.

Desde hace tiempo se sabe que algunas mutaciones del locus *white* de *Drosophila melanogaster* son el resultado de la inserción de ciertas secuencias de DNA. Este es el caso del alelo w^a en el cual la inserción del elemento transponible *copia* es la causa del fenotipo mutante. Se tiene por cierto que la escisión precisa de esta secuencia puede revertir el fenotipo, dando lugar a la recuperación del color de ojos de tipo salvaje. Por otra parte, se ha descrito (aunque con resultados contradictorios) que el estrés provocado por choque térmico a) no afecta a la transposición, b) aumenta la transcripción de *copia* y c) aumenta la transposición de elementos *copia-like*. Ahora bien, la transposición de los elementos *copia-like* no implica su movilización o escisión. Nuestro interés reside en estudiar la inducción de la escisión de *copia* a causa del choque térmico (si es que ocurre) y los efectos fenotípicos que se deriven de la movilización.

Los resultados obtenidos indican que la frecuencia de fenotipos nuevos inducidos en la descendencia de machos después de un choque térmico fuerte es mayor que la observada en el grupo control, en el cual no se han observado revertientes. A partir de machos tratados y cruzados con hembras de cromosomas X unidos, hemos obtenido algunos revertientes (fenotipo salvaje) y, con una mayor frecuencia, descendientes con un color de ojos más claro que el *white-apricot*, de los cuales algunos tienen quetas más cortas. A partir de estos revertientes y fenotipos nuevos se han establecido varias líneas mediante el cruzamiento de los machos con hembras portadoras de cromosomas X unidos.

Para determinar los cambios moleculares responsables de los distintos fenotipos, se ha realizado un análisis de Southern. Los resultados obtenidos hasta ahora indican que los tres fenotipos de tipo salvaje analizados han perdido el elemento *copia*. Por otra parte, el estudio de los individuos de ojos claros indica que las cuatro líneas que también presentan las quetas cortas han perdido el elemento *copia*, mientras que de las siete líneas con quetas normales, solamente una ha perdido el elemento *copia*.

CARACTERIZACIÓN Y AMPLIACIÓN DEL ANÁLISIS MOLECULAR DE REVERTIENTES DE LA CEPA *WHITE-SPOTTED-1* DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* OBTENIDOS POR EXPOSICIÓN A AGENTES ALQUILANTES

Soriano, S., Velázquez, A., Creus, A., Marcos, R., Cabré, O. y Xamena, N. Unitat de Genètica, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

El mutante *white-spotted 1* (w^{sp1}) de *D. melanogaster* se caracteriza por la inserción del elemento *B104* o *roo* (8,7kb) en la zona reguladora del gen *white*, en la posición +4922 del locus, a 1,2kb antes del extremo 5' de la región transcrita.

Para analizar la relación existente entre la inducción de reversión por tratamiento químico y/o la posible movilización del elemento inserto involucrado, se han obtenido diversos revertientes en la línea germinal por tratamiento con tres agentes alquilantes distintos: metanosulfonato de etilo (EMS), N-etil-N-nitrosourea (ENU) y metanosulfonato de metilo (MMS).

El análisis fenotípico de los "revertientes" se ha llevado a cabo mediante la cuantificación de los pigmentos rojos de los ojos. El estudio de las líneas establecidas indica que todas corresponden a revertientes parciales, pues se obtienen valores superiores a los de w^{sp1} , pero inferiores a los de la cepa salvaje *Canton S*.

El análisis molecular realizado por *Southern blot* y *PCR* indica que la reversión no ha sido debida a la escisión, ni total ni parcial, del elemento transponible. Asimismo tampoco se aprecian lesiones en otras partes del locus *white*, detectables con las técnicas utilizadas.

Estos resultados sugieren que la alteración causante de este cambio fenotípico es una lesión pequeña, no detectable por *Southern blot* o *PCR* en las condiciones experimentales seguidas, que afecta al locus *white* o una mutación en otro locus que afecta la expresión del mutante w^{sp1} . Los resultados de un estudio preliminar realizado para determinar la posible relación del gen modificador *supressor of white spotted* (*su* (w^{sp})) con los fenotipos estudiados indican un origen diferente de los distintos mutantes aislados.

ANÁLISIS DE REVERSIONES INDUCIDAS EN EL MUTANTE *WHITE-IVORY* DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Suárez S., Cabré O., Velázquez A., Creus A., Marcos R. y Xamena N.

Unitat de Genètica, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

El *locus white* del cromosoma X es uno de los más estudiados en *Drosophila melanogaster*, habiéndose encontrado que muchos de sus alelos se caracterizan por la presencia de fragmentos extra de DNA. El mutante *white-ivory* (*w'*), que presenta una secuencia de 2,96-kb duplicada en tándem, se caracteriza por un color rosado-pálido de los ojos. Este mutante manifiesta una moderada inestabilidad debido a la escisión espontánea de la duplicación, dando lugar a la reversión al fenotipo salvaje. El mecanismo preciso de dicha reversión no se conoce todavía.

Este estudio pretende ampliar la información que se posee sobre la inducción de reversiones mediante tratamientos químicos en el mutante *w'*, y profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados. Los mutágenos químicos utilizados han sido tres agentes alquilantes típicos: metanosulfonato de etilo (EMS), N-etil-N-nitrosourea (ENU), y metanosulfonato de metilo (MMS), con los que se han tratado individuos de primer y segundo estadio larvario. Los individuos adultos *w'* tratados se cruzaron con hembras vírgenes portadoras de cromosomas X unidos para obtener individuos revertientes en la línea germinal. Con los machos que presentaban fenotipo revertiente se fundaron sendas líneas con hembras de cromosomas X unidos. El análisis de los machos de las líneas revertientes se realizó a dos niveles:

- Cuantificación de pigmentos rojos del ojo: no se encontraron diferencias entre los individuos revertientes y los de la cepa salvaje Canton S.

- Análisis molecular: con el método de *Southern blot*, usando tres sondas que abarcan distintas zonas del *locus white*, comprobamos la delección de la secuencia de 2,96-kb en todos los individuos revertientes estudiados, así como el posible origen común de tres de estos revertientes. El mismo resultado fue confirmado por PCR, presentando los individuos revertientes el mismo patrón de bandas que la cepa salvaje Canton S. Estos resultados indican que, en todos los individuos revertientes analizados hasta el momento, la escisión casi precisa de la duplicación parece ser el origen de las reversiones inducidas por el tratamiento con los agentes alquilantes utilizados.

ESTUDIO DEL EFECTO GENOTÓXICO DE DISTINTOS INHIBIDORES DE LAS TOPOISOMERASAS EN EL ENSAYO SMART DE *DROSOPHILA*

Torres C., Xamena N., Creus A. y Marcos R.

Unitat de Genètica, Dpt. de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

La topología del ADN juega un papel fundamental en diversos procesos de gran importancia para la viabilidad y el normal funcionamiento de la célula, siendo las topoisomerasas las enzimas encargadas de modificar y regular dicho estado topológico controlando los cambios conformacionales de la estructura del ADN. Así, al estar estas enzimas implicadas en mecanismos tales como la replicación, la recombinación y la reparación, su inhibición puede afectar la expresión espontánea y/o inducida de distintos procesos mutagénicos.

El ensayo *SMART* de *Drosophila*, que utiliza marcadores de las células de las alas, mide fundamentalmente los efectos de la recombinación somática, permitiendo detectar también mutación puntual, delección, aneuploidía y conversión génica. Dado que distintos investigadores han asociado las topoisomerasas con los mecanismos de recombinación, este ensayo puede aportar información adicional sobre la acción de estas enzimas.

En este trabajo se ha evaluado el papel de cuatro inhibidores de las topoisomerasas: camptotecina (CPT), m-amsacrina (m-AMSA), etopósido (VP-16) y ácido nalidíxico (NAL); de los cuales, el primero es un inhibidor de la topoisomerasa I, los dos siguientes son inhibidores específicos de la topoisomerasa II, mientras que el ácido nalidíxico es un inhibidor de la girasa bacteriana.

Los resultados obtenidos tras el tratamiento con estos inhibidores indican que tanto la CPT como el VP-16 producen un elevado incremento de la frecuencia de sectores mutantes, tanto pequeños como grandes, y también dobles, mientras que el NAL produce un incremento significativo únicamente a la mayor de las concentraciones. Por el contrario, la m-AMSA no muestra efecto alguno.

También se ha estudiado la posible interacción entre los inhibidores y el mutágeno estandar metanosulfonato de etilo (EMS). Después de realizar co-tratamientos EMS-inhibidor, los resultados obtenidos indican un efecto de tipo aditivo, lo cual parece indicar que los mecanismos de inducción de sectores mutantes por el EMS y por los inhibidores de las topoisomerasas son independientes, no detectándose interacción entre los mismos.

SEIS COMPUESTOS PRODUCTORES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO ENSAYADOS CON EL TEST w/w^+ .

Gaivão, I^{*} y Comendador, M.A.^{**}

^{*}Departamento de Genética y Biotecnología. Universidad de Tras Os Montes e Alto Douro. Vila Real. Portugal. ^{**}Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo.

Los compuestos inductores de especies reactivas de oxígeno son un grupo heterogéneo de moléculas que se caracterizan por que en su metabolismo dan lugar a estrés oxidativo y que cada vez están adquiriendo más relevancia por su implicación en procesos genotóxicos. Por otra parte, los ensayos somáticos de mutación y recombinación (SMART) en *Drosophila* pueden adquirir cada vez más importancia como herramienta en la evaluación genotóxica para lo que se precisa, entre otras cosas, evaluar con estos tests un mayor número de compuestos con diferente modo de acción.

Con esta idea, y utilizando el SMART de ojos w/w^+ , se han ensayado seis compuestos (paraquat, menadiona, 4-nitroquinolina 1-óxido, streptonigrina, plumbagina y tert-butilhidroperóxido) usando, entre las disponibles, la línea Oregon K. Todos los compuestos, salvo menadiona cuyos resultados con otras líneas son también negativos o marginalmente positivos, fueron evaluados positivamente. Estos resultados ponen de manifiesto que el ensayo w/w^+ posee una buena capacidad de detección de efectos genotóxicos inducidos por agentes productores de especies reactivas de oxígeno y, junto con otros obtenidos previamente, permiten sugerir que la línea Oregon K debe incluirse entre la batería de líneas recomendadas para realizar ese test.

¿ES EL ENSAYO *WHITE-IVORY* DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* UNA HERRAMIENTA ÚTIL EN LA DETECCIÓN DE EFECTOS GENOTÓXICOS?

Ferreiro, J.A., Consuegra, S., Sierra, L.M. y Comendador, M.A.

Área de Genética, Dpto. de Biología Funcional, Universidad de Oviedo, Oviedo.

El ensayo *white-ivory* es un test de genotoxicidad somática basado en la reversión del gen w^i , que es debido a una duplicación de 2.9 kb del gen *white*, al alelo salvaje w^+ . Aunque no se conoce el mecanismo exacto por el que se produce la reversión, hay fuertes sugerencias que indican que es producido por recombinación intracromosómica.

En este trabajo hemos evaluado 36 compuestos químicos pertenecientes a grupos con diferentes modos de acción. Estos grupos son: agentes alquilantes monofuncionales, productores de enlaces cruzados, dihaloalcanos, inhibidores de DNA-topoisomerasas, inductores de aductos voluminosos y carcinógenos no genotóxicos. Los resultados obtenidos muestran que este ensayo: (i) detecta agentes productores de enlaces cruzados, alquilantes monofuncionales y dihaloalcanos, (ii) no detecta agentes intercalantes, inhibidores del pool de nucleótidos y carcinógenos no genotóxicos, (iii) detecta sólo algunos de los compuestos clasificados en los grupos restantes.

La conclusión general es que este ensayo es más restrictivo en cuanto al espectro de compuestos que es capaz de detectar en comparación con otros ensayos somáticos de *Drosophila*, y hasta que se obtengan evidencias concretas acerca del mecanismo específico de reversión de la mutación w^i , este ensayo debería ser utilizado con precaución.

EL ENSAYO *WHITE-IVORY* DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* BAJO CONDICIONES DE REPARACIÓN DEFICIENTES.

Ferreiro, J.A., Sierra, L.M. y Comendador, M.A.

Área de Genética, Dpto. de Biología Funcional, Universidad de Oviedo, Oviedo.

Hemos introducido dos mutaciones que confieren deficiencia en reparación en el *ensayo white-ivory* de *Drosophila* con el objeto de comprobar si se incrementa su sensibilidad. Por un lado, hemos utilizado *mus201*, que es deficiente en reparación por escisión de nucleótidos, y por otro lado *mei 41*, que es deficiente en el mecanismo de reparación post-replicación.

Ambas líneas fueron utilizadas para estudiar la mutagenicidad de 3 agentes alquilantes monofuncionales, metil metanosulfonato, etil metanosulfonato y N-etil N-nitrosourea; un agente productor de enlaces cruzados, hexametil fosforamida; el dihaloalcano 1,2-dibromoetano; los inhibidores de las DNA-topoisomerasas I, camptotecina, y II, etopósido; el inductor de daño oxidativo, 4-nitroquinolina 1-óxido y un compuesto productor de múltiples tipos de daño, daunomicina. Todos estos compuestos habían sido detectados eficazmente con anterioridad en la línea con reparación eficiente.

Los resultados, tomados en conjunto, no aportan ninguna evidencia sobre una mejor sensibilidad del test bajo ninguna de las dos condiciones deficientes en reparación. Sin embargo, parece que al menos el sistema de reparación por escisión de nucleótidos tiene influencia en la pérdida del fragmento de 2.9 kb duplicado inducida por algunos de los agentes químicos probados.

N-ETIL-N-NITROSOUREA (ENU), HIPERMUTABILIDAD Y LA MUTACIÓN *MUS308*.

Tosal, L.; M. A. Comendador y L. M. Sierra

Área de Genética, Dpto. de Biología Funcional, Universidad de Oviedo, Oviedo.

La mutación *mus308* de *D. melanogaster* fue aislada por Boyd et al. en 1981 como un mutante sensible a nitrógeno mostaza (HN2) pero no a metil metanosulfonato (MMS). Este mutante parece presentar hipersensibilidad a agentes no sólo productores de enlaces cruzados, habiéndose sugerido un posible defecto en la reparación post-replicativa de aductos no escindidos. Además, la mutación *mus308* ha sido propuesta como un modelo animal para el estudio de la anemia de Fanconi.

En un experimento destinado a aislar mutantes *vermilion* inducidos por ENU, en estadios postmeióticos y condiciones de reparación deficientes (mutación *mus308*), se detectó que, en contra de resultados anteriores, no aparecía hipermutabilidad en el conjunto de las descendencias observadas. Sin embargo, dos hechos son notorios: por un lado, el claro descenso en la frecuencia de inducción de mutaciones recesivas ligadas al sexo (SLRL), paralelamente al envejecimiento de las células germinales; y por otro, la existencia de una hipermutabilidad en la descendencia correspondiente a espermatozoides (y no así en la de espermátidas) cuando se consideran por separado los datos de ambas.

Asimismo, y comparando estos datos con aquellos referidos a condiciones de reparación eficientes (Pastink et al., 1989), es de destacar la existencia de una clara hipermutabilidad considerando las frecuencias de mutación del locus *vermilion*, tanto en F₁ como en F₂.

En la comunicación se discuten los datos de hipermutabilidad y sus posibles causas, y se presenta una primera aproximación al espectro molecular de mutación inducido por ENU.

DAÑO CROMOSOMICO INDUCIDO POR ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN Y SU MODULACION MEDIANTE LIGASA DEL FAGO T4 EN CELULAS CHO ELECTROPORADAS

Piñero, J., Ortiz, T., Daza, P., Cortés, F.

Unidad de Cultivo Celular y Radiobiología. Dpt. Biología Celular. Universidad de Sevilla.

El método de electroporación viene siendo usado en los últimos años en biología y medicina para la introducción de moléculas hidrosolubles en células vivas, dadas sus indudables ventajas frente a otros métodos de permeabilización. En nuestro laboratorio, hemos empleado la electroporación para introducir macromoléculas, como enzimas de restricción, ovoalbúmina o catalasa, en células cultivadas de mamíferos.

En el presente trabajo, hemos estudiado la posible modulación de las roturas de doble cadena en el DNA y el daño cromosómico inducido por endonucleasas de restricción mediante ligasa de T4 en células CHO electroporadas. Se han empleado cuatro enzimas de restricción, dos que producen roturas de doble cadena de DNA con extremos romos (Dra I y Sca I), y dos que provocan roturas con extremos cohesivos (Eco RI y Bam HI), comparándose la frecuencia de aberraciones cromosómicas observadas cuando cada enzima se introdujo sola con aquellas frecuencias obtenidas cuando se introducía simultáneamente la ligasa de T4.

Mediante marcaje con bromodesoxiuridina (BrdU) pudo comprobarse que más del 95 por ciento de las células se encontraban en su primera mitosis después de ser electroporadas, ya sea con la enzima de restricción sola o con la combinación enzima+ligasa, y los resultados mostraron que la ligasa fue capaz de reducir de manera clara la frecuencia de aberraciones para las 4 enzimas de restricción ensayadas. Por otra parte, pudo observarse que el grado de modulación por la ligasa del daño cromosómico dependía del tipo de corte de la enzima, siendo más evidente para aquellas enzimas de restricción que producen roturas en el DNA con extremos cohesivos que en el caso de extremos romos.

Una observación muy interesante fue que a pesar de la reducción en la frecuencia de aberraciones cuando la ligasa estaba presente, la proporción relativa de deleciones e intercambios se mantenía en gran medida, lo cual sería, en nuestra opinión, una prueba en favor de que la reparación mediada por la ligasa exógena sería libre de error.

POTENCIACION DEL DAÑO CROMOSOMICO Y MUERTE CELULAR POR INHIBIDORES DE TOPOISOMERASAS EN CELULAS CHO PRETRATADAS CON 5-AZACITIDINA

Cortés, F., Piñero, J., Lopez-Baena, M., Ortiz, T.

Unidad de Cultivo Celular y Radiobiología. Dpt. Biología Celular. Universidad de Sevilla.

Nuestros propios resultados, y los de otros autores, han demostrado claramente la importancia del progreso de la horquilla de replicación del DNA para que se produzca el daño cromosómico y la muerte celular en células tratadas con inhibidores de topoisomerasas. Surge, pues, la idea de que si de algún modo fuera posible que se activasen replicones, la eficacia de un tratamiento con dichas drogas antitumorales podría potenciarse en gran medida.

La 5-azacitidina (5-azaC), de acción hipometilante sobre el DNA, ofrece una oportunidad única en el sentido de que tras una exposición prolongada a dicho análogo de la citidina, las células adelantan el momento de la replicación, de manera que bloques de replicones que normalmente replican a final del S (heterocromatina constitutiva, por ejemplo) lleven a cabo su replicación en S temprano, tal como se ha demostrado en células humanas y en células de roedores.

Por nuestra parte, una vez comprobado el efecto de la 5-azaC en el grado de condensación cromosómica, hemos podido demostrar en células cultivadas CHO (fibroblastos de ovario de hamster) que efectivamente se produjo dicho adelanto en el momento de la replicación y, aprovechando esta circunstancia, hemos logrado incrementar el daño cromosómico inducido por inhibidores de topoisomerasas así como la muerte celular proliferativa (pérdida de la capacidad clonogénica).

Hemos estudiado, asimismo, a nivel molecular las actividades topoisomerasas (decatenado de DNA de cinetoplasto por la Topo II y relajamiento de DNA plasmídico superenrollado por la Topo I) en extractos nucleares obtenidos de células control y luego de tratar con 5-azaC, y nuestros resultados parecen indicar una mayor actividad topoisomerasa en estos últimos, lo cual estaría muy de acuerdo con la mayor actividad replicativa y transcripcional.

INDICE DE AUTORES

Abril N	37,39	Lapeña N	31
Alarcón M	33	Leal J	26
Autio K	29	López MT	27
Baldrich E	41	López-Baena M	50
Barale R	32	López-Yarto A	34,36
Barrueco C	20	Macos R	30,31,32,41,42
Bauchinger M	12		43,44
Caballo C	19	Marsá M	31
Cabré O	41,42,43	Moya P	40
Carbonell E	30,31	Norppa H	29,35
Catalán J	29	Ortiz T	49,50
Comendador MA	45,46,47,48	Peñá E de la	17
Consuegra S	46	Piñero J	49,50
Cortés F	49,50	Pitarque M	31
Creus A	30,31,41,42,	Prieto-Alamo MJ	37,39
	43,44	Pueyo C	37,38,39
Daza P	49	Resino M	36
Díaz Llorente M	20	Ribas G	32
Duk S	33	Salas J	40
Falck G	35	Sánchez Hombre MC	34,36
Ferreiro JA	46,47	Saraza R	40
Ferrezuelo F	37,38	Sierra LM	46,47,48
Ferro MT	34,36	Sinués B	10
Frenzilli G	32	Soriano S	42
Gaivao I	45	Sorsa M	29
Galofré P	30	Suarez S	43
García M	33	Surrallés M	35
García Moreno MC	27	Torres C	44
García Sagredo JM	34,36	Torres M	31
González T	40	Tosal L	48
Guadaño A	23	Valcarce E	13
Gutierrez S	30	Vallcorba I	34,36
Hermosilla I	33	Vázquez Mazariego Y	34
Herrera A	18	Velázquez A	41,42,43
Jurado J	38,39	Venegas W	33
Lanuza J	10	Weigert G	33
		Xamena N	25,30,31,41,42
			43,44