



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

213  
24

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIATURA EN

B I O L O G I A

PRESENTA:

LIBIA VEGA LOYO

CON EL TÍTULO:

EL ARSENICO EN LA PROLIFERACION "IN VITRO"  
DE LINFOCITOS HUMANOS

DIRECTOR:

M. EN C. MARIA EUGENIA GONSEBATT B.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.  
FACULTAD DE CIENCIAS.  
BIOLOGIA.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.

## INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
El arsénico, fuente de exposición y efectos	4
El cultivo de linfocitos como modelo experimental	13
Ciclo celular del linfocito	15
Evaluación de la proliferación celular y del daño genético	18
JUSTIFICACION	21
HIPOTESIS	22
OBJETIVO	22
MATERIAL Y METODOS	23
DISEÑO EXPERIMENTAL	23
PROCEDIMIENTO	25
Obtención y preparación de muestras	25
Cultivo de muestras	25
Cosecha	26
Preparación de laminillas	26
Tinción	27
Tratamientos	28
A.- Linfocitos en proliferación	28
B.- Linfocitos en G <sub>1</sub>	29
C.- Linfocitos en G <sub>0</sub>	29
METODOS ESTADISTICOS	30
ANALISIS DE LAMINILLAS	31
INDICE MITOTICO	31
PROLIFERACION CELULAR	31
INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS	32
RESULTADOS	37
DISCUSION	49
CONCLUSION	54
COMENTARIOS	55
TABLA DE ABREVIATURAS	56
BIBLIOGRAFIA	57

## RESUMEN

Existen poblaciones expuestas a altos niveles de arsenico en el agua de bebida que presentan lesiones en la piel y signos avanzados de cancer. En estas poblaciones se encontro una cinetica de proliferacion linfocitaria disminuida en relacion a los controles. con base en estos hallazgos se decidio comprobar si esta alteracion en la cinetica era debida al arsenico, para lo que se realizo el presente trabajo, utilizando sales arsenicales ( $\text{NaAsO}_2$  -  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ) en distintas concentraciones ( $1 \times 10^{-9}\text{M}$ ,  $1 \times 10^{-6}\text{M}$  y  $1 \times 10^{-3}\text{M}$ ) y a distintos tiempos de tratamiento (2, 4, 6 y 24 horas) y con el sistema de cultivo de linfocitos de sangre periferica estimulados con PHA y sin estimular.

Los datos de este trabajo muestran que el arsenico es capaz de inhibir la respuesta mitogenica de los linfocitos cuando han estado expuestos a el por 24 horas en fase  $\text{G}_0\text{-G}_1$ .

Tambien se observo una disminucion de la cinetica de proliferacion de los linfocitos dependiente de la dosis utilizada cuando se encontraban proliferando activamente.

## INTRODUCCION

La vida en la Tierra está dada por un continuo tráfico de información del medio a los organismos y de los organismos al medio. La vida es mantenida gracias a la interacción con el medio y éste es transformado en esta relación. El ambiente es un factor determinante para el desarrollo de los seres vivos y se encuentra constantemente en interacción con ellos. El medio es, más que una barrera aislante entre los organismos, una continuidad de espacio sobre el que éstos nacen, crecen, se reproducen y mueren sin dejar de perder el contacto con él en ningún momento y, en realidad, al morir se convierten en parte del mismo para los demás individuos.

El ambiente proporciona las condiciones y nutrientes para el desarrollo de los organismos pero, de igual manera, puede prevenirlo o alterarlo poniéndolos en situación desventajosa y, en ocasiones, al borde de la muerte.

Los seres humanos, como todo organismo vivo, también dependemos de este ambiente para sobrevivir, pero hemos sido capaces de alterar sus condiciones de una manera tal que a veces puede ser muy peligrosa y escapar a nuestro control.

La epidemiología acumula cada vez más evidencia que relaciona cierto tipo de padecimientos como el cáncer, la

diabetes o la arterioesclerosis con la exposición a agentes ambientales (1). Estos "factores de riesgo" han aumentado por la actividad humana, es decir, como producto del desarrollo de la tecnología y del gran avance científico de nuestra época.

Es debido a esto que algunos tipos de contaminantes, como es el caso de algunos metales, han elevado sus niveles en el ambiente, y el ser humano entra en contacto con ellos cada vez con mayor frecuencia, por lo que es importante conocer sus efectos en los organismos ya que muchos de ellos, además de ser tóxicos a corto plazo, son acumulables, de tal manera que también sus efectos a largo plazo pueden tener graves consecuencias para la salud.

La exposición humana a metales y metaloides (como lo son el Arsénico, Selenio, Berilio, Cromo, Cadmio, Niquel, Plomo y Mercurio) puede proceder de diversas fuentes tales como exposición ocupacional (2), ambiental (3) o factores de dieta (4) siendo esta última la de mayor importancia ya que se ha sugerido que hasta el 70% de todos los cánceres humanos pueden estar asociados con factores de dieta (1). Además, el arsénico junto con el cromo y el níquel están considerados como carcinógenos humanos por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) por lo que la exposición a ellos o a los compuestos que forman, implica un riesgo para la salud (5).

## El arsenico, fuentes de exposici3n y efectos

En algunos lugares de la Tierra, en donde existen dep3sitos de azufre, el arsenico est3 presente como sulfuro de ars3nico y como arseniuro de alg3n metal, estado en el cual es capaz de contaminar dep3sitos subterrneos de agua de los que se abastecen, en ocasiones, gran parte de algunas ciudades.

Adem3s de esta fuente natural de ars3nico, 3ste se libera al ambiente durante la fundici3n de metales, combusti3n de carb3n mineral, producci3n de vidrio, semiconductores y otros procesos industriales (6, 7) (fig. 1).

En la agricultura se usa como plaguicida, fungicida y herbicida. Tambi3n se ha usado extensamente en el tratamiento de algunas enfermedades como anemia, pelagra, asma y reumatismo (8). El ars3nico, adem3s de ser un toxico general, ha demostrado ser un agente genot3xico capaz de producir da3o mutag3nico, carcinog3nico y teratog3nico en algunos sistemas de prueba (9, 10, 11, 12, 13, 14).

La naturaleza quimica del ars3nico en el medio ambiente no es muy conocida, en muchas 3reas urbanas y suburbanas el

arsénico se encuentra como una mezcla de arsénico inorgánico tri y pentavalente, predominando esta última en la gran mayoría de los casos. Por otro lado, se sabe que la forma química del arsénico ya metabolizado por el hombre es un derivado dimetilado, que comúnmente se denomina ácido cacodílico (15, 16).

Existen, como se mencionaron antes, diversas formas a través de las cuales el humano puede estar expuesto al arsénico, las de mayor interés para la salud pública son la inhalación y la ingestión de compuestos arsenicales.

La inhalación es una vía indirecta que se da principalmente dentro del campo laboral, por lo que se podría considerar que son poblaciones específicas y conocidas las que están expuestas a esta forma de contaminante (17). La ingestión es una vía directa y es la principal fuente de exposición para las poblaciones al consumir alimentos o agua contaminada y no siempre son pequeñas o están controladas. Por ejemplo, en los depósitos subterráneos de agua el arsénico llega a alcanzar concentraciones de hasta 1100 ug/litro, siendo la concentración máxima permitida por el servicio de salud pública de los Estados Unidos de América de 50 ug/litro en el agua potable (18).

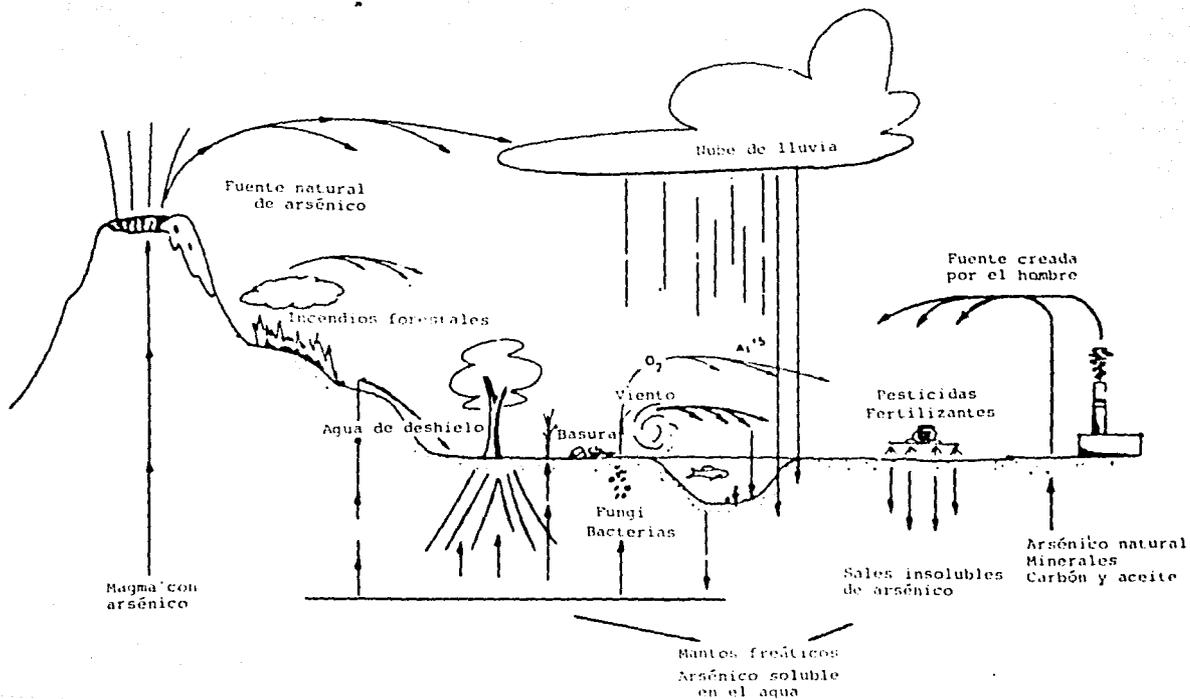


Fig. 1 Fuentes y ciclo del arsénico en el ambiente (fishbein 1986) (30)

Estudios epidemiológicos muestran que en poblaciones humanas, la exposición crónica al arsénico esta asociada a una elevada incidencia de cáncer de piel, de vejiga (por ingestión) y cáncer broncogenico (por via respiratoria). Sin embargo, hasta el momento no se ha podido demostrar experimentalmente en algunos animales el efecto carcinogenico del arsénico (9, 19, 20).

Hay evidencias que demuestran diferencias en el metabolismo del arsénico entre el ser humano y algunas especies animales. Se ha encontrado que la absorcion, distribución, metabolismo y excreción del arsénico dependen de una gran cantidad de factores tanto fisiológicos como ambientales, lo que podría explicar en parte, las diferencias en la toxicidad de este compuesto en las distintas especies estudiadas (21, 22, 23, 24, 25).

Se ha tenido una preocupación constante por descubrir los mecanismos por los cuales algunos metales son capaces de producir daños mutagénicos y carcinogenicos ya que se piensa que permitirian comprender parte de los efectos biológicos que se observan por la exposicion a ellos. Algunas posibles explicaciones se han dado ya a algunos de estos fenómenos, pero para otros metales aún no se ha llegado a conocer el proceso y se especula sobre ellos.

Se ha observado por ejemplo, que el arsénico afecta la

oxidación en las mitocondrias de las células, puesto que estimula a la ATPasa de la mitocondria y la oxidación en la ausencia de fosfato inorgánico (26).

En la división celular los efectos del metal incluyen alteraciones en el huso mitótico, detención de las células en metafase, formación poliploide, formaciones diplocromatídicas, cromosomas rezagados y, finalmente, un decremento en el índice mitótico (27). Algunas de estas respuestas pueden ser atribuidas a la afinidad de los metales por los ligandos de sulfuro (28) y, consecuentemente, por las proteínas del huso mitótico (29).

Se ha propuesto que el mecanismo de acción de algunos metales (Cr, Ni, Cd y Co) está relacionado con la capacidad de éstos para desplazar al magnesio de los sitios activos de las enzimas que intervienen en la replicación y que, debido a esto, la identificación de las bases en la transcripción no se lleva a cabo correctamente (28, 30, 31, 32).

Otro tipo de interacción que se postula como causante del daño genético a las células es aquél en la que el metal produce un aducto (bloquea la apertura de las cadenas) en el ADN (ácido desoxirribonucleico) que impide que se realice una replicación completa del mismo. En este sentido se ha observado que algunos iones metálicos son capaces de reaccionar con el grupo fosfato de los nucleótidos e incluso

los nucleósidos y que este tipo de interacciones estabilizan y vuelven rígida a la hélice de ADN; algunas veces estas uniones pueden resultar en la formación de macro-anillos (30). Considerando lo anterior como un mecanismo de acción, se puede explicar fácilmente la inducción de aberraciones cromosómicas por algunos metales.

En algunos estudios de laboratorio se ha observado que el arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ) en cultivos de linfocitos humanos es capaz de detener la división celular en las fases S y  $G_2$  y altera la segregación cromosómica por lo que se piensa que interfiere con los microtúbulos. El tratamiento "in vitro" con arsénico, produce una disminución en la proliferación de linfocitos humanos medida por la cantidad de timidina tritiada que se incorpora a los cultivos (33).

En otro sistema, Wan y colaboradores (34) encontraron una disminución en el ciclo de proliferación celular en cultivos de células de ovario de hamster chino (CHO) cuando se trataron con  $\text{NaAsO}_2$ , esta inhibición del crecimiento presentó una relación directa con la cantidad de arsenito de sodio administrada.

Wen y col. encontraron que, cuando cultivos de linfocitos de individuos normales y con la enfermedad de pie negro, eran tratados con arsenito de sodio, se inhibía la cinética de proliferación celular (35).

También McCabe y col. (36) han hecho aportaciones en este sentido utilizando incorporación de timidina en sus cultivos y obteniendo resultados similares.

Se ha reportado que este metal puede producir también rompimientos en el ADN al incorporarse en vez del fósforo, causar aberraciones cromosómicas (AC), inducir intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y actuar comutagénicamente con otros compuestos (29, 33, 37, 38, 39, 40).

Tal como se muestra en la tabla 1, ya han sido probados una gran cantidad de compuestos arsenicales principalmente en cuanto a su producción de aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y mutaciones dominantes letales en mamíferos e incluso el ser humano, obteniéndose resultados algunas veces contradictorios.

En general, se puede decir, que ha sido más estudiada la inducción de AC y de ICH (41, 42) que su efecto sobre la proliferación celular (43), dado que ambos parámetros se utilizan como indicadores de daño al material genético. Sin embargo es importante recordar que los estudios de proliferación celular son modelos ampliamente utilizados en la investigación de factores que puedan inducir o inhibir la división celular, eventos indispensables en los procesos de transformación y promoción carcinogénicas, así también como

TABLA NO. 1

ESTUDIOS DE LA ACCION DEL ARSENICO Y SUS COMPUESTOS SOBRE CROMOSOMAS DE DIFERENTES TIPOS CELULARES SEGUN GEBHART, 1969 (48).

COMPUESTO	SISTEMA DE PRUEBA	DOSES (RANGO)	CLASTOGENICIDAD ICH
KAsO <sub>2</sub> /Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub>	<u>Vicia faba</u>	0.2/1ppm	+
NaAsO <sub>2</sub> /Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub>	Hamster sirio	10-7M/10-5M	++, +
	Hamster chino (ovario)	10-6M/10-5M	++, +
	Linfocitos humanos en cultivo	"	+, +
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	LHC y Fibroblastos humanos	10-7M/10-6M	+
AsCl <sub>3</sub>	LHC y FHC	"	+
NaAsO <sub>2</sub>	LHC y FHC	10-9M/10-6M	+, ±
Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub>	LHC y FHC	10-7M/10-6M	+, ±
H <sub>2</sub> AsO <sub>4</sub>	FHC	"	+
As <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	LHC	"	+
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Medula, espermatozoides de ratón	4-12mg/Kg	-
As atmosferico	Feto de ratón	28mg/m <sup>3</sup> inh.	+
NaAsO <sub>2</sub>	Medula, espermatozoides de ratón	0.5-10mg/Kg	+, -
Terapia con As	Linfocitos humanos expuestos		+, +/-
Exp. ocupacional	LH expuestos		+
Agua potable	LH expuestos		-, +

ICH= Intercambio de cromátidas hermanas, AC= Aberraciones cromosómicas,  
 +=Positivo, ++=Fuerte, -=Negativo, ±=Dato contradictorio,  
 LHC= linfocitos humanos cultivados, FHC= fibroblastos humanos cultivados.

los que tienen que ver con la modulación de la respuesta inmune (44, 45, 46).

Existen grupos humanos expuestos a niveles elevados de arsénico en el agua que beben. estas poblaciones se encuentran en diversas ubicaciones geográficas como en China, Sudamérica y en Mexico, en la Comarca Lagunera, localizada entre los estados de Coahuila y Durango. Esto ha permitido estudiar más directamente los efectos de este metaloide en la salud humana. los datos epidemiológicos muestran una alta incidencia de lesiones de diferentes grados en la piel que van desde cambios en la pigmentación y queratosis hasta signos avanzados de cancer, interferencias gastrointestinales, cambios neurológicos y alteraciones en los vasos sanguíneos periféricos (2, 15, 47).

A pesar de que los experimentos de laboratorio muestran una clara actividad mutagénica y comutagénica del arsénico (48, 49, 50, 51, 52), los estudios citogenéticos realizados en cultivos de linfocitos de individuos expuestos por razones ocupacionales o ambientales al metal, no muestran la actividad genotóxica observada "in vitro". Sin embargo en un estudio realizado recientemente en individuos de La Comarca Lagunera, con hidroarsenicismo crónico, se observó que la velocidad de proliferación de los linfocitos de las personas expuestas era significativamente menor que la de los

testigos, diferencia que se puede atribuir a una manifestación biológica de la exposición crónica al metal (53).

#### El cultivo de linfocitos humanos como modelo experimental

Los cultivos de linfocitos humanos estimulados por mitógenos, como la lectina fitohemaglutinina (PHA), no sólo tienen aplicación como sistema de prueba para la detección de mutágenos y/o carcinógenos, ya sea en el laboratorio o en poblaciones expuestas, sino que también se utilizan como modelo en estudios inmunológicos para observar la respuesta de las células linfocitarias a diferentes estímulos (54, 55, 56, 57). Una ventaja adicional que presenta el uso de este tejido es su fácil obtención y manutención una vez extraído.

Los estudios sobre el ciclo de proliferación celular en linfocitos de sangre humana periférica estimulados con fitohemaglutinina (58) y otros mitógenos derivados también de extractos vegetales, como Lens culinaris y Wistarina floribunda, (59) han demostrado que la fitohemaglutinina tiene una mayor capacidad de inducción mitótica. Además de estas variaciones en cuanto a la respuesta del ciclo de proliferación celular (CPC) dependiente del tipo de mitógeno utilizado, se encuentran también variaciones inter-individuales y, en algunos casos, intra-individuales, que se relacionan directamente con el estado fisiológico de los

individuos al momento de tomar las muestras y con otros factores externos a los que se encuentren sometidos en estos períodos.

Dentro de estos estudios, y en relación al estado fisiológico, se pueden mencionar los realizados en individuos con desnutrición calórica, en los cuales se ha encontrado una pequeña elevación de la cinética de proliferación en los linfocitos (60), mientras que en ratas esta desnutrición causa supresión parcial, y en algunos casos, total) de la proliferación (61).

Algunos factores externos que son capaces de disminuir la respuesta mitogénica de los linfocitos son; una alta concentración de contaminantes ambientales (62), la exposición a pesticidas (63), el tratamiento con drogas antineoplásicas (64), la exposición reiterada a rayos X (65) y la presencia de infecciones parasitarias (66) entre otras.

Los linfocitos humanos en la circulación sanguínea se encuentran generalmente en  $G_0$  y para hacerlos proliferar "in vitro" es necesario estimularlos con algún mitógeno, de los cuales, el más usado es la fitohemaglutinina (PHA), una glucoproteína extraída de Phaseolus vulgaris (67). Estas células proliferan en suspensión y llevan a cabo una división celular cada 12-18 horas de cultivo. Se considera que la PHA induce la producción en los linfocitos T (humanos

y de otros mamíferos) de una proteína, la interleucina 2 (68). Este proceso ocurre en  $G_1$ , mientras que en el inicio de la fase S es necesario el consumo de esta proteína para continuar con éxito la división celular (69)(fig.2).

### Ciclo celular del linfocito

El intervalo que transcurre entre una división celular y la siguiente se conoce como ciclo celular. Este proceso incluye el crecimiento celular, la replicación del ADN y la citocinesis. Se ha considerado que el ciclo inicia y termina en la interfase, momento en el cual la célula puede entrar en reposo y detener la división (64).

Dentro del ciclo se pueden observar dos procesos fácilmente identificables como son la replicación del ADN y la división de la célula. Estos eventos permitieron dividir inicialmente al ciclo celular en cuatro etapas denominadas  $G_1$ , S,  $G_2$  y M. Posteriormente se demostró (70) que existe, en algunas líneas celulares, una etapa más, llamada  $G_0$ .

En la fase  $G_0$ , que se considera una etapa de reposo, el contenido de ARN (ácido ribonucleico) es bajo, y se incrementa cuando la célula es inducida a proliferar. Se ha demostrado que los niveles de calmodulina (proteína reguladora de enzimas intracelulares sensibles a calcio), se elevan cuando la célula entra en  $G_0$  (71).

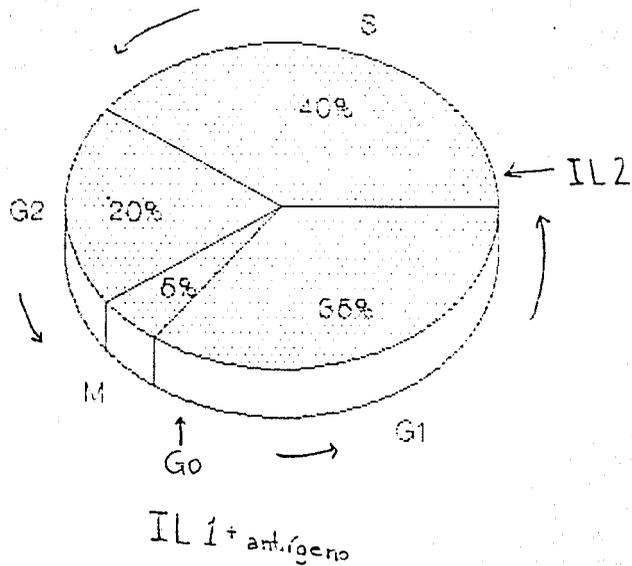


Fig. 2 Fases del ciclo celular del linfocito humano. Go- reposo, S- síntesis de ADN, M- mitosis.(65).

G<sub>1</sub> es una fase de duración variable dependiendo del tipo celular. En esta fase se sintetizan proteínas histonas en pequeñas cantidades. Al final de este periodo, nuevamente se elevan los niveles de calmodulina. Aparentemente los eventos cruciales que controlan la regulación del crecimiento celular ocurren en esta fase, cuya duración puede ir de 1 a 9 horas (72).

La fase S es en la que se da comienzo a la duplicación del material genético y se sintetizan proteínas histonas por un lapso aproximado de 6 a 8 horas. La replicación del material genético se realiza simultáneamente en varios cromosomas y en varios segmentos de un mismo cromosoma. Esta fase se subdivide en tres estadios: en el primero se duplica el 15% del ADN total, en el segundo se duplican preferencialmente las bandas cromosómicas G negativas (claras) y en el tercero las bandas G positivas (oscuras) (73).

El tiempo de duración de la fase G<sub>2</sub> es de 2 a 6 horas aproximadamente y en esta, la célula se prepara para la mitosis por lo que se produce una gran condensación de la cromatina ya duplicada en la fase anterior (74).

La mitosis tiene un tiempo de duración de aproximadamente una hora y corresponde a la división celular propiamente dicha. Consta de varias etapas: profase,

metafase, anafase y telofase (74). Es en el estadio de metafase que es posible detener la división celular con colcemid o colchicina y observar la estructura de los cromosomas que contienen el material genético. La proporción de células que se encuentran en metafase es un indicador de la actividad proliferativa del cultivo y se conoce como índice mitótico (I. M.).

#### Evaluación de la proliferación celular y del daño genético

Existen distintos métodos para medir la proporción de células que proliferen como lo son la incorporación de un análogo radioactivo de base del ADN por ejemplo, timidina tritiada ( $^3\text{HT}$ ) por lo que la cantidad de radioactividad incorporada al material genético es proporcional a la proliferación celular.

Otra técnica más simple es la que utiliza un análogo de base del ADN, la 5-Bromo-desoxiuridina (BrdU) para que las células lo incorporen a su ADN. Los cultivos se detienen con un veneno mitótico (la colchicina o el colcemid) y se cuentan las metafases al microscopio después de haber realizado una tinción diferencial la que permite además de determinar el I.M., identificar metafases de células que han completado un ciclo de división de una célula que ha completado dos, tres o más ciclos "in vitro". Esta técnica de Perry y Wolff (75), se basa en que la BrdU, en una

metafase de primera división, sustituirá una sola de las cadenas de la doble hélice en las cromátidas hermanas de un cromosoma, dejando a la otra cadena con el material original. Los cromosomas en esa metafase adquieren una tinción homogénea.

En la división consecutiva (segunda división), una cromátida de cada cromosoma metafásico tiene una sola cadena de ADN sustituida por el análogo, mientras que la cromátida hermana está sustituida bifilarmente (en las dos cadenas) con Brdu, dando como resultado una proporción de 50% de diferencias en la coloración de los cromosomas. En las divisiones subsecuentes, y a consecuencia de la duplicación semiconservativa del ADN, la proporción de coloración clara con respecto de la oscura, se va haciendo mayor conforme transcurren las divisiones celulares.

Esta técnica permite entonces, determinar la proporción de células que se han dividido una, dos o más veces en un dado tiempo de cultivo, lo cual permite conocer no solo la velocidad de proliferación sino también calcular la duración del ciclo celular "in vitro" (54).

Este fenómeno de tinción diferencial es producido por la fotólisis que sufre el ADN en las cromátidas bisustituidas. La fotólisis ocurre cuando la preparación se expone a la luz ultravioleta después de la tinción con

fluorocromos como el Hoescht 33258, que sensibilizan al ADN que ha incorporado Brdu, aumentando el nivel de fotólisis en éstas (67).

Por esta misma técnica diferencial se pueden visualizar fácilmente los intercambios de cromátidas hermanas (ICH). Estos representan un cambio recíproco de secuencias de ADN en loci homólogos entre cromátidas en el estado de cuatro cadenas, durante la replicación del ADN cromosómico (72).

La inducción de ICH se considera como un indicador de daño genético, puesto que se ha sugerido que la formación de estos permite a las células superar el daño no reparado durante la replicación del material genético. Los mecanismos específicos involucrados en la producción espontánea de ICH no han sido aclarados del todo, pero se han propuesto algunos modelos para ello (76, 77) en los que se producirían rompimientos en las hebras de ADN y una posterior reunión de estas, ya sea por mecanismo de reparación (reparación por recombinación) que implique una recombinación de las cadenas dañadas para superar este evento no reparado durante la replicación, o como 'recombinación somática' procesos de amplificación de genes o diversificación de los mismos.

## JUSTIFICACION

El arsénico es una sustancia que ha demostrado tener una actividad carcinogénica, clastogénica y comutagénica en algunos modelos animales y en experimentación "in vitro", pero la actividad clastogénica y la comutagénica no ha podido ser demostrada fehacientemente hasta la fecha en humanos que han estado expuestos al arsénico.

Otro parámetro, recientemente considerado dentro de las pruebas realizadas sobre el arsénico es el análisis de la cinética de proliferación celular de linfocitos humanos expuestos "in vivo" e "in vitro". Este parámetro ha dado resultados positivos ya en una población expuesta a hidroarsenicismo crónico que presenta niveles de contaminación en la sangre menores que los utilizados en la mayoría de los estudios realizados "in vitro".

De aquí surge la importancia de realizar experimentos "in vitro" con concentraciones semejantes a las de estos individuos expuestos presenten y así determinar si el arsénico (aún en bajas dosis) es capaz de alterar la cinética de proliferación celular en linfocitos humanos de manera semejante a la encontrada en estas poblaciones expuestas.

## HIPOTESIS

Puesto que la proliferación de los linfocitos de individuos expuestos a agua contaminada con el metaloide se encuentre disminuida con respecto a individuos normales, entonces el arsenito y el arsenato, que son las formas químicas encontradas en mayor proporción en el agua de la población, serán capaces de modificar la respuesta normal de los linfocitos a la estimulación con PHA y su proliferación en cultivo.

## OBJETIVO

Determinar si el arsénico es capaz de alterar la respuesta a la estimulación mitogénica de la fitohemaglutinina en linfocitos de sangre humana periférica.

Determinar si el arsénico es capaz de alterar la cinética de proliferación celular en linfocitos humanos. "in vitro"

## MATERIAL Y METODOS

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Con el objeto de verificar la hipótesis de trabajo, se realizó el diseño experimental que se muestra a continuación:

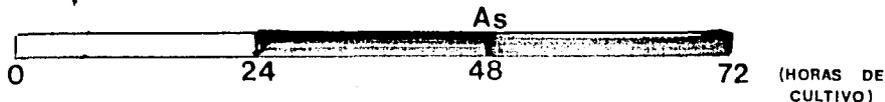
# TRATAMIENTOS

Acido arsénico  
 Arsenito de Sodio



Siembra  
 RPMI  
 PHA  
 BrdU  
 Sangre

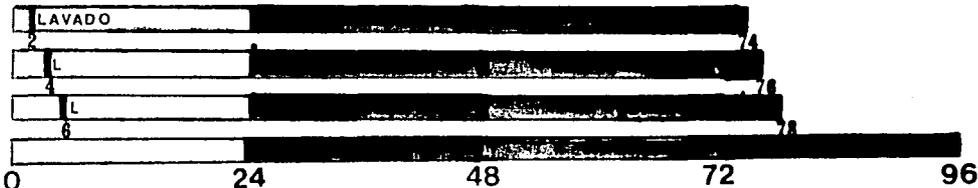
Cosecha



RPMI  
 PHA  
 BrdU  
 Sangre  
 Arsénico



RPMI  
 BrdU  
 Sangre  
 Arsénico



Después del lavado se agregó RPMI, PHA y BrdU - T

PROCEDIMIENTO

- OBTENCION Y PREPARACION DE MUESTRAS

Se obtuvo sangre de dos hombres sanos (24 años de edad y 60 Kg de peso promedio) y de tres mujeres sanas (28 años de edad y 55 Kg de peso promedio) con jeringas desechables, bajo condiciones de esterilidad, previamente heparinizadas, la sangre se cultivo siguiendo la tecnica descrita por Moorhead (78) que consiste en lo siguiente.

- CULTIVO DE MUESTRAS

Alicuotas de 0.5 ml de sangre se cultivaron en tubos de plástico de 15 ml esteriles, se agregaron 6.5 ml de Medio de cultivo RPMI 1640 modificado (Gibco) y suplementado con 1 ml de aminoácidos no esenciales y 1 ml de glutamina (Gibco) por cada 100 ml de medio; a cada cultivo se agregaron 0.2 ml de fibrohemaglutinina (Micrilab) y 0.3 ml de bromodesoxiuridina (Sigma) 250M, los cultivos se mantuvieron en estufa a 37°C.

- COSECHA

Este procedimiento se efectuó centrifugando los tubos de cultivo a 1200 rpm durante 10 minutos, retirando la mayor parte del sobrenadante y aplicando un choque hipotónico a las células (resuspendidas previamente) durante 10 minutos con una solución de cloruro de potasio (KCl) 0.075M a una temperatura de 37°C.

Posteriormente se centrifugaron los tubos de nuevo, retirando el exceso de sobrenadante y se fijaron los nucleos con una solución de metanol-acido acético 3:1 fría, agregada después de resuspender el botón del tubo, se centrifugó y se lavó varias veces con fijador. Este procedimiento se realizó hasta que el sobrenadante fue transparente. Se guardaron los tubos en refrigeración por 24 horas con muy poco fijador (aproximadamente 0.5 ml).

#### - PREPARACION DE LAMINILLAS

Después de transcurridas 24 horas de la fijación de las células se hicieron preparaciones de cromosomas sobre laminillas lavadas y enfriadas previamente con alcohol de caña. Se resuspendió el botón de células con una pipeta Pasteur y se tomaron algunas gotas de la solución, esta se dejaron caer sobre la laminilla desde una altura considerable (aproximadamente 1.50 M) y se secaron a la flama de un mechero. Estas laminillas se guardaron durante

24 horas en una caja para preparaciones (en oscuridad).

#### - TINCION

Para teñir las laminillas se utilizó una solución de 1.0 ml de Hoechst (Sigma) al 0.01% en 50 ml de buffer de fosfatos con pH de 6.8 (fosfato de sodio al 0.98% y fosfato de potasio al 0.91% en proporción de 1:1) en la que se sumergieron las laminillas durante 30 minutos en completa oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo se enjuagaron con agua corriente y se secaron al aire para exponerlas a luz ultravioleta cercana, cubiertas con buffer de fosfatos y un cubreobjetos, para evitar la evaporación, durante dos horas. Después de este periodo de tiempo las laminillas se enjuagaron con agua corriente y se secaron al aire para inmediatamente ser teñidas con una solución de 1.5 ml de Giemsa (Merck) en 50 ml de solución de buffer de fosfatos por aproximadamente 2 a 4 minutos. Las laminillas se enjuagaron de nuevo con agua corriente y se secaron para poder ser analizadas al microscopio óptico (Olympus).

#### - TRATAMIENTOS

Los compuestos arsenicales fueron preparados previamente a su utilización en agua bidestilada, deionizada

y filtrada (con millipore) antes de ser utilizada, todo bajo condiciones de esterilidad. Los tratamientos fueron aplicados a los cultivos codificados y por duplicado.

Estas soluciones fueron de ácido arsenico ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )  $10^{-7}\text{M}$ ,  $10^{-6}\text{M}$  y  $10^{-5}\text{M}$  y de arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ )  $10^{-7}\text{M}$ ,  $10^{-6}\text{M}$  y  $10^{-5}\text{M}$ . Las soluciones se prepararon para agregar a cada cultivo unicamente 50  $\mu\text{l}$  y alterar lo menos posible el volumen final de los cultivos.

#### A.- LINFOCITOS EN PROLIFERACION

Los cultivos de 4 individuos fueron dejados proliferar durante 48 horas, después de las cuales, un grupo de estos fueron tratados con las tres diferentes concentraciones anteriormente mencionadas de arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ) y otro grupo se trató con las tres diferentes concentraciones de ácido arsenico ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Se cultivo un control negativo (sin compuesto arsenical) para cada individuo en todos los casos.

Una vez agregadas las soluciones se continuó el cultivo por 22 horas más después de las cuales se agregaron 0.2  $\mu\text{l}$  de colcemid preparado al 0.1% a cada tubo de cultivo y se cultivaron por 2 horas más antes de cosechar los linfocitos.

#### B.- LINFOCITOS EN $G_1$ .

En un segundo bloque experimental se hicieron cultivos con la sangre de dos individuos sanos (un hombre y una mujer) y se les agregó fitohemaglutinina desde el inicio del cultivo (linfocitos en  $G_1$ ).

En este lote experimental de cultivos con FHA se agregó ácido arsénico a un grupo y arsenito de sodio a otro grupo; ambas sustancias con una concentración de  $1 \times 10^{-7} M$ . A continuación se fueron lavando a las 2, 4, 6 y 24 horas de haber iniciado los cultivos.

El mismo procedimiento se realizó con los controles (uno en cada lavado) y se cosecharon a 72 horas de estimulación.

#### C.- LINFOCITOS EN $G_0$

En otro bloque experimental se hicieron cultivos con la sangre de los mismos individuos sin agregar FHA al inicio del cultivo (linfocitos en  $G_0$ ). A estos cultivos se agregó ácido arsénico a un grupo de cultivos y arsenito de sodio a otro grupo; con la misma concentración utilizada anteriormente. A continuación se lavaron cultivos a 2, 4, 6 y 24 horas después de la siembra.

Después de finalizado el lavado, se inició el estímulo

mitogénico con la PHA, cosechándose los cultivos 72 horas después de haber iniciado la estimulación.

#### - METODOS ESTADISTICOS

Se utilizó la prueba de "t de student" con una F menor de 0.05 para evaluar la significancia estadística de los datos obtenidos en los índices de replicación y los intercambios de cromátidas hermanas. Se utilizó la prueba de  $\chi^2$  para evaluar la significancia estadística de los datos obtenidos en los índices mitóticos, con una F menor de 0.05.

## ANALISIS DE LAMINILLAS

## - INDICE MITOTICO

Las laminillas se analizaron en un microscopio fotonico a 20 aumentos recorriendolas en zig zag y comenzandó de la parte central de la laminilla para contar 2000 nucleos totales y de ellos determinar cuantos estaban en division (metafase). Se registraron como nucleos aquellos que presentaban una forma aproximadamente esferica, de tincion clara y de tamaño relativamente grande, siempre y cuando pudieran identificarse individualmente como un nucleos de linfocito que sobrevivio en el cultivo (fig. 9). El valor del indice mitótico se obtiene con la siguiente fórmula:

$$I.M. = \frac{\text{Numero total de metafases}}{2000 \text{ nucleos totales}}$$

## - PROLIFERACION CELULAR

Se analizaron 100 metafases seguidas con el objetivo de 100 aumentos y aceite de inmersión, determinándose cada una como de primera, segunda o tercera división dependiendo de la cantidad de cromátidas con tinción clara y oscura que

presentaran los cromosomas.

Si la metafase presentaba un 100% de tinción oscura se clasificaba como de primera división, si en ésta se observaba un 50% de tinción clara y un 50% de tinción oscura sobre cada cromosoma se clasificaba como de segunda división y, por último, si presentaba aproximadamente un 25%, o menos, de tinción oscura y aproximadamente el 75%, o más, de tinción clara se clasificaba como de tercera división (fig.4).

Con esta información se calculó un índice de replicación utilizando la siguiente fórmula:

$$I. R. = \frac{1(\#1as) + 2(\#2as) + 3(\#3as)}{100}$$

Los valores de este índice serán mayores cuando más rápido proliferen las células.

#### - INTERCAMBIO DE CRONATIDAS HERMANAS

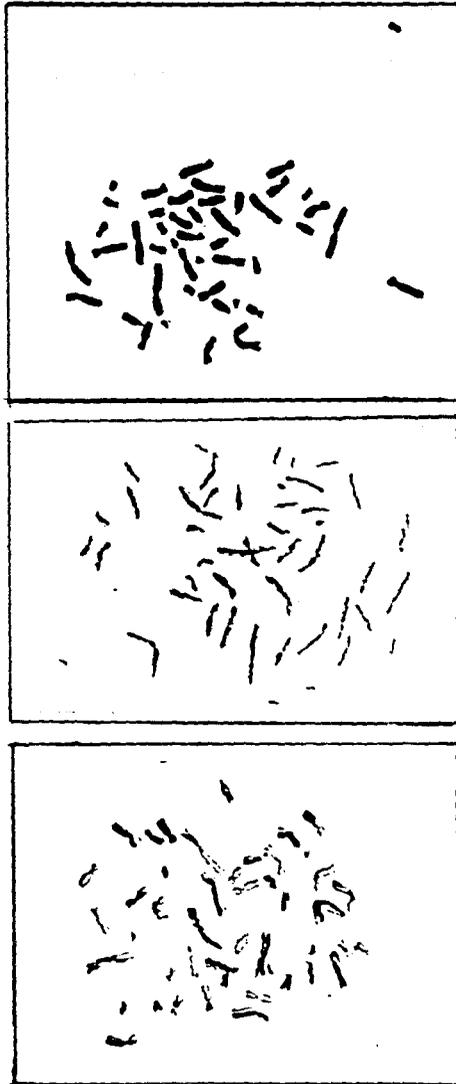
Se analizaron 25 metafases en segunda división con el objetivo de 100 aumentos y aceite de inmersión, contándose en cada una el número total de cromosomas presentes en la metafase y el número total de intercambios en la misma.

Se registró un evento por cada intercambio de cromátidas terminal y dos eventos por cada porción del cromosoma intercambiada intersticialmente (fig.5).



IM = #METAFASES  
2000 NUCLEOS

Fig: 3 MODELO PARA EL ANALISIS DEL INDICE MITOTICO



**Fig. 4 MODELO PARA EL ANALISIS DE LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR. A) PRIMERA DIVISION. B) SEGUNDA DIVISION. C) TERCERA DIVISION.**



**Fig: 5 MODELO PARA EL ANALISIS DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS. SEGUNDA DIVISION, METAFASE CON 50% DE CROMOSOMAS MUY TEÑIDOS (CROMOSOMAS EN ARLEQUIN).**

## RESULTADOS

En las tablas 2 y 3 se muestran los resultados individuales de la cinética de proliferación celular, índice de replicación, índice mitótico e intercambio de cromátidas hermanas obtenidos de linfocitos tratados en proliferación con ácido arsénico y arsenito de sodio durante 24 horas respectivamente. En las tablas 4 y 4A se muestran los datos individuales obtenidos en linfocitos tratados en fase  $G_0$  con As (III\*) y As (V\*). Se obtuvo una respuesta con la misma tendencia individual en linfocitos tratados en  $G_0$ , que se muestran en las tablas 5 y 5A. Esta respuesta es de un retraso proporcional al tiempo de exposición al As en la cinética de proliferación celular.

En la figura 6 se representa el índice mitótico promedio observado en linfocitos en proliferación tratados con As (III) y As (V) a diferentes concentraciones. En esta gráfica se observa una clara disminución del índice mitótico dependiente de la concentración de arsenito. La dosis más alta de As (III) disminuye el I. M. en un 83%, mientras que la dosis más alta de As (V) lo disminuye en un 56% aproximadamente. Las dosis más bajas lo disminuyeron en un 7% (As III) y un 13% (As V). (aunque estos últimos valores no fueron estadísticamente significativos), siendo más potente el As (III) que el As (V).

En las figuras 7 y 8 se representa el efecto sobre el índice mitótico de los linfocitos tratados en  $G_0$  y  $G_1$ , respectivamente. Los linfocitos tratados en  $G_0$  muestran una disminución de aproximadamente 6:7 en el I.M. con respecto al control, mientras que los linfocitos en  $G_1$  no mostraron una respuesta constante, siendo el tratamiento a 4 y a 24 horas los que presentan una mayor disminución del I. M.. En estas figuras no se observan diferencias en el efecto producido por ambos tipos de arsenico.

En la tabla 6 se muestran los promedios de los índices de replicación observados en linfocitos en proliferación a distintas dosis de arsenico (A), en linfocitos en  $G_0$  (B) y en linfocitos en  $G_1$  (C). Se ve en todos los casos una disminución, estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en la respuesta al mitógeno.

La inhibición de la proliferación guarda una relación directa con la concentración del arsenico usado en los tratamientos. Los linfocitos tratados en  $G_0$  y  $G_1$  son más sensibles a los efectos del metaloide, ya que los efectos inhibitorios se manifiestan después de 4 horas de tratamiento ( $p < 0.05$ ) y son incapaces de proliferar después de 24 horas de exposición (Figuras 7 y 8 y tabla 6B y 6C)

En la tabla 7 se muestra el efecto del As sobre el intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos en

proliferación (A), en linfocitos en  $G_0$  (B) y en linfocitos tratados en  $G_1$  (C). Se observa un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) a las dosis  $10^{-6M}$  y  $10^{-7M}$  cuando los linfocitos están en proliferación. Los linfocitos en fase  $G_0$  no mostraron un aumento estadísticamente significativo, al igual que los linfocitos en  $G_1$ , aunque se puede observar una tendencia a elevar el nivel de ICH. Este resultado puede explicarse considerando las diferencias en cuanto al número de metafases analizadas en cada caso (400 para linfocitos en proliferación y 200 para linfocitos en  $G_0$  y en  $G_1$ ).

TABLA NO. 2

CICLO DE PROLIFERACION CELULAR, INDICE DE REPLICACION, INDICE MITOTICO E INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (ICH) EN CULTIVOS CON ACIDO ARSENICO (As V) Y CONTROLES (24 HORAS)

CONCENTR.	CICLO DE PROLIF. CELULAR			I. R.	IND. MIT.	I. C. H.	INDIV.
	1as	2as	3as				
TESTIGO	18	41	41	2.23	0.0185	7.70±1.17	LU 5-3
1X10-9M	26.5	47	26.5	2.00	0.0187	8.54±1.64	
1X10-8M	46	35.5	19.5	1.75	0.0207	10.90±2.00	
1X10-7M	49	42	9	1.60	0.0105	9.26±2.91	
TESTIGO	12.5	44	43.5	2.31	0.0205	7.94±1.98	AR 19-3
1X10-9M	24.5	46	29.5	1.17	0.0183	9.12±2.15	
1X10-8M	42	44	14	1.72	0.0198	9.84±3.06	
1X10-7M	58	30	12	1.54	0.0048	12.14±1.39	
TESTIGO	11.6	40.6	47.8	2.36	0.0235	7.40±1.94	LV 8-4
1X10-9M	16.5	42.5	41	2.25	0.0227	7.68±1.40	
1X10-8M	28.5	44	35.5	2.23	0.0105	9.35±2.05	
1X10-7M	37.5	44	18.5	1.81	0.0105	9.18±1.54	
TESTIGO	10.5	38	51.5	2.41	0.0453	7.44±1.55	AB 21-5
1X10-9M	13.5	35.5	51	2.38	0.0442	7.70±1.73	
1X10-8M	19	31	50	2.31	0.0372	8.98±2.01	
1X10-7M	33.5	42	24.5	1.91	0.0195	11.16±2.18	

I. R.= indice de replicación, IND. MIT.= indice mitótico, ICH.= intercambio de cromátidas hermanas, INDIV.= individuo.

TABLA NO. 4

CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR, INDICE DE REPLICACION, INDICE MITOTICO E INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS EN CULTIVOS DE LINFOCITOS EN G<sub>0</sub>. INDIVIDUO ME 20-5

HRS		CINET. PROLIF. CEL.			I. R.	I. M.	I. C. H.
TRAT	AS	1as	2as	3as			
2	III	26.0	32.5	41.5	2.16	0.0080	8.84±1.41
2	V	24.5	39.5	36.0	2.11	0.0163	8.58±2.16
tst.		14.0	29.0	57.0	2.43	0.0190	6.92±1.16
4	III	26.0	35.0	39.0	2.13	0.0093	10.04±2.02
4	V	29.0	28.0	43.0	2.14	0.0093	9.75±2.26
tst.		13.0	38.0	49.0	2.36	0.0340	6.68±1.54
6	III	29.5	38.5	32.0	2.02	0.0010	
6	V	30.5	41.0	28.5	1.98	0.0080	11.42±2.06
tst.		11.0	35.0	54.0	2.43	0.0190	6.32±1.22
24	III				0.00	0.0000	
24	V				0.00	0.0000	
tst.		19.0	32.0	49.0	2.30	0.0070	7.08±2.61

TABLA No. 4A INDIVIDUO AR 24-6

2	III	23.5	44.0	32.5	2.09	0.0190	11.47±2.06
2	V	24.5	39.5	36.0	2.11	0.0147	10.16±3.09
tst.		12.0	34.0	54.0	2.42	0.0305	8.26±1.96
4	III	31.0	45.0	24.0	1.93	0.0273	12.96±2.93
4	V	28.5	46.5	35.0	2.26	0.0258	11.62±3.62
tst.		14.0	53.0	34.0	2.22	0.0270	11.20±2.34
6	III	48.0	30.5	21.5	1.73	0.0200	12.68±3.47
6	V	36.0	49.0	15.0	1.79	0.0095	12.72±4.50
tst.		14.0	44.0	42.0	2.28	0.0220	8.20±2.26
24	III				0.00	0.0040	
24	V				0.00	0.0005	
tst.		17.0	42.0	41.0	2.24	0.0160	8.12±1.42

AS= arsénico, I. R.= indice de replicacion, I. M.= indice mitótico, I. C. H.= intercambio de cromátidas hermanas, HRS. TRAT.= horas de tratamiento.

TABLA NO. 3

CICLO DE PROLIFERACION CELULAR, INDICE DE REPLICACION, INDICE MITOTICO E INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (ICH) EN CULTIVOS CON ARSENITO DE SODIO (As III) Y CONTROLES (24 H.)

CONCENTR.	CICLO DE PROLIF. CELULAR			I. R.	IND. MIT.	I. C. H.	INDIV.
	1as	2as	3as				
TESTIGO	18	41	41	2.23	0.0185	7.70±1.17	LU 5-3
1X10-9M	27	43	30	2.03	0.0170	9.50±1.87	
1X10-8M	40.5	42	17.5	1.77	0.0157	8.70±1.66	
1X10-7M	70.5	22	7.5	1.37	0.0120	10.22±2.28	
TESTIGO	12.5	44	43.5	2.31	0.0305	7.94±1.98	AR 19-3
1X10-9M	32	36.5	31.5	2.00	0.0293	9.84±2.45	
1X10-8M	45	42.5	12.5	1.68	0.0133	13.37±3.78	
1X10-7M	63.3	30	6.5	1.43	0.0126	11.50±3.17	
TESTIGO	11.6	40.6	47.8	2.36	0.0235	7.40±1.94	LV 8-4
1X10-9M	20	46	34	2.14	0.0225	8.28±2.02	
1X10-8M	29.5	46	25.5	1.98	0.0142	9.14±2.64	
1X10-7M	39	39	22	1.83	0.0095	11.09±2.66	
TESTIGO	10.5	38	51.5	2.41	0.0453	7.44±1.55	AB 21-5
1X10-9M	16	35	49	2.33	0.0410	8.22±1.70	
1X10-8M	24	34.5	41.5	2.17	0.0335	9.33±2.37	
1X10-7M	38	36.5	25.5	1.88	0.0220	11.12±3.24	

I. R.= índice de replicación, IND. MIT.= índice mitótico, ICH.= intercambio de cromátidas hermanas, INDIV.= individuo.

TABLA NO. 4

CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR, INDICE DE REPLICACION, INDICE MITOTICO E INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS EN CULTIVOS DE LINFOCITOS EN GO. INDIVIDUO ME 20-5

HRS		CINET.	PROLIF. CEL.		I. R.	I. M.	I. C. H.
TRAT	AS	1as	2as	3as			
2	III	26.0	32.5	41.5	2.16	0.0080	8.84±1.41
2	V	24.5	39.5	36.0	2.11	0.0163	8.58±2.16
tst.		14.0	29.0	57.0	2.43	0.0190	6.92±1.16
4	III	26.0	35.0	39.0	2.13	0.0093	10.04±2.02
4	V	29.0	28.0	43.0	2.14	0.0093	9.75±2.26
tst.		13.0	38.0	49.0	2.36	0.0340	6.68±1.54
6	III	29.5	38.5	32.0	2.02	0.0010	
6	V	30.5	41.0	28.5	1.98	0.0080	11.42±2.06
tst.		11.0	35.0	54.0	2.43	0.0190	6.32±1.22
24	III				0.00	0.0000	
24	V				0.00	0.0000	
tst.		19.0	32.0	49.0	2.30	0.0070	7.08±2.61

TABLA No. 4A INDIVIDUO AR 24-6

2	III	23.5	44.0	32.5	2.09	0.0190	11.47±2.06
2	V	24.5	39.5	36.0	2.11	0.0147	10.16±3.09
tst.		12.0	34.0	54.0	2.42	0.0305	8.36±1.06
4	III	31.0	45.0	24.0	1.93	0.0273	12.96±2.93
4	V	28.5	46.5	35.0	2.26	0.0258	11.62±3.62
tst.		14.0	53.0	34.0	2.22	0.0270	11.20±2.34
6	III	48.0	30.5	21.5	1.73	0.0200	12.68±3.47
6	V	36.0	49.0	15.0	1.79	0.0095	12.72±4.50
tst.		14.0	44.0	42.0	2.28	0.0220	8.20±2.26
24	III				0.00	0.0040	
24	V				0.00	0.0005	
tst.		17.0	42.0	41.0	2.24	0.0160	8.12±1.42

AS= arsénico, I. R.= índice de replicación, I. M.= índice mitótico, I. C. H.= intercambio de cromátidas hermanas, HRS. TRAT.= horas de tratamiento.

TABLA NO. 5

CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR, INDICE DE REPLICACION, INDICE MITOTICO E INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS EN CULTIVOS DE LINFOCITOS EN G1. INDIVIDUO ME 20-5.

HRS AS TRAT		CINET. 1as	PROLIF. 2as	CEL. 3as	I. R.	I. M.	I. C. H.
2	III	24.5	33.0	42.5	2.18	0.0098	8.56±1.49
2	V	24.0	31.5	44.5	2.21	0.0083	9.10±1.52
tst.		15.0	26.0	59.0	2.44	0.0210	6.48±1.44
4	III	21.5	37.5	41.5	2.21	0.0215	8.94±2.39
4	V	26.0	37.5	36.5	2.11	0.0200	9.34±1.48
tst.		11.0	41.0	48.0	2.37	0.0310	7.16±1.35
6	III	34.5	29.5	36.0	2.02	0.0190	10.78±2.50
6	V	30.5	35.0	34.5	2.04	0.0193	10.72±1.67
tst.		14.0	30.0	56.0	2.42	0.0195	6.80±0.85
24	III	44.0	35.5	20.5	1.76	0.0050	10.46±1.69
24	V	41.0	37.0	22.0	1.81	0.0050	11.18±2.13
tst.		17.0	37.0	46.0	2.29	0.0315	7.28±1.28

TABLA No. 5A INDIVIDUO AR 24-6

2	III	19.5	36.0	44.5	2.25	0.0198	12.52±1.63
2	V	15.5	43.0	41.5	2.26	0.0173	11.32±4.05
tst.		8.0	33.0	59.0	2.51	0.0250	8.76±2.35
4	III	26.5	51.0	22.5	1.96	0.0175	13.27±4.67
4	V	27.5	39.0	33.5	2.06	0.0170	10.46±2.72
tst.		12.0	40.0	48.0	2.36	0.0480	10.48±2.40
6	III	35.5	31.5	33.0	1.97	0.0112	15.10±3.20
6	V	36.5	40.5	23.0	1.86	0.0175	12.54±2.59
tst.		15.0	43.0	42.0	2.27	0.0170	7.60±1.65
24	III				0.00	0.0005	
24	V	52.0	32.0	16.0	1.64	0.0085	15.26±3.38
tst.		15.0	35.0	50.0	2.35	0.0280	11.28±2.18

AS= arsénico, I. R.= índice de replicación, I. M.= índice mitótico, I. C. H.= intercambio de cromátidas hermanas, HRS. TRAT.= horas de tratamiento.

TABLA NO. 6

PROMEDIOS DE INDICE DE REPLICACION DE LINFOCITOS EXPUESTOS A ARSENICO

A LINFOCITOS EN PROLIFERACION

(ARSENICO)		10-9M	10-8M	10-7M
TESTIGO	2.33±0.08			
AS III		2.12±0.14*	1.89±0.20*	1.62±0.22*
AS V		2.16±0.15*	1.96±0.26*	1.73±0.16*

B LINFOCITOS EN G<sub>0</sub>

HORAS DE TRATAM.	2h	4h	6h	24h
TESTIGO	2.42±0	2.29±0.07	2.35±0.10	2.27±0.04
AS III	2.12±0.03*	2.04±0.11*	1.70±0.19*	0
AS V	2.04±0.13*	2.05±0.02*	1.88±0.15*	0

C LINFOCITOS EN G<sub>1</sub>

HORAS DE TRATAM.	2h	4h	6h	24h
TESTIGO	2.47±0.04	2.37±0	2.35±0.10	2.32±0.04
AS III	2.21±0.04*	2.08±0.15*	1.99±0.09*	1.76±0.06*
AS V	2.23±0.05*	2.08±0.02*	1.95±0.09*	1.72±0.09*

\*P<0.05

TABLA NO. 7

PROMEDIOS DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS DE LINFOCITOS EXPUESTOS A ARSENICO

A LINFOCITOS EN PROLIFERACION

(ARSENICO)	10-9M	10-8M	10-7M
TESTIGO	7.58±1.80		
AS III	8.95±2.28	9.87±3.26*	11.25±2.77*
AS V	8.35±1.92	9.74±2.75*	10.21±2.35*

B LINFOCITOS EN G<sub>0</sub>

HORAS DE TRATAM.	2h	4h	6h	24h
TESTIGO	7.64±1.32	9.14±2.47	7.26±2.05	7.60±1.150
AS III	10.10±2.25	11.73±2.73	13.08±3.41	0
AS V	9.47±2.82	10.91±3.04	12.53±2.85	0

C LINFOCITOS EN G<sub>1</sub>

HORAS DE TRATAM.	2h	4h	6h	24h
TESTIGO	7.62±2.26	8.70±2.54	7.40±1.47	9.28±2.68
AS III	10.54±2.57	11.18±4.22	13.04±3.55	10.46±1.68
AS V	9.98±2.91	9.89±2.33	11.54±2.74	13.37±3.31

\*P<0.05

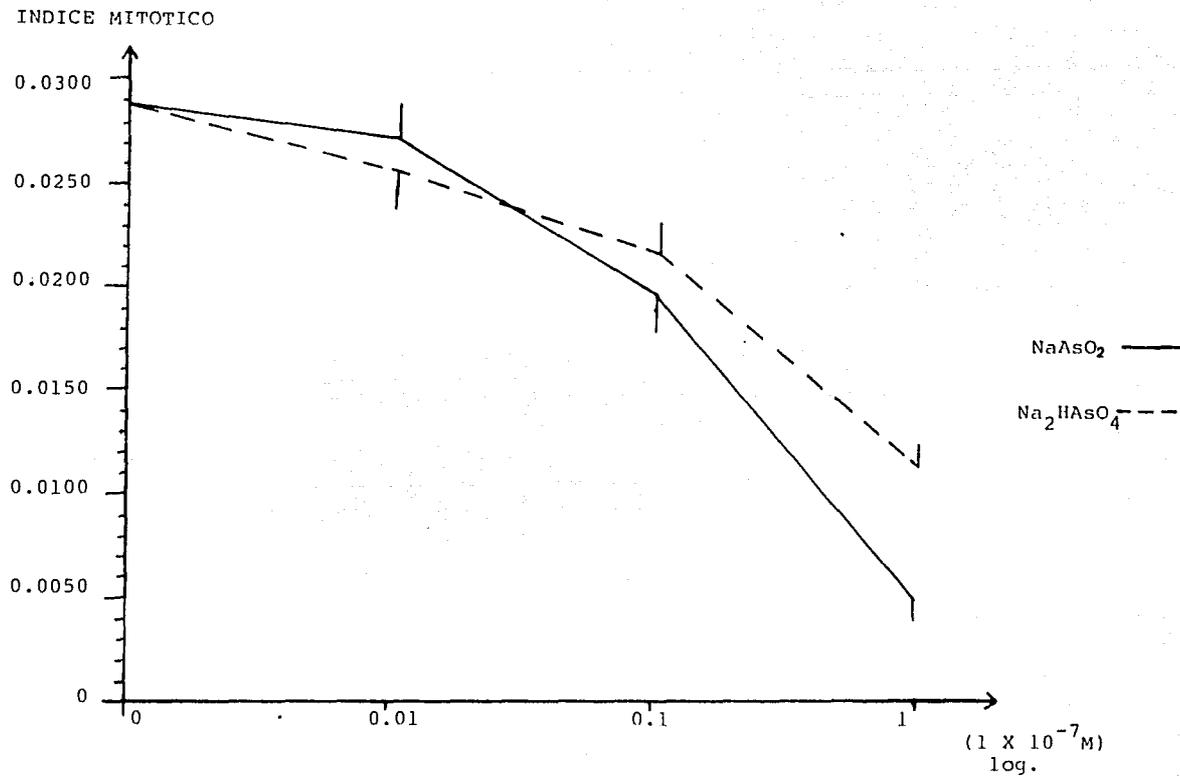


Fig. No. 6

Linfocitos en proliferación (promedio de cuatro individuos)

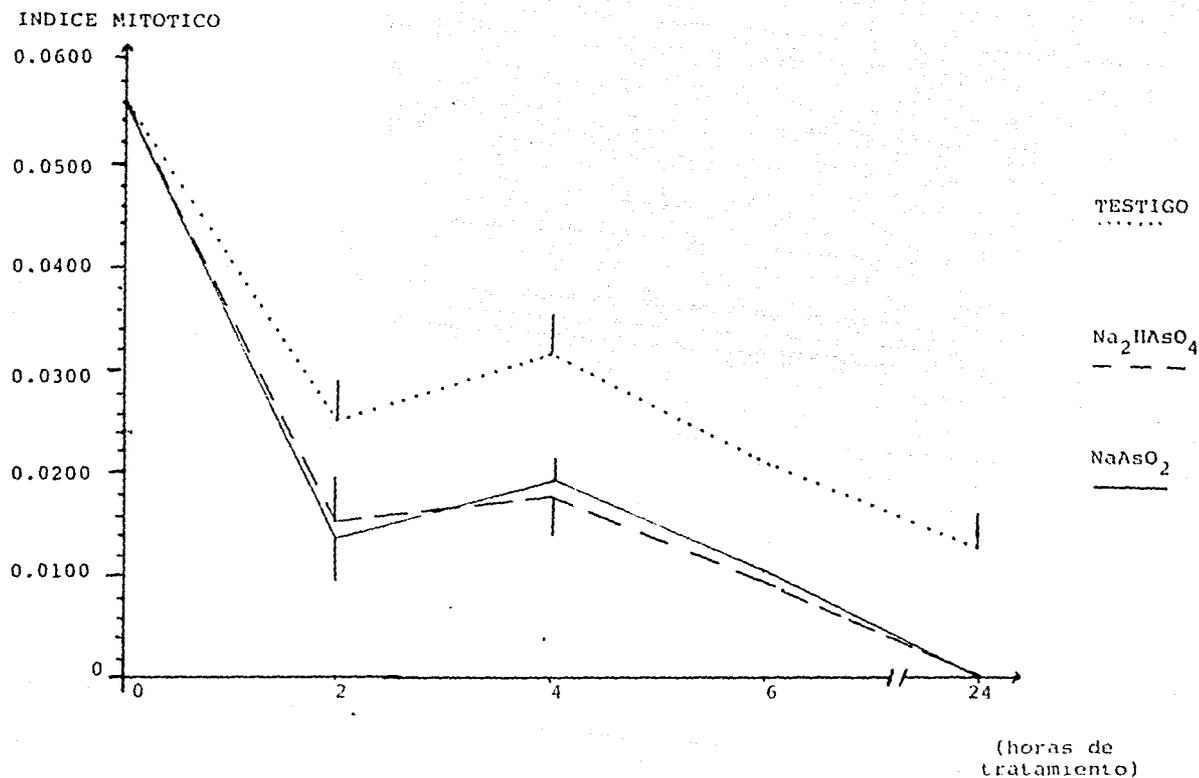


Fig. No. 7

Linfocitos tratados en Go (sin PHA) con ácido arsénico (AsV) y arsenito de sodio (AsIII)

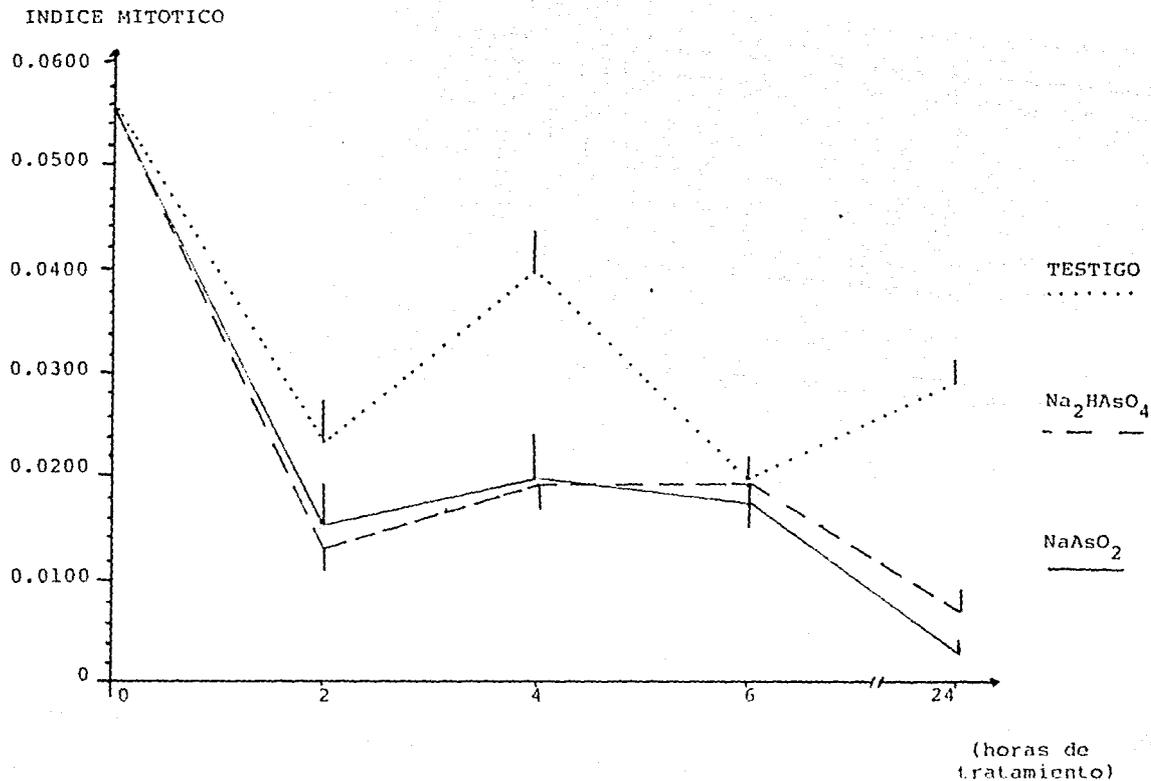


Fig. No. 8

Linfocitos tratados en G<sub>1</sub> (con PHA) con ácido arsénico (AsV) y arsenito de sodio (AsIII)

## DISCUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos en los cultivos de linfocitos humanos, el arsenico es capaz de inhibir la estimulación y la proliferación linfocitaria inducida por PHA, aun a muy bajas dosis. Esto indica una elevada citostaticidad del compuesto (capacidad de detención de las células en una fase de su ciclo). La inhibición fue mas acentuada cuando las células fueron tratadas en G<sub>0</sub> y en G<sub>1</sub>, que cuando están proliferando activamente. Se sabe que el As III se une a los grupos SH de las proteínas (15) y que de este manera es capaz de inactivar enzimas (11), por lo que podemos pensar que cuando los linfocitos son estimulados por la PHA y se inicia la síntesis y expresión en membrana de numerosas proteínas (entre ellas la de IL-2), el As puede interferir con la expresión de estos receptores, de tal manera que el estímulo inicial de la lectina puede perderse o inhibirse.

En cambio, esta inhibición fue menos efectiva cuando las células se encontraban proliferando (tabla 6A), esto probablemente se deba a que los linfocitos ya estaban estimulados y a que existe una síntesis y recambio de proteínas más activos, lo que podría diluir el efecto inhibitorio del metaloide.

Existen reportes en los que se demuestra que la forma

de As (III) es mas potente, como clastógeno y citotóxico que el As (V), sin embargo, estas observaciones fueron hechas a concentraciones por encima de  $1 \times 10^{-7} M$  (36), nivel al que se se detectaron diferencias entre la potencia de los dos estados oxidativos. A concentraciones menores ( $1 \times 10^{-8} M$  y  $1 \times 10^{-9} M$ ) no fue evidente esta diferencia. Vahter y col. (25) reportaron, de manera similar, que la acumulacion de As en tejidos animales es diferente entre As (V) y As (III) cuando las dosis son elevadas, desapareciendo la diferencia cuando las concentraciones son bajas.

Fetres y col. (33) han mencionado que el arsenico es capaz de detener los linfocitos en las fases S y G<sub>2</sub>, pero usando concentraciones mas elevadas que las del presente trabajo ( $1 \times 10^{-8} M$  -  $1 \times 10^{-6} M$ ), probablemente porque a esos niveles el As inhibe enzimas directamente relacionadas con la reparacion y sintesis del ADN como las ligasa (31).

Las diferencias encontradas en la magnitud del efecto, que son dependientes de la etapa del ciclo, pueden ser atribuidas a los diferentes estados fisiologicos y metabolicos por los que atraviesa la célula, ya que tambien se ha mencionado que el arsenico altera los procesos oxidativos que se llevan a cabo en las mitocondrias (26) y, como consecuencia de esto, es capaz de alterar las condiciones energéticas y metabolicas de la célula. Tambien puede estar relacionada con la produccion de proteínas que

se lleva a cabo en las distintas etapas del ciclo celular ya que el As es capaz de inhibir proteínas con grupos sulfhidrilos (25) y enzimas de reparación del ADN (31).

En este trabajo se comprobó la capacidad inductora de ICH con las concentraciones más altas utilizadas ( $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  M). Sin embargo, con  $10^{-8}$  M no se logró inducción cuando las células estaban en activa proliferación ni en  $G_0-G_1$ . Lo anterior concuerda con informes de Wen y col. (25) que reportaron no haber encontrado inducción de ICH en linfocitos tratados en fase  $G_0$ , aunque con dosis más elevadas ( $1 \times 10^{-6}$  M). A este respecto se ha mencionado que la cause de esta diferencia se pueda deber a que la inducción de ICH es un evento dependiente de la fase S, o sea que las células se tienen que dividir, en presencia del As, para poder observarlas.

Los linfocitos humanos circulan normalmente en  $G_0$ , la fase que demostró ser la más sensible a los efectos del arsénico, esto podría relacionarse entonces, con la evidencia obtenida en individuos expuestos al metaloide (52). En estos se presenta una muy alta incidencia de alteraciones en los epitelios dérmicos que van desde hiperqueratosis hasta cáncer de piel y una muy pobre respuesta inmunológica.

Consideramos que los hallazgos del presente trabajo

tienen relevancia fisiologica puesto que, a las dosis utilizadas (0.12ug/l-31ug/l), se pudo evidenciar que se afecta la cinetica de proliferacion celular y la respuesta a la estimulacion con PHA, mientras que se ha reportado (25) que los individuos expuestos a concentraciones de As en el agua de bebida superiores a 300 ug/l, presentan en sangre una concentracion aproximada de 50-60 ug/l de As. Estas cantidades equivalen a la molaridad de nuestras sales, a valores superiores a  $10^{-6}M$ . A pesar de que en los experimentos "in vitro" los metales detoxificadores no se toman en cuenta y que, el arsenico inorganico representa el 20% del arsenico total excretado por los individuos con hidroarsenicismo cronico (53).

Walder y col. (44) reportaron que, personas tratadas con inmunosupresores durante el periodo de aceptacion de un transplante de organos, y de 5 a 8 años mas, presentaron lesiones y cancer de piel similares a las observadas en las poblaciones con hidroarsenicismo cronico. Por otra parte, se ha reportado que, cultivos de linfocitos obtenidos de individuos expuestos cronicamente a altos niveles de As en el agua, mostraron IR menores y un ciclo celular mas largo que los observados en individuos normales (53).

Los datos de este trabajo sugieren que la exposicion de los linfocitos al arsenico interfiere con la respuesta inmune-celular normal. Esto podria traducirse en un fenomeno

de inmunodeficiencia crónica que favorecería el desarrollo de procesos infecciosos además de la aparición de procesos malignos y cáncer (76, 77).

### CONCLUSIONES

La exposicion "in vitro" de linfocitos humanos a concentraciones de arsenico similares a las que se podrian encontrar en la sangre de individuos cronicamente intoxicados con arsenico en el agua, demuestra que las celulas son incapaces de responder al estirulo de un mitigene como la PHA, cuando son tratadas en fase G<sub>0</sub>, lo cual constituye una evidencia de que el metaloide interfiere con la respuesta celular normal de los linfocitos T.

## COMENTARIOS

El presente trabajo deja puertas abiertas a varios temas de investigación sobre el arsénico. Esta línea de investigación puede continuarse para seguir aportando datos sobre los efectos del metaloide en la salud humana y sus mecanismos de acción y, de esta manera, encontrar sus implicaciones en el cáncer de piel.

## TABLA DE ABBREVIATURAS

AC	Aberraciones cromosomitas
ICH	Intercambio de cromátidas hermanas
PHA	Fitoemaglutinina
ErDU	Bromodesoxiuridina
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
IM	Indice mitotico
IF	Indice de replicacion
CFC	Cinetica de proliferacion celular
As	Simbolo quimico del arsenico

## BIBLIOGRAFIA

- 1 Doll R., Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of the avoidable risk of cancer in the U. S. today. J. Natl. Cancer Inst., 66: 1191-1305 (1961)
- 2 Nordenson I., Beckman G., Occupational and environmental risk in and around a smelter in northern Sweden. Hereditas, 66: 47-50, 263-267 (1978), 90: 178-181 (1982)
- 3 Bergoñi J. M., Vincent F., Venturino H., Infante A., Arsenic in the drinking water of the city of Antofagasta: epidemiological and clinical study before and after the installation of a treatment plant. Environ. Health Perspect., 19:103-105 (1977)
- 4 Cohen L. A., Diet and cancer. Scientific American, 257: 42-48 (1987)
- 5 Heikinki H., ENVIRONMENTAL CARCINOGENESIS. Ed. Cooper G., Grover F., Chemical carcinogenesis and mutagenesis I. Springer Verlag, Berlin, Germany, pp.33-61 (1990)
- 6 Braman R. S., Foreback C. G., Methylated forms of arsenic in the environment. Science, 182:1247-1249 (1973)
- 7 Lindeberg S. E., Andrews, A. W., Arden R. J., Fulkerson W., Mass balance of trace elements. Environ. Health Perspect., 12:9-18 (1973)
- 8 NAS, Medical and Biologic effects of environmental pollutants. arsenic national research council. National Academy of Sciences, Washington, D.C., U.S.A., (1977)
- 9 Fern V. H., Arsenic as a teratogenic agent. Environ. Health Perspect., 19: 213-217 (1977)
- 10 Vladimir E., Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of arsenic. Environ. Health Perspect., 19: 179-182 (1977)
- 11 Carson A., (1987). Toxicology and biological monitoring of metals in human systems.
- 12 Dehnudt G., Leonard A., Arany J., Edisson G., Delevignette F., In vivo studies in male mice on the mutagenic effects of inorganic arsenic. Mutagenesis, 6: 33-34 (1986)
- 13 Gilani H. S., Alibhai Y., Teratogenicity of metals to chick embryos. Journal of Toxicol. and Environ. Health, 30: 23-31 (1990)
- 14 Pershagen G., The carcinogenicity of arsenic.

Environmental Health Perspectives, 40: 93-100 (1980)

- 15 Del Razo L. M., Arellano M. A., Cebrian M. E., The oxidation states of arsenic in well-water from a chronic arsenicism area of northern Mexico. Environmental Pollution, 64: 143-152 (1990)
- 16 Bertolero F., Pozzi G., Sabbioni E., Saffiotti U., Cellular uptake and metabolic reduction of pentavalent to trivalent arsenic as determinants of cytotoxicity and morphological transformation. Carcinogenesis, 6: 8:803-806 (1987)
- 17 Beckman G., Beckman L., Nordenson I., Chromosome aberrations in workers exposed to arsenic. Environ. H. Perspec., 19: 145-148 (1977)
- 18 U. S. Public Health Service, Drinking water standards. F. H. S. Public. #986, Washington D. C. (1961)
- 19 Battley P. R., O'Shea J. A., The absorption of arsenic and its relation to carcinoma. British J. of Dermatol., 90:543-556 (1975)
- 20 Yamanaka K., Hasagawa A., Sawamura F., Inade S., Dimethylated arsenics induce DNA strand breaks in lung via the production of active oxygen in mice. Biochem. Biophys. Res. Commun., 165 (1): 43-50 (1989)
- 21 Buchet J. P., Lauwergs R., Roels H., Comparison of the urinary excretion of arsenic metabolites after a single oral dose of sodium arsenite, monomethyl arsenate or dimethyl arsenate in man. Int. Arch. Occup. Environ. Health, 48: 71-79 (1981)
- 22 Lanz H., Wallace F. C., Hamilton J. G., The metabolism of arsenic in laboratory animals using AS 74 as trace. Univ. California Publ. Pharmacol., 2: 263-282 (1950)
- 23 Fenroy C., Charbonneau S. M., Mc Cullough R. S., Tan C. K., Human retention studies with AS 74. Toxicology and Applied Pharmacology, 13: 550-559 (1966)
- 24 Crevelius E. A., Changes in the chemical speciation of arsenic following ingestion by man. Environ. H. Perspec., 19: 147-150 (1977)
- 25 Vehter M., Norin H., Metabolism of <sup>74</sup>As-labeled trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice. Environ. Res., 21:446-457 (1980)
- 26 Schiller C. M., Fowler B. A., Woods J. S., Effects of arsenic on pyruvate dehydrogenase activation. Environ. H. Perspec., 19: 205-207. (1977)

- 27 Roldan E., Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and satellite associations in human lymphocytes cultures exposed to vanadium pentoxide. Mutat. Res., 2-S: 61-65 (1990)
- 28 Rossman T. G., Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis. Mol. Toxicol., 2: 1-9 (1989)
- 29 Cherian G., Metallothionein and metal toxicity. CBQ Press, Boca Raton, FL, U.S.A., pp. 2003-2024, (1987)
- 30 Fishbein L., Furst A., Mehler M. A., Genotoxic and carcinogenic metals: environmental and occupational occurrence and exposure. Princeton Scientific Publishing Co. Inc. U.S.A., pp. 109-207, (1987)
- 31 Rossman T. G., Mown M. S., Trull W., Effects of arsenite on DNA repair in Escherichia coli. Environ. H. Perspect., 19: 229-233 (1977)
- 32 Okui T., Fujiwara Y., Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the co-mutagenic effect in V79 chinese hamster cells. Mutat. Res., 171: 69-76 (1986)
- 33 Petres J., Barron D., Hagedorn M., Effects of arsenic cell metabolism and cell proliferation: cytogenetic and biochemical studies. Environm. Health Perspect., 19: 207-233 (1977)
- 34 Wan B., Christian R. T., Soukup S. W., Studies of cytogenetic effects of sodium arsenicals on mammalian cells in vitro. Environ. Mutag., 4: 493-498, (1982)
- 35 Wen N., Lieu T. L., Chang H. J., Wu S. W., Yau M. L., Jan K. Y., Baseline and sodium arsenite-induced sister chromatid exchange in cultured lymphocytes from patients with blackfoot disease and healthy persons. Human Genetics, 59: 201-206 (1981)
- 36 McCabe M., Maguire D., Nowak M., The effects of arsenic compounds on human and bovine lymphocytes mitogenesis "in vitro". Environm. Res., 31: 319-331 (1982)
- 37 Zanboni F., Jung E. G., Arsenic elevates the sister chromatid exchange rate in human lymphocytes in vitro. Arch. Dermatol. Res., 267: 91-95 (1980)
- 38 Nakamuro K., Seyato Y., Comparative studies of chromosomal aberrations induced by trivalent and pentavalent arsenic. Mutation Research, 88: 73-80 (1981)
- 39 Swains A., Protective effect of selenium against arsenic

induced chromosomal damage in cultured human lymphocytes. Hereditas, 99: 249-252 (1983).

40 Sharma A., Talukder G., Effects of metals on chromosomes of higher organisms. Environ. Mutagen., 9:191-206. (1987)

41 Crossen R., Arsenic and sister chromatid exchange in human lymphocytes. Mutat. Res., 119: 415-419 (1983)

42 Burgdorf W., Kurvink M., Cervenka J., Elevated sister chromatid exchange rate in lymphocytes of subjects treated with arsenic. Human Genetics, 36: 69-72 (1977)

43 King H., Lunford E. J., The relation between the constitution of arsenicals and their action on the cell division. J. Chem. Soc., 9: 2046. (1930)

44 Walder E., Robertson M., Jeremy J., Spin centers and immunosuppression. Lancet, 2109-2110. (1971)

45 Volans G., Sims J., Sullivan F., Basic Science in Toxicology, V. ICI, Ed. Taylor & Francis, Great Britain (1991).

46 Ostrosky-Wegman P., Montero F., Hernandez N., Ruiz L., Gasque, Herrera L., Ruiz M., Cortinas C., Rodriguez R., Lymphocyte proliferation kinetics as a cytostatic screening system. Environ. Mol. Mutag., 11: 73-80 (1988)

47 Cebrían M. E., Albores A., Aguilar M., Blakely E., Chronic arsenic poisoning in the North of Mexico. Human Toxicology, 2: 121-133 (1983).

48 Gebhart E., Heavy metals induced chromosome damage. Life Chemistry Reports, 7: 113-148 (1989)

49 Leonard A., Lauwreys F. R., Carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity of arsenic. Mutat. Res., 75: 49-61 (1980)

50 Jacobson-Krur D., Montalvo L., The reproductive effects assessment groups report on the mutagenicity of inorganic arsenic. Environ. Mutag., 7: 787-804 (1985)

51 Gebhart E., Chromosome damage in individuals exposed to heavy metals. In: Merian E., Frei W., Hardi W., Schlatter C., Carcinogenic and mutagenic metal compounds, Ed. Gordon & Breach, New York, U.S.A., pp. 213-225 (1985)

52 Kanematsu N., Hara M., Kada T., Rec assay and mutagenicity studies of metal compounds. Mutat. Res., 77: 109 (1980)

53 Ostrosky-Wegman P., Gensebatt M. E., Montero F., Vega

54. Barba H., Espinosa J., Falao A., Cortinas C., Garcia V., Del Razo L., Cebrián M., Lymphocytes proliferation kinetics and genotoxic effects. A pilot study on human chronically exposed to arsenic in Mexico. Mutat. Res., 250: 477-482 (1991)
54. Mc Carthy M., Michalski J., Sears E., McDonnals C., Inhibition of polyamine synthesis suppresses human lymphocyte proliferation without decreasing cytokine production or interleukine 2 receptor expression. Immunopharmacology, 20: 11-20 (1993)
55. Møller J., Hoffman E., Langhoff E., Damgaard Jacobsen N., Odum N., Dickmeiss E., Ryder L., Thastrup C., Sharff O., Foder B., Immunodeficiency after allogeneic bone marrow transplantation in man. Effect of phorbol ester (phorbol myristate acetate) and calcium ionophore (A23187) in vitro. Scand. Immunol., 31: 461-467 (1989)
56. Orson F., Saadeh C., Lewis D., Nelson D., Interleukin 2 receptor expression by T cells in human aging. Cell Immunol., 124: 278-281 (1989)
57. Rodl S., Fuchs G., Khoshrorur G., Iberer F., Tscheliessnigg F., Lipoprotein-induced modulation of cyclosporine-A-mediated immunosuppression. Eur. J. Clin., 20: 248-252 (1990)
58. Tice R., Thorne P., Schneider E., Blisack analysis of the phytohemagglutinin-induced proliferation of human peripheral lymphocytes. Cell Tissue Kinet., 12: 1-9 (1979)
59. Dehnudt G., Cell kinetics and radiosensitivity of human lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin. Histaria floribunda or Lentil lectin. Can. J. Genet. Cytol., 24: 761-769 (1982)
60. Mutchinick G., Lisker R., Ron L., Salemate F., Armandares S., Frequency of sister chromatid exchanges in severe protein caloric malnutrition. Ann. Recept., 20: 129-132 (1979)
61. Ortin S., Rotenscourt M., Cell proliferation in bone marrow cells of severely malnourished animals. J. Nutr., 114: 471-476 (1984)
62. Hadnagy W., Seemayer N., Tomingas R., Cytogenetic effects of airborne particulate matter in human lymphocytes in vitro. Mutat. Res., 175: 97-101 (1988)
63. Rupa D., Reddy P., Reddy G., Analysis of sister chromatid exchanges, cell kinetics and mitotic index in lymphocytes of smoking pesticides sprayers. Mutat. Res., 223: 253-258 (1989)

64 Tselepi M., Demopoulos N., Catsoulacos O., Induction of sister chromatid exchanges and cell division delay in human lymphocytes by the anti-tumor agent homo- $\alpha$ -steroidal ester of p-bis (2-chloroethyl) aminophenoxy acetic acid. Mutagenesis, 4: 361-364 (1989)

65 Purrott R., Vulpis N., Lloyd D., The use of harlequin staining to measure delay in the human lymphocytes cell cycle induced by in vitro X irradiation. Mutat. Res., 69: 275-282 (1980)

66 Ostrosky-Wegman P., Garcia G., Arellano L., Espinosa J., Montero R., Cortinas C., Genotoxicity of antiamebic, anthelmintic and antimycotic drugs in human lymphocytes. In: Tice R., Hollaender A., Sister chromatid exchanges. New York Plenum Press, U.S.A., 915-925 (1992)

67 Klaus G., Hawrylowicz O., Cell cycle control in lymphocyte stimulation. Immunol. Today, 9: 15-19 (1988)

68 Reitt I., Bronstoff J., Male D., Immunology, C. V. Mosby Missouri, U.S.A., 34-37, (1989)

69 Prescott D. M., Reproduction of the eucaryotic cells. Academic Press, New York (1976)

70 Lajthla L., Oliver R., Gurney O., Kinetics model of a bone-marrow stem-cell population. Erit. J. Haematol., 8: 442-460 (1992)

71 Means A., Tash J., Chafouleas J., Physiological implications of the presence, distribution and regulation of calmodulin in eukaryotic cells. Physiol. Rev., 62: 1-29 (1992)

72 Gensebatt E. M. E., Cinética de la proliferación celular e intercambios de cromátidas hermanas basales e inducidas por mitomicina c en linfocitos humanos cultivados en solución salina balanceada suplementada con plasma autólogo. Tesis de Maestría en Ciencias Facultad de Ciencias, U.N.A.M. (1989)

73 Fardes A., Dobrou R., Hamlin J., Kletznier R., Animal cell cycle. Ann. Rev. Biochem., 47: 715-750 (1978)

74 Alberts E., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J., Molecular biology of the cell. Garland Publishing Inc., New York, U.S.A., pp. 345-267, (1989)

75 Perry F., Wolff S., New Giemsa method for differential staining of sister chromatids. Nature, 261: 156 (1974)

76 Painter R. B., A replication model for sister chromatid

exchange. Mutat. Res., 70: 337-341 (1980)

77 Morales R. P., Rodriguez R. R., Vallarino K. T., Fate of DNA lesions that elicit sister chromatid exchanges. Mutat. Res., (1990)

78 Moorhead P. S., Nowell P. C., Mellman W. J., Battips D. M. and Hungerford D. A., Chromosomes preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp. Cell. Res., 20: 613-616 (1960)

79 Zbinden G., The relationship between clinical immunology and classical experimental immunotoxicology. In: Volans G., Sims J., Sullivan F., Turner P., Basic science in toxicology. Taylor and Francis, USA pp 344-353 (1990)

80 Sneller M., Sweder W., Abnormalities of lymphokine gene expression in patients with common variable immunodeficiency. J. Immunol., (150: 144: 3782-3789 (1990)