

ESTADOS LARVALES DEL ANFIBIO  
ANURO *CAUDIVERBERA CAUDIVERBERA*:  
MODELO BIOLÓGICO PARA ESTUDIOS  
DE AGENTES GENOTÓXICOS <sup>1</sup>

Larval stages of the anuran  
amphibia *Caudiverbera caudiverbera*:  
A biological model for studies  
of genotoxic agents

WALDO VENEGAS<sup>2</sup>, IVONNE HERMOSILLA\*, JUAN F. GAVILAN\*,  
RINA NAVEAS\*\*, PATRICIO CARRASCO\*\*.

RESUMEN

Con el objeto de validar un método de detección de los agentes mutagénicos presentes en los cuerpos de aguas continentales de la VIII Región, Chile, se seleccionaron los estados larvales premetamórficos de *Caudiverbera caudiverbera* como modelo de estudio. Con el propósito de afinar aspectos metodológicos y determinar la sensibilidad del modelo, se utilizó la acción clastogénica de las radiaciones gamma. La actividad genotóxica fue medida cuantificando la presencia de micronúcleos en los eritrocitos de la sangre periférica de las larvas tratadas.

Se seleccionaron larvas de un mismo estado de desarrollo, se establecieron tres grupos de tratamiento y un grupo control. Cada grupo recibió una sola dosis de 50 rads, 100 rads y 150 rads respectivamente. Al sexto día posterior al tratamiento, las larvas se sacrificaron y posteriormente se hizo el recuento de micronúcleos. Los resultados muestran una relación dosis-respuesta altamente significativa entre la frecuencia de micronúcleos y la dosis de radiaciones administradas.

Esta publicación demuestra que las larvas de *Caudiverbera caudiverbera* constituyen un sustrato cómodo y sensible que presenta una serie de ventajas que lo hacen ideal como modelo para estudios *in vivo* de potenciales agentes mutagénicos y carcinogénicos presentes en ríos, esteros, lagos y lagunas de Chile.

El test de micronúcleos probado aquí, demostró ser un método sensible, rápido, de bajo costo y de fácil realización, que lo hacen recomendable para ser utilizado como test corto en estudios de Genética-Toxicológica.

ABSTRACT

In order to make a method feasible for the detection of mutagenic agents present in continental water bodies of the VIII Region, Chile, larvae of *Caudiverbera caudiverbera* at premetamorphic stages were selected as study models. With the purpose of optimizing the methodological aspects and of determining the sensitivity of this amphibian, the clastogenic action of gamma rays was used. Genotoxic activity of this type of radiation was measured by the quantification of the presence of micronuclei in erythrocytes of peripheral blood of the treated larvae.

Once larvae of the same developmental stage

<sup>1</sup> Proyecto 20.31.21. Dirección de Investigación, Universidad de Concepción.

<sup>2</sup> A quien debe dirigirse la correspondencia, Casilla 2407, Apartado 10, Concepción, Chile.

\* Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

\*\* Departamento de Matemática, Facultad de Ciencias, Universidad de Concepción.

were selected, three treatment and one control group were set up. Radiation was applied in doses of 50, 100, and 150 rads. Six days after the treatment, larvae were killed and micronuclei count made. The results show a highly significant dose-response relationship between frequency of micronuclei and radiation doses applied.

It is shown in this paper that larvae of *Caudiverbera caudiverbera* are an advantageous, sensitive and easily usable material that has turned out to be an ideal model for *in vivo* studies of potential mutagenic and carcinogenic agents present in rivers, streams, lakes, and lagoons of Chile. The micronucleus test proved to be a fast, sensitive, inexpensive, and easy to carry out method, all of which make its use recommendable as a short test in Toxicology Genetics.

**KEYWORDS:** Toxicology genetics. Micronucleus test. Gamma radiation. Continental aquatic animals.

### RESUMÉ

Des états larvaires prémétamorphiques de *Caudiverbera caudiverbera* ont été utilisés comme modèle biologique pour mettre au point une méthode permettant le dépistage d'agents mutagéniques

### INTRODUCCION

En los cuerpos de aguas continentales de la VIII Región, Chile, se ha detectado (Weinert, O. 1986) altas concentraciones de agentes químicos provenientes, principalmente, de la descarga de desechos industriales, de desperdicios de uso doméstico y del uso indiscriminado de fertilizantes y pesticidas en la agricultura y actividad forestal.

La ruptura del equilibrio natural que se está produciendo, presenta directa o indirectamente, un riesgo genético enorme, no sólo para el hombre, sino que para una infinidad de especies animales y vegetales allí existentes.

*A priori*, se puede sospechar que numerosos de estos agentes químicos y/o sus metabolitos pueden reaccionar con el ADN celular provocando diversas lesiones en él. La acción de agentes físicos y químicos puede inducir una gran variedad de lesiones primarias tales como rupturas simples y dobles en las hebras

présents dans les eaux continentales de la Région du Bío-Bío (8<sup>ème</sup> région du Chili). Pour perfectionner des aspects méthodologiques et pour déterminer la sensibilité du substrat on a utilisé l'effect clastogénique des radiations gamma, dont la géotoxicité fut mesurée en comptant les micronoyaux présents dans les érythrocytes du sang périphérique des larves traitées.

On a sélectionné des larves d'un même stade de développement et on a établi trois groupes de traitement et un groupe témoin. Le premier groupe reçut une dose de 50 rads, le deuxième une de 100 rads et le troisième une de 150 rads. Six jours après le traitement, les larves furent sacrifiées et leurs micronoyaux comptés. Les résultats montrent une significative relation dose-réponse entre la fréquence de micronoyaux et les doses de radiations administrées.

On peut apprécier donc que les larves de *Caudiverbera caudiverbera* constituent un substrat sensible, présentant des avantages surtout comme modèle idéal pour l'étude *in vivo* d'agents mutagéniques et carcinogéniques potentiels se trouvant soit dans les cours d'eau soit dans les lacs du Chili.

Le test de micronoyaux employé s'avéra sensible, rapide, bon marché et facile à mettre en oeuvre, donc rentable et utile comme test à court-terme en toxicologie génétique.

que conforman la molécula de ADN, lesiones de diferentes tipos en las bases nitrogenadas púricas y pirimidicas, reacciones de alquilación y de intercalación, formación de dímeros de pirimidina, etc. (IAEA, 1986).

Los agentes clastógenos al provocar rupturas en la molécula de ADN, generan posteriormente alteraciones cromosómicas tales como inversiones, translocaciones, deleciones, que pueden ser detectadas por un examen acucioso de los cariotipos. Los diferentes tipos de lesiones producidas y observadas en los cromosomas han sido clasificadas y descritas en numerosas publicaciones (Heddle, J. 1973) (Evans, H.J. 1976) (Savage, J.R. 1975).

Este método clásico que permite detectar y cuantificar las aberraciones cromosómicas inducidas por un compuesto clastogénico dado es un excelente test utilizado en Genética toxicológica como indicador del efecto mutagénico y/o carcinogénico de los agentes físicos y químicos

del medio ambiente, sin embargo presenta el inconveniente de que la cuantificación es larga y tediosa, si se quiere evaluar con precisión las alteraciones cromosómicas inducidas por un tratamiento con un agente clastogénico dado. Además se requiere una gran experiencia en citogenética que permita la seguridad y confiabilidad necesaria en la obtención y discusión de los resultados encontrados. Estas dificultades se eliminan en su totalidad cuantificando los micronúcleos inducidos por los agentes en estudio.

El test de micronúcleos, así como el precedente, es un test que tiene como objetivo poner en evidencia las propiedades de un agente físico o químico de producir anomalías cromosómicas en las células con ciclo vital activo. Este test se basa en el hecho de que los fragmentos de los cromosomas afectados desprovistos de centrómero, y que resultan de la acción de un agente mutagénico, no emigran en la anafase, originándose finalmente uno o más núcleos pequeños, llamados micronúcleos, y que se observan en el citoplasma, separados del núcleo principal que es el que contiene, en definitiva, los cromosomas intactos y los fragmentos cromosómicos con centrómero. Pueden igualmente provocar la formación de micronúcleos ciertas alteraciones en el funcionamiento del aparato mitótico inducidas por venenos del huso, que ejercen un efecto específico sea sobre las fibras del huso o sobre los centriolos, pero en este caso se trata de cromosomas enteros que no pudieron emigrar normalmente durante el transcurso de la anafase.

Como quiera que sea, micronúcleos (MN) perfectamente visibles en el citoplasma de las células afectadas, pueden ser observados con un microscopio óptico compuesto corriente. (fig. 1).

Actualmente la inducción de MN es estudiada principalmente durante la eritropoyesis de los mamíferos (Schmid, W. 1975). Este autor utilizó el hecho de que estos animales expulsan los núcleos de las células rojas inmaduras y que por razones desconocidas los MN formados

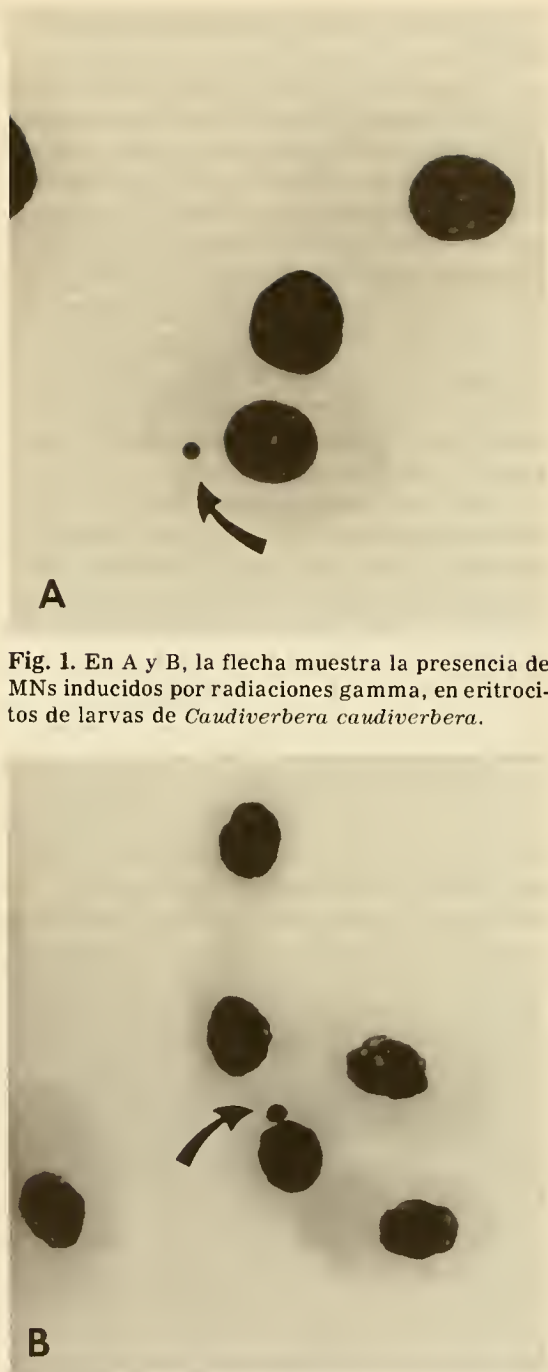


Fig. 1. En A y B, la flecha muestra la presencia de MNs inducidos por radiaciones gamma, en eritrocitos de larvas de *Caudiverbera caudiverbera*.

quedan en el interior de los jóvenes eritrocitos.

Aplicando este análisis a varias especies de roedores, Schmid pudo demostrar lo importante de esta técnica en la identificación de mutágenos y venenos del huso: sensibilidad, rapidez, simplicidad pa-

ra llevarla a cabo y lectura fácil de los resultados.

La técnica de Schmid es la que más se utiliza actualmente en los laboratorios de Genética-Toxicológica de los países desarrollados; sin embargo, ella utiliza animales de experimentación isogénicos que además de su alto costo, dado el número de animales a utilizar en cada experiencia, se requiere de una infraestructura y personal especializado para su mantención, que permita contar con un substrato de experimentación confiable. Esto por el momento es muy oneroso para nuestro medio.

En lo que nos concierne y dado que nuestro objetivo a corto y mediano plazo es estudiar los efectos genotóxicos de los agentes químicos extraños presentes en los cuerpos de aguas continentales de la VIII Región, decidimos adaptar el test de MN utilizando como modelo las larvas del anfibio anuro *Caudiverbera caudiverbera* o rana grande chilena (fig. 2), que pretendemos adoptar en nuestro programa de investigaciones futuras, dada las ventajas que este substrato presenta para nuestros planes de estudios de Genética-Toxicológica (véase discusión).

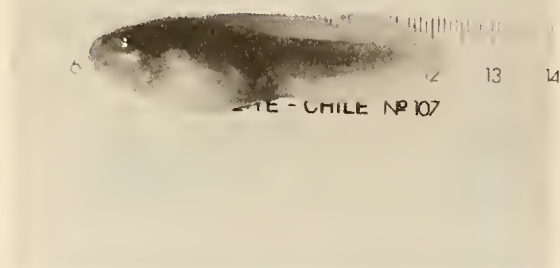


Fig. 2. Larva premetamórfica de *Caudiverbera caudiverbera*, vertebrado endémico de amplia distribución en Chile (IV a X Región).

## MATERIALES Y METODOS

Este estudio se planificó para ser realizado en dos etapas:

**Primera etapa.** Ensayo del test de MN en larvas premetamórficas de *Caudiverbera caudiverbera*. Para ello se utilizó radiaciones gamma, agente físico de probados efectos clastogénicos (Léonard, A. 1983) (Joshi, G.P. et al. 1982). Los resultados obtenidos de esta investigación son presentados y discutidos en la presente publicación.

**Segunda etapa.** Determinación del efecto genotóxico de algunos contaminantes químicos presentes en los cuerpos de agua de ríos y lagunas de la VIII Región (Pentaclorofenol, fluoruros, pesticidas, detergentes, etc.). Los resultados obtenidos de estas investigaciones serán motivo de publicaciones posteriores.

Para llevar a cabo los objetivos de la primera etapa se seleccionaron 90 larvas premetamórficas, exentas de parásitos externos, de enfermedades y malformaciones, provenientes de una misma postura obtenida en los acuarios y piletas de cultivo del Laboratorio de Biología del Desarrollo del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Concepción. Ocho días previos a la experimentación, las larvas fueron mantenidas en condiciones de iluminación, temperatura y alimentación idénticas a las utilizadas durante la práctica de los ensayos preliminares y definitivos.

## Ensayos preliminares

Las larvas seleccionadas de 6 a 8 cm. de longitud, fueron colocadas en cristalizadores de 20 cm. de diámetro que contenían un volumen de agua suficiente para cubrir completamente y sobrepasar apenas el cuerpo de los animales. Se establecieron 3 grupos de tratamiento constituidos por 20 larvas cada uno, la irradiación gamma fue proporcionada por una bomba de cobalto, Universal Phillips, con una energía de radiación de 1,17 MEV. Se utilizó un diafragma 6011/01. Conocida la distancia de foco del instrumento y de acuerdo al rendimiento del mismo, se determinó el tiempo de irradiación para los diferentes grupos de

tratamiento, de acuerdo a las distintas dosis empleadas, las que fueron seleccionadas arbitrariamente dentro del rango de radiaciones bajas, para así poder determinar la sensibilidad de este material biológico. Los tres grupos de tratamiento recibieron una dosis de 50 rads, 100 rads y 150 rads respectivamente. La cantidad de radiación absorbida fue medida con un dosímetro perteneciente al Departamento de Radioterapia del Hospital "Guillermo Grant Benavente" de Concepción. Se estableció, además, un cuarto grupo formado por 10 larvas que no se irradiaron, pasando a constituir éste, el grupo control.

Los grupos de tratamiento y control fueron trasladados a sus unidades de cultivo respectivas, las que contenían agua de acuario filtrada a razón de 100 ml. por larva. Todas las unidades de cultivo se conectaron a un sistema de aeración constante de acuerdo al método establecido por Gavilán y Hermosilla (1984). (fig. 3).

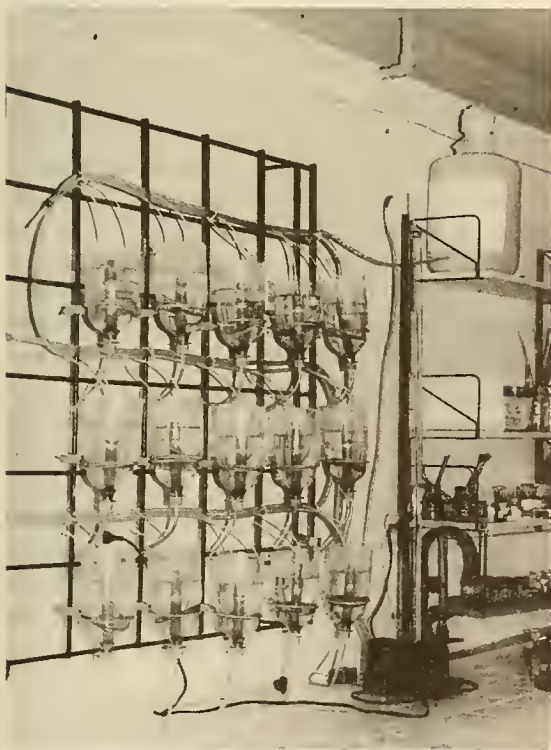


Fig. 3. Disposición de varias unidades de cultivo y tratamiento, conectadas al sistema de aereación.

La experiencia se condujo durante 10 días. Cada 24 horas se sacrificaron dos larvas de cada grupo tratado y una del grupo control. Con la sangre obtenida por punción cardíaca se realizaron dos frotis por larva, los que fueron debidamente clasificados para posterior lectura de la frecuencia de MN.

Los ensayos preliminares tuvieron por objeto determinar el período de mayor frecuencia de MN en función del tiempo a partir del tratamiento, información indispensable para la planificación de los ensayos definitivos. Estas experiencias se hicieron necesarias debido a que no existen antecedentes bibliográficos referentes a la duración del ciclo celular de los eritrocitos de *Caudiverbera caudiverbera*, impidiéndose de esta manera hacer una estimación del retardo del ciclo celular de éstos, al ser afectados por la radiación.

### Sacrificio de las larvas, confección de frotis, coloración y lectura.

Al momento del sacrificio, las larvas son anestesiadas por inmersión en una solución acuosa de mentol (2 g./l.), después de lavadas, cada larva se dispone sobre la platina de una lupa binocular, con la ayuda de pinzas finas se hace una incisión en la piel a nivel del tórax dejando a la vista el músculo cardíaco. La punta de una micropipeta de aproximadamente 100 micrones de diámetro, previamente heparinizada, es introducida en el ventrículo. Al otro extremo de la pipeta se adosa con anterioridad, una fina goma aspirante lo que permite al experimentador hacer subir la sangre. El hecho de perforar el ventrículo no impide que el corazón continúe latiendo, lo que facilita la ascensión del líquido y coloreado tejido. (fig. 4).

La gota de sangre obtenida se deposita en un extremo de una lámina histológica desgrasada y seca, una fina capa de ella es extendida a lo largo de toda la lá-

## ENSAYOS DEFINITIVOS

Se establecieron cuatro grupos de tratamiento constituidos ahora por 6 larvas cada uno, los tres primeros grupos recibieron una dosis única de 50 rads, 100 rads y 150 rads respectivamente, el cuarto grupo no se irradió, pasando a constituir el grupo control. Cada grupo fue trasladado de inmediato a sus respectivas unidades de cultivo.

La experiencia se condujo durante 6 días en consideración a que en los ensayos preliminares, entre el quinto y séptimo día posterior al tratamiento, se obtuvo la mayor frecuencia de MN (fig. 5). En consecuencia, sólo al sexto día después del tratamiento, fueron sacrificadas y confeccionados los preparados histológicos de todas las larvas, de todos los grupos de tratamiento incluidos los animales del grupo control.

## RESULTADOS

Las tres dosis de radiación proporcionadas a los diferentes grupos de tratamientos indujeron la formación de MN en los eritrocitos de *Caudiverbera caudiverbera*, el 100% de los ejemplares sobrevivió al tratamiento y no hubo muertes durante el tiempo que se condujo la experiencia. La fig. 5 confeccionada con los resultados obtenidos de los ensayos preliminares, permite reconocer claramente un incremento de la frecuencia de MN encontrados en función del tiempo, alcanzándose un máximo entre el quinto y séptimo día. Desde el séptimo al décimo día la frecuencia de MN disminuye notoriamente, esta situación se observa en los tres grupos irradiados (50 rads, 100 rads y 150 rads); en cambio, en el grupo control, la cantidad de MN por 1000 es aproximadamente constante durante los 10 días que duró la experiencia.



Fig. 4. Con una fina pipeta Pasteur previamente heparinizada, se obtiene por punción cardíaca la sangre necesaria para la confección del frotis sanguíneo.

mina de acuerdo a la técnica clásica de preparación de un frotis sanguíneo. Una vez realizado el frotis, éste es inmediatamente secado mediante un flujo de aire. Posteriormente, las láminas son fijadas por inmersión en etanol puro durante un mínimo de 3 minutos, luego son coloreadas durante 10 minutos en una solución Giemsa al 4% en buffer fosfato de pH 6,8. Después las láminas son lavadas sumergiéndolas dos o tres veces sucesivas en agua destilada, por último, se dejan escurrir y secar lentamente al aire. En estas condiciones las láminas se pueden conservar durante varios meses con tal de mantenerlas al abrigo del polvo y de la luz.

Para la lectura los preparados son observados al microscopio óptico y la frecuencia de eritrocitos con uno o más MN es determinada por el examen de 2000 células por lámina, 4000 células en total por larva.

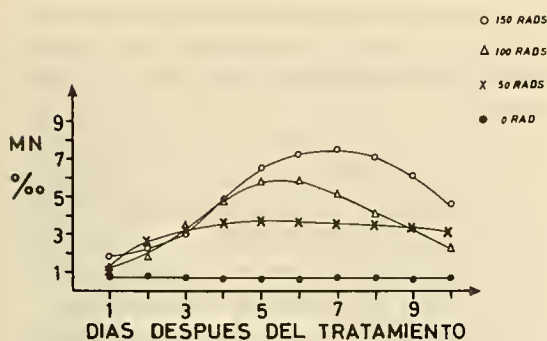


Fig. 5. Frecuencia por mil de eritrocitos con MN, contados cada 24 horas después del tratamiento por un período de 10 días consecutivos. Las líneas corresponden a curvas de mejor ajuste (regresión polinomial de cuarto grado).

radiación proporcionada a cada grupo, esto es, 6 días (144 horas) después del tratamiento. Los resultados promedios obtenidos se presentan en las Tablas I y II, las que nos muestran una relación directamente proporcional entre el número de MN encontrados y la dosis de radiación proporcionada en cada tratamiento.

TABLA I. Valores promedio de MN de las larvas de cada grupo de tratamiento que recibieron la misma dosis de radiación. Dos preparados histológicos fueron leídos por larva. Se contaron 2000 células por lámina, o sea 4000 eritrocitos en total por larva.

Dosis (Rads)	Promedio de micronúcleos por larva					
	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6
0	0,00	0,167	0,00	0,167	0,33	0,00
50	4,00	4,33	2,67	4,33	5,00	4,00
100	6,33	6,00	6,00	5,83	6,83	6,16
150	8,33	8,33	9,00	8,67	8,83	8,83

TABLA II. Frecuencia de MN en eritrocitos de sangre periférica de larvas de *Caudiverbera caudiverbera* inducidos por diferentes dosis de radiación gamma. Para cada dosis se contaron 24.000 eritrocitos obtenidos de 6 individuos.

Dosis (Rads)	Promedio de Micronúcleos por 1000 ± SE	
0	0.110 ± 0.055	(6 larvas)
50	4.055 ± 0.314	(6 larvas)
100	6.191 ± 0.145	(6 larvas)
150	8.665 ± 0.114	(6 larvas)

El análisis estadístico de los resultados medido a través de un Test de Linealidad (Tabla III) muestra una relación dosis-respuesta altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) entre los valores de MN inducidos por las distintas radiaciones. Esta relación tiene una gran tendencia a la linealidad.

TABLA III. Análisis de varianza (Draper, N., H. Smith, 1981)

Fuente de variación	Grados de libertad	Sumas de cuadrados	Cuadrados Medios	Valor F	Valor p
Total	23	240,554			
Regresión 1		231,846	231,846	585,740	0,0001
Error	22	8,708	0,396		

Ecuación de Regresión:  $y (MN/1000) = 0.056 \text{ Rads} + 0.586$   
 Coeficiente de correlación:  $r = 0.9817$

### DISCUSION

En el presente estudio, la inducción de MN en eritrocitos de larva de *Caudiverbera caudiverbera*, por la acción de 3 dosis bajas de radiaciones gamma, muestra una evidente actividad genotóxica de dicho agente físico.

La frecuencia de MN<sub>5</sub> encontrada en el grupo control, fue baja, de lo que se puede deducir que el aumento significativo de MN<sub>5</sub> en los grupos tratados, se debe a la acción clastogénica de las radiaciones gamma. Algunos preparados de cromosomas metafásicos obtenidos de médula ósea de juveniles de *Caudiverbera caudiverbera*, irradiados con una sola dosis de 150 rads, así lo confirman; en efecto, es posible observar con cierta frecuencia placas metafísicas con evidentes fracturas cromosómicas (fig. 6).

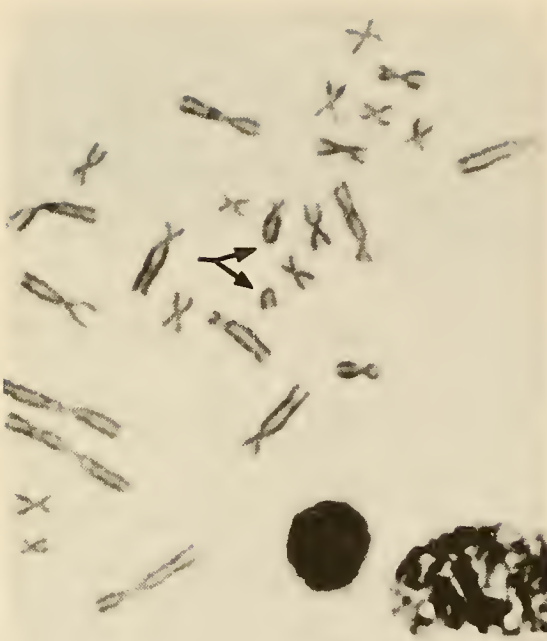
Los resultados descritos en la presente publicación muestran con claridad que las larvas de la rana grande chilena pueden usarse como un sensible modelo para el estudio del efecto genotóxico de los agentes físicos del medio ambiente y

en consecuencia podrían ser un buen sustrato para determinar el efecto mutágeno-clastógeno de los agentes químicos presentes en los cuerpos de agua de ríos y lagunas de la VIII Región.

Consideramos que las larvas de este anfibio anuro presentan una serie de ventajas como modelo biológico, que las hace ideales para nuestros planes de estudios futuros de Genética-Toxicológica.

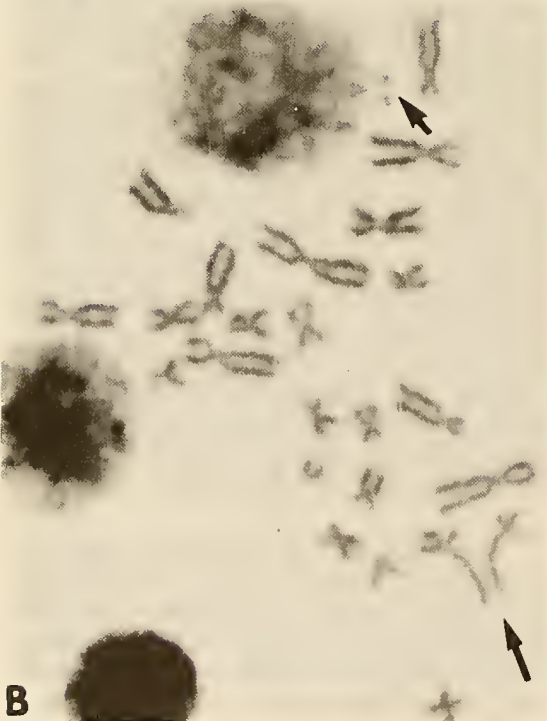
A continuación se señalan las ventajas principales:

- La postura de las ranas adultas es abundante y la crianza y desarrollo de las larvas han sido bien estudiadas en el laboratorio de Biología del Desarrollo de la Universidad de Concepción (Hermosilla, I. 1984) (Hermosilla, I. y Coloma, L. 1985).
- Las larvas de *Caudiverbera caudiverbera* constituyen un abundante y homogéneo material de estudio; en cada oviposición se pueden encontrar entre 8000 y 10000 huevos.
- El ambiente natural de las larvas es acuático lo que permite ponerlas en contacto directo con los agentes químicos disueltos en las muestras traídas de terreno, o bien una vez identificada y determinada la concentración de uno o varios de los contaminantes, se puede efectuar el tratamiento separadamente, disolviéndolos en el agua de cultivo.
- En los anfibios la sangre circulante posee eritrocitos nucleados capaces de dividirse, esta eritropoyesis sanguínea persiste durante toda la vida del individuo, pero es particularmente importante hasta los límites de la metamorfosis (Deparis, P. 1973).
- Los agentes clastógenos inducen la formación de MN en los glóbulos rojos de la sangre circulante (fig. 1).
- Los frotis sanguíneos realizados después de la punción cardíaca de las larvas tratadas, permiten detectar y contar fácilmente los eritrocitos con MN; esta lectura puede ser realizada por personal no especializado que reciba un entrenamiento adecuado.



A

Fig. 6. Microfotografías de placas metafásicas provenientes de juveniles de *Caudiverbera caudiverbera* ( $2n = 26$  cromosomas) obtenidas con un fotomicroscopio Zeiss, III. Las flechas muestran en A y B fracturas cromosómicas inducidas por una sola dosis de 150 rads.



B



- El cultivo y mantención de las larvas así como la confección de las unidades de tratamiento es de bajo costo y está al alcance económico de cualquier estación experimental de organismos, tanto privados como estatales, de control del medio ambiente.
- *Caudiverbera caudiverbera* es un vertebrado endémico de Chile que posee una amplia distribución geográfica, que coincide con las zonas de más alto riesgo de contaminación en el país, o sea, desde la IV a la X Región.

### CONCLUSIONES

- Se establece por primera vez a las larvas premetamórficas de *Caudiverbera caudiverbera* como modelo para estudios *in vivo* de Genética-Toxicológica.
- El estado larval premetamórfico de este anfibio anuro, cuya duración comprende de 7 a 8 meses, es un modelo biológico ventajoso que puede ser utilizado como indicador del efecto mutagénico-carcinogénico de los agentes físicos y químicos del medio ambiente, dado que:
- Son de fácil manejo en condiciones de laboratorio y su crianza se puede llevar sin dificultad.
- Presentan una gran actividad mitótica y un elaborado proceso de crecimiento durante su vida acuática que se traduce casi exclusivamente en

crecimiento corporal.

- Los estados larvales son más sensibles que los juveniles y adultos a la acción de agentes clastógenos (resultados en redacción).
- El habitat acuático de las larvas hace de estos anfibios los modelos ideales para el estudio *in vivo* de potenciales agentes mutágeno-clastógenos presentes en las aguas continentales de ríos, esteros, lagos y lagunas de Chile.
- El test de MN, usando como substrato larvas de *Caudiverbera caudiverbera*, ha mostrado ser un método sensible, rápido, de costo reducido y de fácil realización que lo hacen recomendable para ser utilizado como test corto en estudios de Genética-Toxicológica.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su reconocimiento a la Dirección de Investigación de la Universidad de Concepción, por su apoyo a través del Proyecto 20.31.13; a la profesora Mary Fuentes del Departamento de Idiomas Extranjeros y al profesor Emilio Almonacid y señorita Luz E. Spano, del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Concepción, por su colaboración. Agradecemos igualmente a la señorita Isabel Albornoz por la preparación dactilográfica de este trabajo y a los técnicos del Departamento de Radioterapia del Hospital "Guillermo Grant Benavente" de Concepción.

### BIBLIOGRAFIA

- Deparis, P. 1973. Le sang circulant au cours de la croissance larvaire de *P. waltlii* Michah. *J. Physiol.*, 66: 423-436.
- Draper, N., H. Smith. 1981. *Applied Regression Analysis*, Second edition. John Wiley, U.S.A. 709 págs.
- Evans, H.J. 1976. Cytological methods of detecting chemical mutagens: 1-25 *In* Hollander, A. (ed.), *Chemical Mutagen, Principles and Methods for their Detection*. Vol. 4., Plenum Press, New York, 1225 págs.
- Gavilán, J.F. e I. Hermosilla. 1984. Técnica experimental para realizar bioensayos toxicológicos con animales acuáticos. *Bol. Soc. Biol. Concepción, Chile. Tomo 55*, pp. 155-169.
- Heddle, J. 1973. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutat. Res.*, 18: 187-190.
- Hermosilla, I. 1984. Posibilidades de la rancicultura en Chile. *Mems. Assoc. Latinoam. Acuicult.* 5(3): 775-784.
- Hermosilla, I., y L. Coloma. 1985. La rana chilena *Caudiverbera caudiverbera*. Un recurso renovable. *Arch. de Invest.* 3:31-42.
- IAEA. 1986. Biological dosimetry: Chromosomal aberration analysis for dose assesement. *Technical Reports Series N° 260*. International Atomic Energy Agency, Vienna.

- mic Energy Agency, Viena. 1-69.
- Joshi, G.P. W.J. Nelson, S.H. Revell, and C.A. Shaw. 1982. X-ray-induced chromosome damage in mammalian cells and improved Measurements of its effects on their colony-forming ability. *Int. J. Radiat. Biol.*, 41:161-181.
- Léonard, A. 1983. Cytogenetic Effects of Ionizing Radiations in Somatic Cells From Experimental Mammals and Extrapolation to man: 561-583 *In*: Alan R. Liss, Inc., (eds.), *Radiation-Induced Chromosome Damage in Man*. 1277 págs.
- Savage, J.R. 1975. Clasificación and relationships of induced chromosomal structural changes. *Journal of Medical Genetics*, 12: 103-122.
- Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutat. Res.*, 31: 9-15.
- Weinert, O. 1986. Origen, uso y perspectivas del río Bío Bío. Seminario Universidad de Concepción, Corporación para la Regionalización del Bío Bío. Auspiciado por diario "El Sur", Canal 5 TV, Universidad de Concepción. 1-22.