



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



INDUCCION DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS E INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS POR ALGUNOS COMPUESTOS METALICOS EN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO

T E S I S

Que para obtener el Título de: BI O L O G O Presenta: ELIA ROLDAN REYES



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 está 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.

## C O N T E N I D O

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	1
MATERIAL Y METODOS.....	18
RESULTADOS.....	22
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFIA.....	50

## RESUMEN

En este trabajo se estudia la inducción de aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas por algunos compuestos metálicos en linfocitos humanos *in vitro*.

Se realizaron tratamientos con tres concentraciones diferentes de cada uno de los metales probados: cloruro de estaño, cloruro de manganeso y pentóxido de vanadio, 10, 20 y 30 ug/ml para los dos primeros y 2, 4 y 6 ug/ml para el último. Todas las evaluaciones realizadas fueron hechas a doble ciego.

Los resultados mostraron que el estaño indujo un aumento significativo de aberraciones totales a la concentración de 20 ug en relación al testigo (8.6% vs 3.0% con  $z = -2.36$  y  $P < 0.05$ ). La frecuencia de fragmentos sencillos se incrementó con las dos concentraciones más altas (20 y 30 ug con  $z = -1.94$  y  $-3.54$  con  $P < 0.05$ ). Con respecto a la producción de gaps el estaño disminuyó significativamente en relación con el testigo (1.33 vs 2.27).

Por su parte el manganeso incrementó la frecuencia de fragmentos sencillos en las concentraciones de 10 ug/ml (10.88%) y 30 ug/ml (1.95%) significativamente con respecto al testigo (2.28%) con  $P < 0.05$ , existiendo una correlación entre este daño y el incremento de mitosis con aberraciones en las mismas concentraciones (14% para 10 ug/ml y 11% para 30 ug/ml con  $P < 0.05$  para ambos casos).

El estaño fue el único metal que produjo un incremento significativo en el porcentaje de poliploidias a la concentración

de 30 ug/ml.

A diferencia de los otros dos compuestos el manganeso en la concentración mas alta elevò de manera significativa la frecuencia de ICH por metafase (7.83 vs 6.26 del testigo con  $P < 0.05$ ). Asi mismo la distribución de ICH por metafase mostrò que a 10 ug/ml el manganeso disminuyò el porcentaje de células con pocos intercambios (1 a 3 y de 4 a 6), mientras que aumentò el número de células con mas intercambios (7 a 10 y mas de 11) para la concentración de 20 ug/ml se encontró una disminución en las metafases con 4 a 6 intercambios y un incremento en las que presentaban mas de 11 intercambios.

Por su lado el tratamiento mas alto (30 ug/ml) mostrò el mismo patròn de efecto que el primer tratamiento, disminuyendo el número de células con intercambios entre 1 y 3 y de 4 a 6, y aumentando las frecuencias de células con 7 a 10 y más de 11.

INDUCCION DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS E INTERCAMBIO DE  
CROMATIDAS HERMANAS POR ALGUNOS COMPUESTOS METALICOS EN  
LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO

Introducción

En nuestra sociedad se usan actualmente cerca de 70,000 productos químicos diferentes, muchos de los cuales han sido elaborados por el hombre para su uso diario, provocándose por este motivo, que este se encuentre constantemente expuesto a un sinnúmero de compuestos (Sorsa et al., 1982; Tice, 1986).

La contaminación del agua, aire y suelo se debe en gran parte a la actividad de las industrias, ya que la mayoría de estas contribuyen fuertemente a deteriorar el ambiente aportando a este sus desechos líquidos, sólidos y gaseosos. Aunada a esta fuente importante de contaminación, las actividades derivadas de la vida doméstica, las emisiones automotrices, las aspersiones y fumigaciones agrícolas y otras fuentes menores de contaminación, también juegan un papel importante en la acumulación de sustancias nocivas en el ambiente (Ma et al., 1982).

Por tales motivos unas de las preocupaciones de hoy en día es la incidencia de estas sustancias sobre el hombre, y su posible efecto sobre la salud del mismo, ya que existen numerosas evidencias que han demostrado que la mayoría de estas sustancias son capaces de producir daño en el organismo, además de poder alterar de manera importante el material genético, lo cual puede conducir a la aparición de enfermedades tan graves

como el cáncer (Sasaki,1982).

El control de las exposiciones a estos agentes ha sido siempre un problema complejo, ya que las metodologías que se emplean para determinar experimentalmente el riesgo a la salud aun son inadecuadas ,especialmente en nuestro país, provocandose por tal motivo que la detección de los agentes genotóxicos en el ambiente haya tomado amplio interés durante los últimos años (Sorsa et al.,1982).

Como se mencionó anteriormente uno de los efectos más comunes de los agentes químicos sobre los organismos es la alteración del material genético, provocandose mutaciones las cuales pueden heredarse o producir alguna otra respuesta como el desarrollo de cáncer o la aparición de malformaciones (Tice,1986). A todos los agentes que producen algún cambio en el ácido desoxiribonucleico (ADN) se les conoce como agentes mutagénicos (Sorsa et al., 1982).

Diversos estudios han mostrado que una de las causas más importantes de la morbilidad y mortalidad en el hombre estan relacionadas con alteraciones en los cromosomas, las cuales son responsables en ocasiones de gran parte de las muertes fetales tempranas, de las muertes de los recién nacidos, de algunos casos de retraso mental, de algunas malformaciones del neonato y cardiopatías congénitas, la infertilidad y muchas otras enfermedades más (Hook,1982).

En la actualidad se sabe que la eficacia de un agente químico como mutageno depende de varios factores, como por ejemplo: Su estabilidad en condiciones naturales y dentro de los

organismos, su estabilidad en solución, el pH óptimo de acción, su transformación metabólica y su posible interacción con otros compuestos como en la formación de complejos no covalentes asociados directamente a los ácidos nucleicos, inducidos por algunos metales y agentes intercalantes como la naranja de acridina (Perry y Evans, 1975; Sorsa et al., 1982).

El hombre por sus costumbres y actividades se encuentra en contacto con una gran cantidad de compuestos químicos, agentes físicos y biológicos, de manera prolongada y constante, por lo que la interacción con ellos se ha podido catalogar como una exposición de tipo crónico (Perry y Evans, 1975).

Moutschen en 1985 propuso una clasificación general de las sustancias mutagénicas, dividiéndolas en tres grandes grupos, y correlacionando la cantidad de sustancia en el ambiente y el riesgo para el hombre:

GRUPO I: SUSTANCIAS MUTAGENICAS SINTETIZADAS POR EL HOMBRE Y USADAS DIRECTAMENTE POR EL MISMO EN CONDICIONES ESPECIFICAS

A) FARMACOS

- a) AGENTES ANTITUMORALES
- b) ANTIBIOTICOS
- c) NARCOTICOS
- d) ANTICONCEPTIVOS
- e) EXCIPIENTES
- f) ANESTESICOS

B: PESTICIDAS

- a) INSECTICIDAS

- b) HERBICIDAS
  - c) FUNGICIDAS
  - d) RATICIDAS
  - e) MOLUSQUICIDAS
  - f) NEMATICIDAS
- C) ADITIVOS
- a) ALIMENTARIOS
  - b) OTROS (cosméticos)

GRUPO II: SUSTANCIAS MUTAGENICAS USADAS EN LA INDUSTRIA O PRESENTES EN EL AMBIENTE COMO PRODUCTO DE LAS MISMAS.

- A) AGENTES ALQUILANTES INDUSTRIALES
- B) SOLVENTES ORGANICOS Y COMPUESTOS ORGANO-METALICOS
- C) CONTAMINANTES DEL AGUA
- D) CONTAMINANTES DEL AIRE
- E) METALES PESADOS

GRUPO III: SUSTANCIAS MUTAGENICAS NATURALES.

- A) ALCALOIDES
- B) PRODUCTOS DEL METABOLISMO MICROBIANO
- C) CONTAMINANTES BIOLÓGICOS

Dentro de los agentes químicos antes mencionados encontramos que los metales pesados poseen una importancia toxicológica muy grande, ya que la mayoría de los organismos muestran poca adaptabilidad a elevadas concentraciones de estos elementos. (Deknudt y Deminatti, 1978 ; Dekndut y Gerber, 1979; Duffus, 1983) .

Dentro de los metales podemos encontrar a los llamados metales pesados y a los ligeros, de los cuales algunos son elementos traza (Duffus, 1983; Lenhinger, 1982). Un elemento traza

ha sido definido como aquel que se encuentra presente en la corteza terrestre en una concentración de 100 ppm o menos, conociéndose dentro de la tabla periódica solo doce de estos compuestos (Oxígeno, Silicio, Aluminio, Hierro, Calcio, Sódio, Potasio, Magnesio, Titanio, Hidrógeno, Fósforo y Manganeso). Por otro lado los metales pesados han sido definidos como elementos cuya densidad es superior a 5g/cm<sup>3</sup>, mientras que los ligeros presentan una densidad inferior a 5g/cm<sup>3</sup>, siendo muchos de estos esenciales para la vida (Duffus, 1983).

La toxicidad y el peligro de los metales y derivados metálicos tanto a nivel de las enfermedades de tipo ocupacional y el riesgo que representan estos para la salud como contaminantes ambientales ha tenido un gran interés (Hahn, 1984). La agencia de protección ambiental de los Estados Unidos de Norte América ha definido a algunos metales como el berilio (un metal traza ligero) y al mercurio (un metal traza pesado) como peligrosos, mientras que el bario, cadmio, cobre, manganeso, níquel, zinc y estaño son considerados como potencialmente peligrosos (Deknudt y Deminatti, 1978; Deknudt y Gerber, 1979; Umeda y Nishimura, 1979; Andersen et al., 1983; Duffus, 1983), y cuyo manejo y uso debe de mantenerse bajo control. De los mencionados anteriormente, todos excepto el manganeso son metales traza, mientras que el bario es el único metal no pesado de este grupo (Duffus, 1983).

Sin embargo aunque muchos metales son peligrosos al encontrarse en altas concentraciones en el ambiente o en los organismos, estos también juegan un papel importante dentro de la vida normal de los mismos ya que algunos de ellos son

micronutrientes esenciales como el vanadio (V), el manganeso (Mn) y el estano (Sn) (Duffus, 1983).

El vanadio es uno de los metales que ha mostrado ser indispensable en la dieta de algunos animales como los pollos y las ratas, sirviendo este para su crecimiento, siendo además indispensable en la nutrición y desarrollo humano (Hopkins y Mohr, 1974; Siemon et al., 1982)

Aunque el vanadio no es un contaminante corriente en el ambiente se pueden encontrar grandes cantidades de este en el medio por efecto del uso de combustibles de tipo fósil como el petróleo y de elementos como el carbón, para la obtención de energía, dando como resultado su acumulación y produciéndose así un gran impacto en la salud humana (Sabbioni y Brazzelli, 1983).

Para el vanadio las concentraciones máximas permisibles en el agua potable deben de ser de 0.1 mg/l-1 (Holdway y Sprawe, 1979).

En el ambiente podemos encontrar al vanadio de diversas formas químicas, de las cuales la más importante por ser la más tóxica para los mamíferos es el vanadio pentavalente (Roshchin, 1967).

Estudios realizados por Phillips y Col. (1983) demuestran que altas concentraciones de este elemento son encontradas frecuentemente en el riñón, el cual parece ser su principal órgano blanco. Como micronutriente interviene en la regulación de la excreción del agua y sales, interactuando y modificando la bomba de sodio en el riñón observándose que en forma de vanadato incrementa la eliminación de solutos y agua

por la vía urinaria, inhibiendo además la posible acumulación en el riñón de iones orgánicos así como de sodio, potasio y ATP-asa renal (English et al., 1983).

Diversos estudios han mostrado que concentraciones micromolares de este elemento estimulan la incorporación de timidina en el ADN, así como la proorción de la división celular en fibroblastos humanos, mientras que las concentraciones superiores a 40µM del ión vanadato son tóxicas para la célula (Clereci y Brazelli, 1983). Otros trabajos realizados por los mismos autores han revelado que el vanadato incrementa la velocidad inicial de digestión del ADN del timo de ternera, revelado esto por la densidad óptica mostrada.

A nivel citogenético el ión vanadato al ser aplicado a células de Allium cepa mostró tener efectos a nivel de la división celular, produciendo la aparición de células binucleadas e inhibiendo la formación de la pared celular (Navas et al., 1986)

Por su lado el manganeso es un metal pesado ampliamente distribuido y muy empleado en la fabricación del acero (Duffus, 1983), por lo que es importante desde el punto de vista laboral. Se ha observado que la intoxicación con este metal produce un desorden neurológico semejante al síndrome de Parkinson (Rodier, 1975), notandose al principio cambios conductuales indicativos de disfunción cerebral. Sin embargo cuantificaciones de ARN realizadas en el cerebro y cerebelo de personas normales y afectadas con el mal de Parkinson, difieren significativamente en ambos casos, siendo mayor la concentración de esta molécula en neuronas y neuroglia de casos severos del mal de Parkinson

(Gomirato y Hyden, 1963).

Los estudios histoquímicos realizados por diversos investigadores han mostrado que algunos metales pesados son componentes naturales de los lisosomas (Burn y Brunk, 1970), siendo el manganeso el metal que con mayor frecuencia se acumula, sin embargo se ha visto además que este metal también tiene una gran afinidad por las mitocondrias (Cotzias, 1958). En trabajos realizados para evaluar la toxicidad de este metal, empleando enzimas lisosómicas en tejidos cerebrales, se lograron observar cambios en la concentración de ADNasa y ARNasa en el mismo órgano, lo cual indica que el manganeso probablemente realiza, o interviene en el proceso catabólico (Zonek y Olkowski, 1965).

Por su parte Hoffman y Morgan (1984) basándose en estudios realizados a nivel nutricional, pudieron establecer que una de las mayores fuentes de exposición a agentes mutagénicos de tipo químico proviene de los alimentos, pudiendo también ser una fuente potencial de carcinógenos, como por ejemplo el estaño, metal que se encuentra en los alimentos enlatados, lográndose cuantificar en cantidades variables dependiendo de factores como el pH del contenido, la temperatura de almacenamiento, el tiempo del mismo etc. (Schafer y Femfert, 1984).

El estaño es uno de los metales que se encuentra comúnmente en los alimentos. Aunque en animales como la rata se sabe que son necesarios de 1 a 2 mg/kg de peso de este elemento, no se ha podido comprobar que en el hombre el estaño sea un elemento traza esencial (Schwarz, 1971), considerándose por muchos años como un compuesto no tóxico, empleándose ampliamente

como droga terapéutica (Schafer y Femfert, 1984).

Los niveles máximos permitidos de estaño en alimentos están marcados en 250 mg/kg (Schafer y Femfert, 1984; Duffus, 1983), mientras que la dosis letal media de compuestos como el cloruro de estaño es de 21 mg/kg de peso para animales como el ratón y para el tetracloruro de estaño de 41 mg/kg de peso de el mismo animal (Schafer y Femfert, 1984).

Los mayores problemas de envenenamiento o intoxicación con metales a partir de comida enlatada vienen de la contaminación de esta por más de dos metales, como por ejemplo la inclusión de plomo en latas estañadas (Rouseff y Ting, 1980), o por un mal proceso de estañado de los envases, provocandose una contaminación de los alimentos por estos elementos (Warburton et al., 1962; Benoy et al., 1971; Theuer et al., 1971; Barkér y Runte, 1972; Omori et al., 1973).

Ante la gran incidencia de mutágenos en el medio, la mayoría de los investigadores se han planteado dos preguntas: "En que parte del ambiente se localizan las sustancias mutagénicas?" y "cómo pueden ser detectados estos agentes y evaluado el riesgo de daño para el hombre?" (Moutschen, 1985).

Para tratar de responder a estas preguntas hace algunos años se empezó a desarrollar un área la cual conjunta a la Toxicología y a la Genética, a la que se llamo Genética Toxicológica, la cual implementó una serie de sistemas biológicos de prueba para poder evaluar el poder mutagénico y carcinogénico de los agentes contaminantes químicos, físicos y biológicos, para de esta manera tener un parámetro de evaluación del riesgo

para el hombre (Hoffman, 1981; Tice, 1986).

Dentro de la Genética Toxicológica la variedad de sistemas empleados para evaluar el daño producido al ADN por los diferentes agentes es muy amplia, abarcando desde los sistemas de microorganismos hasta sistemas complejos como serían animales de laboratorio, pasando por plantas y células en cultivo, aunque en muchos de los casos no siempre sea fácil evaluar el riesgo real para el hombre con base en los datos obtenidos a estos niveles.

Los diferentes sistemas biológicos de prueba se pueden separar en 4 grupos :

grupo I: Son todas aquellas pruebas que detectan el posible daño al ADN producido por químicos a nivel molecular, pudiendo dar información suficiente para clasificar a las sustancias como mutágeno potencial.

Grupo II: Incluye a las pruebas que están dirigidas a detectar mutaciones a nivel celular, ya sea de una manera directa o indirecta, mediante el empleo de microorganismos, plantas superiores, células en cultivo o mamíferos completos, lo que permite tener un mayor poder de resolución.

Grupo III: Son todos aquellos sistemas que proveen de observaciones de los efectos directos de los agentes mutagénicos sobre los cromosomas.

Grupo IV: Recopila a una serie de ensayos a largo plazo, cuya información fundamental es la del efecto de los agentes sobre la descendencia de los organismos tratados.

**GRUPO I: PRUEBAS DISEÑADAS PARA DETECTAR LESIONES A NIVEL MOLECULAR**

- a) -En los diferentes tipos de ADN (con adición de la reacción microscópica o no)
  - Infidelidad en la síntesis de ADN
- b) -En las proteínas (p.e. la hemoglobina)

GRUPO II: PRUEBAS DISEÑADAS PARA DETECTAR MUTACIONES A NIVEL CELULAR

A) DIRECTAS

- a) -Organismos inferiores
  - fagos
  - bacterias (E. coli, Salmonella typhimurium)
  - levaduras (Saccharomyces cerevisiae)
  - hongos (Neurospora crassa, Aspergillus)
  - protozoarios (Paramecium aurelia)
- b) -Organismos superiores
  - plantas (Tradescantia, Vicia faba)
  - mamíferos (ratón; conejo, hamster, hombre)

B) INDIRECTAS

- a) -Ensayos mediados por el hospedero
  - conejo: + Salmonella + Neurospora.
  - ratón: + Salmonella + Neurospora.
  - rata: + Salmonella + Neurospora.
  - hamster: + Salmonella.

GRUPO III; PRUEBAS DISEÑADAS PARA ESTIMAR LA INDUCCION DE DAÑO CROMOSOMICO (EFECTO CLASTOGENICO).

A: *in vitro*.

- a) Plantas
  - Tradescantia (granos de polen)

Trillium (granos de polen)

zanahoria, Nicotiana (Cultivo de tejidos)

b) Animales

Conejos; hamster; ratón; rata; y hombre.

B: In vivo

a) Plantas

Cebada

cebolla

Tradescantia

Trillium

b) Animales

Raton (\*)

rata (\*)

Hamster (\*)

\* (espermatogenesis y medula osea)

GRUPO IV: PRUEBAS DE MUTAGENICIDAD A NIVEL DE ORGANISMOS  
COMPLETOS

A: Plantas

Cebada

maíz

chicharo

B: Animales

Drosophila

Habrobracon

Ratón.

(Fishbein et al., 1970; Hollander, 1971a; b; 1973; 1976; Hollander  
y de Serres, 1978; Moutschen, 1985).

Dentro de los sistemas biológicos de prueba antes mencionados, el cultivo de células de mamífero se ha considerado como uno de los sistemas ideales para poder evaluar los efectos citogenéticos de una gran cantidad de agentes mutagénicos, siendo el cultivo de linfocitos uno de los más ampliamente usados para este fin (Maher y McCormick 1982; Natarajan y Obe, 1982).

Los linfocitos humanos representan una población de células las cuales se encuentran exclusivamente en el estado de G<sub>0</sub> presintético del ciclo celular (Fig.1), en el cual su actividad bioquímica y fisiológica está muy deprimida, tanto que sólo el 2 por ciento de los linfocitos periféricos muestran actividad replicativa del ADN (Natarajan y Obe, 1982), y que probablemente provienen de un grupo de células linfoides del tipo de los linfocitos T estimulados o de algún tipo de células plasmáticas inmaduras, las cuales representan linfocitos B estimulados también (Ling y Kay, 1975) (Fig.2).

Nowell en 1960 mostró por primera vez que podía existir la posibilidad de estimulación de los leucocitos humanos, logrando su división mitótica in vitro por la adición de una sustancia llamada fitohemaglutinina (PHA), siendo en 1962 cuando Carstairs determinó que las células blanco de la PHA eran los linfocitos, estableciendo que estos no son células en un estado total de diferenciación y que conservan su pluripotencialidad, (Natarajan y Obe, 1982).

Diversos estudios clínicos muestran que en la sangre de las personas normales las concentraciones de linfocitos varían

grandemente dependiendo de la edad, encontrándose por ejemplo que en un adulto de 21 años el número de estas células es de 2500/mm<sup>3</sup>, mientras que en los recién nacidos la cantidad es de más del doble (5500/mm<sup>3</sup>) (Natarajan y Obe, 1982).

En el hombre el 80% de los linfocitos periféricos son pequeños, mientras que aproximadamente un 5% son medianos y un 15% de estos pertenecen a las células grandes llamadas de tipo linfóide (Natarajan y Obe, 1982).

En los adultos el 70% de los linfocitos son de tipo T, mientras que el 30% corresponden al tipo de los linfocitos B, pudiendo variar estas proporciones con la edad (Smith *et al.*, 1974; Steel *et al.*, 1975).

Desde el punto de vista de la mutagénesis el linfocito ofrece una serie de ventajas que lo hacen muy interesante, como el hecho de presentar larga vida, lo cual permite que este acumule lesiones en su ADN, además de encontrarse en un estado definido del ciclo celular (G<sub>0</sub>), lo que permite que mediante la adición de agentes mitogénicos como la fitohemaglutinina (PHA) puedan ser inducidos a la división en condiciones controlables, y por último, estas células han demostrado poseer una baja actividad de reparación, por lo que durante mucho tiempo ha sido uno de los sistemas ideales para el estudio del efecto de la exposición crónica a bajas concentraciones de mutágenos, pudiéndose realizar una gran variedad de análisis como 1) aberraciones cromosómicas en metafase (Fig. 3), 2) micronúcleos en interfase (Foto.1) 3) Intercambio de cromátidas hermanas en metafase (Fig.4) 4) mutaciones puntuales en interfase, 5)

Asociaciones de satélites en metafase (Fig.5), 6) infidelidad en la síntesis del ADN 7) Cinética de la división celular (Evans y O'Riordan, 1975; Natarajan y Obe, 1982; Albertini et al.,1982; Moutschen,1985)

Las lesiones inducidas en el ADN de los linfocitos por agentes mutagénicos, pueden estar sujetas en algunos de los casos a la reparación, a pesar de la baja actividad, (Ferry y Thomson, 1984), conduciendo a que las lesiones no reparadas o mal reparadas formen mutaciones puntuales y aberraciones cromosómicas importantes. Los efectos primarios de los mutágenos en el ADN generalmente pueden ser evaluados por diferentes vías, como por ejemplo las bioquímicas, o con el empleo de algunos métodos citológicos y microfluorométricos (Natarajan y Obe, 1982).

Mediante el empleo del cultivo de linfocitos se ha podido demostrar que agentes como la Mitomicina-C (Shiraishi et al., 1979), la estreptonigriña (Andersson,1981), la bleomicina (Vijayalaxmi y Evans,1982), el DDT (Lessa et al., 1976), el malathion (Moutschen 1985), el benzopireno (Doloy et al.,1978), los rayos-X (Abramovsky et al., 1978) y los virus (Gardner, 1981) son capaces de producir daño en el ADN.

Hasta hace algunos años la mayoría de las técnicas empleadas en citogenética para detectar el efecto mutagénico de agentes químicos, físicos y biológicos en los cromosomas empleaban las tinciones convencionales (Giemsa,etc), por lo que se tuvo la necesidad de buscar y diseñar metodologías más sensibles que pudieran detectar algún otro tipo de daño no observable con estas. Por tal motivo a partir de 1974 Latt, y

Perry y Wolff implementaron una técnica de tinción diferencial de cromátidas hermanas que ha aportado valiosos datos acerca del efecto de las sustancias químicas en el ADN, desarrollándose ampliamente hasta la fecha, ya que ha demostrado ser altamente sensible, pudiéndose detectar lesiones en el ADN aun a concentraciones de 10 a 100 veces menores que las usadas comúnmente para producir aberraciones cromosómicas (Wolff, 1977), pudiéndose usar en una gran cantidad de sistemas biológicos de prueba incluyendo al humano (Morimoto y Wolff, 1980; Waksuik et al., 1981; Schneider et al., 1982).

La técnica de intercambio de cromátidas hermanas se basa en la incorporación de 5-bromodesoxiuridina (BrdU) al ADN durante dos ciclos de replicación continuos (Fig.5) y su posterior revelado mediante el uso de un colorante fluorocromado Hoechst-33258 en combinación con luz ultravioleta y colorantes como el giemsa, de tal modo que las células cuyo ADN ha incorporado BrdU por un ciclo de duplicación (monofilarmente sustituidas) teñiran de una manera homogénea, mientras que las células que ya han pasado por dos ciclos de replicación y cuyos cromosomas muestran una cromátida monofilarmente sustituida y la otra bifilarmente sustituida, teñiran de una manera diferencial, oscura la primera y palida la segunda (Fig.5b) (Perry y Wolff 1974) pudiéndose evidenciar de esta manera los intercambios entre las cromátidas hermanas sin ningun problema. Los intercambios involucran la ruptura de cadenas dobles de ADN en ambos brazos del cromosoma y su posterior reubicación, sin llegar a alterarse la morfología del cromosoma (Perry y Evans, 1975).

Sabiendo que la mayoría de los agentes químicos ambientales pueden llegar a presentar una actividad mutagénica, lo cual puede poner en peligro la estabilidad hereditaria de las futuras generaciones, y dada la necesidad de desarrollar sistemas de monitoreo que permitan evaluar el posible daño producido por bajas concentraciones de químicos o la actividad de algunos compuestos cuya acción es considerada débil con respecto a otros mutágenos, en este trabajo se pretende evaluar mediante el uso del cultivo de linfocitos humanos el posible daño cromosómico producido por 3 metales conocidos por su baja actividad mutagénica o nulo efecto, con el objeto de contribuir al establecimiento de metodologías que permitan detectar el posible efecto producido al ADN por estos compuestos conocidos como mutágenos débiles, así como de realizar un análisis amplio de los parámetros de evaluación empleados comúnmente en el cultivo de linfocitos y sus aplicaciones.

## MATERIAL Y METODOS

### A) Cultivos:

Linfocitos de sangre periférica de donadores sanos fueron puestos a cultivar en 4.75 ml de medio McCoye 5A (microlab) suplementado con 0.25 ml de fitohemaglutinina M (microlab), durante 72 horas a 37°C en la obscuridad.

A las 24 horas de iniciados los cultivos y una vez que las células están aclimatadas y empezaron a dividirse se le adicionó a cada frasco 0.1 ml de una solución de 5-brdU (sigma) (200 ug/ml). A las 70 horas a cada cultivo se le adicionó 0.1 ml de una solución de colchicina (Merck) (100 ug/ml), hasta completar las 72 horas. Una vez transcurrido este tiempo las células se centrifugaron a 1000 RPM durante 5 minutos y el paquete celular se sometió a un choque hipotónico con una solución de cloruro de potasio (KCl 0.075 M) por 20 minutos a 37°C. Posteriormente se centrifugaron nuevamente las células y se fijaron en una solución de Metanol-ácido acético (3:1) realizándose tres cambios de esta dejando reposar en cada una de ellas 20, 15 y 10 minutos respectivamente. Por último las preparaciones se realizaron por goteo y se dejaron secar al aire.

### B) Tratamientos:

A las 24 horas de iniciados los cultivos se realizaron los tratamientos con los compuestos metálicos elegidos para este trabajo; Cloruro de estaño ( $\text{SnCl}_2$ ), Cloruro de manganeso  $\text{MnCl}_2$  y el pentóxido de vanadio ( $\text{V}_2\text{O}_5$ ), con las concentraciones de 10, 20 y 30 ug/ml de cultivo para los dos primeros compuestos y de 2, 4

y 6 ug/ml para el último, siendo en todos los casos seleccionadas las concentraciones en base a experimentos preliminares. En todos los casos las sustancias fueron disueltas en agua destilada y esterilizados por filtración empleando membranas Millipore de 0.45 u de poro, siendo adicionada de manera simultánea agua destilada a los cultivos testigo. En todos los casos los cultivos se realizaron por duplicado y con una repetición.

#### C) Tinción diferencial de cromátidas hermanas (TDCH).

Una vez obtenidas las preparaciones, estas se tiñeron con una solución de Hoechst-33258 (0.1 ug/ml) durante 20 minutos en la obscuridad. Posteriormente las laminillas se lavaron en agua corriente y se irradiaron con luz ultravioleta por 2 horas sumergidas en una solución de KCl 0.075 N. Transcurrido este tiempo las preparaciones se incubaron por 60 minutos en una solución citrato-salina (0.3 M de cloruro de sodio + 0.03 M de citrato de sodio) 2XSSC, a 60°C. Finalmente las preparaciones se lavaron y se tiñeron con una solución de Giemsa (Sigma) (1:30) en agua corriente durante 20 minutos, después de los cuales se lavaron al chorro de agua y se dejaron secar al aire.

#### D) Evaluaciones:

Todas las evaluaciones se realizaron a doble ciego en un microscopio de contraste de fases Zeiss.

##### i) Alteraciones cromosómicas

Se analizaron un mínimo de 45 metafases en primera división por concentración para cuantificar el número y tipo de aberraciones cromosómicas, tomando como parámetro la

clasificación propuesta por Evans y O'Riordan en 1975 (Cuadro 1). considerandose dentro de estas a las poliploidias (Foto 2), las endoreduplicaciones (Foto 3) y las pulverizaciones .

ii) Analisis de la cinética del ciclo celular e índice mitótico.

Para determinar el índice mitótico se contabilizaron 1000 células al azar, determinando mediante la siguiente fórmula la proporción de células en división:

$$\text{I.M.} = \frac{\text{No de células en metafase}}{\text{No de células totales}} \times 100$$

mientras que para la determinación de la cinética del ciclo celular se observaron 100 células en metafase por concentración y al azar cuantificando las células en primera división (Foto 4), segunda división (foto 5) y terceras o sucesivas divisiones (Foto 6).

Por otro lado y aplicando la siguiente fórmula propuesta por Tice ( 1986 ) se obtuvo la tasa de división linfocítica:

$$\text{TDL} = 1 \times (\text{I}) + 2 \times (\text{II}) + 3 \times (\text{III})$$

en donde I, II y III representan las proporciones de células en primera, segunda y tercera o subsecuentes divisiones respectivamente.

iii) Intercambio de cromátidas hermanas (ICH).

El análisis de la frecuencia de ICH se realizó observando un mínimo de 50 metafases bien extendidas en segundo ciclo de duplicación, cuantificándose el número y tipo de ICH, considerándose a los terminales como un intercambio, y a los intersticiales como dos intercambios (Fig. 5c).

#### iv) Asociaciones de satélites (AS)

El análisis del número y tipo de AS (Fig. 6) se realizó en un mínimo de 60 células en metafase de primer ciclo siguiendo para esto los criterios de Zang y Back (1968).

#### v) Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó aplicando la prueba de diferencia de proporciones para las aberraciones cromosómicas, asociaciones de satélites, índice mitótico y para la cinética de división celular, y para la distribución de ICH por metafase en los distintos experimentos se aplicó la  $\chi^2$  para proporciones, mientras que para la frecuencia de ICH por metafase se aplicó la prueba de "t" de Student.

## RESULTADOS

Cloruro de estaño ( $\text{SnCl}_2$ ).

### 1) Alteraciones cromosómicas:

#### i) Aberraciones;

En la tabla I se muestran los resultados del análisis de las aberraciones cromosómicas inducidas en cultivos de linfocitos por el cloruro de estaño, observándose que al ser tratados los cultivos con 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  se obtuvo un incremento significativo de aberraciones totales con relación al testigo (8.6 % vs. 3.0 % con  $Z = -2.36$  y  $P < 0.05$ ). Al establecer los diferentes tipos de aberraciones se encontró que la frecuencia de fragmentos sencillos se incrementó conforme a la concentración, mostrando efectos significativos en las dos concentraciones más altas (20 y 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $Z = -1.94$  y  $-3.54$  con  $P < 0.05$ ), con respecto a la producción de gaps el cloruro de estaño (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) produjo una disminución significativa con respecto al testigo (1.33 vs 2.77 del testigo), lo cual resultado estadísticamente significativo mientras que en los demás tipos de alteraciones no hubo diferencias estadísticas.

### 2) Asociaciones de satélites (AS)

#### i) Frecuencia de AS por metafase.

En los cultivos tratados con 10  $\mu\text{g}$  de  $\text{SnCl}_2$  hubo un incremento significativo en el porcentaje de asociaciones cromosómicas totales (85.50 % vs 57.00 % con  $P < 0.001$ ), modificándose por este motivo las frecuencias de asociación

esperadas para los cromosomas "D" y "G" las cuales son de 60 % vs 40 % (Hansson,1970), con  $P < 0.05$  con respecto al testigo (Tabla II) .

Por su lado al establecer la distribución del número de asociaciones por célula (Tabla III) no se encontró ningún efecto, mientras que al analizar la distribución del número de cromosomas que intervenían en cada asociación tampoco se observó cambios significativos (tabla IV)

### 3) Cinética de división celular

#### i) Índice mitótico (IM).

Para este punto se realizaron 2 evaluaciones tomando dentro de las preparaciones dos puntos de referencia diferentes al inicio de cada conteo, (fig.8), encontrando que en ambas revisiones los resultados obtenidos fueron diferentes (Gráfica 1). El primer índice mitótico determinado mostró que existió una elevación del número de células en división en las dos primeras concentraciones (3.3 y 5.3 Vs 3 del testigo) siendo solo significativo el incremento de este parametro en la concentración de 20ug/ml ( $Z = 2.57$  con  $P < 0.01$ ), mientras que en la última concentración 30ug/ml existió una disminución no significativa en el índice mitótico (1.9 vs 3 del testigo). El segundo Índice calculado mostró ser mas constante , no encontrando diferencias entre los valores de los cultivos tratados y el testigo.

Para poder establecer si existían diferencias entre las dos determinaciones realizadas, además de la prueba de "z" usada para cada una de estas, se aplicó un análisis de varianza ,

encontrando que las dos determinaciones son diferentes ( $P < 0.05$ ) lo cual muestra la poca consistencia de este parametro.

ii) Frecuencia de división.

En la gráfica 2 se muestran los resultados de los porcentajes de células en primera, segunda y tercera o sucesivas divisiones en relación a la concentración, encontrando que en el tratamiento con 20  $\mu\text{g/ml}$  hay una disminución en el número de metafases en primer ciclo (28.8 %) con respecto al testigo (42.5%) , mientras que en la misma concentración existe un incremento de las metafases en tercer ciclo (44.8 % vs 29.8 % del Testigo) siendo en ambos casos significativos con  $P < 0.05$  y  $P < 0.01$  respectivamente.

4) Intercambio de cromátidas hermanas (ICH).

i) Frecuencia de ICH por metafase.

Los resultados de las frecuencias de ICH por metafase en los cultivos tratados con  $\text{SnCl}_2$  mostrados en la gráfica 3 hacen evidente que este metal no produce incrementos significativos , en 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$  se ve un aumento, mientras que en 30 una reducción sin embargo el análisis estadístico indica que no son significativos con respecto al testigo al ser analizados con prueba de "t" de Student .

ii) Distribución de ICH por metafase.

Al realizar el análisis de la distribución del número de ICH por metafase tampoco se encontraron efectos producidos por el estaño (Gráfica 4).

Fentóxido de vanadio ( $\text{V}_2\text{O}_5$ ).

1) Alteraciones cromosómicas.

i) Aberraciones cromosómicas

En la tabla V se muestran los datos obtenidos con este metal y se puede observar que estadísticamente no produce daño cromosómico al ser aplicado a los cultivos de linfocitos humanos en las concentraciones de 2, 4 y 6 ug/ml.

2) Asociaciones de satélites (AS)

i) Frecuencia de AS por metafase

Los resultados de las asociaciones de satélites en los cromosomas de linfocitos tratados con el V205 muestran que este metal a la concentración de 2 ug/ml aumenta significativamente la media de asociaciones totales ( $P < 0.01$ ) con respecto al testigo, además que a 6 ug/ml el número de células con asociaciones se ve incrementado (42.00 % vs 32.50 % del testigo) siendo significativo con  $P < 0.05$ . Por otro lado en la concentración de 4 ug/ml también se observó que el total de asociaciones aumento, pero en este caso la diferencia no es estadísticamente significativa (tabla VI).

Por su parte este metal a la concentración de 4 y 6 ug/ml produjo un aumento significativo en la proporción de células con asociaciones (48.00% para 4 ug/ml,  $Z = -1.71$  y  $P < 0.05$ , y 48.78% para 6 ug/ml,  $Z = -1.72$  y  $P < 0.05$ ).

La distribución del número de asociaciones por células se muestra en la tabla VII. En todos los casos (2, 4 y 6 ug/ml) se encontró una disminución significativa del porcentaje de células con una sola asociación, incrementándose significativamente en las mismas concentraciones el número de metafases que presentaban

2 asociaciones al ser comparados los datos con los mostrados por el testigo.

Al analizar las distribuciones del número de cromosomas que intervenían en la formación de las asociaciones se encontró que este metal no aumenta el número de cromosomas totales asociados por complejo (Tabla VIII).

### 3) Cinética de división celular

#### i) Índice mitótico

Al igual que el estaño en el caso del vanadio se vio afectado el índice mitótico de los cultivos tratados con respecto al testigo, tanto en el primer conteo como en el segundo (Gráfica 5). Al analizar el primer índice mitótico se encontró que en las tres concentraciones los datos obtenidos fueron estadísticamente significativos con respecto al testigo, mientras que en la segunda evaluación solo la concentración más alta (6 $\mu$ g/ml) mostró una elevación del índice mitótico.

#### ii) Frecuencia de división.

En la gráfica 6 se puede observar los resultados obtenidos del conteo de células en los diferentes ciclos de división encontrándose en todos los casos un comportamiento similar, teniendo un incremento de células en primera división, una disminución de las células en segundo ciclo y un nuevo aumento de las células de tercera, siendo solo en la concentración de 6 $\mu$ g/ml las terceras divisiones significativamente mayores a las mostradas por el testigo ( $Z=2.71$  y  $P<0.05$ )

#### 4) Intercambio de cromátidas hermanas.

##### i) Frecuencia de ICH por metafase.

Dentro de este parametro el vanadio tampoco tuvo efectos estadísticamente significativos, siendo en todos los tratamientos los resultados similares al testigo (Gráfica 7).

##### ii) Distribución de ICH por metafase.

Con respecto al número de intercambios de cromátidas hermanas por metafase y la distribución del número de células con estos eventos se encontró que el vanadio en la concentración de 4 ug/ml elevó la frecuencia de células que no presentaban intercambios así como de las que mostraban una frecuencia de 1 a 3 intercambios por célula, con  $P < 0.1$  para ambos casos, mientras que para la concentración de 6 ug/ml se elevó la frecuencia de células sin intercambios y las de 1 a 3 con  $P < 0.01$  y con  $P < 0.05$  respectivamente.

#### Cloruro de manganeso ( $MnCl_2$ ).

##### 1) Alteraciones cromosómicas.

##### i) aberraciones cromosómicas.

En la tabla IX se muestran los resultados obtenidos al tratar linfocitos humanos en cultivo con diferentes concentraciones de  $MnCl_2$ , observando que este metal incrementó la frecuencia de fragmentos sencillos en las concentraciones de 10 ug/ml (10.88 %) y 30 ug/ml (9.55 %) significativamente con respecto al testigo (2.28 %) con  $P < 0.05$  existiendo una correlación entre este daño y el incremento de mitosis con aberraciones en las mismas concentraciones ( para 10 ug/ml 14 %

y 30 ug/ml 11 % con  $P < 0.05$  para ambos casos).

Dentro de las aberraciones cromosómicas evaluadas se consideraron a las poliploidias y a las endoreduplicaciones (fotos 2 y 3) como un solo evento (aumento en el número "n" de cromosomas), siendo este metal el único que produjo un incremento significativo de este tipo de daño a la concentración mas alta (30 ug/ml).

## 2) Asociaciones de satelites.

### i) Frecuencia de AS por metafase

En la tabla X se puede observar que el manganeso no mostro efecto en el incremento de células con asociaciones , encontrandose que solo la concentración de 10 ug/ml elevó la frecuencia de asociaciones totales con respecto al testigo (101.5 vs 81.5 con  $P < 0.05$ ). Además se notó que en tanto en los cultivos testigo, asi como en los tratados con 10 y 20 ug/ml las frecuencias esperadas de asociaciones (60 % para "D" y 40 % para "G") se vieron modificadas estadísticamente ( $P < 0.05$  al aplicar  $\chi^2$  para proporciones (Marques, 1987).

El manganeso solo en la concentración de 10 ug/ml incrementó la proporción de células con tres asociaciones con respecto al testigo no mostrando ningún efecto en las otras concentraciones (Tabla XI). Por otro lado en la tabla XII se ilustran los resultados de la distribución de cromosomas por AS encontrandose que este compuesto a 20 y 30 ug/ml elevó la frecuencia de asociaciones que presentaban 3 y 4 cromosomas respectivamente.

## 3) Cinética de división celular

### i) Índice mitótico.

Al igual que en los casos anteriores el manganeso si afecto el índice mitótico de los linfocitos tratados con este metal. El primer índice mostró un comportamiento similar al del vanadio, observando una disminución del índice en 10 y 20 ug/ml y un aumento en la concentración de 30ug/ml, siendo en todos los casos estadísticamente significativas las diferencias con respecto al testigo. De igual manera el segundo índice mitótico mostro diferencias con respecto al primero, además de observarse una disminución de este en todas las concentraciones (gráfica 9).

ii) Frecuencia de division.

En este caso el manganeso incrementó significativamente la frecuencia de células en primera división en las concentraciones de 10 y 30 ug/ml con  $P < 0.05$  en ambos casos , mientras que las mismas concentraciones tuvieron un efecto contrario en las células en tercer ciclo en la primera concentración y en la mas alta con  $P < 0.05$  en ambos casos (Gráfica 10).

4) Intercambio de cromátidas hermanas

i) Frecuencia de ICH por metafase.

A diferencia de los otros dos compuestos el manganeso en la concentración mas alta (30 ug/ml) elevó de una manera significativa la frecuencia de ICH por metafase (Grafica 11), siendo el unico caso para este tipo de parametro (7.83 vs 4.26 del testigo con  $P < 0.05$  al aplicar "t" de Student).

ii) Distribución de ICH por metafase.

Para este compuesto también fue analizada la

distribución de intercambios por metafase, encontrándose que a 10 ug/ml el manganeso disminuyó el porcentaje de células con pocos intercambios ( 1 a 3 y de 4 a 6) , mientras que aumentó el número de células con mas intercambios (7 a 10 y mas de 11), mientras que para la concentración de 20 ug/ml se encontró una disminución en las metafases con 4 a 6 intercambios y un incremento en las que presentaban mas de 11 ICH. Por su lado el tratamiento mas alto (30 ug/ml)mostró el mismo patrón de efecto que el primer tratamiento disminuyendo el número de células con intercambios de 1 a 3 y de 4 a 6, y aumentando las frecuencias de células con 7 a 10 y mas de 11 (Gráfica 12).

## DISCUSION.

Historicamente los genetistas iniciaron las investigaciones en mutagénesis estudiando los efectos de las radiaciones antes que las sustancias químicas.

A partir de los primeros estudios efectuados por Auerbach y Robson (1944; 1947), Auerbach et al., (1971), Rapopor (1946; 1948) en animales y los de Gustafson y Mackeg (1946) en plantas, se inició la era de estudios de mutagénesis química logrando percatarse los investigadores del grave riesgo potencial que representan estas sustancia químicas en el ambiente (Moutschen, 1985; Tice, 1986).

La gran cantidad de compuestos sintéticos (más de 70,000) y la exposición diaria y ocupacional a estos resulta en muchos de los casos en señales obvias de daño a la salud (Tice, 1986).

Por tal motivo los efectos nocivos han sido el principal foco de atención por parte de los investigadores, ya que la carga mas grande para la población humana viene cuando el resultado de estas exposiciones es a nivel de tejido germinal, siendo su expresión no necesariamente en el individuo expuesto, sino que tambien pueden producirse condiciones como la esterilidad, infertilidades o incrementarse la carga de enfermedades genéticas en las generaciones subsecuentes (Tice, 1986), (Fig. 9).

Estos hechos han provocado que se cuente con técnicas para detectar el riesgo de la exposición a estos agentes químicos, empleando para estos motivos animales o plantas en gran número y variedad, aunque no siempre se tiene un control adecuado de estas metodologías y por lo tanto es difícil lograr evaluar la importancia real para el hombre de algunos resultados obtenidos con las pruebas con las que se cuenta actualmente, ya que la mayoría de las tecnologías genéticas fueron creadas para medir el daño producido por los agentes físicos y químicos bien conocidos por su alta eficiencia mutagénica, y no para muestrear el posible riesgo de muchas sustancias de baja actividad (Moutchen, 1985).

Cuando se trabaja en la Genética Toxicológica empleando alguno de los sistemas biológicos de prueba encargados de evaluar el potencial mutagénico de algún agente, se deben buscar ciertas cualidades para considerarlos como eficientes y confiables como:

- a) la de proveer de resultados aplicables al hombre, b) las pruebas deben de ser lo suficientemente sensibles para detectar bajas concentraciones de mutágenos en el ambiente o detectar mutágenos de baja actividad, c) deberán ser susceptibles de ser analizadas estadísticamente, d) deberán de poder adaptarse a un gran número de situaciones prácticas, presentando un amplio rango de evaluaciones en el mismo ensayo, e) deberán de ser de rápida realización, y finalmente, f) para poderla considerar como una prueba útil debe de ser fácil de realizar, reproducible y poco costosa, de tal manera que se pueda aplicar rutinariamente (Moutschen, 1985).

Dentro de los sistemas biológicos de prueba, los ubicados en el grupo III (pruebas diseñadas para evaluar el daño inducido en los cromosomas (efecto clastógeno) y que incluyen a los cultivos de células de mamífero ofrecen la gran ventaja de que las células blanco logran presentar una cierta relación próxima a las células expuestas del cuerpo humano, obteniéndose resultados mas instructivos para poder sopesar los peligros de las exposiciones del hombre a los mutágenos (Maher y McCormick, 1982).

En el presente trabajo se empleó el sistema de cultivo de linfocitos humanos debido a que estos son un sistema ideal para analizar el efecto de exposiciones crónicas a bajas dosis de mutágenos debido en parte a que estas células son de vida larga y esto puede conducir a la acumulación de lesiones en el ADN (Natarajan y Obe, 1982), además de que la mayoría de los linfocitos periféricos están en un estado bien definido del ciclo celular (G<sub>0</sub>), (Fig.1) y pueden ser transformados in vitro en condiciones controladas. Sin embargo una de las características más importantes de los linfocitos es que presentan una actividad de reparación baja al ser comparada con las células que ciclan normalmente (Natarajan y Obe, 1982). Estas características han ocasionado que este sistema sea utilizado ampliamente para los estudios de mutagénesis química, física o biológica (Leonard et al., 1982; Brøgger, 1982; Satya-Prakash et al., 1981; Markkanen et al., 1982).

Para poder evaluar el potencial del cultivo de linfocitos humanos, así como su amplia gamma de parametros de

evaluación se emplearon varios compuestos metálicos agrupados dentro de la tercera clasificación dada por Moutschen (1985).

Estudios experimentales han demostrado que metales como el plomo y el cadmio (Bauchinger et al., 1976), manganeso, estaño y vanadio (Smith, 1973; Dube y Loeb, 1975; Hansen y Stern, 1984), el cobalto, arsénico, mercurio, zinc y níquel (Rossman et al., 1984; Fackham, 1983; Casey et al., 1984; Popenos y Schmaeler, 1979) están presentes en el ambiente y son potencialmente mutágenos y carcinógenos (Hansen y Stern, 1984).

Una de las primeras evaluaciones que se deben de realizar cuando se están empleando sistemas biológicos como el cultivo de linfocitos humanos, es el de la citotoxicidad del agente químico probado, ya que aunque el principal blanco de muchos agentes clastogénicos es el ADN, la evaluación del daño sobre la proliferación celular puede ser un reflejo importante del efecto de las sustancias sobre esta molécula (Brewer y Stetka, 1982), aunque en algunos casos los dos efectos pueden ser independientes (Setlow, 1982).

El principal método de evaluación de citotoxicidad lo representa la determinación del índice mitótico, el cual nos da una idea de la proliferación celular y los posibles cambios sufridos a lo largo de los tratamientos.

Dentro del trabajo se realizaron dos determinaciones del índice mitótico de manera independiente y al azar dentro de las preparaciones obtenidas, encontrando poca correlación entre una y otra evaluación. Los resultados obtenidos pudieron ser debidos a dos factores: a) es posible que exista una gran

variabilidad entre las preparaciones de un mismo cultivo, lo cual puede estar modificando los conteos al ser realizados y sumados a partir de las 4 preparaciones realizadas por cada uno de los cultivos y b) las distribuciones de las células al realizar las preparaciones pueden ser diferentes lo cual puede modificar el conteo según sea el área de inicio del análisis.

Se sabe que dentro de los individuos existe mucha variabilidad en cuanto a la respuesta de los linfocitos a los agentes mitogénicos, por lo que posiblemente pudiera estar pasando lo mismo en cada uno de los cultivos que se realizaron, si se toma en consideración que en algunos casos no se puede llegar a tener un control absoluto de las calidades de las fitohemaglutininas (Lambert et al., 1982).

Para poder realizar determinaciones de los índices mitóticos y que los resultados sean confiables en todos los experimentos y todos los laboratorios, debe de existir una estandarización del método de realización de las preparaciones así como del punto de inicio de los conteos, empezando siempre en el mismo punto y de ser posible realizando las determinaciones en una sola preparación por tratamiento y por individuo, lo cual puede disminuir la variabilidad aportada por las distintas preparaciones. Una de las posibles alternativas, es la de incrementar el tamaño de muestra observado para de esta manera tener una visión mas amplia del evento en cuestión.

Dentro de las alteraciones cromosómicas que se evalúan en el cultivo de linfocitos existen tres importantes: los rompimientos (cromatídicos o cromosómicos), los gaps y los

intercambios entre cromátidas hermanas.

En las tablas I, V y IX se presentan las frecuencias de alteraciones cromosómicas obtenidas al tratar los linfocitos con el cloruro de estaño, el pentóxido de vanadio y el cloruro de manganeso durante 48 horas, lo que implica la presencia y acción del metal por 2 ciclos de división efectivos, y en las cuales se incluyen rompimientos sencillos, dobles, gaps y poliploidias (incluyéndose las endoreduplicaciones).

Dentro de las evaluaciones los gaps son los que más discusión causan entre los investigadores debido a su posible origen y su significado. Dentro de los metales probados el estaño produjo una disminución significativa a la dosis de 20 ug/ml, en este tipo de alteraciones, observándose además que las frecuencias de fragmentos sencillos aumentaron. Por su parte el vanadio no mostró diferencias significativas en estos parámetros y el manganeso mostró en cuanto a las frecuencias de gaps no tener una relación directa con respecto a la dosis, ya que en la concentración mas baja y la intermedia aumentaron y en la mas alta disminuyeron.

Diversos estudios han podido demostrar que los gaps son alteraciones difíciles de cuantificar, ya que son muy variables las frecuencias de experimento a experimento, así como en el mismo individuo, además de que su naturaleza no esta bien definida todavía (Natarajan y Obe, 1982; Brøgger, 1982). Investigadores como Hittelman y Rao (1974) han sugerido que hay dos tipos de gaps : los debidos a las alteraciones producidas en el primer estado de condensación de la cromatina, implicando

algun tipo de daño a esta y los que son producidos por disturbios causados en el último periodo de condensación de las fibras cromosómicas. La interferencia posterior en la condensación cromosómica puede asociarse con otros efectos sobre el aparato mitótico, los cuales pueden conducir a errores en la segregación o daño mutagénico (Brøgger, 1982).

Brøgger (1982) propone que los gaps son desde el punto de vista genético inocentes y de naturaleza transitoria en la vida de la células, lo cual posiblemente sea verdad en algunos casos, sin embargo al analizar los resultados obtenidos en el trabajo encontramos variaciones apreciables de estas frecuencias dentro de los cultivos tratados con respecto a los testigos, teniendo como ejemplo que el estaño disminuye la frecuencia de gaps y aumenta la de fragmentos sencillos, lo cual puede indicar la traducción de los gaps en fragmentos. Anderson et al., (1981) reportan que tanto los gaps como los rompimientos son igualmente informativos de daño producido por los agentes mutagénicos, como por ejemplo el cloruro de polivinilo (PVC), mientras que Stich y Rosin (1985) mencionan que estos son indicadores sensitivos de exposiciones a genotóxicos, por lo que no pueden considerarse como inocentes y sin importancia.

Aunque en la literatura se encuentren muchas contradicciones acerca del origen y la importancia de los gaps, es importante tomarlos en cuenta para todos aquellos estudios que pretendan demostrar algún tipo de acción sobre el ADN por parte de agentes físicos, químicos o biológicos, ya que de alguna

manera su presencia tiene que ver con algunas modificaciones sobre la estructura del ADN (Stich y Rosin, 1985).

Al analizar las frecuencias de rompimientos en los cromosomas de los linfocitos tratados con los metales, encontramos que el estaño y el manganeso fueron los únicos que indujeron este daño, siendo el vanadio el compuesto que no tuvo efecto a este nivel. En la literatura existe escasa información acerca del efecto genotóxico del vanadio, el cual ha mostrado ser mutagénico solo en ensayos con procariontes, como lo muestra la revisión realizada por Hansen y Stern (1984), mientras que el estaño y el manganeso aunque son elementos con baja actividad (mutagenos debiles) su efecto es mas amplio, considerandose al manganeso como un carcinogeno (Dube y Loeb, 1975; Hansen y Stern, 1984).

En los casos del manganeso y del estaño el tipo de rompimientos que prevalecieron fueron los sencillos, lo que implica una acción a nivel de rupturas de cadenas simples de ADN en una de las cromátidas del cromosoma.

Diversos autores han clasificado a las aberraciones cromosómicas dependiendo de si estan implicadas una o ambas cromátidas del cromosoma metafásico, siendo llamadas de tipo cromosómico o de tipo cromatídico respectivamente (Evans, 1962; Natarajan y Obe, 1982).

Los tipos de aberraciones observadas en metafase dependen del estado del ciclo celular en el que el tratamiento se efectuó, así como el tipo de agente mutagénico usado. Agentes como los rayos X inducen aberraciones de tipo cromosómico si es

aplicado durante el periodo de G1, mientras que si es aplicado en el periodo de G2 produce rupturas de tipo cromatídico (Evans, 1962) (Agente S-independiente), sin embargo existen agentes como la luz ultravioleta que depende del estado del ciclo celular en el que se aplique para que pueda manifestar su daño (Agente S-dependiente).

Los datos obtenidos concuerdan con los encontrados por Umeda y Nishimura (1979), los cuales encontraron que el manganeso induce aberraciones cromosómicas del tipo de los fragmentos sencillos en condiciones similares a las empleadas en este trabajo.

Por su parte el estaño no ha sido reportado como mutágeno, sin embargo en este trabajo se ve como un inductor (débil) de aberraciones en frecuencias significativas en las concentraciones mas altas (4.00 % y 4.72 % para 20 y 30 ug/ml, vs. 0.75 % del testigo), por lo que habria que hacer un muestreo mas fino de este metal en particular en varios ensayos simultáneos, para evitar alguna variacion en el método que pudiera haber originado este resultado.

Hansen y Stern (1984) realizaron una revisión acerca de la mutagenicidad de los metales tanto in vivo como in vitro, encontrando al manganeso como positivo en 8 de 15 sistemas probados, mientras que el vanadio solo fue reportado como mutágeno en uno de los 15 ensayos realizados (daño al ADN de procariontes), lo cual es congruente con lo encontrado ya que este metal no produjo ningún tipo de daño, aunque a nivel toxicológico el vanadio fue mas citotóxico que los otros dos

metales, razón por la cual se emplearon concentraciones mas bajas que las usadas con los otros dos compuestos.

Otra de las evaluaciones realizadas en este trabajo fue el de la inducción de poliploidias, renglon dentro del cual quedaron las endorreducciones, ya que estas se consideran como reactivos que conducen a la duplicación del número cromosómico (Pallitt et al., 1974).

Las endorreducciones son un tipo muy particular de daño, en la cual las células presentan dos síntesis sucesivas de ADN sin pasar por mitosis, resultando en la formación de cromosomas dobles (diplocromosomas) unidos por el centrómero (Weber y Hoengerman, 1980; Sutou, 1981; Takanari, 1985; Takanari et al., 1985).

En la actualidad se conocen muchos reactivos químicos inductores de endorreducciones, tales como las lectinas, mercaptoetanol, colchicina, fluoruro de sodio etc. (Hare y McFeely, 1966, Sutou y Arai, 1971), siendo en algunos casos sinérgicos los resultados, lo cual sugiere la existenciade al menos dos posibles mecanismos. Sutuo (1981) propone que el mecanismo principal puede ser debido a un bloqueo de la fosforilación (como por ejemplo las histonas), y por tal motivo evitar la entrada a mitosis. El segundo mecanismo propuesto por el mismo autor menciona que pueden existir otros elementos blanco como el calcio y el AMFc, ya que estos estan implicados en el ensamble y desensamble de los microtúbulos, por lo que cualquiera de las alteraciones en estos pueden causar disturbios en la formación del huso mitótico y conllevar a la formación de

cromosomas dobles. El manganeso como metal puede actuar a los dos niveles, sin embargo se puede pensar que su vía más posible es la primera, inhibiendo de alguna manera la fosforilación de las histonas, para evitar la entrada de las células a mitosis y obligarlas a regresar a G1 nuevamente, sin embargo se requiere estudios complementarios para poderlo demostrar.

Diversas evidencias han demostrado que la mayoría de los agentes inductores de endorreducciones son mutagénicos, mostrando una relación con efectos carcinogénicos, por lo cual estos compuestos pueden ser extremadamente peligrosos (Sutou y Tokuyama, 1974). Estos datos no concuerdan con los encontrados para el manganeso, el cual ha sido considerado como un mutageno y carcinogeno peligroso (Sirover y Loeb, 1976), no mostrando ser inductor de endorreducciones, cuando se aplicó la prueba de diferencia de proporciones, sin embargo al tomar en cuenta los lineamientos marcados por el programa de Genética Toxicológica (Latt et al., 1981) cuando los tratados doblan la frecuencia de endorreducciones del testigo, se puede considerar como positivo el efecto, lo que ocurrió únicamente con el manganeso.

En un gran número de especies de mamíferos, uno o más pares de cromosomas muestran una conspicua constricción secundaria al ser observados en metafase (Hsu et al., 1967), siendo en el cariotipo humano 5 pares de cromosomas los que la presentan (pares 13, 14, 15, 21 y 22), encontrándose esta sobre el brazo corto. En las preparaciones de los cromosomas humanos en metafase, se puede apreciar frecuentemente que los cromosomas de estos grupos (D y G) se asocian unos a otros por medio de sus

satélites o constricciones secundarias, unos muy próximos a los otros, pudiendo ocurrir este fenómeno tanto en mitosis como en meiosis, siendo al parecer esto una organización implicada en la formación del nucleolo (Ferguson-Smith y Handmarker, 1961; Zank y Back, 1968; Houghton, 1979).

A partir de hace algunos años el interés de los investigadores se centró en el fenómeno de las asociaciones de satélites (AS), ya que han existido sospechas de que estas pueden estar implicadas en la aparición de aneuploidias causadas por no disyunciones en niños recién nacidos (Houghton, 1979; Mikkelsen *et al.*, 1975; Zankl y Nagl, 1980).

Por tales motivos en el presente trabajo se realizaron una serie de evaluaciones relacionadas con estos fenómenos, con el objeto de tratar de encontrar una relación entre el número y tipo de asociaciones de satélites y los tratamientos empleados, para determinar si las (AS) son un buen indicador de daño.

De los parámetros evaluados se puede establecer que los metales sí modifican la presencia de estos eventos, como puede observarse en el caso de las asociaciones totales, en las cuales en todos los casos en la concentración más baja se obtuvo la mayor frecuencia de AS, y aunque no fue estadísticamente significativo el hecho, en las concentraciones más altas disminuyó esta frecuencia.

Diversos estudios han demostrado que factores como la edad, el sexo y enfermedades como el hipotiroidismo, así como algunos agentes químicos como el cloruro de cobalto (Farah, S.P. 1982) pueden llegar a alterar las frecuencias de AS en

el hombre (Zang y Beck, 1968; Houghton, 1974; Nilsson et al., 1975).

De las evaluaciones la que mayor importancia puede tener es el porcentaje de células que presentan una asociación, encontrando que solo el vanadio mostró alterar estas frecuencias significativamente con respecto a la dosis usadas.

Al comparar los dos parámetros evaluados inicialmente podemos decir que no existe relación entre el porcentaje de células con asociaciones y el número de cromosomas asociados, pudiendo estar relacionado el hecho de que a mayor número de asociaciones totales, mayor número de células con asociación.

Las frecuencias de asociaciones esperadas para los cromosomas D con respecto a los cromosomas G ha sido calculada en 60% vs. 40% respectivamente (Hansson, 1970), por lo que al calcular sus participaciones se puede detectar modificaciones a estas expectativas, como se observó con el manganeso el cual en el caso del testigo y las dos primeras concentraciones las frecuencias esperadas se vieron modificadas significativamente. El hecho de que el testigo mostrara datos significativos, viene a dar una idea de la gran variabilidad individual en cuanto a las frecuencias normales de AS y sus distribuciones.

Aunque muchos de los trabajos previos en los que se realizan evaluaciones similares mencionan que las asociaciones de los cromosomas son al azar, existen evidencias fuertes de que estas no son aleatorias, existiendo una mayor tendencia de los cromosomas 13 y 21 a reunirse (Curtis, 1974; Mikkelsen et al

1975; Zankl y Nagl 1980; Delinassios et al.,1981), razón por la cual se explica una mayor frecuencia de asociaciones presentes en personas que manifiestan el síndrome de Down o parientes cercanos.

Con el objeto de establecer un daño mas fino y tratar de determinar la potencialidad del sistema, en el presente trabajo se empleó la técnica de tinción diferencial de cromátidas hermanas.

A partir de 1974 cuando Latt introduce la metodología de intercambio de cromátidas hermanas, se abrió un nuevo campo para los investigadores que se dedicaban a la Genética Toxicológica ya que esta nueva técnica de evaluación logró dar un nuevo respiro e impulso a las determinaciones de los efectos mutagénicos de muchos agentes químicos y físicos, debido a que los sistemas empleados, a excepción de los bacterianos, mostraban inconsistencia y poca sensibilidad en las evaluaciones, por lo que inmediatamente se procedió a la adaptación de esta técnica dentro de un gran número de pruebas de monitoreo, encontrándose a la fecha que se aplica en vegetales (Ma, et al., 1982; Grant y Zura, 1982), invertebrados (Pesch et al.,1984), peces (Kligerman,1982), y gran diversidad de mamíferos en pruebas in vivo y en células en cultivo (Wolff,1977; Latt et al.,1981;Moutschen,1985) siendo los linfocitos humanos en cultivo uno de las pruebas mas empleadas con esta metodología debido a que estas células son fácilmente accesibles, capaces de inducirse a la proliferación in vitro, y representan una parte del cuerpo humano en exposición (Carrano y Moore,1982).

En 1980 Painter propuso que los intercambios entre cromátidas hermanas son el reflejo de errores en la síntesis del ADN, sin que estos conduzcan a la muerte de la célula, siendo un intercambio de un doble filamento entre dos moléculas de ADN posiblemente por alguna de las tres vías siguientes: 1) un intercambio entre cromátidas que han sido rotas independientemente en sitios homólogos, 2) un sistema de reparación que opera durante la replicación del ADN y 3) un error en la replicación del ADN, existiendo hasta la fecha evidencias que apoyan las tres posibilidades, aunque la tercera parece ser la más viable.

En el presente trabajo al evaluar las frecuencias de ICH inducidas por los tres compuestos metálicos se encontró que solo el manganeso en la concentración más alta elevó significativamente la frecuencia de intercambios, lo cual de manera general está de acuerdo con los trabajos de Hansen y Stern, 1984 y los de Moutschen, 1985, ya que el vanadio y el estaño han sido reportados como no inductores de ICH

El manganeso es el único de los tres metales que ha sido consistentemente reportado como mutágeno y carcinógeno, sin embargo no como buen inductor de aberraciones y de ICH. El hecho de encontrar a un mutágeno y carcinógeno que no responde a la prueba de ICH hace pensar en la necesidad de buscar nuevas variantes a las metodologías empleadas, ya que si se realiza un análisis más detallado de cada una de las pruebas empleadas, pueden encontrarse datos interesantes, como en este trabajo, el

cual muestra que el manganeso si puede inducir , aunque en bajas proporciones aberraciones cromosómicas e ICH, lo que si es congruente con lo reportado dentro de la literatura para las sustancias productoras de intercambios, las cuales generalmente son mutágenas y carcinógenas (Carrano y Moore, 1982; Perry y Thomson, 1984).

El efecto del manganeso sobre la frecuencia de intercambios se ve mas evidente al realizar un análisis de las distribuciones del número de ICH por célula, en donde el manganeso aumenta sustancialmente el número de células con un mayor número de ICH (7 a 10 y más de 11) , lo cual da un indicio mas claro del efecto de este metal a este nivel, observando que el estaño no presenta daño alguno, mientras que el vanadio muestra una relación muy particular, aumentando significativamente el número de células sin intercambios y las del rango de 1 a 3 ICH por célula, mientras que en los intervalos mas altos (mas de 11) se presentan frecuencias de cero. Aunque no se encontró una determinación que evidenciara una citotoxicidad efectiva del vanadio sobre las células, esto puede demostrar que este metal puede dañar de una manera importante, ya sea por una inhibición de la replicación de las células que acumulan mas metal y por lo tanto no se hacen evidentes las células que presentan muchos intercambios, o por muerte de las células con mucho daño, efecto mas probable si tomamos en consideracion que este metal fue el mas tóxico de los tres al ser comparados los efectos equimolares.

El hecho de que la técnica de tinción diferencial de cromátidas hermanas se base en la incorporación de un analogo de la timina como lo es la bromodesoxiuridina durante dos ciclos de división , da la posibilidad de aprovechar este fenómeno para poder estudiar la cinética de proliferación de los linfocitos, ya que se esta en posibilidad de poder determinar segun el patrón de tinción , el número de veces que se ha dividido una célula, teniendo células que se han dividido una sola vez y muestran por lo tanto una tinción homogénea en ambas cromátidas (foto,5) mientras que las células que se han dividido dos veces presentan la clásica tinción diferencial de cromátidas hermanas, siendo una de ellas clara, mientras que la otra es oscura (foto,6), y las células que ya pasaron por tres o más ciclos muestran una tinción como la que se observa en la foto 7.

De los metales probados encontramos que dos de ellos presentan efectos sobre la cinética de división, siendo el estaño uno de ellos, provocando en la concentración de 20 ug/ml un acortamiento en la duración del ciclo celular, mientras que el manganeso lo alarga.

De todo lo anterior podemos concluir que uno de los puntos más importantes que se deben de tomar en consideración cuando se trabaja con sistemas o modelos para probar el posible efecto mutagénico de agentes químicos , es que deben de realizarse el mayor número de determinaciones posibles , pues como se observa comunmente en la literatura, empleando sólo un sistema y un sólo parametro de evaluación, los resultados no son positivos en algunos casos, pero en otros si lo es, como se

observa en el presente trabajo, en donde los metales probados, uno de ellos, el manganeso, reconocido como mutageno (productor de la infidelidad en la síntesis del ADN) y dos de ellos, el estaño y el vanadio como no mutagenos, demostraron en algunas de las evaluaciones si tener efectos a nivel citogenético.

Lo anterior abre las posibilidades de realizar ensayos con agentes químicos que a nivel toxicológico son peligrosos, pero que a nivel mutagénico son negativos o muestran resultados contradictorios, resultados que comunmente se comparan en evaluaciones unicas, como por ejemplo el níquel, el cual es positivo en los ensayos de infidelidad en la síntesis de ADN, de daño al ADN de procariontes, de daño a nivel del ADN de células de mamíferos, productor de aberraciones y de ICH en células de mamíferos *in vitro*, causar transformaciones celulares *in vitro*, y positivo en plantas, mientras que es negativo en los ensayos *in vivo*, con mamíferos, *Drosophila* y de igual manera con el empleo de *Salmonella* y *E. coli*. (Hansen y Stern, 1984).

De igual manera y como se sugiere realizar trabajos posteriores, se pueden tratar de establecer nuevos protocolos que faciliten la detección del daño producido por mutagenos débiles, mediante el uso de agentes inhibidores de la reparación del ADN, evento que ocurre comunmente en las células, y que como ya se ha demostrado en muchos casos las frecuencias reales de aberraciones o de intercambios de cromátidas hermanas quedan enmascaradas debido a este fenómeno, por lo que en el caso de estas sustancias al presentar una frecuencia de daño baja y esta ser reparada, las manifestaciones citológicas no son significativas

estadísticamente. Con relación a este último punto conviene mencionar que es recomendable realizar dos tipos de evaluaciones para poder establecer los niveles de daño producidos por los agentes químicos: el estadístico y el propuesto por el Programa de Genética Toxicológica (Genotox-program) (Latt *et al.*, 1981), el cual propone que cuando el grupo tratado duplica la frecuencia de daño mostrada por el testigo se puede considerar como un efecto positivo, criterio que debería ser usado en muchas de las determinaciones al parejo de las estadísticas, ya que existen casos en los que estas no muestran significatividad, sin embargo las frecuencias de los tratados son más del doble de las de los testigos, como sucedió en el caso del manganeso con los fragmentos sencillos en donde la concentración intermedia mostró una frecuencia de 4.9 vs 2.28 del testigo, siendo en la misma sustancia en la concentración más alta la frecuencia de gaps de 1.47 vs 0.57 del testigo, datos que estadísticamente no fueron significativos, pero según el programa de Genética Toxicológica sí lo son.

BIBLIOGRAFIA:

- ABRAMOVSKY, I., VORSANGER, G. Y HIRSCHHORN, K. (1978). SISTER CHROMATID EXCHANGE INDUCED BY X-RAY OF HUMAN LYMPHOCYTES AND THE EFFECT OF L-CYSTEINE. MUTAT.RES. 50:93-100.
- ALBERTINI, R.D., SYLVESTER, D.L. Y ALLEN, E.F. (1982). THE 6-THIOGUANINE -RESISTANT PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES ASSAY FOR DIRECT MUTAGENICITY TESTING TESTING IN HUMANS: EN MUTAGENICITY: NEW HORIZONS IN GENETIC TOXICOLOGY. ACADEMIC PRESS, N.Y.
- ANDERSEN, O., FONNE, M. Y NORDBERG, G.F. (1983). EFFECTS OF INORGANIC METAL SALTS ON CHROMOSOME LENGTH IN HUMAN LYMPHOCYTES. HEREDITAS, 80:65-70.
- ANDERSON, D., RICHARDSON, C.R., PURCHASE, I.F.H., EVANS, H.G. Y O'RIOEDAN, M.L. (1981). CHROMOSOMAL ANALYSIS IN VINYL CHLORIDE EXPOSED WORKERS. MUTAT.RES. 83:137-144.
- ANDERSON, H.C. (1981). INDUCTION OF SISTER CHROMATID ECHANGES BY STREPTONIGRIN, AND ANTIBIOTIC AND ANTINEOPLASTIC AGENT. HEREDITAS 95:141-148.
- AUERBACH, C. Y ROBSON, J.M. (1947). TEST OF CHEMICAL SUBSTANCES FOR MUTAGENIC ACTION. PROC. R. SOC. 62:284-291.
- AUERBACH, C., MOUTSCHEN-DAHMEN, M. Y MOUTSCHEN, J. (1977). GENETIC AND CYTOGENETIC EFFECTS OF FORMALDEHYDE AND RELATED COMPOUNDS. MUTAT. RES. 39:317-362.
- BARKER, W.H. Jr. Y RUNTE, V. (1972). TOMATE JUICE-ASSOCIED GASTROENTERITIS AMER. J. EPIDEMIOL. 96:219-226.
- BAUCHINGER, M., SCHMID, E., EINBRODT, H.J. Y DRESP, J. (1976). CHROMOSOME ABERRATIONS IN LYMPHOCYTES AFTER OCCUPATIONAL EXPOSURE TO LEAD AND CADMIUM. MUTAT RES 40:57-62.
- BENDY, C.J., HOOPER, F.A. Y SCHNEIDER, R. (1971). THE TOXICITY OF TIN IN CANNED FRUIT JUICE AND SOLIDS FOODS. FOOD. COSMET. TOXICOL. 9:645-656.
- BRADBURY, E.M., MACLEAN, N. MATTHEWS, H.R. (1981). DNA CHROMATIN AND CHROMOSOMES. BLAKWELL SCI. PUB. OXFORD.
- BREWEN, J.G. Y STETKA, D.G. (1982). CYTOGENETIC EVENTS IN VIVO. EN: MUTAGENICITY: NEW HORIZONS IN GENETIC TOXICOLOGY CAP. 13 ACADEMIC. PRESS. N.Y.

- BROGGER, A. (1982). THE CHROMATID GAP-A USEFUL PARAMETER IN GENOTOXICOLOGY? CYTOGENET. CELL GENET. 33:14-19.
- BURN, A. Y BRUNK, U. (1970). HISTOCHEMICAL INDICATIONS FOR LYSOSOMAL LOCALIZATION OF HEAVY METALS IN NORMAL RAT BRAIN AND LIVER. J. HISTOCHEM. CYTOCHEM. 18:820-823.
- CARSTAIRS, K. (1962). THE HUMAN SMALL LYMPHOCYTE: ITS , POSSIBLE FLURIPOTENTIAL QUALITY. LANCET 1:829-832.
- CARRAND, A.V. Y MOORE, D.H. (1982). THE RATIONALE AND METHODOLOGY FOR CUANTIFYNG SISTER CHROMATID EXCHANGES IN HUMANS. EN: MUTAGENICITY: NEW HORIZONS IN GENETIC TOXICOLOGY. CAP. 10 ACADEMIC PRESS. N.Y.
- CASEY, C.E., HAMBIDGE, K.M., Y NEVILLE, M.C. (1985). STUDIES IN HUMAN LACTATION: ZINC, COPPER, MANGANESE AND CHROMIUM IN HUMAN MILK IN THE FIRST MONTH OF LACTATION. AM J CLIN NUTR 41:1193-1200.
- CLERECI, L. Y BRAZZELLI, A. (1983). DIFFERENT EFFECTS OF VANADIUM IONS ON SOME DNA METABOLIZING ENZIMES. J. TOXICOL. ENVIRONM. HTLH. 12:737-748.
- COTZIAS, S.C. (1958). MANGANESE IN HEALTH AND DISEASE PHYSIOL. REV. 38:503-532.
- CURTIS, D.J. (1974). ACROCENTRIC ASSOCIATIONS IN MONGOL DPOPULATIONS. HUMANGENETIK 22:17-22.
- DEKNUDT, GH. Y DEMINATTI, M. (1978). CHROMOSOME STUDIES IN HUMAN LYMPHOCYTES AFTER IN VITRO EXPOSURE TO METAL SALTS. TOXICOLGY 10:65-70.
- DEKNUDT, GH. Y GERBER, G.B. (1979). CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN BONE MARROW CELLS OF MICE GIVEN A NORMAL O A CALCIUM DEFICIENT DIET SUPPLEMENTED WITH VARIOUS HEAVY METALS. MUTAT RES 68:163-168.
- DELINASSIOS, J.G., VOLOUDAKIS-BALTATZIS, I., KOTLARIDIS, S.D. Y BARAS, J. (1981). NONRANDOM ASSOCIATION OF ACROCENTRIC CHROMOSOMES IN HUMAN EPITHELIAL CELLS. EXPERIENTIA 37:476-477.
- DIROVER, M.A. Y LOEB, L.A. (1976). INFIDELITY OF DNA SYNTHESIS IN VITRO: SCREENINGS FOR POTENTIAL METAL MUTAGENS OR DCARCINOGENS. SCIENCE 194:1434-1436.
- DOLOY, M.T., LEGO, R., HARDY, M. Y REILLAUDOU, M. (1978). CHROMOSOME ABNORMALITIES PRODUCED IN HUMAN LYMPHOCYTES BY ORGANIC EXTRACTS FROM RIVER WATER. EN: MUTAGEN-INDUCED CHROMOSOME DAMAGE IN MAN. NEW HAVEN YALE UNIVERSITY PRESS.

- DUBE, E.K. Y LOEB, L.A. (1975). MANGANESE AS MUTAGENIC AGENT DURING IN VITRO DNA SYNTHESIS. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMM. 57:1041-1046.
- DUFFUS, J.H. (1983). TOXICOLOGIA AMBIENTAL. CAP. 6 ED. OMEGA, BARCELONA ESPANA.
- ENGLISH, L.H., MANCERA, I.G. Y CANTLEY, L.S. (1983). VANADIUM STIMULATES (Na,K) PUMP IN FRIEND ERYTROLEUKEMIA CELLS AND BLOCK ERYTHROPOIESIS. J. CELL. BIOL. 79:1299-1302.
- EVANS, H.J. (1962). CHROMOSOME ABERRATIONS INDUCED BY IONIZING RADIATION. INT. REV. CYTOL. 13:221-231.
- EVANS, H.J. Y O'RIORDAN, M.L. (1975). HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES FOR THE ANALYSIS OF CHROMOSOME ABERRATIONS IN MUTAGEN TEST. MUTAT RES. 31:135-148.
- FARAH, S.B. (1982). ORGANIZADORES E ALTERACOES CROMOSSOMICAS NA ESPECIE HUMANA. CIENCIA E CULTURA 34:474-479.
- FERGUSON-SMITH, M.A. Y HANDMAKER, S.D. (1961) OBSERVATIONS ON THE SATELLITED HUMAN CHROMOSOMES. LANCET, 25:638-640.
- FISHERIN, L., FLAMM, W.G. Y FOLK, H.L. (1970). CHEMICAL MUTAGENS: ENVIRONMENTAL EFFECTS ON BIOLOGICAL SYSTEMS-ENVIRONMENTAL SCIENCE. AN INTERDISCIPLINARY MONOGRAPH SERIES. ACADEMIC PRESS N.Y.
- GARDNER, M.E. (1981). VIRUSES AS ENVIRONMENTAL CARCINOGENS: AN AGRICULTURAL PERSPECTIVE. EN: GENETIC TOXICOLOGY. PLENUM PRESS. N.Y.
- GRANT, W.F. Y ZURA, K.D. (1982). PLANTS AS SENSITIVE IN SITU DETECTORS OF ATMOSPHERIC MUTAGENS. EN: MUTAGENICITY: NEW HORIZONS IN GENETIC TOXICOLOGY. CAP. 15 ACAD. PRESS. N.Y.
- GONIFATO, G. Y HYDEN, H. (1963). NEUROHISTOCHEMISTRY. ELSEVIER. DUB. CO. N.Y.
- GUFSTANSON, A. Y McKEY, J. (1948). THE GENETICAL EFFECTS OF MUSTARD GAS SUBSTANCES AND NEUTRONS. HEREDITAS 34:371-386.

- HARON, N. Y BOOTH, J.A. (1984). EFFECT OF CHROMIUM AND MANGANESE PARTICLES ON THE INTERFERON SYSTEM. J. INTERFERON RES. 4:17-27.
- HANSEN, K. Y STERN, R. (1984). A SURVEY OF METAL-INDUCED MUTAGENICITY IN VITRO AND IN VIVO. TOXICOL. ENVIRONM. CHEM. 9:87-91.
- HARE, W.C.D. Y McFEELY, R.H. (1966). POSITION OF LABELLED CHROMATIDS IN DIPLOCHROMOSOMES OF ENDOREDUCATED CELLS AFTER UPTAKE OF TRIATED THYMIDINE. NATURE 209:107-108.
- HANSSON, A. (1970). DIFFERENCES IN THE SATELLITE PATTERN IN THE HUMAN POPULATION. HEREDITAS 66:21-30.
- HITTELMAN, W.N. Y RAD, P.N. (1974). PREMATURE CHROMOSOME CONDENSATION II. THE NATURE OF CHROMOSOME GAPS PRODUCED BY ALKYLATING AGENTS AN UV. LIGHL. MUTAT. RES. 23:259-266.
- HOFFMAN, G.R. (1981). OVERVIEW OF GENETIC TOXICOLOGY. EN: GENETIC TOXICOLOGY. PLENUM PRESS. N.Y.
- HOFFMAN, G.R. Y MORGAN, R.W. (1984). REVIEW: PUTATIVE MUTAGENS AND CARCINOGENS IN FOODS V. CYCADS. AZOXYGLYCOSIDES. ENVIRONM. MUTAG. 6:103-116.
- HOLDWAY, D.A. Y SPRAGUE, J.B. (1979). CHRONIC TOXICITY OF VANADIUM TO FLAGFISH. WATER RES. 13:905-910.
- HOLLAENDER, A. (1971a). CHEMICAL MUTAGENS PRINCIPLES AND METHODS FOR THEIR DETECTION. VOL. 1 PLENUM PRESS. N.Y.
- HOLLAENDER, A. (1971b). CHEMICAL MUTAGENS. PRINCIPLES AND METHODS FOR THEIR DETECTION. VOL 2 PLENUM PRESS. N.Y.
- HOLLAENDER, A. (1973). CHEMICAL MUTAGENS. PRINCIPLES AND METHODS FOR THEIR DETECTION. VOL. 3 PLENUM PRESS. N.Y.
- HOLLAENDER, A. (1976). CHEMICAL MUTAGENS. PRINCIPLES AND METHODS FOR THEIR DETECTION. VOL 4 PLENUM PRESS. N.Y.
- HOLLAENDER, A. Y de SERRES, F.J. (1978). CHEMICAL MUTAGENS. PRINCIPLES AND METHODS FOR THEIR DETECTION. VOL 5 PLENUM PRESS. N.Y.

- HOOK, E.B. (1982). CONTRIBUTION OF CHROMOSOME ABNORMALITIES TO HUMAN MORBILITY AND MORTALITY. CITOGENET. CELL GENET. 33:101-106.
- HOPKINS, L.L. Y MOHR, H.E. (1974). VANADIUM AS AN ESSENTIAL NUTRIENT. FED. PROC. 33:1773-1775.
- HOUGHTON, J.A. (1979). RELATIONSHIP BETWEEN SATELLITE ASSOCIATION AND THE OCCURRENCE OF NON-DISJUNCTION IN MAN. MUTAT. RES. 6:103-114.
- HSU, T.C., BRINKLEY, B.R. Y ARRIGHI, F.E. (1967). THE STRUCTURE AND BEHAVIOR OF THE NUCLEOLUS ORGANIZERS IN MAMMALIAN CELLS. CHROMOSOMA 23: 137-153.
- KLIGERMAN, A.D. (1982). FISHES AS BIOLOGICAL DETECTORS OF THE EFFECTS OF GENOTOXIC AGENTS. EN: MUTAGENICITY: NEW HORIZONS IN GENETIC TOXICOLOGY. CAP. 10 ED. ACADEMIC PRESS. N.Y.
- LAMBERT, B., BREDBERG, A., MCKENZIE, W, Y STEN, M. (1982). SISTER CHROMATID EXCHANGE IN HUMAN POPULATIONS: THE EFFECT OF SMOKING, DRUG TREATMENT, AND OCCUPATIONAL EXPOSURE. CITOGENET. CELL GENET. 33:62-67.
- LATT, S.A. (1974). SISTER CHROMATID EXCHANGES, INDICES OF HUMAN CHROMOSOME DAMAGE AND REPAIR: DETECTION BY FLUORESCENCE AND INDUCTION BY MITOMICYN C. PRDC. NAT. ACAD. SCI. USA. 71:3162-3166
- LATT, S.A., ALLEN, J., BLOOM, S.E., CARRANO, A., FALKE, E., KRAM, D., SCHNEIDER, E., SCHRECK, R., TICE, R., WHITEFIELD, B. Y WOLFF, S. (1981). SISTER CHROMATID EXCHANGES: A REPORT OF A GENE-TOX PROGRAM. MUTAT. RES. 87:17-62.
- LEHNINGER, A.L. (1982). BIOQUIMICA. 2a Ed. OMEGA, BARCELONA ESPANA.
- LEONARD, A., FABRY, L., DEKNUDT, G. Y DECAT, G. (1982). CHROMOSOME ABERRATIONS AS MEASURE OF MUTAGENESIS: CYTOGENETIC EXTRAPOLATION FROM ANIMAL TO MAN. CITOGENET. CELL GENET. 33:107- 113.
- LESSA, J.M.M., BECAK, W., NAZARETH-RABELLO, PEREIRA, C.A.B. Y UNGARO, M.T. (1976). CITOGENETICS STUDIES OF DDT ON HUMAN LYMPHOCYTES IN VITRO. MUTAT. RES. 40:131-138.
- LING, N.R. Y KAY, J.E. (1975). LYMPHOCYTE STIMULATION. NORTH HOLLAND AMSTERDAM PUB.

- MA, T.H., ANDERSON, V.A. Y AHMED, I. (1982). ENVIRONMENTAL CLASTOGENS DETECTED BY MEIOTIC POLLEN MOTHERS CELLS OF *Tradescantia*. EN: GENOTOXIC EFFECTS OF AIR BONE AGENTS. ED. TICE, R.R., COSTA, D.L. Y SCHAICH, K.L. PLENUM PUB. CO.
- MAHER, V.M. Y McCORMICK, J.J. (1982). MEASUREMENT OF MUTATIONS IN SOMATIC CELLS IN CULTURE. EN: MUTAGENICITY: NEW HORIZONS IN GENETIC TOXICOLOGY ACAD. PRESS. N.Y.
- MARKKANEN, A., HEINONEN, K., KNUOTILA, S. Y A de la CHAPELLE (1982). BRIEF REPORT METHOTREXATE-INDUCED INCREASE IN GAP FORMATION IN HUMAN CHROMOSOME BAND 3p14. *HEREDITAS* 96:317-319.
- MARQUES, M.J. (1987). PROBABILIDAD Y ESTADISTICA PARA CIENCIAS QUIMICO BIOLÓGICAS. ENEP-ZARAGOZA UNAM, MEXICO.
- MAUGH, T.H. (1982). BIOLOGICAL MARKERS FOR CHEMICAL EXPOSURE. *SCIENCE* 215:643-647.
- MIKKELSEN, M., HANSSON, A., JACOBSEN, P. Y HOBOTTH, N. (1975). TRASLOCATION (13q21q): FOR GENERATION FAMILY STUDY WITH ANALYSIS OF SATELLITE ASSOCIATIONS, FLOURESCENT MARKERS, AND PRENATAL DIAGNOSIS. *HUMANGENETIK*. 27:303-307.
- MORIMOTO, K. Y WOLFF, S. (1980). INCREASE OF SISTER CHROMATID EXCHANGES AND PERTURBATIONS OF CELL DIVISION KINETICS IN HUMAN LYMPHOCYTES BY BENZENE METABOLITES. *CANCER RES.* 40:1189-1193.
- MOUTSCHEN, J. (1985). INTRODUCTION TO GENETIC TOXICOLOGY. ED. JOHN WILEY & SONS. N.Y.
- NATARAJAN, A.T. Y OBE, G. (1982). MUTAGENIC TESTING WITH CULTURED MAMMALIAN CELLS. CYTOGENETIC ASSAYS. EN: MUTAGENICITY: A NEW HORIZONS IN GENETIC TOXICOLOGY. ACAD. PRES. N.Y.
- NAVAS, F., HIDALGO, A. Y GARCIA-HEIDIGO, G. (1986). CYTOKINESIS IN ONION ROOTS: INHIBITION BY VANADATE AND CAFFEINE. *EXPERIENTIA* 42:437-439.
- NILSSON, C., HANSSON, A. Y NILSSON, G. (1975). INFLUENCE OF THYROID HORMONES ON SATELLITE ASSOCIATION IN MAN AND THE ORIGIN OF CHROMOSOME ABNORMALITIES. *HEREDITAS* 80:157-166.
- NOWELL, P.C. (1960). PHYTOHEMAGGLUTININ: AN INITIATOR OF MITOSIS IN CULTURES OF NORMAL HUMAN LEUKOCYTES. *CANCER RES.* 20:462-466.
- OMORI, Y., TAKANAKA, A., TANAKA, S., IKEDA, Y. Y FURUYA, T. (1973). EXPERIMENTAL STUDIES ON TOXICITY OF TIN IN CANNED ORANGE JUICE. *J.FOOD. HYD. SOC. JAP.* 14:69-74.

- PACKHAM, N.Y. Y BARBER, J. (1984). STIMULATION BY MANGANESE AND OTHER DIVALENT CATIONS OF THE ELECTRON DONATION REACTIONS OF PHOTOSYSTEM II. *BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA.* 764:17-23.
- PAINTER, R.B. (1980). A REPLICATION MODEL FOR SISTER-CHROMATID EXCHANGE. *MUTAT. RES.* 70:337-3412.
- PALITTI, F., RIZZONI, M. Y OLIVIERI, G. (1974). CHROMOSOMAL ABERRATIONS INDUCED BY CAFFEINE IN ENDOREDUCATED CHINESE HAMSTER CELLS. *MUTAT. RES.* 26:145-150.
- PERRY, P. Y EVANS, H.J. (1975). CYTOLOGICAL DETECTION OF MUTAGEN-CARCINOGEN EXPOSURE BY SISTER CHROMATID EXCHANGE. *NATURE* 258:121-125.
- PERRY, P.E. Y THOMSON, E.J. (1984). THE METHODOLOGY OF SISTER CHROMATID EXCHANGES EN: HANDBOOK OF MUTAGENICITY TEST PROCEDURES. ELSEVIER SCI. PUB.
- PERRY, P. Y WOLFF, S. (1974). NEW GIEMSE METHOD FOR THE DIFFERENTIAL STAINING OF SISTER CHROMATIDS. *NATURE* 251:156-158,
- PESCH, G., HELTSHE, J. Y MUELLER, C. (1984). A STATICAL ANALYSIS OF *Neanthes arenaceodentata*, SISTER CHROMATID EXCHANGES DATA. EN: SISTER CHROMATID EXCHANGES. 25 YEARS OF EXPERIMENTAL RESEARCH. PLENUM. PRESS. N.Y.
- PHILLIPS, T.D., NOCHAY, B.R. Y HERDELBAUGH, N.D. (1983). VANADIUM CHEMISTRY AND THE KYDNEY. *FED. PROC.* 42:2969-2973.
- POPENOE, E.A. Y SCHMAELER, M.A. (1979). INTERACION OF HUMAN DNA POLYMERASE B WITH IONS OF COPPER, LEAD, AND CADMIUM. *ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS.* 196:109-120.
- RAPOPORT, I.A. (1946). CARBONYL COMPOUNDS AND THE CHEMICAL MECHANISM OF MUTATION. *C.R. ACA. SCI. URSS.* 54:65-67.
- RAPOPORT, I.A. (1948). MUTATIONS UNDER THE INFLUENCE OF UNSATURATED ALDEHYDES. *C.P. ACAD. NAT. SSSA.* 61:713-715.
- RODIER, J. (1975). MANGANESE POISONING IN MAROCCAN MINERS. *BRIT. J. IND. MED.* 3:3-13.
- ROSHCHIN, I.V. (1967). TOXICOLOGY OF VANADIUM COMPOUND USED IN MODERN INDUSTRY. *WATER RES.* 32:26-32.
- ROSSMAN, T.G., MOLINA, M. Y MEYER, L.W. (1984). THE GENETIC TOXICOLOGY OF METAL COMPOUNDS: I. INDUCTION OF LAMBDA PROFHAGE IN *E. COLI* WP2s . *ENVIRON.MUTAGEN* 6:59-69.

- ROUSEFF, R.L. Y TING, S.V. (1980). LEAD UPTAKE OF GRAPE FRUIT JUICE STORED IN CANS AS DETERMINED BY FLAMELESS ATOMIC ABSORPTION SPECTROSCOPY. J. FOOD SCI. 45:965-968.
- SABBIONI, E. Y BRAZELLI, L.C.A. (1983). DIFFERENT EFFCETS OF VANADIUM IONS ON SOME DNA-METABOLIZING ENZYMES. J. TOXICOL. ENVIRONM. HLTH. 18:737-748.
- SASAKI, M. (1982). ROLE OF CHROMOSOMAL MUTATION IN THE DEVELOPMENT OF CANCER. CYTOGENET. CELL GENET. 33:160-168.
- SATYA-PRAKASH, K.L., HSU, T.C. Y PATHAK, S. (1981). CHROMATID LESIONS ADN CHROMATID CORE MORPHOLOGY. CYTOGENETIC. CELL GENET. 30:248-252.
- SCHAFFER, S.G. Y FEMPERT, U. (1984). TIN-A TOXIC HEAVY METAL ? A REVIW OF THE LITERATURE. REG. TOXICOL. PHARMACOL. 4:57-69.
- SCHNEIDER, E.L., BICKINGS, C.K. Y STERNBERG, H. (1984). AGING AND SISTER CHROMATID EXCHANGE. VII EFFECT OF AGING OF BAKGROUND SCE IN VIVO. CYTOGENET. CELL GENET. 33:249-253.
- SCHWARTZ, K. (1971). TIN AS AN ESSENTIAL GROWTH FACTOR FOR RATS. EN: NEWER TRACE ELEMENTS IN NUTRITION. ED. MERTZ, E. DECKER, N.Y. BASEL
- SETLOW, R.B. (1982). DOSE RESPONSE RELATIONS: THE EFFECTS OF DNA REPAIR. EN: GENETIC TOXICOLOGY AND AGRICULTURAL PERSPECTIVE. ED. FLECK, R.A. Y HOLLAEENDER, A. PLENUM PRESS. N.Y.
- SHIRAISHI, Y, YAMAMOTO, K. Y SANDBERG, A.A. (1979). EFFECTS OF CAFFEINE ON CHROMOSOME ABERRATIONS AND SISTER - CHROMATID EXCHANGES INDUCED BY MITOMYCIN-C IN BrdU LABELED HUMAN CHROMOSOMES. MUTAT. RES. 62:139-149.
- SIEMON, H., SCHNEIDER, H. Y FUHRMANN, G.F. (1982). VANADIUM INCREASED SELECTIVE K+ PERMEABILITY IN HUMAN ERYTHROCYTES. TOXICOLOGY 22:272-278.
- SIROVER, M.A. Y LOEB, L.A. (1976). INFIDELITY OF DNA SYNTHESIS IN VITRO: SCREENING FOR POTENTIAL METAL MUTAGEN OR CARCINOGENS. SCIENCE 19:1434-1437.
- SMITH, M.A., EVANS, J. Y STEEL, C.M. (1974). AGE RELATED VARIATION IN PROPORTION OF CIRCULATING T CELLS. LANCETT 2:292-294
- SMITH, W.H. (1973). METAL CONTAMINATION OF URBAN WOODY PLANTS. ENVIRON. SCI. TECHNOL. 1:631-636.
- SORSA, M., HEMMINK, K. Y VAINIO, H. (1982). BIOLOGICAL MONITORING OF EXPOSURE TO CHEMICAL MUTAGENS LIN THE OCCUPATIONAL ENVIRONMEN. TERATOGEN. CARCINOGEN. MUTAGEN. 2:137-150.

- STEEL, C.M., EVANS, J. Y SMITH, M.A. (1975). AGE-RELATED CHANGES IN T AND B CELLS. LANCETT 1:914-915.
- STICH, H.F. Y ROSIN, M.P. (1985). TOWARDS A MORE COMPREHENSIVE EVALUATION OF GENOTOXIC HAZARD IN MAN. MUTAT.RES. 150:43-50.
- SOTOU, S.H. (1981). THE MECHANISMS OF ENDOREDUPPLICATION. CANC. GENET CYTOGENET. 3:317-325.
- SOTOU, S.H Y TOKUYAMA, F. (1974). INDUCTION OF ENDOREDUPPLICATION IN CULTURED MAMMALIAN CELLS BY SOME CHEMICAL MUTAGEN. CANC. RES. 34:2615-2623.
- SOTOU, S.H. Y ARAI, Y. (1975). POSSIBLE MECHANISM OF ENDOREDUPPLICATION INDUCTION. MEMBRANE FIXATION AND DISRUPT OF THE CYTOSKELETON. EXPERIMENTAL CELL. RES. 92:15-22.
- TAKANARI, H. (1985). STUDIES ON ENDOREDUPPLICATION. V.- A THREE-DIMENSIONAL SCHEME FOR DIPLO- AND QUADRUPLE CHROMOSOMES AND A MODEL FOR DNA REPLICATION. CYTOGENET. CELL GENET. 39:188-193.
- TAKANARI, H., NAKAKUKI, K. Y IZUTSU, I. (1985). CYTOGENETIC DEMONSTRATION OF OUT-OF-PHASE DNA SYNTHESIS IN ENDOREDUPPLICATED CHO CELL: EVIDENCE FOR PARTIAL ENDOREDUPPLICATION. CYTOGENET. CELL GENET. 39:93-98.
- THEUER, R.C., MAHONEY, A.W. Y SARETT, H.P. (1971). PLACENTAL TRANSFER OF FLUORIDE AND TIN IN RATS GIVEN VARIOUS FLUORIDE AND TIN SALTS. J. NUTR. 101:525-532.
- TICE, R.R. (1986). AN OVERVIEW OF OCCUPATIONAL STUDIES DIRECTED AT ASSESSING Y GENETIC DAMAGE. EN: PRENSA.
- UMEDA, M. Y NISHIMURA, M. (1979). INDUCIBILITY OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS BY METAL COMPOUND IN CULTURED MAMMALIAN CELLS. MUTAT. RES. 67:221-229.
- VIJAYALAXMI Y EVANS, H.J. (1982) BLEOMYCIN-INDUCED CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN DOWN'S SYNDROME LYMPHOCYTES. MUTAT.RES. 105:107-113.
- WAKSVIK, H., MAGNUS, P. Y BERG, K. (1981). EFFECTS OF AGE, SEX AND GENES ON SISTER CHROMATID EXCHANGES. CLIN. GENET. 20:449-454.
- WARBURTON, S., UDLER, H.W., EWERT, R.M. Y HAYNES, W.S. (1962). OUTBREAK FOODBORNE ILLNESS ATTRIBUTED TO TIN. PUBL.HEALTH. 77:798-800.
- WEBER, K.E. Y HOEGERMAN, S.T. (1980). TIMING OF ENDOREDUPPLICATION INDUCED BY COLCEMID OR RADIATION IN BUdR-LABELED HUMAN LYMPHOCYTES. EXP. CELL. RES. 128:31-39.

WOLFF, S. (1974). SISTER CHROMATID EXCHANGES: THE MOST SENSITIVE MAMMALIAN SYSTEM FOR DETERMINING THE EFFECTS OF MUTAGENIC CARCINOGENS. EXFOR. CONFERENCE OSLO. PP.1-9.

WOLFF, S. (1977). CHROMOSOME EFFECTS INDUCED BY LOW LEVELS OF MUTAGENS. EN: RESEARCH IN PHOTOBIOLOGY. FLENUM PUB. CORP. N.Y.

ZANG, K.D. Y BACK, E. (1968). QUANTITATIVE STUDIES ON THE ARRANGEMENT OF HUMAN METAPHASE CHROMOSOMES. I. INDIVIDUAL FEATURES IN THE ASSOCIATION PATTERN OF THE ACROCENTRIC CHROMOSOMES OF NORMAL MALES AND FEMALES. CYTOGENETICS 7:455-470.

ZANKL, H. Y NAGL, H. (1980). SATELLITE ASSOCIATIONS AND NOR STAINING IN MITOSES OF TRISOMY 21 MOSAICISM. HUMAN GENET. 55:115-117.

ZONEK, J. Y DLKOWSKI, Z. (1965). NADH2 DIAPHORASE THIAMINE PYROPHOSPHATASE AND ACID PHOSPHATASE IN SPINAL CORD OF RABBITS WITH CHRONIC MANGANESE POISONING. ACTA. MORPH. 13:329-337.

TABLA I.- ALTERACIONES CROMOSOMICAS INDUCIDAS POR EL CLORURO DE ESTANO EN CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS *IN VITRO*.

TRATAMIENTOS (ug/ml)	MITOSIS CON ABERRACIONES. (%)	FRAGMENTOS SEN- CILLOS. (%)	FRAGMENTOS DO- BLES. (%)	OTRAS (%)†	GAPS (%)	POLIPLOIDI- DIAS. (x)
TESTIGO	3.00	0.75	--	--	2.25	0.84
10	2.30	1.08	--	--	1.63	1.44
20	8.60 <sup>a</sup>	4.00 <sup>a</sup>	--	1.02	1.33 <sup>a</sup>	1.45
30	5.51	4.72 <sup>a</sup>	0.78	--	--	0.93

† = PULVERIZACIONES, TRIRRADIOS, ANILLOS ETC...

<sup>a</sup> = P < 0.05 (Con diferencia de proporciones)

TABLA II.- ASOCIACIONES DE SATELITES EN CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS *IN VITRO* CON CLORURO DE ESTANO.

TRATAMIENTOS (ug/ml)	CELULAS CON AS. (%)	ASOCIACIONES TOTALES (x)	CROMOSOMAS TOTALES A- SOCIADOS (%)	CROMOSOMAS "D" ASOCIADOS. (%)	CROMOSOMAS "B" ASOCIADOS (%)
TESTIGO	54.88	57.00	16.39	67.88	32.12
10	61.95	85.50 <sup>b</sup>	20.76	69.19	30.88 <sup>a</sup>
20	63.33	62.50	18.66	65.00	39.00
30	55.90	51.50	18.26	63.79	36.21

<sup>a</sup> = P < 0.05 (con X<sub>2</sub>; esperados = 60% para "D" y 40% para "B")

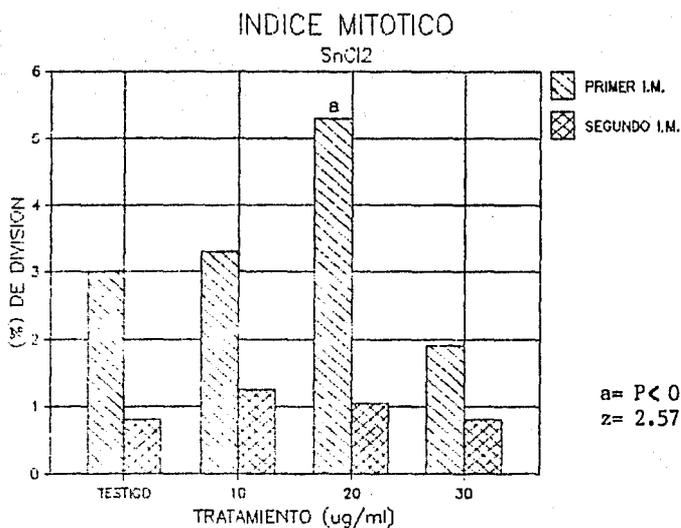
<sup>b</sup> = P < 0.001 (con X<sub>2</sub>)

TABLA III.- PORCENTAJE DE CELULAS QUE PRESENTAN DE 1 A 4 ASOCIACIONES AL SER TRADADAS CON SnCl<sub>2</sub>

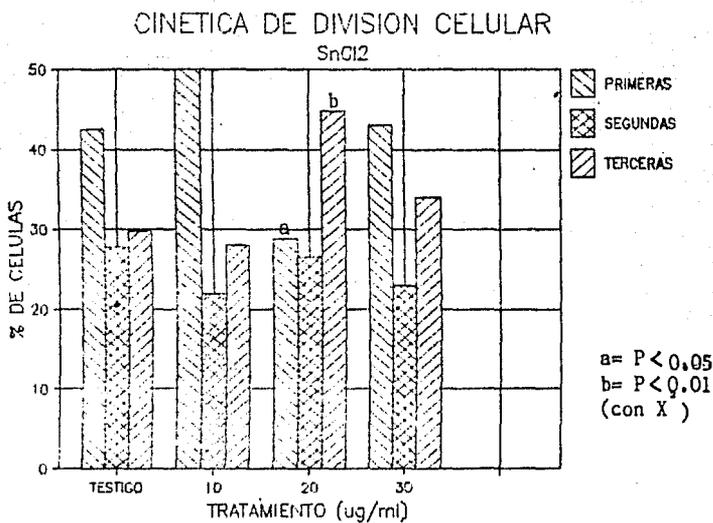
TRATAMIENTOS (ug/ml)	% DE CELULAS CON 1 A 4 ASOCIACIONES			
	1	2	3	4
TESTIGO	64.38	30.13	5.47	--
10	51.54	38.14	9.27	1.03
20	68.42	30.52	1.05	--
30	60.56	38.02	1.40	--

TABLA IV.- PORCENTAJE DE ASOCIACIONES CON 2 A 6 CROMOSOMAS POR COMPLEJO INDUCIDOS POR EL SnCl<sub>2</sub>.

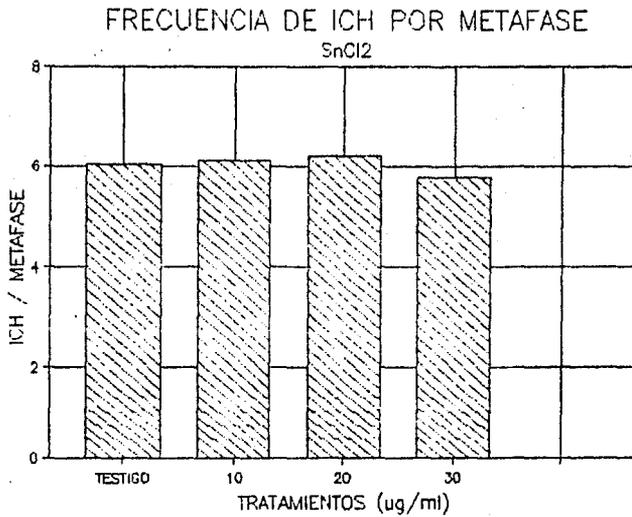
TRATAMIENTOS (ug/ml)	CROMOSOMAS POR ASOCIACION				
	2	3	4	5	6
TESTIGO	89.47	10.52	--	--	--
10	83.62	14.03	2.33	--	--
20	83.20	12.00	4.00	0.80	--
30	78.64	19.41	0.97	--	0.97



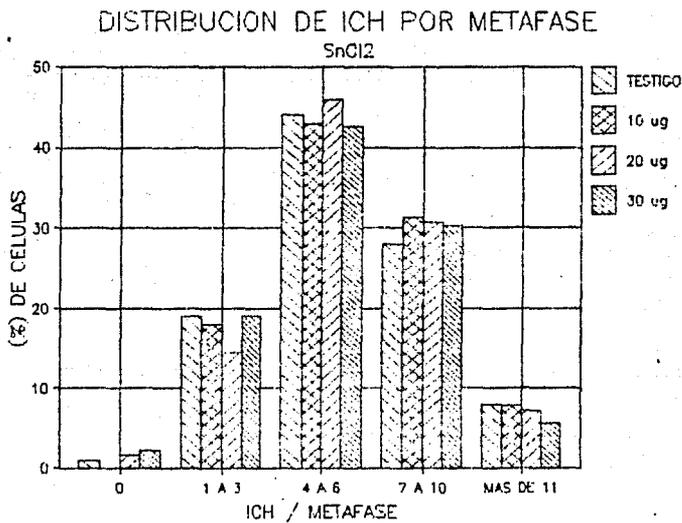
Graf.1- PORCENTAJE DE CELULAS EN MITOSIS, TRATADAS CON CLORURO DE ESTAÑO DURANTE 48 HORAS



Graf.2- PORCENTAJE DE CELULAS EN DIVISION, TRATADAS CON CLORURO DE ESTAÑO DURANTE 48 HORAS



Graf.3- FRECUENCIA DE ICH POR METAFASE EN CELULAS TRATADAS CON CLORURO DE ESTAÑO DURANTE 48 HORAS.



Graf.4- PORCENTAJE DE CELULAS CON ICH , INDUCIDOS POR EL CLORURO DE ESTAÑO

TABLA V.- ALTERACIONES CROMOSOMICAS INDUCIDAS POR EL PENTOXIDO DE VANADIO EN CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS *IN VITRO*.

TRATAMIENTOS (ug/ml)	MITOSIS CON ABERRACIONES (%)	FRAGMENTOS SEN- CILLOS (%)	OTRAS (%)†	GAPS (%)	POLIPLO- DIAS (%)
TESTIGO	4.87	1.24	0.35	1.24	1.77
2	2.25	0.68	--	0.68	2.21
4	3.22	2.41	--	0.80	2.46
6	--	--	--	--	1.53

† = PULVERIZACIONES, TRIRADIOS, ANILLOS ,ETC.

TABLA VI.- ASOCIACIONES DE SATELITES EN CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS *IN VITRO* CON PENTOXIDO DE VANADIO.

TRATAMIENTOS (ug/ml)	CELULAS CON AS (%)	ASOCIA- CIONES TALES (X)	CROMOSO- MAS TD- TALES A- SOCIADOS (%)	CROMOSO- MAS "D" ASOCIA- DOS. (%)	CROMOSO- MAS "G" ASOCIA- DOS. (%)
TESTIGO	34.37	32.50	9.37	60.00	40.00
2	44.52	48.00c	14.24	54.32	45.67
4	48.00a	40.50	13.68	55.78	44.21
6	48.78a	42.00b	15.28a	57.44	42.55

a = P < 0.05 (con diferencia de proporciones)

b = P < 0.05 (con X<sup>2</sup>)

c = P < 0.01 (con X<sup>2</sup>)

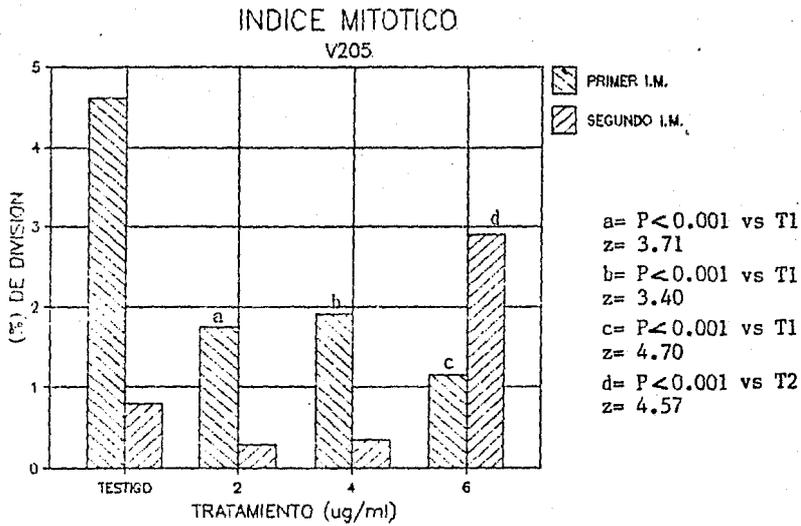
TABLA VII.- PORCENTAJE DE CELULAS QUE PRESENTAN DE 1 A 3 ASOCIACIONES AL SER TRATADAS CON V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

TRATAMIENTOS (ug/ml)	(%)	DE CELULAS CON 1 A 3 "AS"		
		1	2	3
TESTIGO		84.61	13.84	1.53
2		66.17 <sup>b</sup>	29.41 <sup>c</sup>	4.41
4		67.21 <sup>a</sup>	32.78 <sup>a</sup>	--
6		63.93 <sup>b</sup>	34.42 <sup>b</sup>	1.63

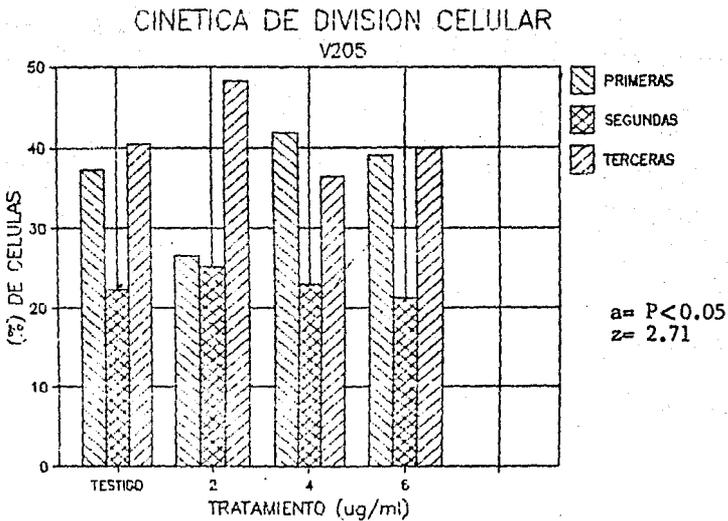
a = P < 0.01  
 b = P < 0.001  
 c = P < 0.05

TABLA VII.- PORCENTAJE DE ASOCIACIONES QUE PRESENTAN DE 2 A 5 CROMOSOMAS POR COMPLEJO INDUCIDOS POR EL V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

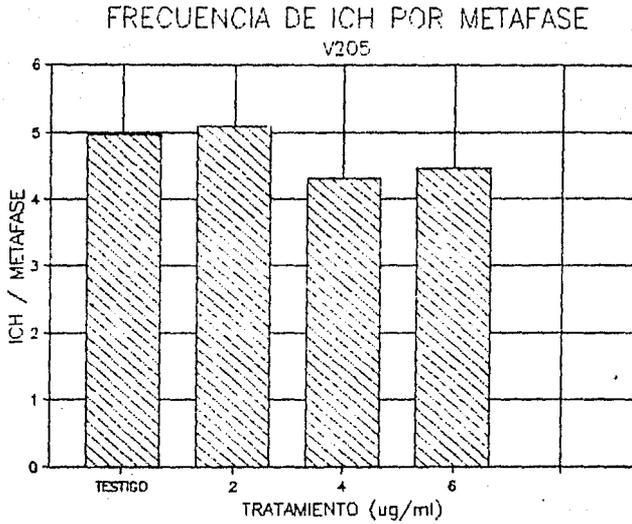
TRATAMIENTOS (ug/ml)	CROMOSOMAS POR ASOCIACION			
	2	3	4	5
TESTIGO	76.92	20.00	3.07	--
2	81.25	14.58	--	2.08
4	88.88	11.11	--	--
6	82.14	13.09	3.57	1.19



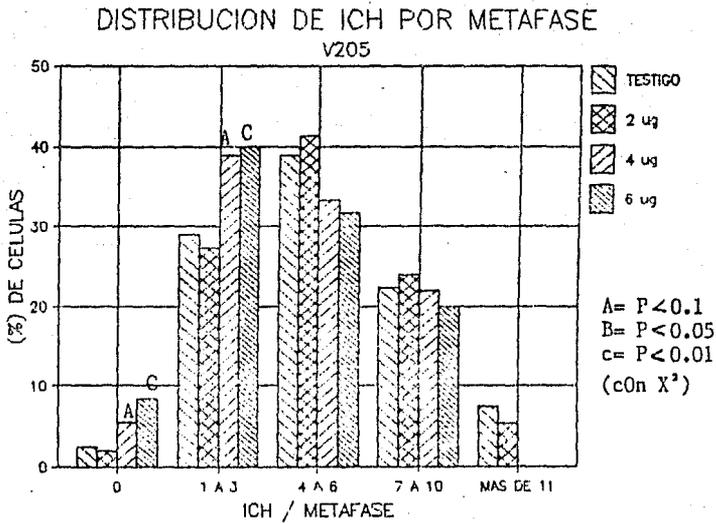
Graf.5- PORCENTAJE DE CELULAS EN MITOSIS, TRATADAS CON PENTOXIDO DE VANADIO, DURANTE 48 HORAS



Graf.6- PORCENTAJE DE CELULAS EN DIVISION, TRATADAS CON PENTOXIDO DE VANADIO, DURANTE 48 HORAS



Graf.7- FRECUENCIA DE ICH POR METAFASE EN CELULAS TRATADAS CON PENTOXIDO DE VANADIO, DURANTE 48 HORAS



Graf.8- PORCENTAJE DE CELULAS CON ICH, INDUCIDOS CON PENTOXIDO DE VANADIO .

TABLA IX.- ALTERACIONES CROMOSOMICAS INDUCIDAS POR EL CLORURO DE MANGANESO EN CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS *IN VITRO*.

TRATAMIENTOS (ug/ml)	MITOSIS CON ABERRACIONES. (%)	FRAGMENTOS SEN CILLOS. (%)	FRAGMENTOS DODOS. BLES. (%)	OTRAS (%)†	GAPS (%)	POLIPLOIDIAS. (%)
TESTIGO	4.00	2.29	1.14	--	0.57	0.56
10	14.00 <sup>a</sup>	10.68 <sup>a</sup>	2.07	1.05	1.03	2.16
20	7.90	4.90	0.61	--	2.45 <sup>a</sup>	2.09
30	11.00 <sup>a</sup>	9.55 <sup>a</sup>	--	--	1.47	2.53

† = PULVERIZACIONES, IRRADIACIONES, ANILLOS, ETC.

<sup>a</sup> = P < 0.05 (con diferencia de proporciones)

<sup>b</sup> = P < 0.001

TABLA X.- ASOCIACIONES DE SATELITES EN CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS *IN VITRO* CON CLORURO DE MANGANESO.

TRATAMIENTOS (ug/ml)	CELULAS CON AS (%)	ASOCIACIONES TOTALES (X)	CROMOSOMAS TOTALES ASOCIADOS (%)	CROMOSOMAS "D" ASOCIADOS. (%)	CROMOSOMAS "G" ASOCIADOS. (%)
TESTIGO	69.75	81.50	20.00	70.45	29.54 <sup>a</sup>
10	72.53	101.50 <sup>a</sup>	22.27	71.62	28.37 <sup>a</sup>
20	57.31	63.00	17.01	69.89	30.10 <sup>a</sup>
30	69.85	61.50	20.07	66.66	33.33

<sup>a</sup> = P < 0.05 (con X<sup>2</sup>)

TABLA XI.- PORCENTAJE DE CELULAS QUE PRESENTAN DE 1 A 4 ASOCIACIONES AL SER TRATADAS CON  $MnCl_2$ .

TRATAMIENTOS ( $\mu g/ml$ )	% DE CELULAS CON 1 A 3 ASOCIACIONES		
	1	2	3
TESTIGO	68.03	30.32	1.63
10	64.74	27.33	7.91 <sup>a</sup>
20	67.02	31.91	1.06
30	72.63	25.26	2.10

<sup>a</sup> =  $P < 0.001$

TABLA XII.- PORCENTAJE DE ASOCIACIONES CON 2 A 5 CROMOSOMAS POR COMPLEJO INDUCIDO POR EL  $MnCl_2$ .

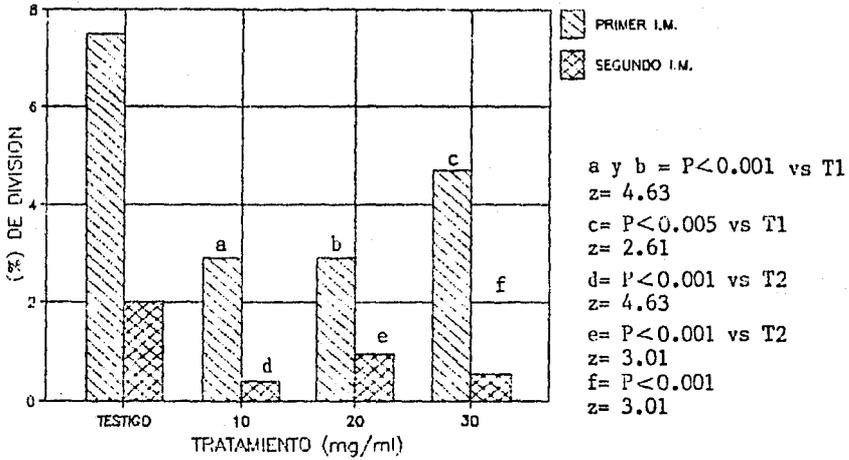
TRATAMIENTO ( $\mu g/ml$ )	% DE CROMOSOMAS POR ASOCIACION			
	2	3	4	5
TESTIGO	85.88	12.88	0.61	0.61
10	85.71	12.80	1.47	--
20	73.30	19.41 <sup>a</sup>	0.79	--
30	80.48	17.07	2.43 <sup>b</sup>	--

<sup>a</sup> =  $P < 0.1$

<sup>b</sup> =  $P < 0.05$

## INDICE MITOTICO

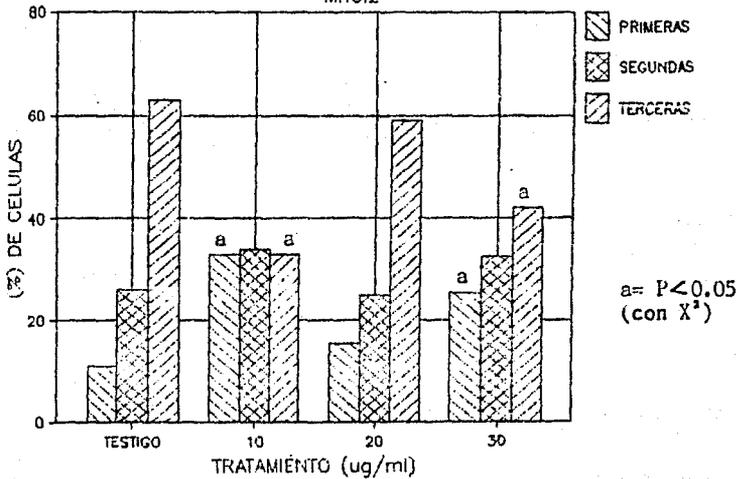
MnCl<sub>2</sub>



Graf.9- PORCENTAJE DE CELULAS EN MITOSIS, TRATADAS CON CLORURO DE MANGANESO DURANTE 48 HORAS.

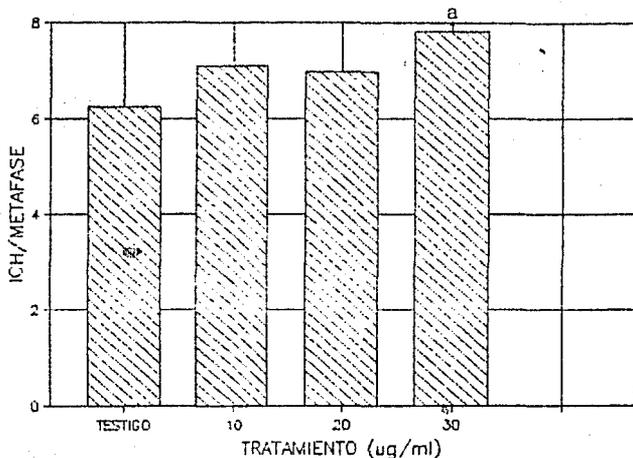
## CINETICA DE DIVISION CELULAR

MnCl<sub>2</sub>



Graf.10- PORCENTAJE DE CELULAS EN DIVISION, TRATADAS CON CLORURO DE MANGANESO DURANTE 48 HORAS.

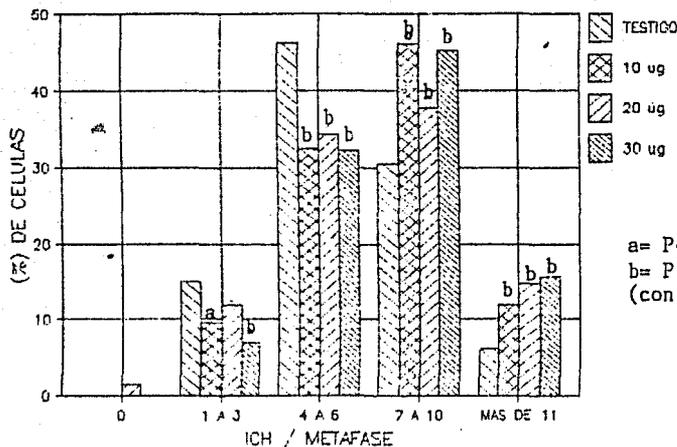
FRECUENCIA DE ICH POR CELULA  
MnCl<sub>2</sub>



a= P<0.05  
(con "t" de Student)

Graf.11- FRECUENCIA DE ICH POR METAFASE EN CELULAS TRATADAS CON CLORURO DE MANGANESO, DURANTE 48 HORAS

DISTRIBUCION DE ICH POR METAFASE  
MnCl<sub>2</sub>



a= P<0.1  
b= P<0.05  
(con X<sup>2</sup>)

Graf.12- PORCENTAJE DE CELULAS CON ICH, INDUCIDOS CON CLORURO DE MANGANESO

SINTESIS DE ADN

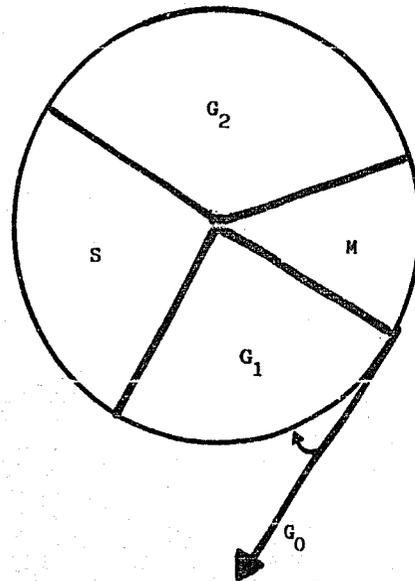


FIG. 1 CICLO CELULAR. D, G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub> SON LOS ESTADOS DEL CICLO CELULAR.  
G<sub>0</sub> REPRESENTA EL ESTADO DE DIFERENCIACION Y NO DIVISION DE LAS  
CELULAS.

(TOMADO DE BRADBURY et al., 1981)

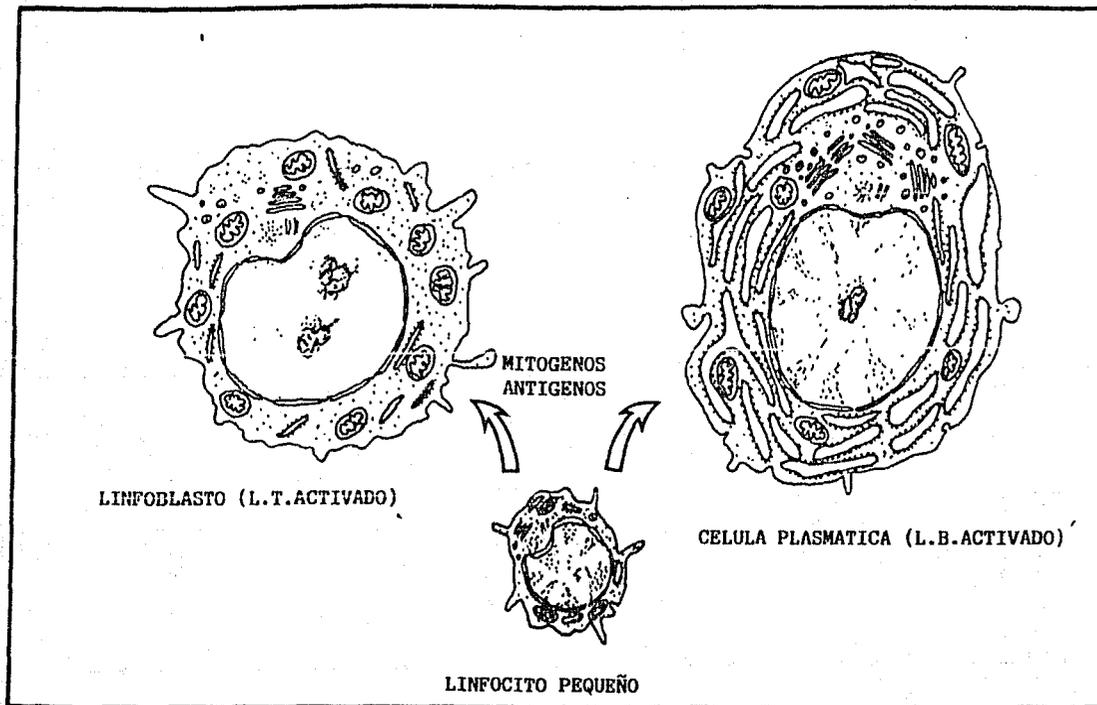
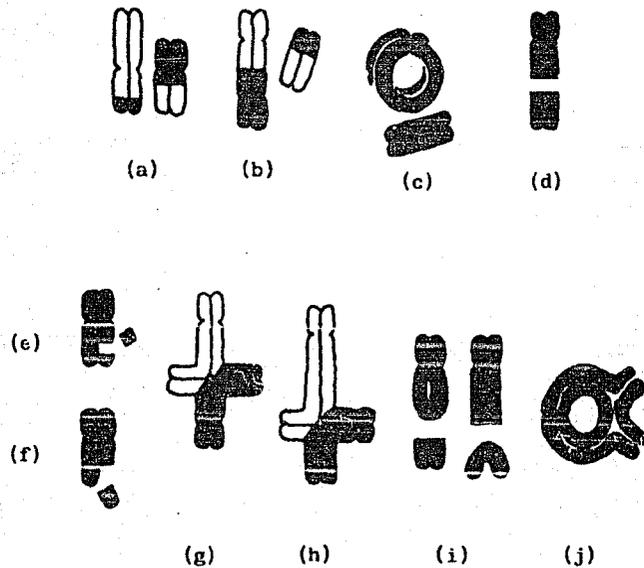


FIG. 2 Activación del linfocito pequeño por antígenos o mitógenos y origen de los linfocitos T y B .



**FIG. 3 EJEMPLO DE ALGUNAS ABERRACIONES CROMOSOMICAS Y CROMATIDICAS OBSERVABLES EN METAFASE.**

(a) Traslocación balanceada, (b) Cromosoma dicéntrico con fragmento, (c) Cromosoma en anillo con fragmento, (d) Delección, (e) Delección intersticial, (f) Delección terminal, (g) Intercambio simétrico, (h) Intercambio asimétrico, (i) Delecciones isocromatídicas, (j) Intercambios intrabrazos asimétricos.

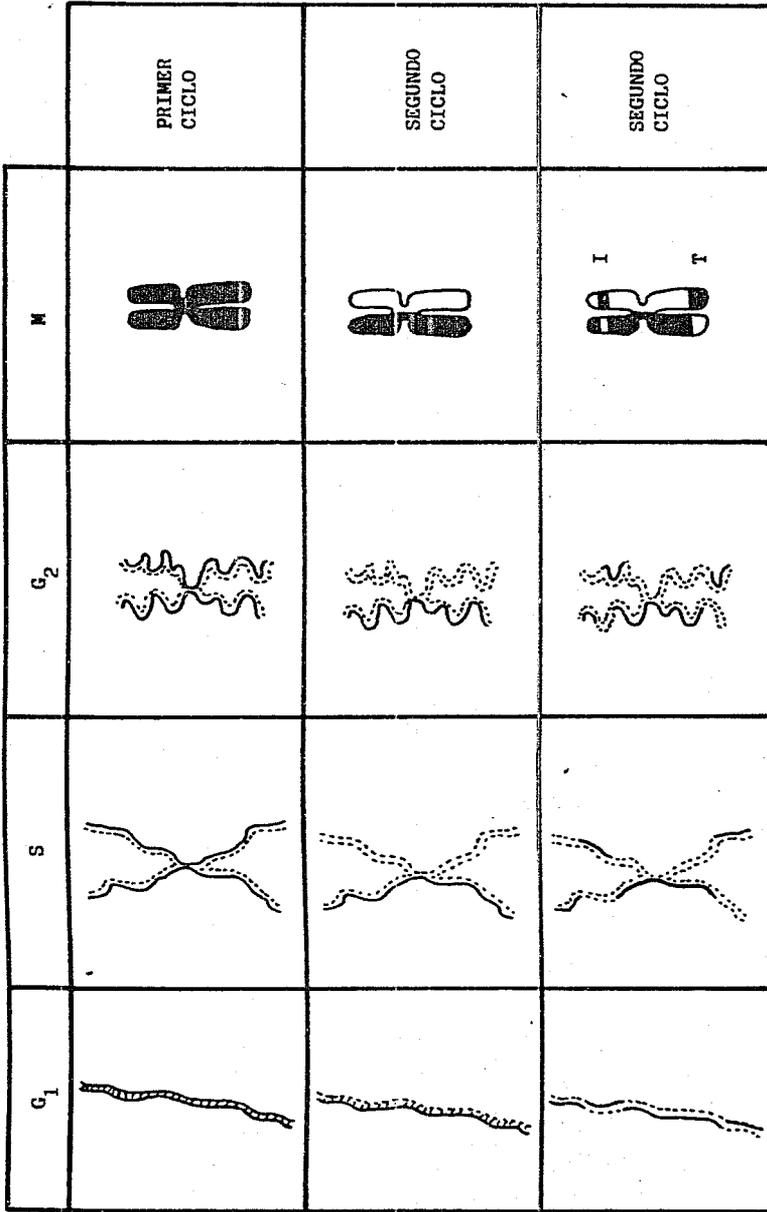


FIG. 4 Incorporación de BrdU (—) en cromosomas de linfocitos humanos durante dos ciclos de replicación: (A) Primer ciclo, (B) Segundo ciclo, (C) Segundo ciclo mostrando un intercambio terminal (T) y uno intersticial (I).

(A)

(B)

(C)

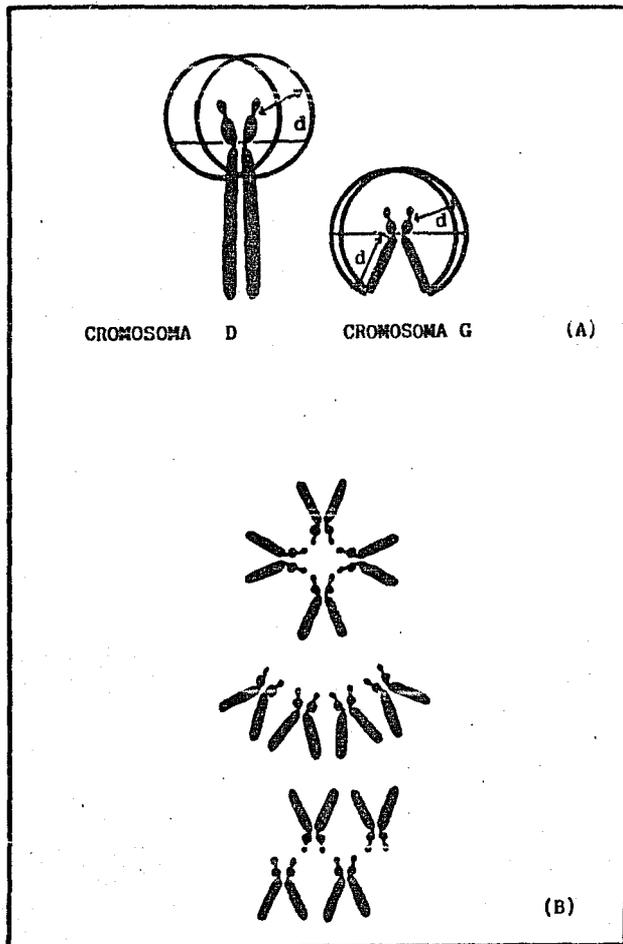


FIG. 5 Criterios de asociación entre los cromosomas acrocéntricos (A)  
 d= longitud del brazo largo del cromosoma G de la metafase en cuestión

Diferentes tipos de asociaciones entre 4 cromosomas acrocéntricos (B).

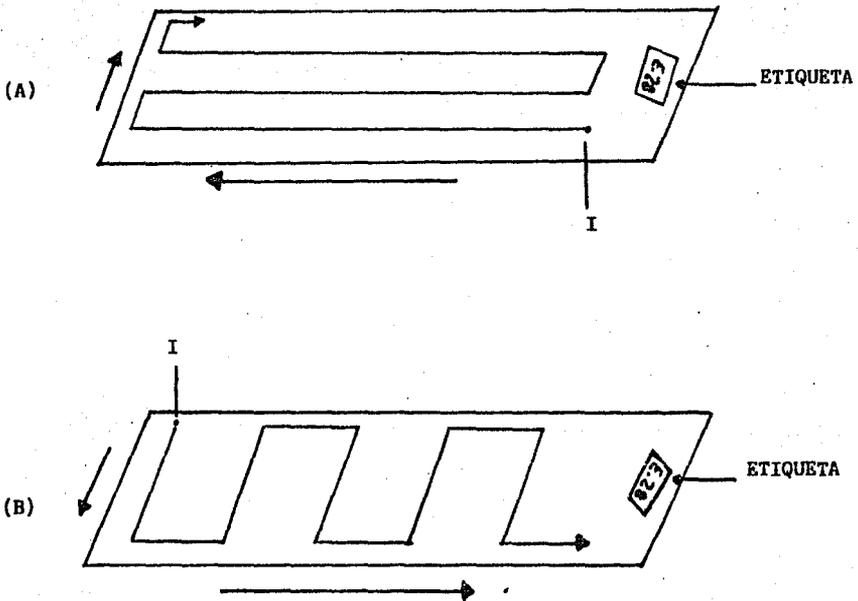
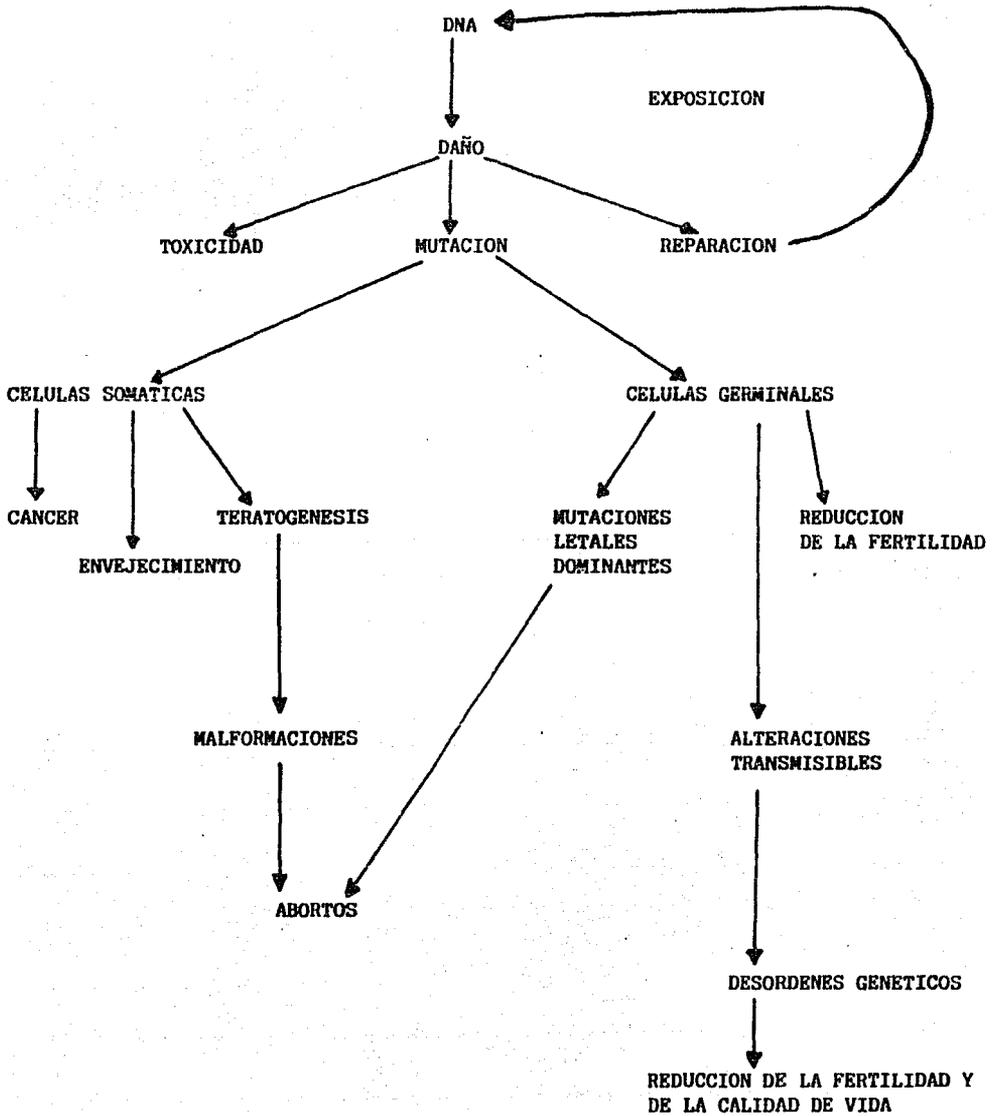


FIG. 6 METODOS DE OBSERVACION DE INDICE MITOTICO

- (A) Tomando como referencia la etiqueta de la laminilla el conteo se realizó de derecha a izquierda en forma ascendente.
- (B) Tomando el mismo punto de referencia, pero en este caso el conteo se realizó de izquierda a derecha en forma descendente.

I= Punto de inicio.

FIG. 7 POSIBLES MANIFESTACIONES DE LAS MUTACIONES EN EL HOMBRE



(Tomado de: Tice, R.R., 1986)

ABERRACIONES TIPO CROMOSOMICO	ABERRACIONES TIPO CROMATIDICO
DELECCIONES TERMINALES	GAPS CROMATIDICOS E ISOCROMATIDICOS
MINUTAS	ROMPIMIENTOS
ANILLOS ACENTRICOS	MINUTAS
ANILLOS CENTRICOS	ANILLOS
INVERSIONES: a) Paracéntricas b) Pericéntricas	ANILLOS CENTRICOS
TRASLOCACIONES RECIPROCAS	ABERRACIONES ISOCROMATIDICAS
ABERRACIONES DICENTRICAS O POLICENTRICAS	INTERCAMBIOS SIMETRICOS
	INTERCAMBIOS ASIMETRICOS
	INVERSIONES

**CUADRO 1 CLASIFICACION DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS ESTRUCTURALES.**

(Tomado de: Evans, H.J. y O'Riordan, M.L., 1975).

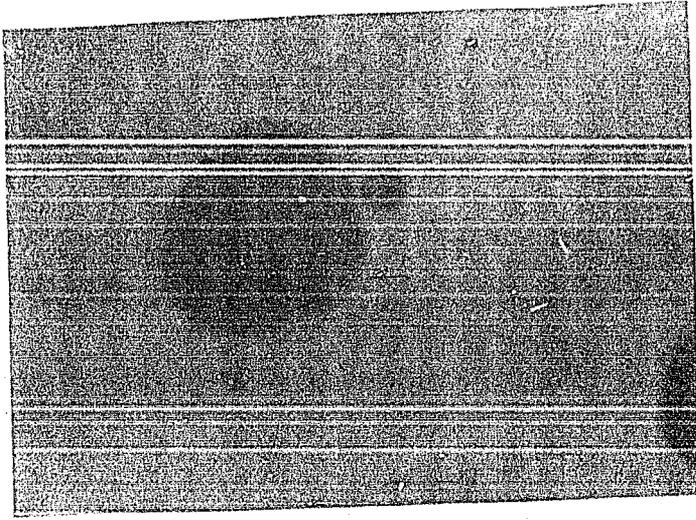


FOTO 1 Célula en interfase con un micronúcleo

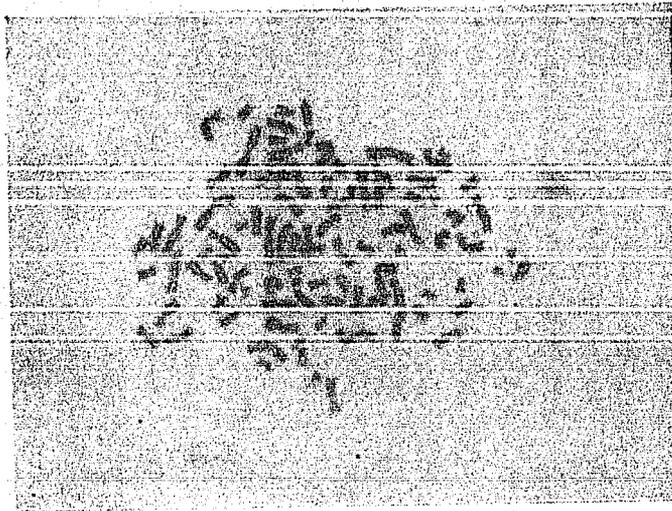


FOTO 2 Metafase en primea división poliploide

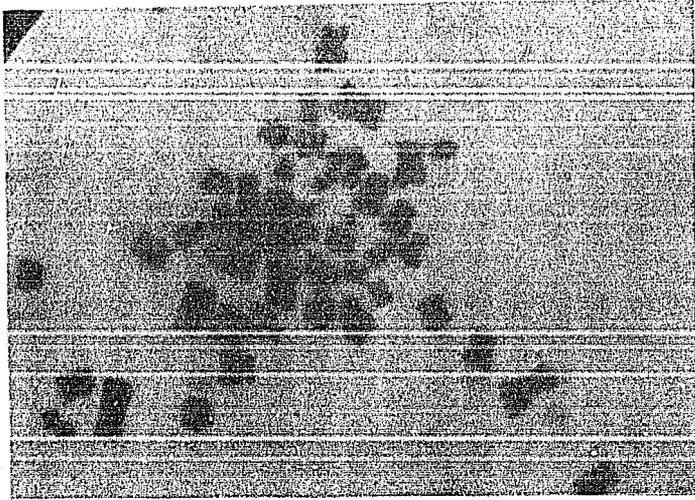


FOTO 3 Metafase en primera división endorreduplicada

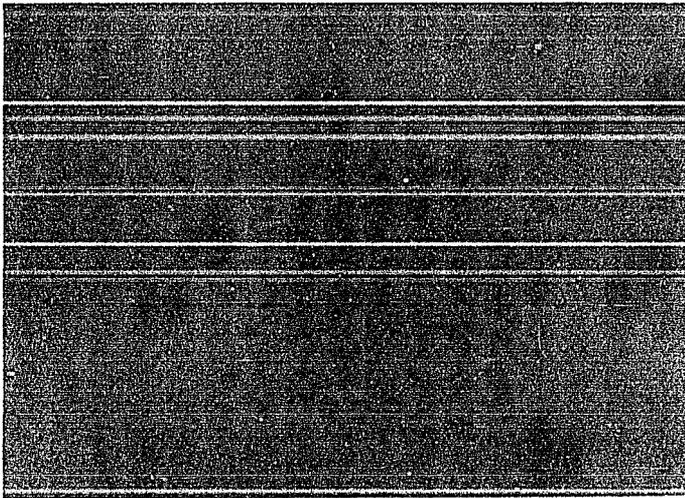


FOTO 4 Metafase poliploide pulverizada

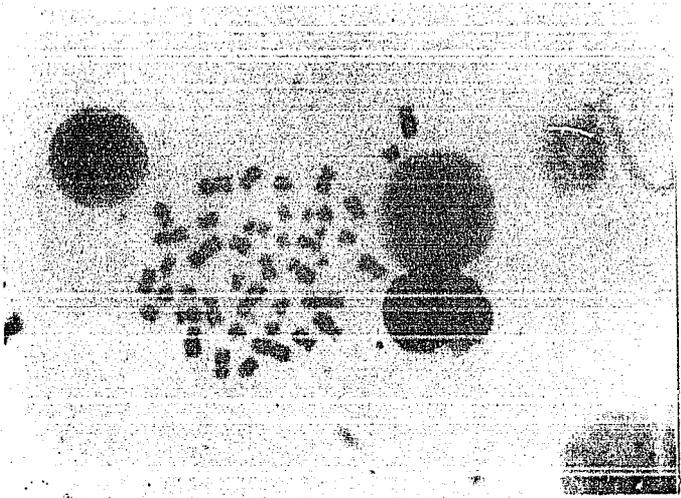


FOTO 5 Metafase en primera división

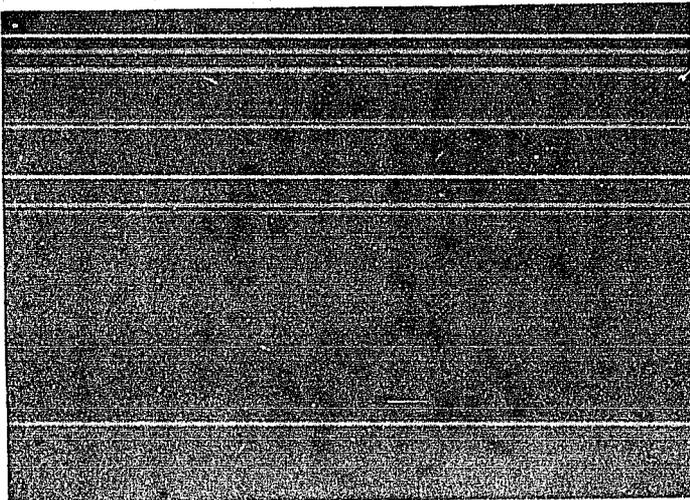
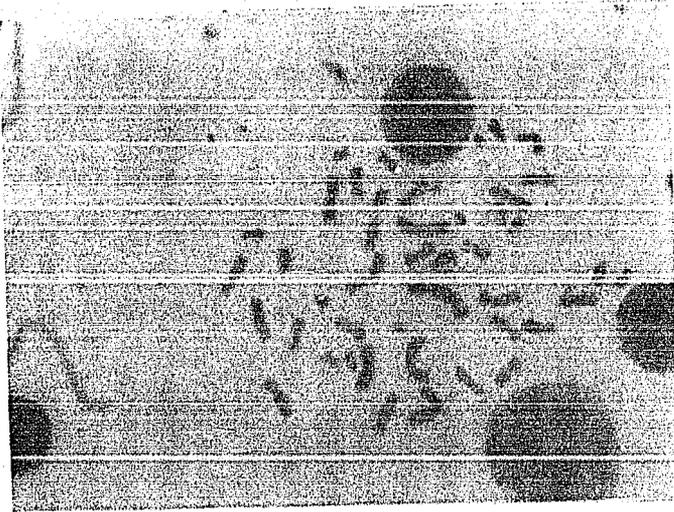


FOTO 6 Metafase en segunda división



**FOTO 7 Metafase en tercera división**