

14
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
" ZARAGOZA "

EFFECTOS DEL ARSENICO SOBRE LA
FRECUENCIA DE ABERRACIONES
CROMOSOMICAS E ICH EN TILAPIAS DEL
GENERO Oreochromys (PISCES: CICHLIDAE)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ALMA ELIA DE JESUS LEIVA GARCIA



MEXICO, D. F.

1992



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.

I INTRODUCCION	1
Contaminación ambiental	1
Métodos para estudiar los efectos de la contaminación	3
Biomonitores ambientales	7
Estudios realizados con organismos acuáticos	8
Los metales como agentes tóxicos	9
Arsénico	10
Efectos sobre la salud	12
II MATERIAL Y METODO	15
III RESULTADOS Y DISCUSION	20
IV CONCLUSIONES	31
ANEXO	32
BIBLIOGRAFIA	34

CONTAMINACION AMBIENTAL

Hasta hace algunos años se tenía el concepto de que la contaminación era una molestia que había que tolerar, una consecuencia inevitable de la vida urbana e, incluso, un símbolo de prosperidad. Con el desarrollo de la tecnología y de la investigación, se ha demostrado que los efectos de la contaminación no son simples molestias sino que influyen notablemente en la salud humana, (Chediack y Albert, 1990).

La industria química ha prosperado enormemente, estimándose que entre 60,000 y 100,000 productos se utilizan diariamente y de éstos, cerca de 7,000 son producidos en grandes cantidades. Muchas de estas sustancias tienen poco o ningún efecto adverso sobre el ambiente, pero algunas otras pueden dañar la salud humana y el medio natural; usualmente estos efectos aparecen después de un uso prolongado, (Moutschen, 1985; Connell, 1987; Menzer, 1987; Fernández, 1989; Parodi *et al*, 1990).

La distribución de los químicos en el ambiente comprende procesos muy complejos, los cuales se gobiernan por las propiedades fisicoquímicas de éstos y del ambiente mismo. Como un primer paso para comprender dichos procesos, el medio se ha separado en fases o compartimentos, siendo básicamente aire, suelo y agua. (Connell, 1987).

La contaminación del aire tiene una larga historia, que ya habla del uso de los combustibles fósiles como su causa. El invento de la máquina

de vapor marcó el inicio de la revolución industrial, llenando a Europa y América de fábricas que arrojaban al medio grandes cantidades de humo; existen actualmente muchos centros urbanos e industriales que tienen problemas importantes de contaminación atmosférica, entre ellos se encuentran algunas ciudades como la Ciudad de México.

Para poder controlar, reducir y, de ser posible, eliminar del aire los principales contaminantes, es necesario conocer cuáles son sus principales fuentes de producción, los mecanismos naturales de protección de la atmósfera, las condiciones climatológicas y geográficas que aumentan o disminuyen el riesgo, así como la interacción de los diversos componentes de la atmósfera (Molina, 1990).

Respecto a la contaminación de suelos, se ha visto que los desechos industriales además de los insecticidas del tipo del DDT y compuestos similares cuando son vertidos en suelos que originalmente son fértiles, se acumulan en la tierra provocando que las propiedades fisicoquímicas y biológicas se vean alteradas disminuyendo con esto la productividad del suelo, (Turk, 1973).

En cuanto a la contaminación del agua, éste es un problema de naturaleza acumulativa (Cubillas, 1987). Las vías principales para que ocurra esta contaminación son los desechos industriales, agrícolas y los generados de otras actividades cotidianas del hombre. Muchos de estos desechos se consideran contaminantes que contienen mutágenos y carcinógenos conocidos o que se sospecha que lo son, mismos que pueden acumularse en el sedimento y, como consecuencia, pueden afectar el buen desarrollo de la vida acuática además de ser un peligro potencial para la salud humana. La

presencia de estas sustancias puede tener repercusiones en las especies acuáticas, e incluso en las cadenas alimenticias llegando a afectar o modificar a las poblaciones (Zakour, *et al*, 1984; Connell, 1987; Meier, 1988; Fernández, *et al* 1989).

METODOS PARA ESTUDIAR LOS EFECTOS DE LA CONTAMINACION

El efecto de los contaminantes se puede observar a nivel histológico, celular, subcelular o molecular, siendo modificado por un gran número de factores incluyendo el estado fisiológico del organismo en estudio.

En la actualidad es posible evaluar el daño cromosómico producido por un agente químico, para lo cual se han establecido técnicas mediante las que pueden detectarse alteraciones en la morfología y/o número de cromosomas.

La mayoría de estas técnicas involucran el análisis de las células en diferentes etapas del ciclo celular; en la etapa de metafase se pueden reconocer dos tipos de aberración dependiendo de si una o ambas cromátidas han sido dañadas, aberración cromatídica y aberración cromosómica, respectivamente. Cabe mencionar que el tipo de lesión va a depender del momento en que sea administrado el mutágeno: será cromatídica cuando la célula ha sido tratada en G2, y es una aberración cromosómica cuando la célula es tratada durante G1 y una combinación de ambos cuando el agente es aplicado durante el período de síntesis (Wolff, 1977; Natarajan y Obe, 1982).

Las pruebas de aberraciones cromosómicas ofrecen un método

sensible para determinar si realmente un agente ambiental puede o no afectar al material genético, (Wolff, 1977)

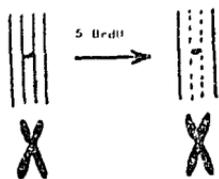
En anafase se observan entre otras, aberraciones tales como rompimientos cromosómicos y puentes, que pueden involucrar una o más cromátidas; además de observarse polarización múltiple, (Natarajan y Obe, 1982).

Durante la interfase pueden ocurrir fragmentos o bien, quedar cromosomas completos que se retrasan durante la anafase y no quedan incluidos dentro del núcleo principal, y en la siguiente interfase éstos se condensan y forman un pequeño núcleo al cual se le denomina micronúcleo, (Natarajan y Obe, 1982).

Se ha observado que la mayoría de los rompimientos cromosómicos son reparados y entonces pasan inadvertidos al usar estos métodos clásicos de estudio para medir el daño cromosómico causado por agentes mutágenicos. Sin embargo, otra prueba citogenética es la que permite visualizar Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH); un ICH puede definirse como un intercambio simétrico de cromátidas de un mismo cromosoma, siendo visibles en cromosomas metafásicos, (Kligerman y Bloom, 1976; Carrano, 1978; Perry y Evans, 1975; Natarajan y Obe, 1982)

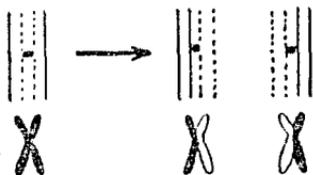
Los ICH fueron descritos inicialmente por Taylor y colaboradores en 1957 utilizando métodos autorradiográficos; sin embargo al ver que esta técnica resultaba costosa y difícil se buscaron nuevas opciones, desarrollándose la técnica FPG (Fluorescent Plus Giemsa) propuesta por Wolff y Perry, (1974) en la que las células son expuestas

durante dos ciclos de replicación a un análogo de la timina, el 5-Bromo uracilo, mismo que a su vez forma parte de la 5-Bromodesoxiuridina (5-BrdU). Los cromosomas que se observan posteriormente en metafases de segundo ciclo (M2) contienen una cromátida con una cadena bromosustituida y la otra con ambas cadenas sustituidas por el análogo, de tal manera que al ser teñidas con un colorante fluorescente seguido de una tinción con Giemsa, presentaran una coloración diferencial en sus cromátidas, siendo una más clara que la otra, (Stetka y Carrano, 1977).



Incorporación de
5 Bromodesoxiuridina

(Primer ciclo replicativo)



Cromátidas bromosustituidas
en ambas cadenas de ADN

(Segundo ciclo replicativo, M2)

La diferencia entre las dos pruebas citogenéticas (aberraciones cromosómicas e ICH), radica en que son el resultado de diferentes lesiones, esto es, un ICH es el producto de una reparación del Acido Desoxirribonucleico (ADN) después de haber sido dañado por un agente poco antes de la replicación, mientras que las aberraciones cromosómicas son el resultado del daño provocado al ADN antes, después o durante el período de síntesis (Gebhart, 1981; Wolff, 1978).

Cabe señalar que los ICH y las aberraciones cromosómicas son dos fenómenos citogenéticos muy diferentes como respuesta a la acción mutagénica, por lo que sustituir la técnica clásica de aberraciones cromosómicas por la de ICH no es justificable, sino que se deben usar como técnicas complementarias (Gebhart, 1981; Natarajan y Obe, 1982).

Algunos trabajos para determinar daño cromosómico se han hecho mediante el cultivo de linfocitos, sin embargo el análisis *in vivo* nos puede ofrecer muchas ventajas en comparación con el anterior.

Los trabajos *in vitro* pueden ser más sencillos y rápidos, pero no contemplan severos problemas potenciales, ya que las células se desarrollan en medios que contienen sustancias que pueden influir en la respuesta de éstas y cabe la posibilidad de que el agente que se está estudiando requiera de una activación o inactivación para producir una respuesta determinada en el organismo (Stetka y Wolff, 1976a), por lo que los datos obtenidos pueden no ser totalmente representativos del daño que causa ese agente.

Los estudios *in vivo*, permiten examinar células que normalmente son quiescentes (como las de hígado) además de aquéllas precursoras de las germinales. Se pueden examinar las variadas rutas que sigue el tóxico; los mutágenos pueden activarse o inactivarse de acuerdo al metabolismo propio del organismo y se puede establecer qué metabolitos son los causantes del daño (Stetka y Wolff, 1976b; Schneider, 1982).

Sin embargo no deben dejarse de lado los estudios *in vitro*, ya que son importantes para trabajar con especies que se encuentran en peligro de extinción sin necesidad de sacrificar a los organismos y poner en riesgo

su permanencia en la biósfera.

BIOMONITORES AMBIENTALES

Se ha definido bioacumulación como la capacidad que tiene un organismo para concentrar en sus tejidos un elemento o compuesto proveniente del alimento y/o agua a un nivel más alto que aquél de su ambiente (Reilly, 1980). Los organismos que poseen esta característica han sido denominados como biomonitores ambientales y son empleados para medir las concentraciones de sustancias tóxicas en el ambiente a nivel local, regional e incluso nacional (Cubillas, 1987).

El uso de organismos como biomonitores ambientales tiene grandes ventajas pues:

- a) Proveen un aviso para descubrir e identificar los elementos tóxicos en estados tempranos de contaminación.
- b) Permiten identificar áreas de impacto y de acumulación, posibilitando la medida del daño ambiental y las rutas por las que llega el contaminante.
- c) Permiten definir las vías de exposición al hombre (Agua, Aire o Suelo)
- d) Proporcionan un medio de monitoreo continuo en el tiempo, integrando a la exposición biológica muchos otros factores en el ambiente.
- e) Ayudan a que se evalué la efectividad de las medidas de control.

En resumen, las plantas y animales pueden servir como monitores biológicos para evaluar los cambios en los niveles de contaminación ambiental y como puntos de referencia determinan directa o indirectamente el efecto de los contaminantes en humanos (Jenkins, 1981).

ESTUDIOS REALIZADOS CON ORGANISMOS ACUATICOS

Muchos estudios para determinar el daño que los contaminantes pueden producir en la vida acuática emplean bioensayos utilizando vertebrados como ranas y/o sus huevecillos, invertebrados acuáticos y algunas algas de importancia dentro del ecosistema.

Para determinar la toxicidad de sustancias que se encuentran presentes en el agua debido a la actividad antropogénica, se han realizado estudios con crustáceos principalmente con *Daphnia*, extrapolando los resultados hacia otros organismos acuáticos como los peces. Dentro de estos estudios se han evaluado metales pesados, insecticidas, detergentes, desechos de nylon, cambios en la temperatura y el efecto que pueden producir las aguas duras sobre los organismos, (Katz, 1971).

Otros organismos como los moluscos han sido empleados para realizar bioensayos de calidad del agua, ya que son extremadamente sensibles en la evaluación de metales pesados y/o desechos industriales (Katz, 1971).

Algunos autores como Strawbridge y Patrick (1963), han sugerido el uso de algas como indicadores de contaminación por detergentes, insecticidas y fungicidas.

El uso de peces para establecer los efectos dañinos de aguas contaminadas no es nuevo, pues se dice que ya desde hace unos 100 años estos organismos fueron empleados para hacer evaluaciones de algunas soluciones de ácidos, sales y otras sustancias presentes en los afluentes;

estos y muchos otros estudios han puesto en evidencia que estas especies son sensibles y presentan una tolerancia tal que permite una gran variedad de observaciones (Katz, 1971; Jenkins, 1981) ya que se ha visto que los peces poseen la "maquinaria" metabólica necesaria para la biotransformación de sustancias xenobióticas, siendo estos mecanismos similares a los encontrados en mamíferos (Bagnasco *et al*, 1991).

LOS METALES COMO AGENTES TOXICOS

Los metales que han sido considerados tóxicos son elementos que pueden no tener una función benéfica esencial pero si una posibilidad de efecto catastrófico sobre las funciones metabólicas normales, aún en pequeñas cantidades (Reilly, 1980).

Los metales constituyen un gran riesgo para los organismos incluyendo al ser humano, debido a su amplia producción, uso, persistencia en el ambiente y su carácter acumulativo en plantas y animales. Ejemplo de éstos son plomo, cadmio, mercurio, níquel y arsénico, que pueden llegar a los organismos a través del agua, aire, ingestión de alimentos contaminados y drogas, (Jenkins, 1981; Connell, 1987) produciendo una serie de efectos e intoxicaciones crónicas que pueden ocasionar algunas muertes, o cuando las concentraciones sobrepasan los límites máximos permisibles para su consumo.

El modo de acción de los metales a nivel celular es muy variado, muchos actúan a nivel de membrana, cambiando la permeabilidad de la célula o mitocondria provocando disturbios dentro del metabolismo energético.

A nivel molecular, los metales interactúan con proteínas, provocando su

desnaturalización, precipitación o efectos sobre su biosíntesis,(Sharma y Talukder, 1984).

Los efectos citotóxicos de los metales tienden a recibir una mayor atención ya que algunos se han identificado como carcinógenos y teratógenos. Se ha observado que muchos actúan produciendo efectos sobre la división celular presentándose como mitogénicos o más frecuentemente como mitostáticos; algunas veces dañan a las fibras del huso acromático provocando una separación no balanceada de los cromosomas al momento de la citocinesis (Sharma y Talukder, 1984).

ARSENICO

El arsénico (As) es un elemento químico considerado como metaloide que tiene la particularidad de presentar diferentes números de oxidación (-3, 0, +3, +5) y se encuentra presente en pequeñas cantidades en toda la corteza terrestre en un promedio de 2 ppm, (Diez, 1987).

En algunos casos, el arsénico debe su presencia a la actividad humana, debido al uso de medicamentos (principalmente veterinarios), plaguicidas, preservadores de madera, fabricación de pinturas, ácido sulfúrico, vidrio, cerámica, etc. (Dickerson, 1980; Castro, 1982; Moutschen, 1985; Galvao y Corey, 1987; Menzer, 1987; Harper y Miranda, 1990).

Las principales vías de exposición al elemento, en humanos, son la respiratoria, la oral y la cutánea. Según sea su valencia o sus combinaciones presentará mayor o menor riesgo para la salud humana; el arsénico que se encuentra en la naturaleza es en gran parte pentavalente y

relativamente poco tóxico. El arsénico de tipo industrial ocurre preferentemente bajo la forma trivalente, que es mucho más tóxica para el organismo. La combinación del arsénico con otros compuestos químicos altera su toxicidad en función de la liposolubilidad del compuesto y de la valencia del arsénico en él, (Castro, 1982; Galvao y Corey, 1987).

Un factor crítico en el proceso de absorción del As es la liposolubilidad ya que entre más liposoluble sea un compuesto penetrará más fácilmente las membranas biológicas, tal es el caso de muchos arsenicales de tipo orgánico (Castro, 1982). Los arsenicales inorgánicos en cambio, penetran con mayor dificultad, sin embargo lo pueden hacer por inhalación o ingestión.

Una vez que el arsénico se absorbe, su modo de distribución dependerá del compuesto, de la especie en que se hace la observación y del tiempo de exposición al elemento.

En cuanto a la excreción, el arsénico y sus compuestos difieren bastante entre sí en las velocidades y en las vías para excretarse, usualmente los compuestos orgánicos se excretan por la orina sin transformarse, en cambio, el arsénico inorgánico se metila *in vivo* antes de la excreción (Castro, 1982; Yamanaka *et al*, 1991)

Por otro lado, en cuanto a las interacciones del arsénico con los componentes celulares se ha visto que las más importantes son las que tienen lugar con los grupos sulfhidriños de proteínas y cofactores (Castro, 1982).

EFFECTOS SOBRE LA SALUD

Los efectos adversos del arsénico sobre la salud son muy variados y van desde lesiones de la piel hasta cuadros clínicos graves de los sistemas gastrointestinal, circulatorio periférico y nervioso.

La intoxicación aguda presenta dos tipos de manifestaciones diferentes : gastrointestinales (vómitos, diarreas y dolores abdominales) y nerviosas (cefalea, crisis convulsivas y pérdida del conocimiento). La dosis letal de arsénico, especialmente inorgánico, es baja (DL50 oral para ratas de 8 a 48 mg/kg) y puede ocurrir muerte dentro de las 48 horas siguientes a la ingestión, (Tsuchiya *et al*, 1977; Stokinger, 1981; Castro, 1982; Diez, 1987; Galvao y Corey, 1987).

Las manifestaciones crónicas son más frecuentes y se observan en poblaciones ocupacional y no ocupacionalmente expuestas al arsénico. Estas manifestaciones se dan en varios órganos, como son: piel, mucosas, sistema nervioso (neuritis periférica), alteraciones hematológicas (anemia moderada y leucopenia), alteraciones hepáticas (cirrosis, cáncer primario y hepatobiliar) y problemas cardiovasculares (Castro, 1982; Díaz-Barriga *et al*, 1990).

En cuanto a los efectos carcinogénicos, se ha visto que el cáncer de piel se presenta en la población general que ingiere habitualmente agua contaminada con arsénico; el período de latencia puede ser hasta de 24 años. La ingestión de arsénico en preparaciones medicinales (solución de Fowler) se asocia con dermatopatología : hiperqueratosis, hiperpigmentación y cáncer de piel (Vega, 1985).

Algunas alteraciones teratogénicas, como anencefalia, agenesia renal y otras malformaciones, han sido demostradas en estudios experimentales con roedores y pollos principalmente y, aunque no han sido comprobadas en el hombre, es probable que esto suceda, ya que el arsénico puede traspasar la barrera placentaria (Castro, 1982; Diez, 1987; Galvao, 1987). A este respecto Tsuchiya (1977) reconoce este efecto solo en animales y no asegura que lo haya en humanos.

El arsénico ha demostrado además, ser mutagénico en estudios epidemiológicos en humanos y en estudios experimentales.

Las evidencias acerca de la acción mutagénica de compuestos arsenicales incluyen aberraciones cromosómicas y de huso acromático (Sharma y Talukder, 1987).

También se han observados niveles elevados de ICH, y acción antimitótica y se han comprobado estas alteraciones experimentalmente *in vitro* (Tsuchiya *et al*, 1977; Stokinger, 1981; Castro, 1982).

Un ejemplo claro de contaminación acuática por arsénico se puede observar en nuestro país, en La Comarca Lagunera, en donde en el agua se estima un promedio de 0.075 mg por litro. Su presencia es atribuida a sobreexplotación del acuífero, actividades mineras de la región, aplicación de plaguicidas de tipo arsenical y la presencia natural del elemento en la corteza terrestre, (Cubillas, 1987).

Es importante reconocer que no solo la población humana de esta región está expuesta al metal, sino también plantas y animales del lugar

y muy especialmente, las especies de vida acuática; entre estas últimas, las Tilapias del género *Oreochromys* mismas que abundan y son consumidas por los pobladores del lugar, por lo que, debido a su carácter bioacumulativo pudieran ser una fuente más de consumo de As para el hombre.

En virtud de que estos peces son de importancia económica además de ser un ejemplo en nuestro país, de exposición directa a un sinnúmero de contaminantes presentes en la Comarca Lagunera, entre ellos el arsénico, y de que son escasos los estudios acerca de los efectos genotóxicos que pudiera causarles el As de su habitat, se planteó el siguiente trabajo, cuyo objetivo fue determinar la frecuencia de aberraciones cromosómicas e ICH en tilapias, aplicando 3 diferentes concentraciones y 3 diferentes tiempos de exposición a una sal de arsenico (arseniato de sodio).

La hipótesis que se planteó fue la siguiente :

Ya que los estudios realizados con mamíferos al ser expuestos al arsénico, han demostrado que la frecuencia de aberraciones cromosómicas e ICH se ve incrementada, se espera que al someter peces a diferentes concentraciones y diferentes tiempos de exposición a una sal de arsénico la respuesta sea similar, viéndose aumentada proporcionalmente a las concentraciones y tiempos de exposición la frecuencia de éstas anormilades.

II MATERIAL Y METODO

Se trabajó con peces de la especie *Oreochromys aurea* obtenidos en la granja piscícola "Eusebio Jauregui", en Cuautla, Morelos; se mantuvieron en los estanques de la UAM-Iztapalapa y conforme se requirieron para el trabajo se llevaron al laboratorio, donde se colocaron en peceras de 40 l a una temperatura aproximada de 23°C y con aireación continua para su aclimatación (aproximadamente dos semanas).

Para el estudio de aberraciones cromosómicas, se elaboró el cariotipo de estos organismos, para lo cual se utilizó la técnica propuesta en 1975 por Kligerman *et al*, para *Umbra limi*, a la cual se tuvo que hacer algunas modificaciones hasta obtener figuras mitóticas de buena calidad en los organismos de estudio, probando diferentes tejidos del animal para determinar en cuál de ellos se obtenía la mayor cantidad de células en mitosis así como la mejor calidad de las mismas .

Se inyectaron 10 organismos (5 hembras y 5 machos) intraperitonealmente (i.p) con colchicina a una concentración del 0.025%, probando 0.1 ml, 0.5 ml y 1 ml por gramo de peso corporal y, variando el tiempo de exposición desde 30 minutos hasta 4 horas; esto con la finalidad de establecer la concentración y tiempo óptimos.

Posteriormente los peces fueron sacrificados por decapitación y se obtuvieron el hígado, los arcos branquiales y el intestino, que fueron macerados por separado en una solución hipotónica de cloruro de potasio (KCl) al 0.4 % y fijados 30 minutos después en una mezcla de metanol y ácido acético en proporción de 3 a 1. Las preparaciones se realizaron por el

método de secado a la flama y se tiñeron con Giemsa al 5 % en buffer de Sørensen pH 6.8. Se revisaron 10 preparaciones y se eligieron 5 mitosis de buena calidad, las cuales se fotografiaron y con ellas se elaboró el cariotipo de la especie para contrastarlo con el reportado por Kornfield (1979) y asegurar que se trataba de la especie de referencia.

Con el propósito de establecer si el arseniato de sodio produce algún tipo de aberración cromosómica en las células del epitelio branquial de las tilapias se planteó el siguiente diseño experimental:

Primero, para determinar si la concentración a la que están expuestos los peces es un factor determinante en el tipo o la frecuencia de aberraciones cromosómicas se manejaron 3 concentraciones, las cuales fueron elegidas con base en los límites permisibles reportados para la vida acuática : 0.05 mg/l en E.U.A y 0.1 mg/l en Inglaterra (Castro 1982), además de la concentración promedio reportada para la Comarca Lagunera por Cubillas (1987) que es de 0.075 mg/l.

Segundo, para poder evaluar si el tiempo de exposición al arsénico puede alterar significativamente los parámetros antes mencionados; los peces fueron expuestos durante 4, 7 y 11 días a una concentración de 0.075 mg/l; el tiempo de exposición se eligió con base en los estudios realizados por Alink *et al*, (1980).

TIEMPO CONC.	4 DIAS	7 DIAS	11 DIAS
0.00 mg/l	X	X	X
0.050 mg/l		X	
0.075 mg/l	X	X	X
0.100 mg/l		X	

Tiempos y concentraciones empleados en los diferentes lotes experimentales.

La técnica empleada para aberraciones cromosómicas fue la propuesta anteriormente (Kligerman *et al*, 1975), que con las modificaciones hechas para adecuarla a la especie en estudio y a las condiciones de laboratorio consistió en los siguientes puntos :

Una vez que los organismos de cada lote cumplieron el tiempo de exposición al tóxico y, dos horas antes del sacrificio se les inyectó i.p. colchicina a una concentración de 0.025 % a razón de 0.1 ml por gramo de peso corporal. Se decapitaron y se extrajeron los arcos branquiales; el epitelio branquial se maceró en solución hipotónica de cloruro de potasio (KCl) al 0.4 % y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos; posteriormente se centrifugó a 1500 r.p.m., se eliminó el sobrenadante , se agregó fijador (metanol-ácido acético en proporción 3:1) y, se mantuvo a 4°C por lo menos durante 12 horas. El material obtenido se lavó varias veces con fijador hasta que se obtuvo un sobrenadante claro.

Las preparaciones se realizaron por el método de secado a la

flama y se tiñeron con Giemsa al 5 % en buffer de Sørensen pH 6.8; se observaron al microscopio y se contó un promedio de 2000 células por organismo, indicando cuántas se encontraban en interfase y en mitosis y además si existían aberraciones cromosómicas y de que tipo.

Se elaboraron tablas de frecuencias y se efectuaron pruebas de X^2 y análisis de varianza, para determinar si existen o no diferencias significativas entre grupos experimentales y testigos, así como entre concentraciones y tiempos de exposición.

Cabe mencionar que con el objeto de detectar posibles aberraciones cromosómicas en otras fases de la mitosis, se estableció igual número de lotes que los que propone el diseño experimental anterior, a los cuales no se les administró colchicina.

En cuanto a la frecuencia de ICH, se aplicó la técnica de tinción diferencial de cromátidas hermanas denominada FPG (Fluorescent Plus Giemsa), propuesta para peces por Kligerman (1976, 1979), la cual, siguiendo el diseño experimental explicado anteriormente, se llevó a cabo de la siguiente manera:

Tres días antes de sacrificar al organismo se le inyectó i.p. 5-Bromodesoxiuridina (5-BrdU) a razón de 0.5 μ g por gramo de peso corporal. Una vez que se cumplió este tiempo, se inyectó colchicina al 0.025 % i.p. dos horas antes del sacrificio, a razón de 0.1 ml por gramo de peso corporal; en esta parte a todos los organismos de cada lote se les inyectó colchicina, ya que para observar ICH se requiere de figuras C-mitóticas. Los pasos siguientes fueron los descritos para la técnica de aberraciones cromosómicas.

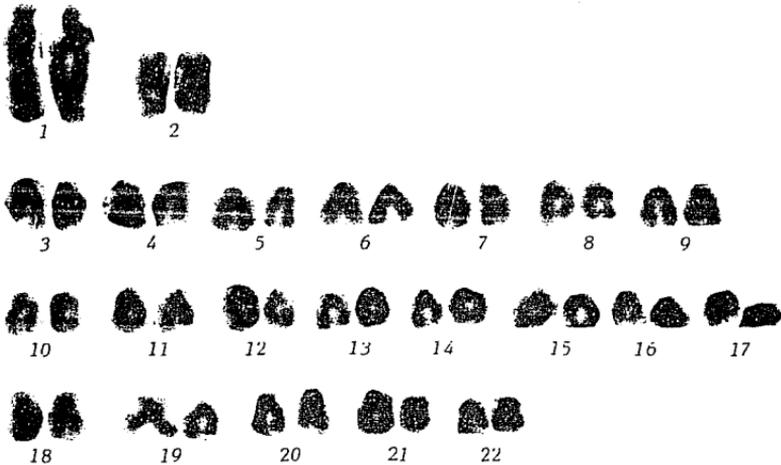
Las preparaciones se tiñeron con Hoechst 33258, (1 mg de fluorocromo en 2 ml de etanol) durante 20 minutos (en la oscuridad); se lavaron en buffer de citratos y se expusieron durante dos horas a una lámpara de luz negra rica en radiaciones de 280 a 350 nm (Sankyo-Denki Blak light blue 20 W, FL20 SBL-B), a una distancia arroximada de 2.5 cm y humedecidas de buffer de citratos.

Se mantuvieron 20 minutos en buffer de Sörensen (pH 6.8) a 60°C y se tiñeron con Giemsa (MERCK) al 5% en Sörensen pH 6.8 durante siete minutos. Se observaron las preparaciones y se analizaron los resultados.

III RESULTADOS Y DISCUSION

En relación con la técnica para la obtención de cromosomas en esta especie y bajo las condiciones en que se trabajó, se observó que 2 horas de tratamiento con una dosis de colchicina de 0.1 ml al 0.025% por cada 10 gramos de peso corporal, es el tiempo ideal para la obtención de cromosomas de buena calidad.

Una vez que se estableció la técnica, se elaboró el cariotipo de estos organismos, encontrando que el número diploide es de 44 cromosomas; se ordenaron de acuerdo con Kornfield, *et al* (1979): los pares 1 y 2 son grandes y submetacéntricos, del 3 al 17 acrocéntricos y pequeños y, el último grupo, del 16 al 22 son submetacéntricos.

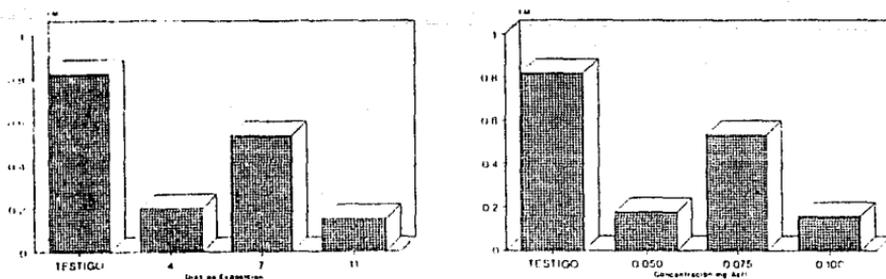


Carotipo de la especie *Oreochromys aureus*.

Se pudo observar que en ésta especie no existe dimorfismo cromosómico sexual, coincidiendo con lo observado en cíclidos del mar de Galilea por Kornfield, *et al* (1979)

El índice mitótico se midió en todos los lotes experimentales tratados con colchicina (por la facilidad para identificar las células en mitosis) y se encontró que éste es bajo en comparación con el obtenido para los grupos control (gráfica 1).

Esto hace pensar que el arseniato de sodio en las concentraciones y tiempos de exposición empleados tiene un efecto citotóxico, posiblemente retardando el desarrollo y disminuyendo la sobrevivencia celular.



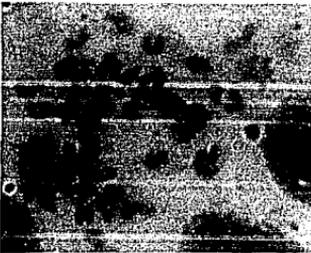
GRAFICA 1. Índice mitótico obtenido en los lotes testigo y experimental

(a) Diferentes concentraciones (b) Diferentes tiempos

En las mitosis analizadas no se encontraron aberraciones cromosómicas, ni en los peces tratados con colchicina ni en los que no la tenían, por lo cual se puede pensar que las concentraciones empleadas no son lo suficientemente altas como para producir daños de este tipo.

Sin embargo se observó la presencia de micronúcleos, núcleos anormales y metafases anormales, además de c-mitosis en organismos a los que no se les inyectó colchicina (figura 2).

Núcleos anormales



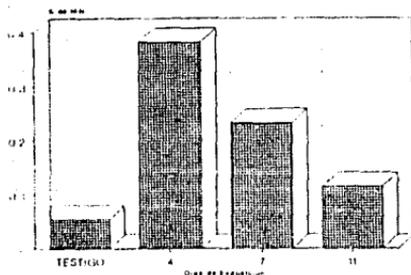
Metafases Anormales



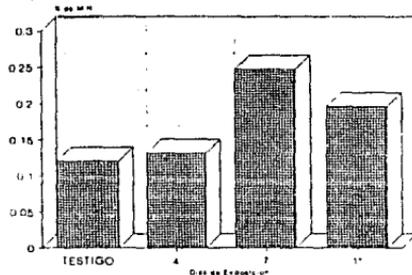
Micronúcleos

En cuanto a los micronúcleos el porcentaje de éstos, tanto en los organismos tratados con colchicina como en los que no se les aplicó, fue bajo; para poder establecer si existen diferencias significativas entre los lotes testigo y experimentales, en los lotes expuestos a diferentes tiempos (graficas 2 y 3), se aplicó la prueba de X^2 , observando que no existe diferencia significativa ($P > 0.05$).

Esta misma prueba aplicada a los datos obtenidos en los tratamientos con diferentes concentraciones muestra que no existen diferencias entre los lotes que fueron expuestos y los que no lo fueron.



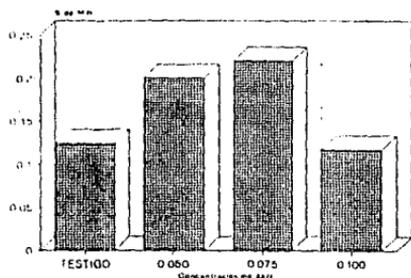
GRAFICA 2. Porcentaje de micronúcleos (tiempo, con colchicina)



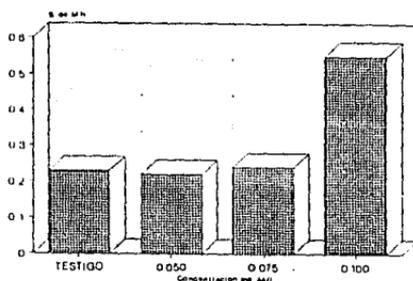
GRAFICA 3. Porcentaje de micronúcleos (tiempo, sin colchicina)

Para establecer si existe diferencia significativa entre los diferentes tiempos de exposición se realizó la prueba de análisis de varianza, encontrando que no hay diferencias que puedan considerarse significativas entre los porcentajes de micronúcleos en los 3 tiempos de exposición empleados.

Esta misma prueba aplicada a los datos obtenidos en las diferentes concentraciones empleadas (gráficas 4 y 5), muestra una situación igual a la explicada anteriormente.



GRAFICA 4. Porcentaje de micronúcleos (concentración, con colchicina)

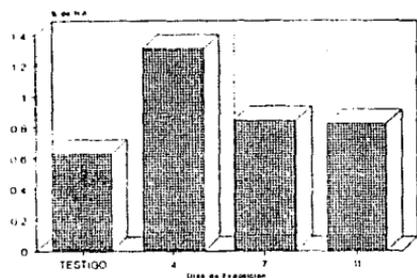


GRAFICA 5. Porcentaje de micronúcleos (concentración, sin colchicina).

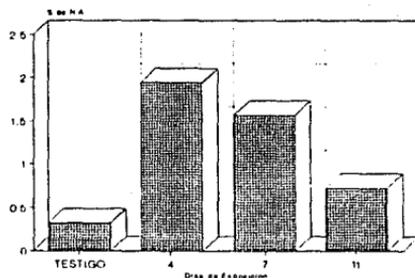
Como núcleos anormales, se consideraron a todos aquéllos con una morfología diferente a la normal, esto es, aquellos que presentaban una zona clara en su centro, dando la impresión de un hueco, o bien, zonas claras distribuidas en todo el núcleo. El porcentaje de estos núcleos fue bajo, sin embargo, para poder establecer si existía diferencia significativa entre los grupos testigo y los experimentales, se calculó el valor de X^2 . Se encontró que entre los grupos tratados durante 4 y 7 días sin colchicina existe diferencia significativa con respecto al testigo; de igual manera en los grupos tratados con colchicina y con una concentración de 0.050 mg/l se observa diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo. Los grupos restantes no mostraron diferencias, (Gráficas 6 a 9).

Probablemente estas zonas hipocrómicas sean debidas a que el arsénico se

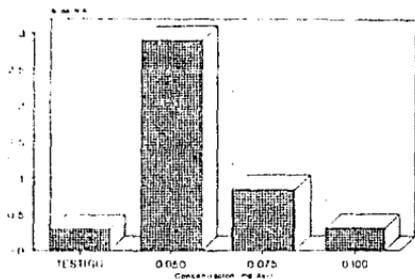
está incorporando en las cadenas de ADN que se están sintetizando en esos núcleos y que, conforme pasa el tiempo, por un lado, o se aumenta la concentración, los núcleos van tomando una apariencia clara más homogénea, por lo que ya no se identifican como núcleos anormales.



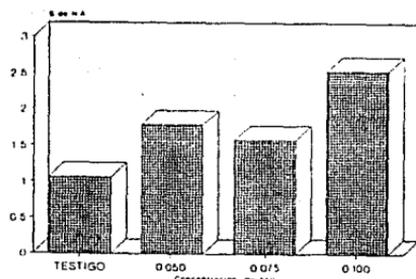
GRAFICA 6. Porcentaje de núcleos anormales (tiempo, con colchicina)



GRAFICA 7. Porcentaje de núcleos anormales (tiempo, sin colchicina)



GRAFICA 8. Porcentaje de núcleos anormales (concentración, con colchicina)

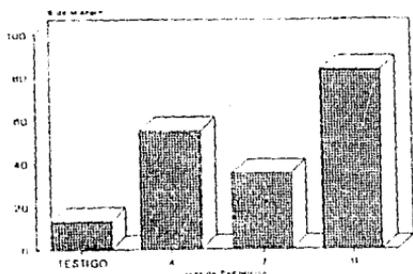


GRAFICA 9. Porcentaje de núcleos anormales (concentración sin colchicina)

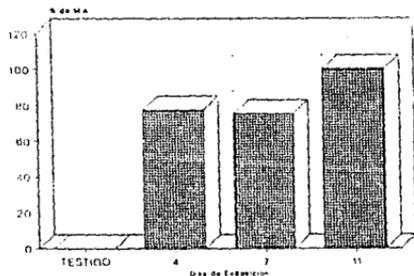
En contraste con los resultados anteriores el porcentaje de metafases consideradas anormales fue muy elevado en todos los tratamientos tanto de tiempo como de concentración, así como en los organismos tratados con y sin colchicina .

Se consideraron como anormales a todas aquellas c-metafases presentes en preparaciones de organismos que no fueron tratados con colchicina; aquellas en las que se observaron cromosomas muy engrosados o desespiralizados y aquéllas que presentaban cromosomas con un patrón de tinción de bandas G, ya que ningún organismo fue tratado para obtener este tipo de tinción.

Para los tiempos de exposición, la prueba estadística de X^2 mostró una marcada diferencia entre los lotes testigo y los experimentales (gráficas 10 y 11). Sin embargo el análisis de varianza aplicado a los datos obtenidos, muestra que no existe diferencia significativa entre los diferentes tiempos de exposición.

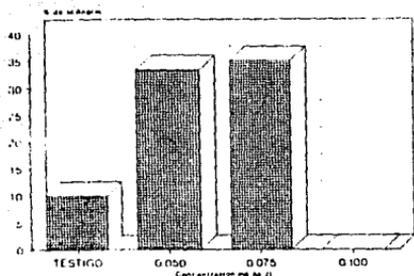


GRAFICA 10. Metáfases anormales
(tiempo, con colchicina)

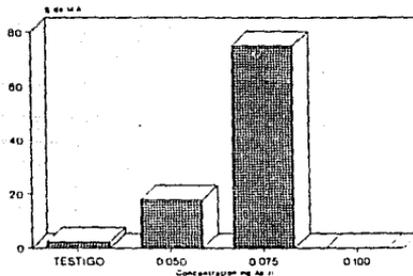


GRAFICA 11: Metáfases anormales
(tiempo, sin colchicina)

En cuanto a las concentraciones empleadas, la prueba de X^2 indica que existe diferencia significativa entre los grupos control y los experimentales, esto se puede apreciar en las gráficas 12 y 13.



GRAFICA 12. Metafasas anormales
(concentración, con colchicina)



GRAFICA 13. Metafasas anormales
(concentración, sin colchicina)

El análisis de varianza mostró que no hay diferencia entre las diferentes concentraciones empleadas.

Lo anterior se puede explicar con base en los estudios efectuados por Castro (1982) y Sharma y Talukder (1987), quienes postulan que el As puede sustituir en la cadena de ADN al fósforo, produciendo una molécula lábil y poco compacta; con esto se podrá explicar la elevada frecuencia de cromosomas aparentemente desespiralizados o engrosados, además de que, al no tener la compactación adecuada se generan zonas

menos cromáticas que otras, dando una tinción heterogénea de la cromatina, por lo que se observarían cromosomas bandeados, como los descritos anteriormente.

Considerando el estudio de Sharma y Talukder (1987), se puede pensar que la elevada frecuencia de c-mitosis en los organismos que no fueron tratados con colchicina, se debe a que el arsénico produce aberraciones a nivel de huso acromático, por lo que se puede considerar como un agente citostático.

En cuanto a las pruebas de ICH, se revisaron las preparaciones encontrando pocas mitosis de buena calidad y en las cuales no se apreció tinción diferencial, por lo que se decidió probar diferentes agentes reportados para aumentar el número de mitosis. Se aplicó cloruro de calcio (Maldonado, 1985) al 0.1% disuelto en solución fisiológica, a razón de 0.025 ml por cada 5 cm de longitud, pero este compuesto resultó ser nocivo para los organismos, los cuales murieron antes de cumplir el tiempo de exposición al As. Se ensayó entonces con concanavalina-A (ConA) (Banerjee, 1987) y fitohemaglutinina (PHA), aplicando 2 inyecciones de Con-A, con un intervalo de 24 horas, en dosis de 5 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal y, en un segundo experimento, sólo se aplicaron 5 $\mu\text{g/g}$ de ConA; en cuanto a la PHA se inyectó 0.1 ml por cada 10 g de peso corporal, observándose que no hubo aumento significativo de metafases, por lo que se eliminó de la técnica el aplicar estos agentes mitógenos.

Por otro lado, al observar que no había resultados positivos para la tinción diferencial, se pensó que no se incorporaba la BrdU al ADN, pudiendo deberse a que el tiempo de exposición no era suficiente, o bien, a

transcurrieran dos ciclos de replicación.

Se hicieron entonces modificaciones, primero de tiempo de exposición, aplicando una dosis de $5\mu\text{g}$ de BrdU por gramo de peso corporal y sacrificando a los peces a los 2, 4, 5, 7, 9 y 11 días después de aplicar el análogo.

A otros organismos se les aplicó una dosis doble de BrdU, inyectándoles $5\mu\text{g/g}$ de ésta, una semana después de su aclimatación y aplicando una segunda inyección 48 horas después de la primera. Los organismos se sacrificaron a las 72 horas de exposición total a la BrdU.

Los resultados obtenidos en ambas pruebas fueron negativos, es decir, no se observó tinción diferencial. Se hizo entonces una sola aplicación pero ahora a una concentración de $10\mu\text{g/g}$, es decir, el doble de lo reportado, se sacrificó a las 48 horas de aplicada ésta, sin obtener resultados positivos.

Para descartar la posibilidad de que el metabolismo de los organismos estuviera interviniendo de alguna manera en la incorporación de la BrdU, se hicieron pruebas *in vitro* utilizando cultivos de células sanguíneas, siguiendo la técnica propuesta por Betancourt (1969) y Frías (1975) (ver anexo).

En los cultivos testigo, a los cuales no se les adicionó ni As ni BrdU, se observaron una gran cantidad de metafases de de muy buena calidad, es decir, con cromosomas bien definidos, pero en los cultivos a los que se les adicionó BrdU se observaron pocas metafases de mala calidad y por lo tanto no era posible observar tinción diferencial.

Por lo anterior se pensó que la BrdU influye de alguna manera en la actividad citocinética de los linfocitos, sin descartar la idea de que este compuesto y el As tuvieran una respuesta diferente al actuar individual o conjuntamente.

IV CONCLUSIONES

- El arsénico en forma de sal de arseniato de sodio (Na_2HAsO_4), disminuye significativamente el índice mitótico en las células epiteliales de branquias de tilapia.
- El arsénico no incrementa la frecuencia de micronúcleos en las células del epitelio branquial de tilapias expuestas a concentraciones de 0.050, 0.075 y 0.100 mg/l durante 4, 7 y 11 días de exposición.
- Se observa un incremento de núcleos anormales en los lotes de 4 y 7 días de exposición sin colchicina y en el de 0.050 mg/l de arsénico con colchicina, pero no en los lotes restantes. Estas diferencias pueden ser debidas a la cinética de acumulación del arsénico durante el período de síntesis.
- En todos los organismos expuestos al arsénico se encontró un aumento significativo en la frecuencia de metafases anormales, principalmente de aquellas con cromosomas con morfología anormal y c-metafases en lotes que no recibieron tratamiento con colchicina, por lo cual se puede considerar al arsénico como un elemento que se intercala en la molécula de ADN y además como un agente c-mitótico.

ANEXO

CULTIVO DE LINFOCITOS DE TILAPIAS

Para la realización de esta técnica se tomaron en cuenta los trabajos realizados por Fenoccio y Bertollo (1988), Ojima *et al* (1970), Betancourt (1969) y Frías (1975), haciendo las adecuaciones necesarias para nuestros organismos y condiciones de trabajo; realizándose finalmente de la siguiente manera:

Se extrajo por punción cardíaca de 1 a 2 ml de sangre (dependiendo del tamaño del organismo)

En un frasco ampula estéril se agregaron 4 ml de medio McCoy, 0.3 ml de Fitohemaglutinina, 4 gotas de antibac, 3 gotas de heparina y 8 gotas de la sangre extraída.

Los frascos se mantuvieron durante 96 horas (4 días) a una temperatura de 20° C. Transcurrido este tiempo se agregó a los cultivos 0.1 ml de colcemida, para realizar la cosecha 2 horas después.

Para cosechar se removió el contenido de los frascos y se centrifugó a 1 500 r.p.m. durante 10 minutos desechando el sobrenadante. Se agregó solución hipotónica (KCl al 4%) dejándolo durante 20 minutos; posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 1 500 r.p.m. eliminando el sobrenadante, se agregó fijador (metanol-ácido acético, 3:1) y se guardó al menos una noche a 4° C.

Se centrifugó nuevamente eliminando el sobrenadante y se enjuagó el botón resultante con fijador hasta obtener un sobrenadante claro.

Las preparaciones se hicieron por el método de secado a la flama tiñéndolas con Giemsa pH 6.8 en bufer de Sörensen, durante 7 minutos, observándose metafases de muy buena calidad.

BIBLIOGRAFIA

- * Alink, G.M.; Frederix-Wolters, E.M.; van der Gaag, M.A.; van der Kerkhoff, J.F.; Poels, C.L.; (1980) Induction of sister chromatid exchanges in fish exposed to rhine water. *Mutat. Res.* 78: 369-374
- * Bagnasco, M.; Camoirano, A.; DeFlora, S.; Melodia, F.; Arillo, A.; (1991) Enhanced liver metabolism of mutagens and carcinogens in fish living in polluted freshwater. *Mutat. Res.* 262 :129-137
- * Banerjee, S.; (1987) Induction of fish division *in vivo* by Concanavalin A. *Indian J. Exp. Biol.* 25 :556-558
- * Barker, C.J.; Rackham, B.D.; (1979) The induction of sister chromatid exchanges in cultured fish cells (*Ameioba splendens*) by carcinogenic mutagens *Mutat. Res.* 68 :381-387
- * Castro, J.A.; (1982) Efectos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos del arsénico. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* (16) 1 :3-17
- * Carrano, A.V.; (1978) Sister chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis. *Nature* 271 :551-553
- * Connell, W.D.; (1987) Ecotoxicology - A framework for investigations of hazardous chemicals in the environment. *AMBIO* (16) 1 :47-50
- * Cubillas, C.B.; (1987) Reporte : Impacto y evaluación de sustancias tóxicas IMTA, SARH, México 1: 1-39
- * Chediack, R.; Albert, A.L.; (1990) Toxicología ambiental. Ed. Limusa, OMS. OPS. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. México.
- * Díaz-Barriga, F.; Llamas, E.; Mejía, J.; Carrizales, L.; Santoyo, M.; Vega-Vega, L.; Yáñez, L.; (1990) Arsenic - Cadmium interactions in rats. *Toxicology* 64 :191-203
- * Dickerson, O.B.; (1980) Arsenic. *In* Waldron, H.A., *Metals in the environment*, Acad. Press. U.S.A. p. 1-25

- * Díez,J.; (1987) El arsénico en el agua subterránea. Asociación Geohidrológica de México, Memorias del Primer Simposio "El agua Subterránea en la Región Lagunera". México.
- * Fenoccio,S.A.; Bertollo,A.C.; (1988) A simple method for fresh water lymphocyte cultured. Rev. Gen. Brasil (11) 4 :847-852
- * Fernández,M.; Gauthier,L.; Andre,J.; (1989) Use of newt larvae for *in vivo* genotoxicity testing of water: results on 19 compounds evaluated by micronucleus test. Mutagenesis (4) 1 :17-26
- * Galvão,L.A.; Corey,G.; (1987) Arsénico. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OMS. Serie Vigilancia No. 3. México.
- * Gebhart,E.; (1981) Sister chromatid exchange (SCE) and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. Hum. Gen. 58 :235-254
- * Harper,M.; Miranda,P.; (1990) Management of health risks in the arsenic production industry: modern production in Chile in the context of past experience in Britain. Ann.Ocup.Hyg. (34) 5 :471-482
- * Jenkins,D.W.; (1981) Biological monitoring of toxic trace elements. EPA- 600/S3-80-090 : 1-10
- * Katz,M.; (1971) Toxicity bioassay techniques using aquatic organisms *In: Water and Water pollution Handbook.* p. 763-800
- * Kligerman,A.D.; (1979) Induction of sister chromatid exchanges in the central mudminnow following *in vivo* exposure to mutagenic agents. Mutat.Res. 64 :205-217
- * Kligerman,A.D.; Bloom,S.E.; Howell,W.M.; (1975) *Umbra limi* a model for the study of chromosome aberrations in fishes. Mutat.Res. 31 :225-233
- * Kligerman,A.D.; Bloom,S.E.; (1976) Sister chromatid differentiation and exchanges in adults mudminnows (*Umbra limi*) after *in vivo* exposure to 5-Bromodeoxyuridine. Chromosoma 56: 101-109
- * Kornfield,I.D.; Ritte,U.; Richler,C.; Wahrman,J.; (1979) Biochemical and cytological differentiation among cichlid fishes of the sea of Galilee. Evolution. Intl. J. Org. Evol. 33 :1-14

- * Maldonado, M.M.C.; (1981) Estudio Cariotípico de *Dormitor maculatus Bloch* y *Gobimonus dormitor Lacepede gobiidae* (Pisces : Perciformes) Tesis Profesional Facultad de Ciencias, U.N.A.M.
- * Meier, R.J.; (1988) Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water *Mutat. Res.* 196 :211-245
- * Menzer, R.E.; (1987) Water and soil pollutants, *In: Cubillas C.B., impacto y evaluación de sustancias tóxicas.* Instituto Mexicano de Toxicología del Agua, SARH. México.
- * Molina, G.A.; (1990) Contaminantes atmosféricos primarios *In: Albert, A.L.; Toxicología Ambiental*, Ed. Limusa, OMS, OPS. México.
- * Moutschen, J.; (1985) Introduction to aquatic toxicology. John Wiley & Sons. New York, U.S.A.
- * Natarajan, A.T.; Obe, G.; (1982) Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: Cytogenetic Assays. *In: Heddle, A.J.; Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*, Acad. Press. U.S.A.
- * Ojima, Y.; Hitotsumachi, S.; Hayashi, M.; (1970) A blood cultured Method for fish chromosomes. *Japan J. Genetics.* 45 (2) 161: 161-162
- * Parodi, S.; Taningher, M.; Romano, S.; Grilli, S.; Santi, L.; (1990) Mutagenic and carcinogenic potency indices and their correlation. *Terat. Carcin. Mutat.* 10: 177-197
- * Perry, P.; Evans, H.J.; (1975) Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 258: 121-125
- * Reilly, C.; (1980) Metal contamination in food. Appl. Sci. Publishers, LTD. England.
- * Schneider, E.L.; (1982) In vivo methods for detecting sister chromatid exchange. *In: Sister Chromatid exchange.* Edited by Sheldon Wolff, U.S.A.
- * Sharma, A.; Talukder, G.; (1987) Effects of metals on chromosomes of higher organisms. *Environmental Mutagenesis* 9: 191-226

- * Stetka,D.G.; Wolff,S.; (1976a) Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens I In in vivo test for compounds requiring metabolic activation. *Mutat. Res.* 41: 333-342
- * Stetka,D.G.; Wolff,S.; (1976b) Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens. II In vitro test for compounds requiring metabolic activation. *Mutat. Res.* 41: 343-350
- * Stetka,D.G.; Carrano,A.V.; (1977) The interaction of Hoechst and BrdU substituted DNA in the formation of sister chromatid exchanges. *Chromosoma* 63: 21-31
- * Stokinger,H.E.,1981; The metals. *In: Patty's industrial hygiene and toxicology.* Clayton G.D., Clayton F.E. Eds. New York, U.S.A.
- * Tsuchiya,K.; Ishinishi,N; Fowler,B.A.,(1977); *In: Toxicology of metals.* V. II, Springfield,V.B. National Technical Information Service. U.S.A.
- * Turk,T.W.; (1973) *Ecología - Contaminación - Medio ambiente* Ed. Interamericana. México. p.227
- * Vega,G.S.; (1985) Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. *OPS. OMS.* 6: 5-12 México.
- * Wolff,S; (1978) Report of the workshop on the utility of sister chromatid exchange. *Mutat. Res.* 64: 53-56
- * Wolff,S.; (1983) Cytogenetics and environmental mutagens *In: Genetics: New Frontiers.* XV International Congress of Genetics, V.III Genetics and Health. India.
- * Wolff,S.; Perry,P.; (1974) Differential Giemsa Staining of Sister Chromatids and the study of Sister Chromatid Exchanges Without Autoradiography. *Chromosoma* 48: 341-353
- * Yamanaka,K.; Hassegawa,A.; Sawamura,R.; Okada,S.; Cellular response to oxidative damage in lung induced by the administration of dimethylarsenic acid. A major metabolite of inorganic arsenics in mice. *Toxicol. Appl. Pharm.* 108: 205-213

* Zakour,R.H.; Landolt,L.M.; Kocan,M.R.; (1984) Sister chromatid exchange analysis in cultured of coldwater marine fish, pacific stghorn sculpin (Leptocottus arnaatus): a feasible system for assessing genotoxic marine pollutants. *In*: Tice,R.; Sister Chromatid exchange. Acad. Press. U.S.A.