

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS

Inhibición de la División Mitótica de Células  
Tumorales Humanas (HeLa) en Cultivo de Tejidos  
por Acción del O,O-Dietil S-(Etiltio) Metil  
Fosforoditioato. (Forato).

T E S I S  
QUE PARA OBTENER  
EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A  
GABRIEL ANTONIO BARUD MARTIN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MIS PADRES:

Con mucho cariño por el  
gran apoyo que siempre  
me han brindado.

A MIS HERMANOS:

Juan José  
Rosa María  
Emma  
Francisco Javier.

A:

Dr. Jorge González Ramírez  
Dra. Angelina Nuñez  
y  
Compañeros de Laboratorio.

Mis más sinceras gracias  
por su gran ayuda y colaboración  
para el desarrollo de este trabajo.

A:  
Patty, con todo mi amor.

# C O N T E N I D O

## I. - INTRODUCCION

- a). - CONCENTRACION DE PESTICIDAS EN ORGANISMOS Y EFECTOS METABOLICOS.
- b). - ANTECEDENTES DE INVESTIGACIONES ACERCA DE INSECTICIDAS Y SUS EFECTOS SOBRE CELULAS EN CULTIVOS DE TEJIDOS.

## II. - OBJETO

## III .- MATERIALES Y METODOS

## IV .- RESULTADOS

## V .- DISCUSION

## VI .- RESUMEN

## VII .- BIBLIOGRAFIA

## 1.- INTRODUCCION

### a).- Concentración de Pesticidas en Organismos y Efectos - Metabólicos.

Una característica especial de los Insecticidas es su capacidad de acumulación en los organismos a través de las cadenas -- alimenticias, por ejemplo el Krill, especie de pequeño camarón -- que habita en las aguas del Antártico, contiene mucho menos DDT, que los pingüinos que se alimentan de aquél, a este proceso se le conoce en la actualidad como magnificación.

En las aves, la acumulación del DDT, se refleja al presentarse envenenamiento e interferencia en el metabolismo del calcio, por lo que los cascarones de los huevos, son sumamente frágiles, siendo pocos los que llegan al final del período de incubación.

En el ser humano, el mecanismo de acumulación del DDT es exactamente igual, los exámenes realizados, para determinar la -- concentración del DDT en tejidos grasos, (Meier-Bode, 1968), ha -- revelado que en países como la India e Israel, sus habitantes presentan comparativamente mayor concentración de DDT, en la si-- guiente tabla se puede observar algunos de esos resultados.

Alemania Occ.	2.3 ppm.	Francia	5.2 ppm.
Región Artica	3.0 ppm.	Hungría	12.4 ppm.
Inglaterra	3.9 ppm.	Israel	19.2 ppm.
Canada	4.9 ppm.	India (Nva. Delhi)	26.0 ppm.

El DDT también se acumula en el sistema nervioso, de preferencia en el cerebro; en un estudio realizado en Florida, U.S.A., entre 1964 y 1967, todas las autopsias de personas que poseían -- historias clínicas acerca de enfermedades hepáticas, cerebrales o neurológicas, fueron cotejadas en otras historias clínicas controladas; los niveles de DDT en el hígado, grasa y cerebro, fueron -- considerablemente altos, pero no se pudo establecer si esas concentraciones afectaron el funcionamiento de los órganos y sistemas en los que se encontraron. (Reporte al Senado de los U.S.A.).

Se han obtenido algunos datos de gran importancia, acerca de mutaciones causadas por metabolitos del DDT, en 1967 científicos británicos, estudiando el efecto genético de agentes alquilantes, -- (los animales y el hombre, pueden convertir el DDT en ese tipo -- de compuesto). Observaron que tales compuestos interfieren con la estructura del ADN y pueden ocasionar muerte celular, al bloquear

la actividad enzimática de esta (Keller, 1970).

Otras evidencias acerca del bloqueo enzimático se han obtenido en moscas de la fruta, resistentes al DDT, en las cuales se -- encontró que producen una enzima, la DDT dehidroclorinosa, la -- que convierten al DDT en una sustancia no tóxica (Keller, 1970).

Se han encontrado evidencias acerca de disturbios hormona-- les producidos por insecticidas por ejemplo, en ratas hembras, el clordano aumenta la producción en un 385 % y en palomas machos la misma sustancia, incrementó el metabolismo de la testosterona al doble. En pollos que fueron inyectados con tres dosis diarias de 50 mgrs. de o,p DDT, el peso y el contenido de glicógeno en los oviductos, fue semejante al que se obtuvo al aplicar 3 dosis dia-- rias de 50 mgrs. de estradiol ( El DDT comercial, está compues-- to en un 15 al 20% de la forma o,p y en 80 a 85% de la forma -- p,p').

En otro experimento con una forma no determinada de DDT - que fué aplicado a gallos jóvenes, se encontró que el peso testicu-- lar de los animales tratados, comparado con los animales control,

fue de 5 veces menor; ese efecto fue similar al que se obtuvo - -  
cuando las aves fueron tratadas con estrógeno, es decir que el --  
DDT, actúa de manera similar a la hormona sexual femenina, co-  
nocida como dietilestilbestrol.

b). - Antecedentes de investigaciones acerca de insecticidas y sus efectos sobre células en cultivos de tejidos:

La técnica de cultivo de tejidos fue usada por primera vez - por Lewis y Richards (1945), como herramienta de trabajo, cuando trataron embriones de pollo con DDT. Sus resultados demostraron que ese insecticida, aplicado en concentraciones máximas de - - - 600 ppm/ml, no era tóxico para los embriones.

En células humanas en cultivo de tejidos, Gabliks y Friedman (1965), probaron 11 insecticidas diferentes y determinaron cuales - eran las dosis que causaban un 50% de alteraciones en la morfología celular, tales como granulaciones citoplásmicas, así como el - grado de inhibición del crecimiento celular, que en ambos cultivos fue entre el 10 y 50%, calculándose este resultado de acuerdo con la cantidad total de proteínas sintetizadas por cultivo. Los resultados indican que los insecticidas a base de dinitrofenol como el Karatano, son más tóxicos que los insecticidas organoclorados y organofósforados, como el DDT y el Malathión.

Wilson y Walker (1966), estudiaron la toxicidad del Malathion y otros productos similares, observando que el Malathion era suma

mente tóxico para el crecimiento de células de embriones de pollo a concentraciones de  $3 \times 10^{-6}$  mgr/ml, y en concentraciones de  $3 \times 10^{-5}$  mgr/ml, se impedía el crecimiento celular por completo.

En 1967, Gabliks ( Gabliks et, al., 1967 ), probaron el efecto de varios insecticidas organofosforados sobre células hepáticas de ratón en cultivo de tejidos, y encontraron muy poca semejanza con los datos obtenidos al tratar células hepáticas humanas en cultivo de tejidos, con los mismos insecticidas. Por ejemplo, el Malathion resultó ser entre 100 y 120 veces más tóxico para las células hepáticas humanas, que para las células hepáticas de ratón.

Johnson y Weiss ( 1967 ), publicaron los resultados de sus estudios acerca de la toxicidad del DDA, que es un derivado metabólico del DDT, sobre dos tipos de células humanas en cultivo de tejidos, observando que a una concentración de 25 ppm/ml, la Membrana celular se destrufa; tales efectos se evitaron agregando 25 ppm/ml, de ácido mevalónico al medio de cultivo.

Chung y colaboradores ( 1967 ), reportan que el DDT y el

Dieldrín tienen propiedades, para reducir o incrementar la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, en células tumorales humanas en cultivos de tejido ( HeLa ), dependiendo estos efectos de las concentraciones aplicadas al medio de cultivo ( 0.5, 10 y 50 ppm/ml).

Posteriormente, Chung y colaboradores ( 1968), reportan los cambios que se presentan en la síntesis de ARN y proteínas, por ruptura de fracciones subcelulares de células HeLa, tratadas con DDT y Dieldrin sometidas a las mismas concentraciones que en su trabajo anterior ( 1967 ).

En 1969 Litterst y colaboradores ( Litterst et. al., 1969), reportan los efectos de varios insecticidas y sus metabolitos sobre las síntesis de ácidos nucleicos y proteínas para cultivos de células HeLa, observando efectos similares en las síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos a los que se presentan al tratar este tipo de células con aspirina y/o cloruro de sodio; ya que actúan interfiriendo las síntesis de ácidos nucleicos y de las proteínas.

## II. - OBJETO:

El cúmulo de información acerca de diversas sustancias -- químicas usadas como insecticidas, que causan serios problemas a la salud pública, así como efectos dañinos a plantas animales, - - (vertebrados); me ha inclinado a probar el efecto que produce el - O,O,-Diethyl S-(Etiltio)Metil Fosforoditioato; denominado químicamente como Forato y conocido en el mercado con el nombre comercial de Thimet; durante la división mitótica de células tumorales humanas del epitelio cérvico uterino ( HeLa ) en cultivo de tejidos, ya - que su efecto sobre este proceso biológico, no ha sido establecido. Por lo que se probará el efecto que diferentes concentraciones del- Forato causan a ese fenómeno. Por lo tanto la hipótesis nula su-- pone que no habrá diferencias entre los resultados obtenidos en --- los lotes controles y los lotes tratados.

### III. - MATERIALES Y METODOS:

En el presente estudio, la técnica de cultivo de tejidos, fue seleccionada como vía de investigación, ya que provee de poblaciones homogéneas de células y los cambios bioquímicos o morfológicos pueden ser evaluados con relativa facilidad. Las células seleccionadas para este trabajo fueron células tumorales humanas, denominadas HeLa, que fueron aisladas originalmente de un Carcinoma cérvico-uterino, por el Dr. George Gey en 1951. ( Gey et. al., -- 1952 ). Su manejo y mantenimiento es sumamente sencillo, además de que su ciclo de replicación esta bien determinado.

El insecticida probado, es el O,O-dietil-S(etiltio)Metil Fosforoditioato, ( Thimet \* ). Esta sustancia posee un alto grado de toxicidad para los insectos, y en pruebas de laboratorios efectuadas con ratas, se estableció una dosis letal media ( DL<sub>50</sub> ) oral de -- 2.4 mg/Kg., y una DL<sub>50</sub> cutánea de 6 mg/Kg. (datos del fabricante).

Para observar los efectos del O,O-dietil-S(etiltio)-Metil Fos

---

\* Marca de fábrica y nombre comercial del insecticida.  
Producido por los Laboratorios American Cyanamid, Co. N. Y.

foroditioato, sobre la división celular, se sembraron en tubos Leighton  $2 \times 10^5$  células HeLa, suspendidas en 1.5 ml de medio basal de Eagle ( M.B.E). Suplementado con suero de ternera, glutamina + 400 ui. de penicilina sódica por tubo, después de 40 hrs., de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ , se cambio el medio de cultivo agregando en el medio de reemplazo, diferentes concentraciones del insecticida.

Las concentraciones se prepararon de la siguiente forma:

Se pesaron 20 mgr, de Forato ( Thimet ) y se disolvieron en 0.1-0.3 ml, de alcohol etílico de  $96^{\circ}$ ; todo en un matraz estéril de 50 ml, se agregaron 50 ml, de M.B.E., para obtener una concentración base de 400 ppm/ml a la que llamamos concentración " A ".

Una vez hecho lo anterior, toda mezcla, se pasó a través de un filtro Seitz-Weker, para que mediante la filtración a presión eliminar cualquier tipo de bacterias que pudiera contaminar el medio de cultivo, de la mezcla filtrada, se tomo 1 ml, de la concentración " A ", usando una jeringa estéril de 10 ml, agregándose a 9 ml. de M.B.E., para obtener una concentración de 40 ppm/ml, a la que se denominó concentración " B ".

De la concentración " B ", se tomaron 5 ml, y se agregaron a 5 ml, de M.B.E., para obtener una concentración de 20 ppm/ml, denominándose a esta solución, concentración " C ".

De la concentración " C ", se tomaron 5 ml, y agregaron a 5 ml, de M.B.E., para obtener una concentración de 10 ppm/ml, denominándose a esta concentración, concentración " D ".

Entre las 65-67 horas de incubación del cultivo, se agregaron 0.4 ml, de colchicina 0.004 M, a cada uno de los tubos, para detener el proceso mitótico; después de 3 hrs., de acción de la colchicina, las células fueron tratadas con agua bidestilada ( choque hipotónico ) y fijadas con una mezcla de metanol-ácido acético glacial ( 3:1 ). El extendido de los cromosomas, fue realizado, calentando la laminilla para evaporar la mezcla de metanol-ácido glacial, y se utilizó la técnica de tinción descrita por Jacobson ( Jacobson, et. al., 1952 ). Las laminillas fueron montadas en resina sintética Harleco \* . Mediante exámen al microscopio; se

---

\* Laboratorios DADE de México.

procedió a contar el número total de células en mitosis en una - -  
población de 10,000 células en cada laminilla, para obtener el coe  
ficiente mitótico.

#### IV. - RESULTADOS:

En la tabla No. 1, aparecen los resultados obtenidos del conteo de mitosis; en la que se aprecia que el coeficiente mitótico de 9.6, para las laminillas controles, está dentro de los valores esperados, descritos por Gey en 1951 ( Gey et. al., 1952 ). Con base en el coeficiente mitótico control, se efectuaron las comparaciones de los valores restantes.

En las laminillas tratadas con el solvente ( alcohol etílico al 96°, grado de pureza analítica a una concentración de 0.5%), el coeficiente mitótico de 11.53, está dentro de los límites descritos por Pomerat en 1952.

Las células tratadas con el Forato ( Thimet), a una concentración de 10 ppm/ml, presentan un coeficiente mitótico de 4.60 y representan un porcentaje de inhibición mitótica de 52.29%. Las células tratadas con el Forato (Thimet), a una concentración de 20 ppm/ml, presentan un coeficiente mitótico de 3.79 y representan un porcentaje de inhibición mitótica del 60.69%. Las células tratadas con el Forato ( Thimet ), a una concentración de 40 ppm/ml, presenta un coeficiente mitótico de 2.42 y representa un porcentaje de inhibición mitótico del 74.90%.

T A B L A N° 1

d o s i s M g r / m l	N° total de células contadas por lote	$\bar{X}$ aritmética del N° total de mitosis	coeficiente mitótico	porcentaje de inhibición mitótica
c o n t r o l	40000	964	9.60	0
s o l v e n t e	40000	1151	11.51	0
10 p . p . m .	40000	460	4.60	52.29
20 p . p . m .	40000	379	3.79	60.64
40 p . p . m .	40000	242	2.42	74.90

## V. - DISCUSION:

El efecto del solvente fue determinado, a fin de establecer en que medida, la acción de éste, influiría en los resultados del experimento; el solvente, aplicado a una concentración de 0.5%, estimuló la división celular del número total de células por cultivo, a diferencia de los resultados obtenidos por Litterst ( 1969), que encontró cierta disminución del crecimiento celular, al aplicar alcohol etílico de 96° a una concentración del 1%.

En la tabla N°. 2, se ha dispuesto del análisis estadístico a que fueron sometidos los resultados obtenidos en cada uno de los lotes, determinando para cada uno de ellos, los siguientes parámetros estadísticos; media aritmética, desviación de la media, el cuadrado de la desviación media, varianza, desviación estándar y el error estándar de la media; a su vez, algunos de esos valores, (media aritmética y varianza), se aplicaron en las pruebas de "Student" (prueba de "t" ), y en prueba de " Chi-cuadrada" (  $\chi^2$  ).

Al aplicar la prueba de " t ", nuestra hipótesis nula se rechazó al nivel de significación del 0.001; (tabla No.3), y al aplicar la prueba de Chi-cuadrada, se rechazó por segunda vez la hipótesis

T A B L A N ° 2

Análisis Estadístico del Coeficiente Mitótico para cada uno de los controles, solventes y las concentraciones de insecticidas aplicadas (ppm/ml).

Media aritmética			varianza	desviación estándar	error estándar de la media
$\bar{X} = \frac{\sum^4 X_i}{n}$	$(X_i - \bar{X})$	$(X_i - \bar{X})^2$	$S_c^2 = \frac{\sum^4 (X_i - \bar{X})^2}{n-1}$	$S_c = \sqrt{\frac{\sum^4 (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$	$S_{\bar{X}_c} = \frac{S_c}{\sqrt{n}}$
960	- 4	16	$S_c^2 = 5034$	$S_c = 70.95$	$S_{\bar{X}_c} = 0.7095$
906	- 58	3364			
1065	+101	10201			
925	- 39	1521			
3856	0	15102			
$\bar{X} = 964$	$\sum (X_i - \bar{X}) = 0$	$\sum^4 (X_i - \bar{X})^2 = 15102$	c o n t r o l		
$\bar{X} = \frac{\sum^4 X_i}{n}$	$(X_i - \bar{X})$	$(X_i - \bar{X})^2$	$S_s^2 = \frac{\sum^3 (X_i - \bar{X})^2}{n-1}$	$S_s = \sqrt{\frac{\sum^3 (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$	$S_{\bar{X}_s} = \frac{S_s}{\sqrt{n}}$
1190	+ 39	1521	$S_s^2 = 1153$	$S_s = 33.93$	$S_{\bar{X}_s} = 0.3393$
1135	- 16	256			
1128	- 23	624			
3453	0	2306			
$\bar{X} = 1151$	$\sum^3 (X_i - \bar{X}) = 0$	$\sum^3 (X_i - \bar{X})^2 = 2306$			
$\bar{X} = \frac{\sum^4 X_i}{n}$	$(X_i - \bar{X})$	$(X_i - \bar{X})^2$	$S_{10}^2 = \frac{\sum^4 (X_i - \bar{X})^2}{n-1}$	$S_{10} = \sqrt{\frac{\sum^4 (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$	$S_{\bar{X}_{10}} = \frac{S_{10}}{\sqrt{n}}$
476	+ 16	256	$S_{10}^2 = 754$	$S_{10} = 27.4$	$S_{\bar{X}_{10}} = 0.27$
432	- 28	784			
442	- 18	324			
490	+ 30	900			
840	0	2264			
$\bar{X} = 460$	$\sum^4 (X_i - \bar{X}) = 0$	$\sum^4 (X_i - \bar{X})^2 = 2264$	c o n c e n t r a c i ó n d e i n s e c t i c i d a 10 p p . m .		
$\bar{X} = \frac{\sum^4 X_i}{n}$	$(X_i - \bar{X})$	$(X_i - \bar{X})^2$	$S_{20}^2 = \frac{\sum^4 (X_i - \bar{X})^2}{n-1}$	$S_{20} = \sqrt{\frac{\sum^4 (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$	$S_{\bar{X}_{20}} = \frac{S_{20}}{\sqrt{n}}$
372	- 7	49	$S_{20}^2 = 66.6$	$S_{20} = 8.16$	$S_{\bar{X}_{20}} = 0.0816$
376	- 3	9			
390	+ 11	121			
378	- 1	1			
1516	0	200			
$\bar{X} = 379$	$\sum^4 (X_i - \bar{X}) = 0$	$\sum^4 (X_i - \bar{X})^2 = 200$	c o n c e n t r a c i ó n d e i n s e c t i c i d a 20 p p . m .		
$\bar{X} = \frac{\sum^4 X_i}{n}$	$(X_i - \bar{X})$	$(X_i - \bar{X})^2$	$S_{40}^2 = \frac{\sum^4 (X_i - \bar{X})^2}{n-1}$	$S_{40} = \sqrt{\frac{\sum^4 (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$	$S_{\bar{X}_{40}} = \frac{S_{40}}{\sqrt{n}}$
270	+ 28	784	$S_{40}^2 = 712$	$S_{40} = 26.7$	$S_{\bar{X}_{40}} = 0.267$
228	- 14	196			
212	- 30	900			
258	+ 16	256			
968	0	2136			
$\bar{X} = 242$	$\sum^4 (X_i - \bar{X}) = 0$	$\sum^4 (X_i - \bar{X})^2 = 2136$	c o n c e n t r a c i ó n d e i n s e c t i c i d a 40 p . p . m .		

T A B L A N ° 3

Prueba de "Student" (prueba de "t") validez y confiabilidad de los datos obtenidos

v a l o r e s

$\bar{X}$ del control	964	$S_c^2 =$	5034	} n-104
$\bar{X}_{10}$ de 10 p p m	460	$S_{10}^2 =$	756	
$\bar{X}_{20}$ de 20 p p m	379	$S_{20}^2 =$	60	
$\bar{X}_{40}$ de 40 p p m	242	$S_{40}^2 =$	712	

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2 + S_2^2}{n}}}$$

$$t = \frac{\bar{X}_c - \bar{X}_{10}}{\sqrt{\frac{S_c^2 + S_{10}^2}{n}}} = \frac{964 - 460}{\sqrt{\frac{5034 + 746}{10,000}}} = \frac{504}{\sqrt{0.5788}} = \frac{504}{0.76} = 663.15789$$

concentración de insecticida  
10 p. p. m.

$$t = \frac{\bar{X}_c - \bar{X}_{20}}{\sqrt{\frac{S_c^2 + S_{20}^2}{n}}} = \frac{964 - 379}{\sqrt{\frac{5034 + 60}{10,000}}} = \frac{585}{\sqrt{0.5094}} = \frac{585}{0.71} = 853.9436$$

concentración de insecticida  
20 p. p. m.

$$t = \frac{\bar{X}_c - \bar{X}_{40}}{\sqrt{\frac{S_c^2 + S_{40}^2}{n}}} = \frac{964 - 242}{\sqrt{\frac{5034 + 712}{10,000}}} = \frac{722}{\sqrt{0.5746}} = \frac{722}{0.76} = 950.000$$

concentración de insecticida  
40 p. p. m.

T A B L A N ° 4

PRUEBA DE "CHI" CUADRADA (  $\chi^2$  )

$$\chi^2 = \sum \frac{(N^\circ \text{ Observado} - N^\circ \text{ Esperado})^2}{N^\circ \text{ Esperado}}$$

$X_e$	Esperado	= 964
$X_{010}$		= 460
$X_{020}$		= 379
$X_{040}$		= 242

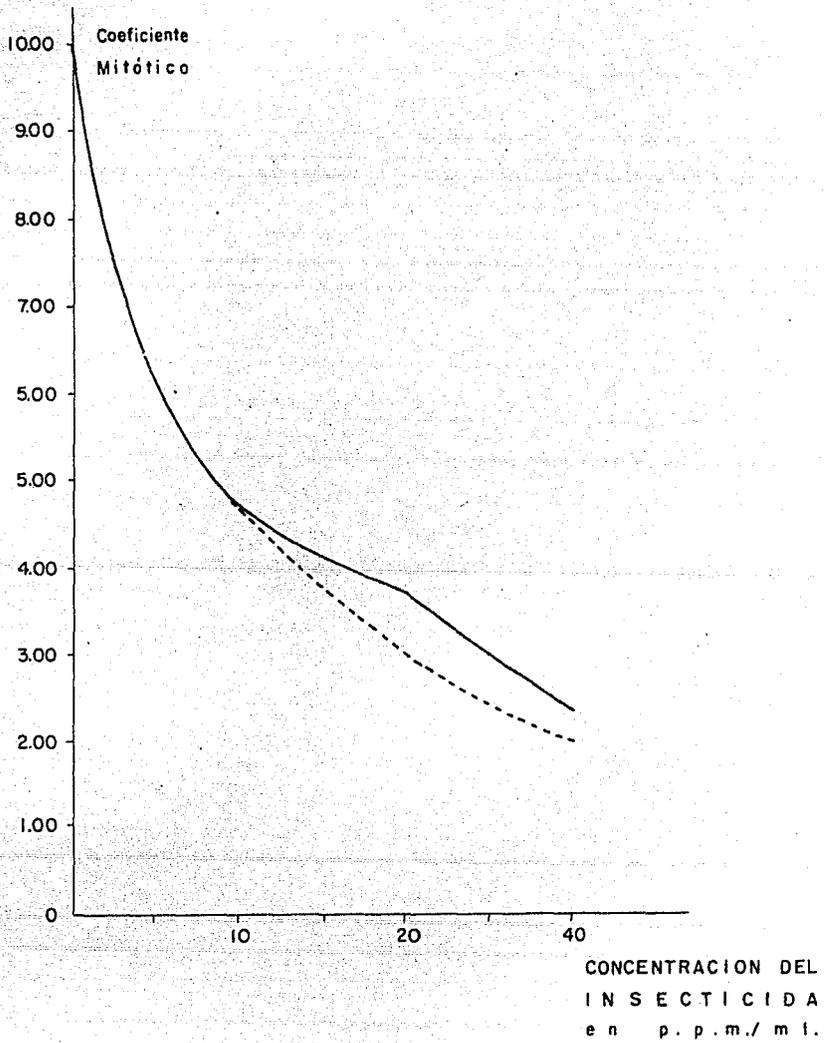
$O$  = Observado

$$\chi^2 = \sum \frac{(X_{010} - X_e)^2}{X_e} = \frac{(460 - 964)^2}{964} = \frac{254016}{964} = 263.50$$

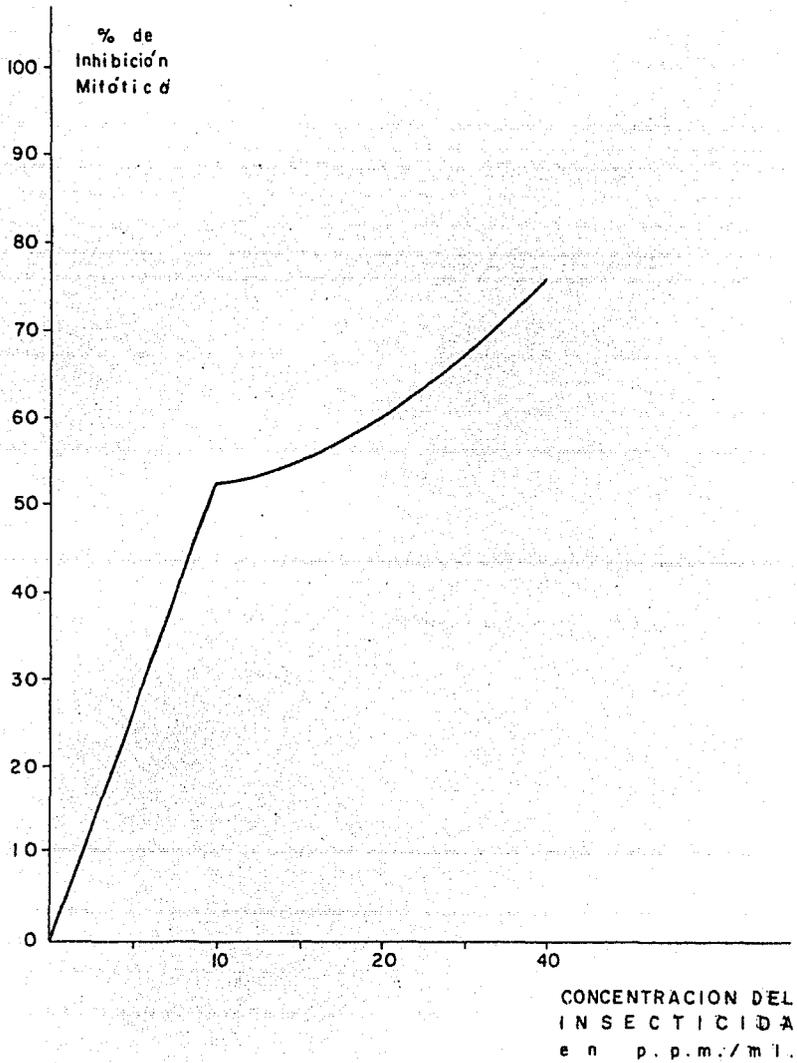
$$\chi^2 = \sum \frac{(X_{020} - X_e)^2}{X_e} = \frac{(479 - 964)^2}{964} = \frac{342225}{964} = 355.005$$

$$\chi^2 = \sum \frac{(X_{040} - X_e)^2}{X_e} = \frac{(242 - 964)^2}{964} = \frac{521284}{964} = 540.751$$

GRAFICA N° 1  
COEFICIENTE MITOTICO V.S.  
CONCENTRACION DE INSECTICIDA



GRAFICA N° 2  
PORCENTAJE DE INHIBICION MITOTICA V.S.  
CONCENTRACION DE INSECTICIDA.



nula al nivel de significación del 0.001 ( tabla N<sup>o</sup>. 4 ).

Al graficar los valores del coeficiente mitótico en función -- de la concentración correspondiente de insecticida, que aparece en la Tabla N<sup>o</sup>. 1, la gráfica correspondiente es una curva exponen-- cial de dosis-respuesta, en la que se establece claramente que el - coeficiente mitótico es inversamente proporcional al aumento de la - concentración del Forato.

Así mismo, al graficar los porcentajes de inhibición mitóti-- ca en función de la concentración del Forato, ( tabla N<sup>o</sup>. 1 ) , la - gráfica que se obtiene es una relación lineal dosis-respuesta, don-- de el porcentaje de inhibición mitótica es proporcional al aumento - de concentraciones del Forato ( Gráfica N<sup>o</sup>. 2 ).

La mayoría de los estudios acerca de los efectos de insecti-- cidas en células de cultivo de tejidos, se han realizado a nivel de - síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas, utilizando para ello -- precursores marcados con un isótopo radioactivo, de ahí que los -- resultados de algunos trabajos sean semejantes entre si; de tal ma-- nera, tenemos que Chung y colaboradores ( 1968 ), reportan --

para la síntesis de ácidos nucleicos de células HeLa, tratadas con diferentes concentraciones de DDT, que, a una concentración de 0.5 ppm/ml, se observa un ligero decremento en la síntesis de ARN; a 10 ppm/ml, la síntesis de ARN decrece marcadamente y, a 50 ppm/ml, se presenta un ligero aumento en la síntesis de ARN en relación con el control; en cambio, Litterst y colaboradores (1969), trabajando con la misma metodología que utilizó Chung, encontraron una disminución del 29% en relación con el control, en la síntesis de ARN, después de exponer a la acción del insecticida células HeLa, durante 4.5 Hrs.

Chung y colaboradores (1967), reporta que el efecto del DDT a diferentes concentraciones, influye en el desarrollo total de células por cultivo, ya que el número total de éstas, disminuye notablemente cuando se aplica el DDT a una concentración de 0.5 ppm/ml; al aumentar la concentración de 50 ppm/ml, el número total de células por cultivo, fue mayor que en el caso anterior, encontrando además de la disminución de número de células por cultivo, se observó un decremento en la incorporación de Leucina T<sub>3</sub> (Tritiada), indicando esto, una disminución en la síntesis de proteínas a la concentración de 50 ppm/ml; también se observó un aumen

to concomitante en la síntesis de proteínas por células, debido a un aumento del tamaño de las células cuando la concentración de DDT se incrementó.

En el presente estudio, se pudo apreciar que el decremento en el número total de células por cultivo es debido a la inhibición de la división mitótica por efecto del Forato; así mismo, las observaciones microscópicas mostraron aumento en las granulaciones citoplásmicas, elongación celular, así como anomalías cromosómicas tales como fragmentación múltiple y aspecto compacto, diferentes a las que reportan Hsu y colaboradores ( 1956 ) para células HeLa.

La toxicidad de los insecticidas clorinados y fosforados, para los mamíferos, es notoria por el bloqueo que produce en el sistema nervioso central y, en algunos casos, puede incidir en la inhibición del crecimiento y pérdida de peso.

La citotoxicidad de los pesticidas para células de mamíferos en cultivo de tejidos, es evidente por la disminución progresiva del crecimiento celular que causan, además de estar asociados a cambios citopáticos en la morfología celular, llegando en algunos - -

casos a causar la destrucción total de las células del cultivo.

El rechazo de la hipótesis nula, por parte de las pruebas - - " t " y de  $X^2$  (Chi-cuadrada), a que fueron sometidos los resultados, datos obtenidos, se debieran al azar, es de  $p = 0.001$ . Por otra parte, las gráficas confirman plenamente que los valores obtenidos para el coeficiente mitótico y el porcentaje de inhibición mitótica son el resultado de la acción del Forato.

Los mecanismos de acción de esos insecticidas, no han sido establecidos todavía, aunque algunos investigadores (Kinoshita et.al., 1966) (Cooney et. al., 1967) reportan que ciertos grupos activos - - que constituyen la base de muchos insecticidas, causan efectos inhibidores sobre diferentes sistemas enzimáticos. Parker ( 1960 ), ha sugerido que la gran liposolubilidad de los insecticidas organoclorados, como el DDT, pueden determinar su acumulación en la mitocondria y otros sitios de gran actividad metabólica. Para reforzarlo anterior Lawrence (Lawrence et. al., 1960) y Heart ( 1961 ), han demostrado que los insecticidas organofosforados así como algunos de sus metabolitos, inhiben por completo el sistema enzimático de células hepáticas de ternera, en cultivo de tejidos.

Por lo tanto, en el presente trabajo, la disminución del coeficiente mitótico al aumentar la concentración del Forato, sugiere que sea el resultado de la interferencia de esa substancia sobre -- los complejos enzimáticos que coordinan ese proceso biológico.

## VI. - RESUMEN:

En el presente trabajo, se estudió en células HeLa, mediante el tratamiento a base de diferentes concentraciones de Forato, de establecer el efecto que tal substancia causa durante la división mitótica, teniendo como base los trabajos de Chung ( Chung et, al., 1967-1968) y de Litterst ( Litterst et, al., 1969) que determinaron el efecto de diferentes insecticidas clorinados durante la síntesis de ARN y de proteínas de células HeLa.

Para tal fin se utilizó un cultivo de 72 hrs., de células HeLa que fueron sometidas a diferentes concentraciones de Forato ( 10, 20 y 40 ppm/ml ), por un período de tiempo de 24 hrs., después de ser incubadas durante 48 hrs., a 37°C, para favorecer su fijación en la laminilla; entre las 65-67 hrs., se agregó a cada tubo 0.5 ml., de colchicina 0.004 M, para detener el proceso mitótico. Posteriormente, se fijaron y tiñeron las células; una vez montadas las preparaciones, se procedió a comparar el número total de mitosis en una población de 10,000 células por laminilla.

Se estableció un coeficiente mitótico control de 9.64 y un porcentaje de inhibición mitótica de 0. A la concentración de

10 ppm/ml, se observó que el coeficiente mitótico disminuyó a - - 4.60 y el porcentaje de inhibición mitótica fue de 52%; a la concentración de 20 ppm/ml, el coeficiente mitótico fue de 3.79 y el porcentaje de inhibición mitótica aproximadamente fue del 61%; a la concentración de 40 ppm/ml, el coeficiente mitótico fue de 2.42 y el porcentaje de inhibición mitótica fue aproximadamente del 75%.

El análisis estadístico y las gráficas de dosis-respuesta, revelan claramente el efecto del Forato, el cual influye notablemente tanto sobre el coeficiente mitótico como en el porcentaje de inhibición mi tótica.

## VII. - BIBLIOGRAFIA:

- Chung, R. A. and Huang I-Lo.  
Studies of DNA, RNA and Proteins Synthesis  
in HeLa Cells, DDT and Dieldrin.  
J. Agr. Food Chem., Vol. 15: 497-5--, 1967
- Chung, R. A. and Lin, Y. D.  
Effect of DDT and Dieldrin on RNA and  
Protein Synthesis in Subcellular Fractions.  
of HeLa Cells.  
J. Agr. Food Chem., Vol. 16: 288-299, 1968
- Conney, A. H., Welch, R. M. and Kuntman, R.  
Pesticides Residues Analysis in Human Tissues  
by Combined Gas Chromatography.  
Clin. Pharmacol. Therap., Vol. 8: 2, 1967
- Gablks, J., and Friedman, L.  
Response of Cell Culture to Insecticides:  
1.- Acute Toxicity to Human Cells.  
2.- Chronic Toxicity and Resistance Induced,  
Proc. Soc. Expt. Biol. Med., Vol. 120: 163-  
168-174, 1965.
- Gablks, J., and Friedman L.  
Effect of several organophosphorus insecticides  
on Mouse Liver cell cultures.  
Proc. Soc. Expt. Biol. Med., Vol. 125: 1002-  
1005, 1967
- Gey, G. O., Coffman, W.D. Kubicek, M. T.  
Tissue Culture Studies of the Proliferative  
Capacity of Cervical Carcinoma and Normal --  
Epithelium.  
Cancer Research, Vol. 12: 264-267, 1952.

- Heat, D. F.  
"Organophosphorus Poisons", Pag. 116  
Pergamon Press, London, 1961.
- Hsu, T. C. and Moorhead, P. S.  
Chromosome Anomalies in Human Neoplasms  
Special Reference to the Mechanism of poliploidization and Aneuploidization in the HeLa - Strain.  
Ann. N. Y. Acad. Sci., Vol. 63: 1083-1095, 1956.
- Jacobson, W. and Webb, M.  
The Two Types of Nucleoproteins During Mitosis. Experimental cell Research.  
Vol. 3: 163-183, 1952.
- Johnson, W. J. and Weiss, S. A.  
Cytotoxicity of Dichloro diphenyl Acid ( DDA ) Upon Cultured KB and HeLa cells, and its Reversal by Mavelonic Acid.  
Proc. Soc. Expt. Biol. Med., Vol. 124: 1005-1008, 1967.
- Keller, E.  
The DDT Story.  
Chemistry, Vol. 43: 8-12, Feb. 1970.
- Kinoshita, F. K., Frawley, J. P., Dubbois, K. P.  
Inhibition of Rat Liver Enzymes by Organochlorine Pesticides ( In Vitro ).  
Toxicol. Appl. Pharmacol., Vol. 9: 505-507, 1966.

- Lawrence, S. H., Weinwe, H. E., Salkin, D.  
Species Comparison of Serum Proteins and  
Enzymes by Starch Gel Electrophoresis  
Proc. Soc. Expt. Biol. Med., Vol. 105: 572-  
588, 1960.
- Lewis, W. H. and Richards, A. G.  
Non Toxicity of DDT on cells in cultured.  
Science, Vol. 102: No. 2648: 331-332 Sept. 28,  
1945.
- Litterst, C. L., Lichtensteins, E. P. and Kajiwara, K.  
Effect of Insecticides on the Growth of HeLa  
Cells.  
J. Agr. Food Chem., Vol. 17: 1199-1203, 1969.
- Mier-Bode, H.  
Acumulative Poisons in Fat Tissues.  
Med. Expt., Vol. I: 146-153, 1960.
- Parker, V. H.  
1:1:1-Tricloro-2:2-di-(P-chlorophenil)etano (DDT)  
and Rat Adipose Tissues.  
Biochem. J., Vol. 77: 74-75, 1960.
- Pomerat, C. M.  
Opportunities for studying the responses of  
Human Allergic cells in tissues culture.  
Journal of Southern Medical Association,  
Vol. 45: 11-24, 1952.
- "Report of Committee on Persistent Pesticides", Division of  
Biology and Agriculture, National Research Coun  
cil, Washington, D. C. 1969.

Wilson, B. W. and Walker N. E.  
Toxicity of Malathion and Mercaptosuccinate to  
Growth of Chick Embryo Cells .  
Proc. Soc. Expt. Biol. Med., Vol. 121: 1260-  
1264, 1966.