



00381  
13  
29.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**Facultad de Ciencias**  
División de Estudios de Posgrado

**Efectos Genotóxicos de Algunas Sales de  
Arsénico en *Drosophila melanogaster*.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:  
**Doctora en Ciencias (Biología)**  
P r e s e n t a

**M. en C. Patricia Ramos Morales**

Directora de Tesis : Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz

México, D.F.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1994



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**Dedico esta tesis:**

A mi madre, porque me enseñaste a amar la vida y me acompañas todos los días.

A mi padre, porque con tu ejemplo y cariño aprendí a trabajar.

A Juan, por tu apoyo, amor y paciencia.

A mis hijos Ma. Patricia, Citlalli y Juan Carlos, porque al sonreír son la fuerza que me impulsa.

A mis hermanos y sobrinos, por los buenos momentos.

A mi tío Guillermo, porque el apoyo que me brindaste fue esencial para continuar superándome.

A todos mis compañeros y amigos, por su compañía.

## Agradecimientos

A la Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz por la dirección de ésta tesis, sus críticas y sugerencias.

A los Doctores: Judith Isabel Guzmán Rincón, Manuel Uribe Alcocer, Martha Patricia Ostrosky Shejet, Saúl Villa Treviño, Ma. Cristina Pérez-Amador Barrón y Sara Frías Vázquez, por aceptar formar parte del jurado y sus acertados comentarios.

Al personal, tesistas, servicios sociales e invitados del Laboratorio de Genética, porque de ellos aprendo algo todos los días.

A mis alumnos, porque me hacen superarme.

A todas las personas que de alguna u otra forma contribuyeron a la realización de esta tesis.

Y, a *Drosophila melanogaster*.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Genética "Theodosius Dobzhansky" de la Facultad de Ciencias de la UNAM y fue apoyada parcialmente por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, como parte del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación Docente. Proyecto: IN-027689.

## INDICE

	Pág.
RESUMEN	i
I. INTRODUCCION	1
Naturaleza química del arsénico	1
Origen	1
Toxicidad del As	21
Mecanismos de acción tóxica	23
Efectos genotóxicos del arsénico	29
Interacción del As con otros metales	39
Epidemiología	40
Efectos teratogénicos	43
Ensayos de genotoxicidad	46
<i>Drosophila</i> como sistema de prueba	54
II. MATERIAL Y METODOS	63
A. Células germinales	65
B. Células somáticas	70
III. RESULTADOS	76
IV. DISCUSION	94
V. CONCLUSIONES	122
VI. REFERENCIAS	123

## RESUMEN

La exposición crónica al arsénico (As) constituye un importante problema de salud en México, sobre todo en la zona de la Comarca Lagunera, en la cual se han detectado concentraciones, 10 veces superiores a la máxima permisible.

Existe evidencia epidemiológica substancial que relaciona al arsénico con riesgo de diversos tipos de cáncer.

El objetivo general de la presente tesis es: **determinar los efectos genotóxicos inducidos por dos sales de arsénico, arsenito ( $\text{NaAsO}_2$ ) y arsenato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ) en *Drosophila melanogaster*.**

Se usaron las pruebas de letales recesivos ligados al sexo (SLRLT) y la de pérdida cromosómica y no disyunción de cromosomas sexuales (SCLT) para células germinales, con un sistema de camadas 0-2, 3-5 y 6-8. En la prueba de SLRL se emplearon dos rutas de administración: inyección de adultos y alimentación de larvas de  $48 \pm 4$  hr. de edad, durante 48 hr. (tratamiento agudo y subcrónico, respectivamente). En la prueba SCL, los compuestos se inyectaron a machos adultos (tratamiento agudo) en tres concentraciones: [50, 100 y 150 ppm. de arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ )] y [100, 250 y 500 de arsenato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ )], el testigo concurrente en todos los casos fue sacarosa al 5%, el cual también se utilizó como solvente.

La prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) se realizó de manera separada, utilizando células de los discos imagales de los ojos y las alas de larvas de tercer estadio, respectivamente, las cuales se trataron durante 6 horas con diferentes concentraciones de los dos compuestos.

Para determinar si el metabolismo juega un papel esencial en la respuesta de los organismos ante las sales utilizadas, se emplearon células de los discos imagales de los ojos y las alas de cepas de *Drosophila* con capacidad metabólica diferencial.

La menor toxicidad del arsenato de sodio favoreció la expresión de alteraciones genéticas, en contraste con el arsenito de sodio, que por su alta toxicidad en la mayoría de las pruebas realizadas, provocó la muerte de las células u organismos afecta

dos.

En la SLRLT el arsenito de sodio incrementó la frecuencia de letales en la camada B ( $P < 0.01$ ) cuando se administró por inyección a machos; pero no incrementó la frecuencia de letales cuando se administró por alimentación durante 96 horas a larvas de 48 horas de edad [1, 2 y 3 ppm.]. La prueba cromosómica no aportó información acerca de la genotoxicidad del arsenito. En SMART de las alas de líneas estándar se indujeron manchas chicas, y en la prueba de los ojos también se incrementó la frecuencia de manchas totales ( $P < 0.05$ ); sin embargo, las frecuencias de manchas grandes obtenidas en la prueba de los ojos en hembras y machos, hizo evidente que en las pruebas aplicadas solamente se detectó parte del daño, debido probablemente a que la toxicidad del arsenito inactiva o elimina a parte de las células afectadas. El metabolismo diferencial en las pruebas somáticas no proporcionó mayor información acerca de este compuesto.

Por su parte, la menor toxicidad del arsenato permitió recobrar más información en relación con sus efectos genotóxicos. En la prueba de letales recesivos, fue detectado daño en las camadas A (100 ppm.) y C (200 ppm.), cuando se administró por inyección a los adultos ( $P < 0.05$ ); posteriormente la respuesta se localizó en la camada A cuando se administró durante 96 horas a larvas de 48 horas de edad (2 y 4 ppm) ( $P < 0.01$ ). Al igual que en el caso del arsenito, la prueba cromosómica no aportó información sobre la genotoxicidad del compuesto. En la prueba somática de las alas, se indujeron manchas chicas pero las frecuencias no fueron significativas y no se recobró ninguna mancha grande. La respuesta fue negativa al utilizar moscas con metabolismo diferencial. En la prueba de los ojos, en las hembras se indujeron manchas chicas y totales en relación con la concentración administrada ( $P < 0.05$ ); también incrementó la frecuencia de manchas grandes, pero en un patrón menos definido; en los machos fue aun más evidente el efecto de la toxicidad, ya que tanto la frecuencia de manchas chicas, grandes y totales mostraron una relación inversa con las concentraciones utilizadas, lo cual se interpretó como el resultado de la



toxicidad del arsenato de sodio. Tampoco en el caso del arsenato el metabolismo diferencial aportó mayor información.

Los objetivos planteados para este estudio se cumplieron al hacer evidente la genotoxicidad de ambas sales en la inducción de alteraciones genéticas, tanto en células germinales como en somáticas. Como resultado de la evaluación de los efectos genotóxicos del arsenito y el arsenato de sodio, se puede considerar que, ambos son mutágenos débiles de acción directa y muy probablemente co-carcinógenos, al facilitar la acción de otros compuestos, ya sea por la inhibición de la incorporación de energía necesaria para el metabolismo de los organismos, o por inducir lesiones que sensibilicen a las células dañadas.

## **I. INTRODUCCION**

### **Naturaleza química del arsénico**

El arsénico (As) tiene una configuración electrónica externa de  $4s^2 4p^3$  y se ubica entre los elementos del grupo  $V_A$  (N, P, As, Sb, Bi); la reducción de la electronegatividad que se encuentra en la descendencia de este grupo no es suficiente para conferirle mucho carácter metálico, o para producir cationes simples. Con frecuencia, ha sido descrito como un metaloide; pero con el fin de comprender su comportamiento en los suelos, es conveniente considerarlo un elemento no metálico que forma compuestos covalentes, o que se encuentra en especies aniónicas. Es similar químicamente al fósforo (P) porque en el estado de oxidación +5 forman oxianiones (arsenato y fosfato) en el suelo, sin embargo, el fosfato es mucho más estable en un amplio rango de condiciones de Eh y pH. El As también se encuentra en suelos en el estado de oxidación +3, con otros ligandos además del oxígeno; y forma especies estables que no se encuentran con el P (Alloway, 1990).

En el estado sólido, existe en cuatro formas alotrópicas: amarillo [As(I)], amorfo [As(II)], ortorómbico [As(III)], y romboédrico [As(IV)]; la energía libre contenida es menor en la romboédrica y las otras, son metaestables. La forma amarilla es la menos estable, y existe sólo a bajas temperaturas y en la oscuridad (Rodionov et al. 1979).

Aunque no es un metal, el arsénico tiene muchas de las propiedades de un metal pesado, y su efecto tóxico es similar al del mercurio y el plomo. Las formas de As(III) o arsenitos, son de las más tóxicas (Manahan, 1984). Difiere del resto de los metales pesados comunes, en que la mayoría de sus compuestos orgánicos son menos tóxicos que los inorgánicos (Alloway, 1990 y Koren, 1991).

### **Origen**

Las fuentes naturales de As en suelo son principalmente oxisales y minerales; por su capacidad para unirse a ligandos de azufre es frecuente que se le encuentre asociado -si el potencial

redox es suficientemente bajo— con depósitos minerales que tienen sulfuros, o como constituyente menor de otros minerales azufrados. Las condiciones de oxidación normales en la superficie terrestre, en las que tiene lugar el desgaste, llevan a la formación de oxianiones basados en el estado de oxidación +5. Los rangos de Eh y pH en los suelos pueden llevar a As(V) o As(III) mediante la actividad microbiana, que causa metilación, desmetilación y/o cambios en el estado de oxidación. Un factor adicional es la presencia de minerales arcillosos, óxidos de hierro y aluminio y materia orgánica, la cual puede influir en la solubilidad y la tasa de oxidación (Alloway, 1990).

De los más de 200 minerales que lo contienen, el 60% son arsenatos, el 20% sulfuros y sales de azufre, y el 20% restante incluye arsenitos, óxidos y As elemental. El más común de sus minerales es la arsenopirita (FeAsS). En rocas ígneas y sedimentarias, se presenta en un promedio de 2 mg/Kg, aunque en rocas de grano más fino, del tipo de las arcillosas y ricas en fósforo, va de 10-15 mg/Kg. Niveles superiores se encuentran asociados con la presencia de minerales de azufre como las piritas (< 1-200 mg/kg); las rocas sedimentarias arcillosas (pizarras y lodos) tienen valores significativamente más elevados (< 900 mg/kg), que las arenosas y limos (< 1-20 mg/kg). A pesar de la aparente estabilidad de las especies iónicas solubles, la concentración de As en agua filtrada de suelos porosos es generalmente baja (< 10µg/l), a menos que el área sea mineralizada. La filtración del As de los suelos se inhibe por la presencia de óxidos hidratados de Fe y Al, arcilla y materia orgánica. Se le ha considerado un elemento indicador de depósitos minerales (Stokinger, 1981 y Alloway, 1990).

El arsénico se encuentra en la corteza terrestre en un nivel promedio de 2 a 5 ppm. La combustión de materiales fósiles, particularmente carbón, introduce grandes cantidades de éste en el ambiente, y una gran parte alcanza a las aguas naturales (Manahan, 1991).

La acción volcánica es la siguiente fuente natural de As en importancia; después de la volatilización a bajas temperaturas, y

en un ámbito local, puede ser la fuente atmosférica dominante (Fishbein, 1981 y Alloway, 1990).

En relación con las fuentes antropogénicas, actualmente la mayoría del As se genera como subproducto de la extracción de Cu, Pb, Au y Ag, a partir de sus precursores. Las emisiones antropogénicas varían considerablemente de un país a otro, debido a que las cifras dependen de la industrialización y el grado de control de la contaminación de éstos.

Los compuestos de arsénico tienen usos diversos: como desecantes para facilitar la cosecha del algodón, como desfoliadores, para descortezar árboles y obtener la pulpa de la madera y conservarla; también como conservador en la tenería y la taxidermia, y mordente en la peletería. En la rama pecuaria se emplea en la crianza del ganado, es un ingrediente en los promotores del crecimiento. El trióxido de arsénico ( $As_2O_3$ ) es materia prima de productos farmacéuticos como el ácido arsenilico y los cacodilatos; también es un aleador de metales, principalmente de materiales a base de plomo; se emplea para endurecerlo en la fabricación de pilas, conductores y cables de electricidad (Stokinger, 1981) y mejora la resistencia del cobre a la corrosión (Koren, 1991). Los arsenatos de calcio, cobre y plomo se usaron extensivamente como insecticidas, todavía hace algunos años. En la industria armamentista, su presencia cambia la tensión superficial del plomo para la formación de balas totalmente esféricas; para soldar y galvanizar, y muchos usos más. La tabla I muestra algunos usos de los compuestos de arsénico.

El uso de pesticidas arsenicales elevó el contenido de As en productos del tabaco a más de 40 mg/kg, sin embargo, por la prohibición del uso de éstos, el contenido de As en el tabaco ha disminuido progresivamente (Léonard y Lauwerys, 1980).

Los principales productores de arsénico son México, Suecia, Francia y la antigua Unión Soviética (Stokinger, 1981). En la actualidad, el uso de muchos arsenicales está prohibido: pesticidas, fertilizantes y pigmentos, entre otros.

Los metales circulan naturalmente por la biósfera, litósfera,

**Tabla I. Fuentes antropogénicas y usos de compuestos de arsénico.**

Fuentes:	Compuestos/usos:	Referencias:
minería (como subpro- ducto)	Cu, Au, Pb y Ag	Alloway, 1990; Fishbein, 1981 y Stokinger, 1981
pesticidas	arsenato de plomo, arsenito de sodio, verde paris	Léonard y Lauwerys, 1980; Beijer y Jernelöv, 1986a y Manahan, 1991
fungicidas	arsenito de plomo y sodio	Manahan, 1991
insecticidas	arsenatos de calcio, cobre y plomo	Stokinger, 1981
esterilizante del suelo	arsenito de sodio	Léonard y Lauwerys, 1980
pigmentos	verde paris, verde esmeralda elab- oración de otros tintes, colo- rantes y pigmentos	Fishbein, 1981 y Ko- ren, 1991
textil	impresión	Koren, 1991
cerámica	tensor de vidrio, fabricación de cerámica, colorante	Fishbein, 1981; Beijer y Jernelöv, 1986a y Koren, 1991
tenería y taxi- dermia	conservación de pieles	Fishbein, 1981 y Ko- ren, 1991
refinería (como subpro- ducto)	Cu, Au, Pb	Fishbein, 1981; Koren, 1991; Manahan, 1991 y Alloway, 1990
fundición	como anticorrosivo, en la alea- ción del acero y en compuestos a base de plomo, como estabilizador con cromo, cadmio, níquel y para aumentar la resistencia del cromo a la corrosión	Stokinger, 1981; Bei- jer y Jernelöv, 1986a y Koren, 1991
eléctrica y electrónica	para endurecer al plomo en las pilas, conductores y cables de electricidad	Stokinger, 1981 y Bei- jer y Jernelöv, 1986a
herrería	para soldar y galvanizar	Fishbein, 1981 y Sto- kinger, 1981
combustibles fósiles	principalmente carbón	Alloway, 1990 y Fish- bein, 1981

hidrósfera y atmósfera, las principales rutas de transporte atmosférico se sintetizan en la figura 1.

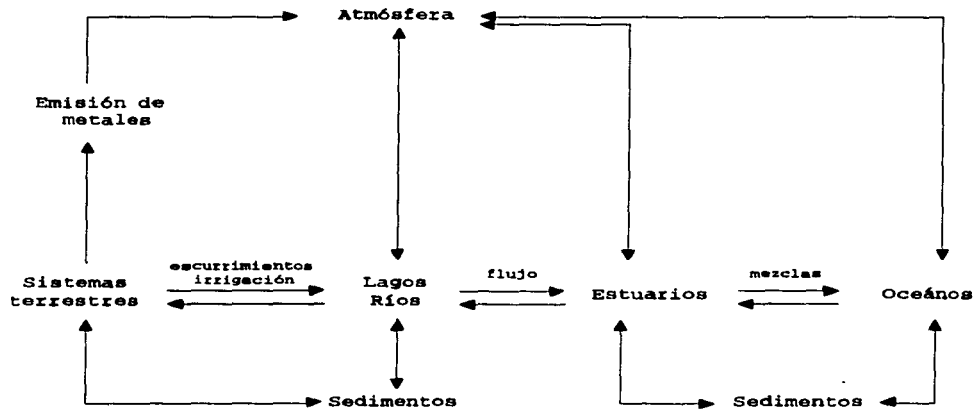
Los metales que ingresan a la atmósfera a partir de varias

**Tabla I. continuación**

forestal	desecante de madera y como ingrediente de conservadores de madera	Alloway, 1990 y Manahan, 1991
agrícola	desecante del algodón para facilitar la cosecha, principalmente el arsenito de sodio como desfoliador de mala hierba y para eliminar corteza en la extracción de la madera	Beijer y Jernelöv, 1986a; Koren, 1991 y Manahan, 1991
pecuario	en la crianza del ganado, como un ingrediente en los promotores del crecimiento y la salud para cerdos y aves de corral	Manahan, 1991
farmacéutico	para el tratamiento de enfermedades nutricionales (incluyendo anemia y pelagra), astenia, reumatismo, neuralgia, cólera, malaria, enfermedades de la piel (psoriasis) y sífilis. El $As_2O_3$ es la materia prima para productos farmacéuticos como ácido arsenilico y cacodilato; solución de Fowler	Léonard y Lauwerys, 1980
armamentista	cambia la tensión superficial del plomo para la producción de municiones y balas totalmente esféricas, para soldar y galvanizar como un ingrediente para las aleaciones	Stokinger, 1981
otros usos industriales	para evitar la descomposición en aceites lubricantes	Koren, 1991

fuentes, son transportados a distancias variables del sitio de emisión, antes de que caigan a la superficie de la tierra o de los océanos. Un factor importante es su estado: gaseoso, vapor o particulado. En el caso de material particulado, el tamaño de la partícula es un factor decisivo, la magnitud del acarreo depende de las condiciones meteorológicas, como los vientos y la precipitación, la topografía y la vegetación. La mayoría de los metales asociados con material particulado de combustión son depositados dentro de los 10 km próximos al sitio de la emisión. La fase gaseosa es importante para el transporte aéreo del mercurio, arsénico, cadmio, plomo, antimonio, selenio y zinc (Beijer y Jernelöv, 1986a).

El arsénico esta presente en el carbón en niveles que varían de 7 a 60 mg/kg, pero se han encontrado muestras con más de 200



**Fig. 1. Principales rutas de transporte atmosférico de metales (Beijer y Jernelöv, 1986b).**

mg/kg (Alloway, 1990), y casi todo se libera durante la combustión; se concentra preferencialmente en las partículas de tamaño mas pequeño, formadas por transporte de vapor dentro de las chimeneas; debe distinguirse entre arsénico particulado y en vapor (es decir,  $<0.05 \mu$ ), el cual con excepción de algunos eventos raros, contribuye con poco a la concentración atmosférica. Esto es lo esperado cuando compuestos con presiones de vapor menores de  $10^{-11}$  atm. están asociados en forma predominante con partículas. El trióxido de arsénico, aeróbicamente estable, tiene presiones de vapor de sólo  $6 \times 10^{-12}$  atm.; la proporción de arsénico particulado: arsénico en vapor, se relaciona de manera inversa con la temperatura (Brimblecombe, 1979). Se ha estimado que la fase de vapor constituye sólo el 7% de la carga atmosférica y el As restante se encuentra

asociado con la fase particulada (Alloway, 1990).

La fundición de metales y la combustión de material fósil, particularmente si hay chimeneas bajas, lleva a la contaminación de suelos y cultivos en las áreas aledañas. El As se deriva principalmente de agua de lluvia superficial, que contiene As depositado de la atmósfera y residuos de pesticidas. Los detergentes fosfatados adicionan pequeñas cantidades y las descargas industriales, particularmente a partir de industrias procesadoras de metales, agregan cantidades importantes. En general, el As contenido en lodos residuales va de 0 a 188 mg As/Kg de peso seco (Alloway, 1990).

Las bajas concentraciones de arsénico en la fase de vapor, podrían reflejar a una especie con vida media relativamente corta, pero que pudiera ser de considerable importancia en su distribución entre las pequeñas partículas en aerosol (Brimblecombe, 1979).

El tiempo de residencia troposférica del arsénico emitido por combustión se estima en 9 días, muy similar al que se espera de un aerosol troposférico (Brimblecombe, 1979 y Beijer y Jernelöv, 1986b).

En 1981, Fishbein reportó, basado en un estudio de Lantzy y Makenzie (1979) que la magnitud de los flujos de emisión del arsénico (en toneladas/año), derivados de varias fuentes naturales fueron: cenizas continentales, 2500; cenizas volcánicas, 300; y gases volcánicos, 10; mientras que los generados por actividades antropogénicas fueron: emisiones particuladas industriales, 62000; uso de combustibles fósiles, 16000; lo que da un total de las segundas (industriales + combustibles fósiles) de 78000 tons/año. El factor de interferencia atmosférico, estimado como el total de emisiones antropogénicas/(flujo continental + volcánico) X 100, es de 2786 %, lo que indica que el flujo antropogénico es mucho mayor que el natural. Sin embargo, en esta estimación no se incluyeron las contribuciones de otras fuentes como los incendios forestales, la vegetación y los aerosoles. Los autores concluyeron que en una escala global, la magnitud de todas las emisiones naturales puede ser mayor que las emisiones antropogénicas para una serie importan-



te de compuestos, pero que aun no se dispone de datos suficientes para hacer un balance global para cada uno de los elementos individuales (Beijer y Jernelöv, 1986a).

Una estimación reciente del flujo atmosférico sugiere un valor de 73540 tons/año con una proporción de 60:40 entre fuentes naturales y antropogénicas. Cifras anteriores señalaban 31400 tons/año y una proporción natural:antropogénica de 25:75, o de 296470 ton/año y 70:30 (Alloway, 1990), es probable que la discordancia entre los valores reportados en estos estudios se deba a que en cada determinación se han considerado parámetros diferentes.

Todos los organismos están expuestos a metales pesados por diversas fuentes, que incluyen los ambientes terrestres, acuáticos y aéreos. En sistemas de agua dulce, el desgaste químico de rocas ígneas y metamórficas, así como del suelo, causa que entren trazas de metales a las aguas superficiales. Las cenizas de actividades volcánicas, el humo de los incendios forestales, los aerosoles y particulados adicionan trazas de metales en la superficie de los océanos (Koren, 1991).

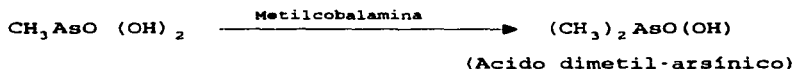
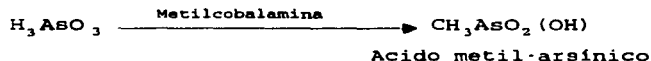
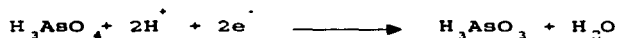
En el ambiente acuático los metales pueden existir en diversas formas. Aunada a sus propiedades intrínsecas, la forma física y química de los metales en los ambientes acuáticos es controlada por variables ambientales como el pH, el potencial redox, el oxígeno disuelto, la fuerza iónica, la salinidad, la alcalinidad y dureza, la presencia de materia orgánica y particulada, y la actividad biológica (Beijer y Jernelöv, 1986a).

En un lago, cierta proporción del total acarreado en partículas de diferentes tipos se fija en áreas con sedimentación activa y así es depositada en los sedimentos; entonces los metales son liberados nuevamente a través de la actividad microbiana y cambios en varios factores físicos y químicos; los niveles de éstos disminuyen conforme se incrementa la distancia en relación con la boca del río. Los organismos acuáticos pueden concentrar metales hasta niveles que exceden, con mucho, los propios del agua; así retienen a los metales dentro de aguas costeras activas (Beijer y

Jernelöv, 1986a); por ejemplo, se ha encontrado que las plantas pueden contener 170 veces más arsénico que el que existe en el agua circundante; en invertebrados y en peces, los niveles pueden ser 330 veces mayores (Fishbein, 1981).

Varios microorganismos, incluyendo a las algas, participan en la biometilación de algunos metales pesados y metaloides: As, Cd, Hg, Pb, Se y Sn.

En el agua de mar el As se encuentra en concentraciones de 2-5  $\mu\text{g/l}$  (Léonard y Lauwerys, 1980); aparentemente, el arsenato es reducido a arsenito por bacterias (Fishbein, 1981), o bien, es convertido por éstas, a derivados metilados más móviles y tóxicos mediante un mecanismo similar al que ocurre con el mercurio, de acuerdo con las reacciones que se indican en la figura 2 (Manahan, 1991).



**Fig. 2.** Reacciones de metilación del arsénico (Manahan, 1991).

Algunas microalgas marinas llegan a contener altas concentraciones de azúcares arsenicales, los cuales pueden ser o no metilados. *Ecklonia* es el principal organismo que concentra arsénico en los ecosistemas costeros, se considera que los compuestos metilados de arsénico formados por *Ecklonia radiata* son productos de la degradación de tales azúcares de arsénico. También, los compuestos pueden ser metabolizados a arsenobetaina y constituir la fuente de esta última en la fauna marina asociada. *Ecklonia* procesa el arsenato incorporado por conversión de los derivados de azúcar; se considera que esta alga ha desarrollado la capacidad de desintoxicar el arsenato en las aguas marinas bajas en fosfatos (Edmonds y Francesconi, 1981). De igual manera se ha sugerido que los productos de la descomposición de arseno-azúcares a partir de macroalgas lleva a la formación de arsenobetaina. La arsenobetaina (trimetil-arsenoetaina) es un componente ubicuo de los tejidos de animales marinos, la importancia de las algas como la fuente inicial de este compuesto en el ambiente marino es ampliamente apreciada (Reed y Gadd, 1990). Los mejillones, langostas y rayas, contienen arsénico di- y trimetilado junto con una pequeña proporción de arsénico inorgánico. Es evidente que la mayoría del arsénico en tales condiciones está unido orgánicamente y no es tóxico (Edmonds y Francesconi, 1977). La metilación y desmetilación de compuestos metálicos también ocurre en otros animales y en el hombre. En el caso del telurio y del arsénico trivalente, se forman derivados metilados en el cuerpo, que son relativamente no tóxicos. Los ácidos dimetil-arsónico y dimetil-arsínico parecen tener toxicidad baja (Clarkson, 1986); los arsenicales inorgánicos trivalentes son oxidados parcialmente en el organismo a la forma pentavalente, y algunos son metilados (Correia y Becker, 1989). Así, la metilación es un importante mecanismo de desintoxicación, debido a que la volatilidad, solubilidad y toxicidad de un elemento dado puede ser alterada (Camner et al. 1986).

Los sedimentos suspendidos y basales pueden desintoxicar el As(III) que entra a los sistemas acuáticos convirtiéndolo a As(V) mediante oxidación abiótica. En 1981, Oscarson et al. sugirieron

que los óxidos de Mn(IV) y Fe(III) podían ser los aceptores primarios de electrones en la oxidación del As(III) debido a que el Mn y el Fe participan en muchas reacciones de oxidación-reducción en ambientes naturales. La metilación biológica de As, Hg y Se, ha llamado la atención recientemente debido a que la metilación de arsenicales inorgánicos es esencialmente una reacción de reducción, la oxidación abiótica de As(III) a As(V) por sedimentos de lagos de agua dulce tiende a contrarrestar el proceso de metilación, sin embargo el óxido de Fe(III) no convierte el As(III) a As(V) en un lapso de 72 horas. Por otro lado, el óxido de Mn(IV), que es muy común en los sedimentos de aguas dulces, es un oxidante muy efectivo del As(III). De modo que en sistemas naturales, el óxido de manganeso (IV) puede ser muy importante en la reducción de la concentración del As(III), un contaminante altamente tóxico.

La figura 3 muestra el ingreso y redistribución atmosférica del arsénico en ecosistemas terrestres.

Para el ciclo del arsénico en ecosistemas terrestres se consideran 12 posibles transferencias a, y de un área a otra, por herbicidas organoarsenicales. La transferencia incluye reducción a metilarsinas, erosión del suelo e incorporación por cultivos, como mecanismos de redistribución primaria.

Los niveles de As en la superficie y aguas subterráneas es, por lo general baja (2-3µg/l), aunque suele incrementarse significativamente si se asocia con actividad térmica (a más de 35µg/l) (Alloway, 1990).

En estudios sobre las concentraciones metalíferas en líquenes de zonas circundantes a fuentes de contaminación con niveles promedio de 0.6 a 1.5 mg/kg y niveles elevados de 2.6 a 8 mg/kg, se reportó que la incorporación de formas aniónicas de As ( $H_2AsO_4^-$ ), fue de 10 µmol/g, y sigue la cinética de Michaelis-Menten, un hecho que implica incorporación activa (Nash III, 1990).

Los reportes de incorporación diferencial de metales por plantas vasculares tolerantes (T) y no tolerantes (NT) reveló que en el caso de las monocotiledóneas, particularmente *Agrostis capillaris* L., el arsénico es absorbido en mayor cantidad por la

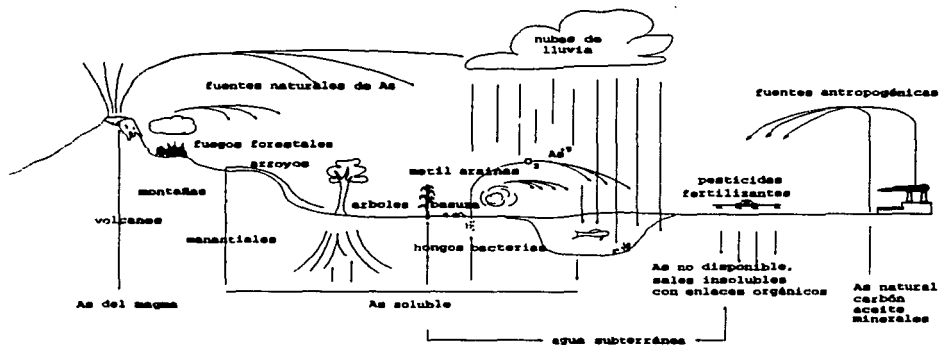


Fig. 3. Ciclo atmosférico del arsénico (Fishbein, 1981).

raíz en las razas tolerantes, pero el grado de restricción del transporte es extremadamente variable; las concentraciones en los vástagos de plantas tolerantes y no tolerantes son similares (Baker y Walker, 1990). En el pasto *Holcus lanatus*, puede hacerse una clara distinción entre plantas tolerantes y no tolerantes si se emplean niveles de arsénico adecuados. Las proporciones obtenidas al cruzar ambos tipos de plantas parecen indicar un modelo en el que se involucra a uno o dos genes (Macnair, 1990).

En plantas comestibles, el nivel de As es generalmente bajo, con frecuencia cercano a los límites de detección, aún cuando los cultivos provengan de tierras contaminadas. Los datos indican que cuando distintos tipos de suelos contienen concentraciones similares de As, los niveles más bajos se encuentran en plantas que crecen sobre arcillas y cienos con mayor contenido de mineral

arcilloso y de óxidos de Fe/Al, que en plantas que crecen en suelos más ligeros como los arenosos. Esto refleja la absorción característica de los suelos (Alloway, 1990).

A diferencia de algunos organismos marinos y de agua dulce en los que las concentraciones de As son altas (más de 1000 mg As/kg de peso fresco), los niveles de As en las plantas terrestres se mantienen muy por debajo de los del suelo. En general, las raíces tienen valores superiores de arsénico que el tallo, las hojas o los frutos. Aunque es raro obtener niveles que alcancen 1 mg As/kg de peso fresco en cultivos comestibles, los pastos que crecen en suelos contaminados cercanos a minas, en los que los materiales de desecho tienen arriba de 20530 mg As/kg, llegan a presentar hasta 3460 mg As/kg de peso seco. Los pastos que crecen en áreas urbanas, en suelos que contienen 20 mg As/kg, tienen un máximo de 3 mg/kg de peso seco (Alloway, 1990).

No se ha determinado cuantitativamente, que cantidad de compuestos volátiles de arsénico se producen en el suelo, en comparación con los sedimentos acuáticos. Numerosos estudios han sugerido que las arsinas volátiles se producen a partir de pastos y suelos húmedos, y que la arsina y la metilarsina se producen a partir de suelos tratados con arsenato, arsenito, monometilarsenato y dimetilarsinato (Alloway, 1990).

Aunque los niveles de As en plantas no reflejan directamente la concentración de éste en los suelos, el orden relativo y la magnitud de la acumulación permanece constante. Por ejemplo, el orden de acumulación es: rábano (1) > pastos (0.33) > lechuga (0.26) > zanahoria (0.17) > tubérculo de papa (0.07) > trigo (0.04). La disponibilidad y toxicidad de las especies de As también varía; el grado de disponibilidad y concentración de las especies de As absorbidas por raíces de frijol, a partir de soluciones nutritivas es: arsenato > arsenito > monometilarsenato > dimetilarsinato (Alloway, 1990).

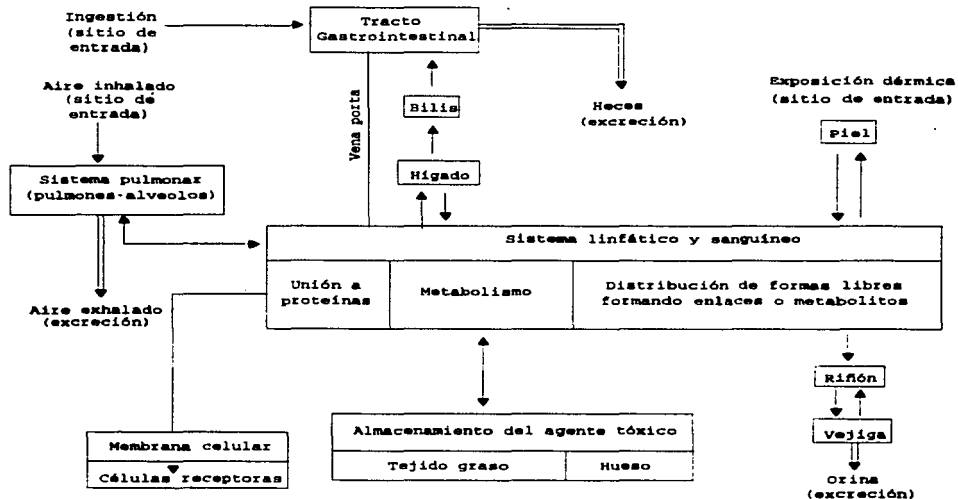
Debido a que la concentración de As en plantas terrestres es baja, también lo es en los animales que se alimentan de éstas. La cantidad ingerida varía de estación en estación siendo menor en el

verano, cuando los pastos cubren totalmente el terreno. Se ha estimado que la ingesta total de As a partir del suelo es de 60-75%, y la retención por parte del ganado es solo del 1%, el resto es directamente excretado (Alloway, 1990). De esta manera, a diferencia de los ambientes acuáticos, la concentración de arsénico en organismos terrestres es generalmente baja (Weis y Weis, 1991); plantas e invertibrados contienen solamente 0.01 veces la del entorno, y en mamíferos y aves la proporción es aún menor (0.001) (Fishbein, 1981).

Los metales pesados ingresan al organismo a través del tracto respiratorio, mediante la adsorción de agua en las superficies corporales (contacto dérmico) y por ingesta de partículas en el alimento o en el agua por el aparato digestivo (Fig. 4) (Koren, 1991).

Un compuesto químico puede ser absorbido del tracto gastrointestinal por difusión pasiva, en la que la solubilidad de la molécula en lípidos y su ionización son importantes; o mediante sistemas de transporte especializados (dependientes del metabolismo); además, la ultrafiltración puede contribuir al transporte en el tracto. Por lo general, las sales inorgánicas de metales no son solubles en lípidos y, por lo tanto, son poco absorbidas por difusión pasiva. Para que ocurra absorción de metales es necesario, en la mayoría de los casos, que éstos sean disueltos en los fluidos del tracto y posteriormente se unan a moléculas que faciliten su absorción (Camner et al. 1986).

Para determinar los efectos de los metales que han ingresado al cuerpo, debe considerarse: la fracción del metal que ha sido absorbida directamente a través de los pulmones, la que es absorbida después de translocación gastrointestinal de partículas inhaladas, así como las cantidades del metal que son absorbidas en el tracto gastrointestinal. El transporte y distribución de los metales depende, en gran medida, de la forma en que éstos se encuentren en la sangre y cuál sea su principal medio de transporte dentro del cuerpo. En los metales hay grandes diferencias entre la fracción de una dosis absorbida que es transportada a varios



**Fig. 4** Principales rutas y sitios de absorción, metabolismo, formación de enlaces y excreción de las sustancias tóxicas en el cuerpo (Manahan, 1991).

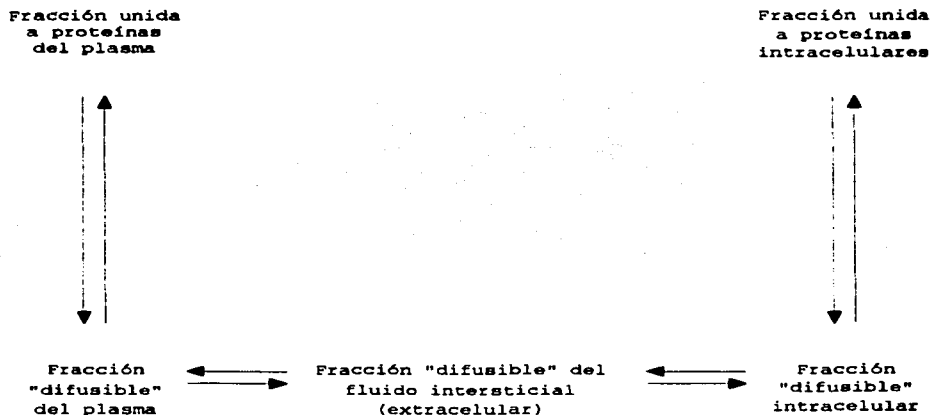
órganos, y la fracción que es excretada. Para la distribución, los siguientes factores son de importancia: la "fracción difusible" en el plasma, fluido intersticial e intracelular; la tasa de perfusión vascular del órgano; la tasa de biotransformación; la permeabilidad de las membranas celulares para el metal que se encuentra en el plasma; y el volumen y la tasa de disponibilidad de los ligandos intracelulares para el metal en cuestión (Camner et al. 1986).

La figura 5 muestra un modelo de intercambio de metales entre la sangre y otros tejidos. La "fracción" difusible es de importancia considerable en la transferencia de metales entre los fluidos intravascular, intersticial e intracelular. Cuando existen especies iónicas de metales en estos fluidos y no se unen a ninguna otra molécula, se espera que haya una distribución igual en todo el



cuerpo. La unión a las proteínas del plasma, a los eritrocitos, y a varios órganos, cambia el patrón de distribución uniforme del metal y entonces, éste se distribuirá proporcionalmente con la disponibilidad de los diversos sitios de unión. La unión de proteínas con iones metálicos en el plasma y órganos varía ampliamente entre los metales. La distribución de elementos esenciales como el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$ , que están íntimamente relacionados con el agua corporal y el balance de ácidos y bases, esta regulado por sistemas especializados, que involucran transporte activo; en ciertos casos, dichos mecanismos acarrean elementos no esenciales (Camner et al. 1986).

Hay varias rutas por las que puede ser excretado un metal del



**Fig. 5.** Modelo de intercambio de metales entre la sangre y otros fluidos (T.G.M.A., 1986).

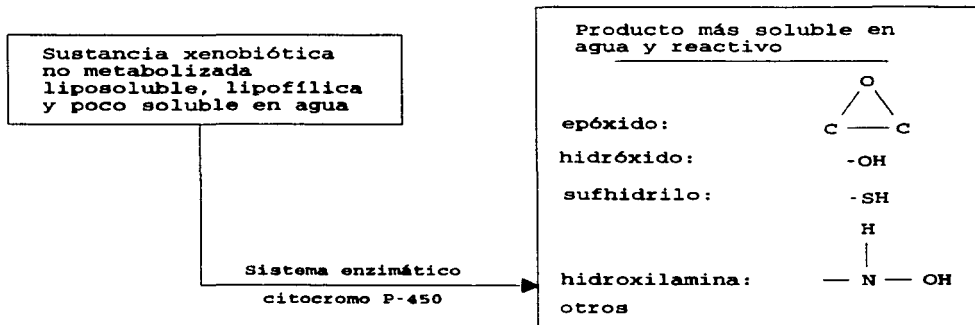
cuerpo, las mas importantes son la gastrointestinal y la renal. Otros procesos de excreción como la secreción salivar, la transpiración, exhalación, lactancia, exfoliación de la piel, pérdida de cabello, uñas y sangrado pueden ser de interés en casos especiales, tanto como un medio de eliminación, así como un índice de exposición y carga corporal. El alcance de la circulación enterohepática de compuestos metálicos parece estar relacionada con el peso molecular del complejo metálico en la bilis (Cassaret y Doull, 1975).

El sistema urinario es probablemente la ruta de excreción más importante para los metales, aunque la gastrointestinal puede, en algunos casos, ser mayor que la primera (Camner et al. 1986).

Los efectos tóxicos de los compuestos metálicos pueden ser modificados de diversas maneras por varios factores, cuya presencia o ausencia puede, algunas veces, modificar el carácter de los efectos y, en otras, cambiar las relaciones dosis-efecto y dosis-respuesta. Los factores nutricionales y fisiológicos también afectan la susceptibilidad. Estos modificadores incluyen ciertas características del organismo expuesto, por ejemplo, factores constitucionales como la edad y el sexo que con frecuencia son llamados factores del hospedero. El metabolismo y los efectos de los metales pueden ser modificados también por exposición simultánea o previa a ciertos agentes ambientales (Nordberg et al. 1986).

El envenenamiento por metales puede ser agudo y resultar letal, o ser seguido por recuperación parcial o completa; ser subagudo inmediatamente, o haber un intervalo entre la absorción y el desarrollo del efecto, el cual puede dar lugar a envenenamiento crónico. Sin embargo, los metales tóxicos producen otros efectos clínicos importantes; éstos son: reacciones de hipersensibilidad que pueden incluir la piel, pulmones, riñones, sistema hematopoyético, y posiblemente el sistema nervioso central; inducción de cáncer después de un intervalo de latencia; y teratogénesis (Kazantzis, 1986).

El proceso mediante el cual los organismos metabolizan a las sustancias xenobióticas (sustancias sintéticas que son extrañas

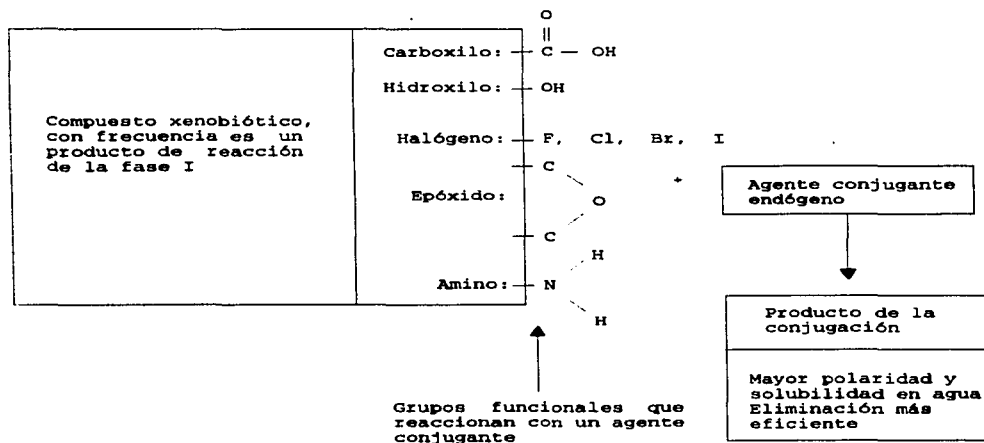


**Fig. 6.** Diagrama de las reacciones de fase I (Manahan, 1991).

para los sistemas vivos) son reacciones catalizadas por enzimas de fase I y fase II (Manahan, 1991).

Las especies xenobióticas lipofílicas en el cuerpo, tienden a sufrir **reacciones de fase I** que las hacen más solubles en agua y reactivas por la fijación de grupos funcionales, como los -OH (Fig. 6). La mayoría involucran "oxidasas microsomales de función mixta" catalizadas por el sistema enzimático citocromo P-450 asociado con el retículo endoplásmico de la célula y que ocurren con mayor frecuencia en el hígado de los vertebrados (Manahan, 1991).

Los grupos polares funcionales que se fijan a un compuesto xenobiótico en una reacción de fase I proporcionan sitios de reacción para las **reacciones de fase II**. Estas son reacciones de conjugación en las cuales las enzimas fijan agentes conjugantes a los xenobióticos, sus productos de reacción de la fase I, y compuestos no

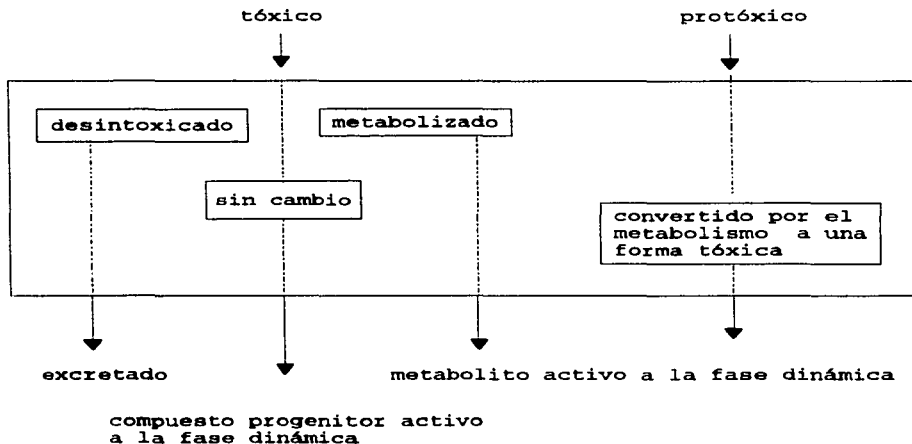


**Fig. 7.** Ilustración de las reacciones de fase II (Manahan, 1991).

xenobióticos (Fig. 7). El producto de la conjugación de una reacción de este tipo es generalmente menos tóxico que el compuesto xenobiótico original, menos soluble en lípidos, más soluble en agua, y se elimina del cuerpo más fácilmente.

En la **fase cinética**, un agente tóxico o el metabolito precursor de una sustancia tóxica (**protóxico**) pueden sufrir absorción, metabolismo, almacenamiento temporal, distribución y excreción, como se muestra en la figura 8. Un agente tóxico que es absorbido puede pasar a la fase cinética sin cambios como un **compuesto progenitor activo**, ser metabolizado a un **metabolito desintoxicado** que es excretado, o convertido a un **metabolito activo tóxico** (Manahan, 1991).

En la **fase dinámica**, un compuesto tóxico o un mebatolito



**Fig. 8.** Proceso de los compuestos tóxicos y protóxicos en la fase cinética (Manahan, 1991).

tóxico interacciona con células, tejidos u órganos en el cuerpo y causa alguna respuesta tóxica (Fig. 9). Las tres subdivisiones de la fase dinámica son:

- **reacción primaria** con un receptor u órgano blanco
- **respuesta bioquímica**
- **efectos observables** (Manahan, 1991).

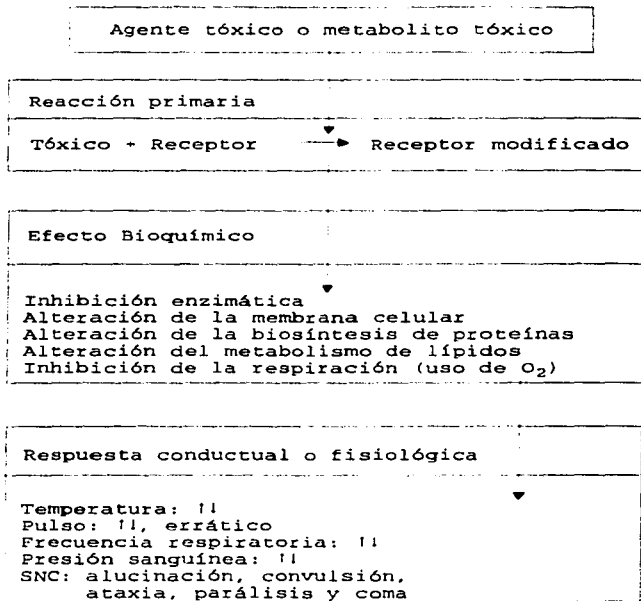
El Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos de Norteamérica marca como límite permisible en el agua potable 0.05 mgAs/l (U.S. Public Health Service, 1962). La comunidad europea señala que la concentración máxima aceptable de As en suelos agrícolas tratados con aguas residuales es de 20 mg/kg. En el Reino Unido, el Departamento del Ambiente ha indicado como concentraciones alerta, 10 mg As/kg de suelo secado al aire proveniente de jardines domésticos, y 40 mg As/kg de suelo secado al aire de parques de juego y espacios abiertos. El nivel de alerta se define

como el valor umbral en el que se deben aplicar evaluaciones y juicios expertos para determinar si puede ocurrir un efecto indeseable y, por lo tanto, si se requiere algún remedio (Alloway, 1990).

El arsénico inorgánico se encuentra generalmente en los estados de valencia +3 y +5 como trióxido de arsénico ( $As_2O_3$ ) y pentóxido de arsénico ( $As_2O_5$ ), respectivamente; de estos, el As(V) es el más prevalente y el menos tóxico (Weis y Weis, 1991). El gas arsina,  $AsH_3$  (valencia -3), constituye principalmente un riesgo ocupacional (Léonard y Lauwerys, 1980).

### Toxicidad del As

El envenenamiento agudo por arsénico puede resultar de la ingestión de más de 100 mg del elemento, mientras que el crónico ocurre por la ingesta de pequeñas cantidades por tiempo prolongado (Stokinger, 1981 y Manahan, 1991). La inhalación de arsénico del aire ambiental es generalmente baja ( $< 1 \mu g/día$ ). La incorporación diaria promedio en adultos no expuestos ocupacionalmente y que



**Fig. 9.** Fase dinámica de la acción de compuestos tóxicos (Manahan, 1991).

**Tabla II. Efectos provocados por intoxicación aguda, subaguda y crónica con arsénico.**

Efectos	Intoxicación aguda/subaguda	intoxicación crónica
náuseas agudas, vómito y dolor abdominal	+	
irritación cutánea	+	+
laringitis y bronquitis	+	
inflamación del tracto gastrointestinal	+	
alteración electrolítica	+	
anormalidades cardiacas, isquemia miocárdial	+	+
neuropatía sensorial		+
depresión de médula ósea		+
gastroenteritis	+	+
infiltración grasa del hígado, disfunción hepática y daño renal		+
cambios hematológicos, anemia (palidez)		+
aliento y heces característicos (aliáceo metálico dulce)	+	
incremento de permeabilidad capilar	+	+
deshidratación	+	
ulceración	+	
perforación del septo nasal	+	+
verrugas por dermatitis alérgica	+	+
pérdida del cabello		+
hiperqueratosis palmoplantar (pie negro)		+
estrias blancas en las uñas		+
acrocianosis		+
hipertensión	+	+
síndrome de Raynaud		+
epitelioma de la piel y otros tipos de cáncer		+
colapso, coma y muerte	+	

viven en áreas no contaminadas va de 0.5 a 4.2 mg/día, dependiendo de sus hábitos alimenticios (Léonard y Lauwerys, 1980). La tabla II presenta los efectos producidos por intoxicación aguda, subaguda y

crónica con arsénico (Norval y Butler, 1974; Léonard y Lauwerys, 1980 y Correia y Becker, 1989).

La intoxicación confiere al aliento y a las heces un olor aliáceo metálico dulce. La forma trivalente del arsénico también daña a los capilares, lo que provoca aumento de la permeabilidad, deshidratación, choque y muerte. El arsénico tiene una acción local irritante que causa inflamación de la piel, ulceración y perforación del septo nasal. Algunos arsenicales también funcionan como alérgenos por contacto (Léonard y Lauwerys, 1980 y Correia y Becker, 1989). La muerte después de dosis fatales sobreviene en promedio, entre las 12 y 48 horas (Stokinger, 1981).

En la intoxicación crónica con arsénico inorgánico, las manifestaciones cutáneas incluyen vasodilatación cutánea y palidez (por anemia), lo que resulta en un aspecto de la piel característico de "leche y rosas". Las cenizas de arsénico entran en contacto con la mayoría de las membranas nasales y forman ácido arsenioso, el cual corroe la mucosa septal (Stokinger, 1981).

Los antidotos comunes son compuestos que tienen grupos sulfhidrilos capaces de unirse al arsénico, como el 2,3-dimercaptopropanol (BAL), el cual remueve al arsenito de las proteínas y restaura la función enzimática normal (Manahan, 1984).

### **Mecanismos de acción tóxica**

El arsénico proporciona un ejemplo de la interferencia de un elemento pesado con la acción enzimática. Los organoarsenicales y el arsenito inorgánico (arsenicales trivalentes) son considerados como reactantes primarios de sulfhidrilos (SH), por lo que inhiben varios sistemas enzimáticos dependientes de tiol en varios tejidos: D-aminoácido oxidasa, monoamino oxidasa, ureasa, glucosa oxidasa, colina oxidasa, piruvato oxidasa, alanina aminotransferasa, aspartato amino-transferasas transferasa, 2-acido glutámico oxidasa, fumarasa, piruvato deshidrogenasa, sistemas de desdoblamiento de citrato, xantina oxidasa, NADH oxidasa, reducción de citocromo b, ATPasa activada por DNP, y otros (Léonard y Lauwerys, 1980 y Clarkson, 1986).



La formación de estructuras anilladas quelantes por metales polivalentes juega un papel relevante en la toxicidad selectiva. Entre las muchas enzimas cuya actividad es destruida por unión a los grupos sulfhidrilos, las que producen energía celular en el ciclo del ácido cítrico son principalmente afectadas.

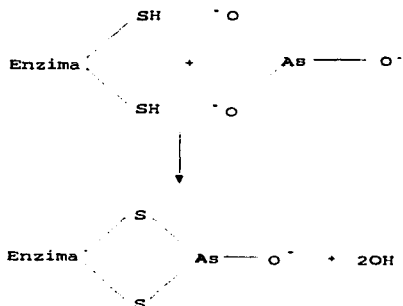


Fig. 10 Interferencia del arsenito con los grupos sulfhidrilo (Manahan, 1984).

El As(III) en la forma de ion arsenito reacciona con los grupos sulfhidrilos en las enzimas y forma una estructura en anillo de cinco miembros, muy estable (Fig. 10). El primer paso en este ciclo es inhibido por el arsénico (III); involucra la generación de ATP a través de la oxidación del ácido pirúvico (ácido  $\alpha$  ceto) a CO<sub>2</sub> y acetyl CoA (coenzima A) en las mitocondrias, una reacción catalizada por la piruvato deshidrogenasa. El ácido alfa lipoico, un cofactor que contiene sulfhidrilos y que se requiere para la acción de la piruvato deshidrogenasa, es inactivado por la formación del complejo con el As(III) (Fig. 11). Se considera que esta lesión bioquímica sustenta los efectos biológicos (Clarkson, 1986).

Las uniones covalentes de las enzimas con compuestos orgánicos pueden resultar en inhibición enzimática, lo cual ocurre cuando los grupos hidroxilo se unen en los sitios activos de las enzimas (Manahan, 1984).

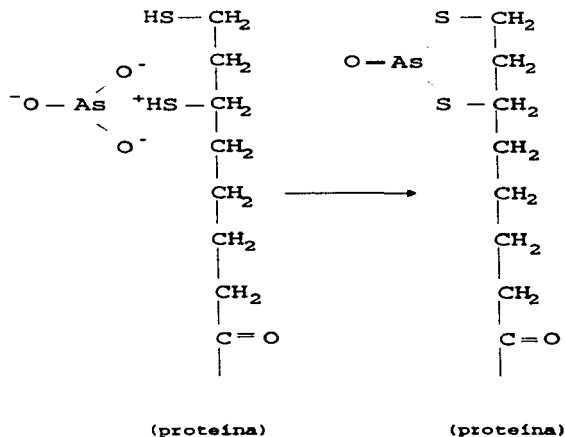
Debido a que es similar al fósforo, el arsénico interfiere con algunas reacciones bioquímicas que involucran al primero. Una de dichas reacciones ocurre en la generación bioquímica del trifosfato de adenosina (ATP), productor crucial de energía. Un paso clave en la generación de ATP es la síntesis enzimática de 1,3-difosfoglicerato a partir de gliceraldehído 3-fosfato (Fig. 12). Cuando

está presente el arsenito, sustituye al fosfato para producir 1-arseno-3-fosfoglicerato en lugar de 1,3-difosfoglicerato. En lugar de la fosforilación, ocurre arsenolisis, la que consiste de hidrólisis espontánea a 3-fosfoglicerato y arsenato y por lo tanto, desacopla la energía metabólica en la síntesis de ATP (Manahan, 1984; Clarkson, 1986; Jennette, 1986; Correia y Becker, 1989).

Los arsenicales inorgánicos a altas concentraciones pueden coagular proteínas. Esto es causado pro-

bablemente por la reacción del arsénico con los enlaces de azufre que mantienen las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas. El efecto también puede adjudicarse a la reacción del arsénico en el sitio activo.

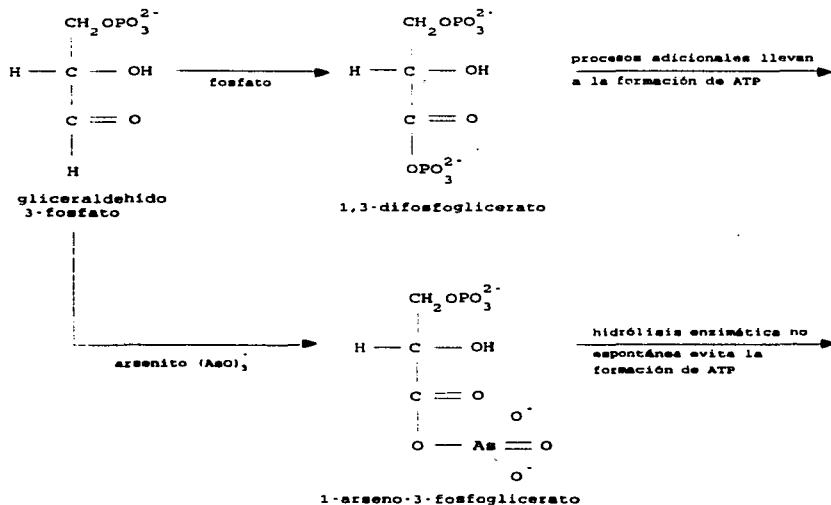
A concentraciones  $\mu\text{M}$ , el arsenito es un inhibidor específico de la descarboxilación del ácido  $\alpha$  ceto glutárico, esencial para mantener la actividad del ciclo de Krebs, y es uno de los pocos compuestos que bloquean el metabolismo a niveles menores que aquellos con los que afectan la división celular. El arresto mitótico producido por el arsenito a concentraciones elevadas se atribuye a su reactividad general con los grupos sulfhidrilos. El



ácido dihidrolipoico-proteína

proteína inactivada formando complejo con As(III)

Fig. 11 Inactivación del ácido  $\alpha$  lipoico por arsénico (III) (Manahan, 1984).



**Fig. 12.** Interferencia del arsénico en la reacción de fosforilación que lleva a la producción de ATP (Manahan, 1984)

arsenito tiene también efecto en la síntesis y reparación del ADN. Debido a su menor afinidad por los grupos hidroxilos y los grupos tiol, el arsenato pentavalente inhibe menos sistemas enzimáticos, es decir, citocromo oxidasa y glicerol oxidasa. También inhibe la síntesis de ATP por desacoplar la fosforilación oxidativa y sustituir el grupo fosforil estable. Los organoarsenicales pentavalentes parecen ejercer una baja toxicidad. Se considera que el arsenato es reducido *in vivo* a arsenito, y es la forma trivalente la que es activa en los tejidos animales (Léonard y Lauwerys, 1980).

La ingesta total de As al día está influida fuertemente por la cantidad de alimento de origen marino en la dieta; menos de 200

**Tabla III. Niveles de arsénico reportados en algunas localidades.**

Localidad/País	Estrato	[ ]	Referencia
Argentina	agua para beber	> 1100 µg/l	Léonard y Lauwerys, 1980
Córdoba, Arg.	agua	0.9-3.4 mg/l	WHO, 1981
Chile	agua para beber	> 1100 µg/l	Léonard y Lauwerys, 1980
Antofagasta, Ch	agua	0.8 mg/l	WHO, 1981
Antofagasta, Ch	suelo	3.2 mg/kg	WHO, 1981
Gran Bretaña	depósito suelo rural	0.8-5.5 mg/m/a	Alloway 1990
Gran Bretaña	suelo no contaminado	10 mg/kg	Alloway, 1990
Gran Bretaña	suelos mineralizados	424 mg/kg	Alloway, 1990
Torreón, Méx.	agua	4-6 mg/l	WHO, 1981
Torreón, Méx.	suelo superficial	3.9 mg/kg	WHO, 1981
Torreón, Méx.	suelo profundo	20 mg/kg	WHO, 1981
E.E.U.U., Reino Unido y Taiwan	agua para beber	> 1100 µg/l	Léonard y Lauwerys, 1980

µg/día y, a nivel general, menos de 50 µg/día (WHO, 1981). La contaminación de la comida y del agua potable a partir de fuentes naturales e industriales da lugar a envenenamiento crónico. En algunas localidades se encuentran depósitos o altas concentraciones de este compuesto que han repercutido en problemas importantes de salud (Tabla III). El límite permisible de As en agua es de 0.05 mg/l (WHO, 1981).

Por ejemplo, en Taiwan se han encontrado pozos artesianos con un alto contenido de As que se han usado por más de 60 años; en este sitio se observaron manifestaciones clínicas de arsenicismo crónico en la población expuesta, incluyendo la enfermedad de pie negro y lesiones hiperqueratosas en la piel. Los niveles en el agua de beber se designaron "bajos" (menores a 0.3 ppm), "medio" (0.3-

0.6 ppm) y "altos" (superiores a 0.6 ppm). La frecuencia de cáncer de piel fue alta, 10.6/1000 personas, y se encontraron evidencias de una relación dosis-respuesta en la forma de un gradiente ascendente de prevalencia de cáncer de piel, de bajo a alto en ambos sexos y en todos los grupos de edad (Kazantzis y Lilly, 1986).

La exposición crónica a este elemento constituye un importante problema de salud en México, sobre todo en la zona de la Comarca Lagunera, en la cual se han detectado concentraciones de más de 0.5 mg/l de arsénico, 10 veces superior a la máxima permisible; el origen de la contaminación en esta zona es de tipo natural.

Existen grandes diferencias en la absorción gastrointestinal de sales inorgánicas y metales que van desde el 10% para cadmio ionizado, indio, estaño y uranio a una absorción casi completa (90-100%) para sales inorgánicas de arsénico, germanio y talio; estas diferencias pueden estar relacionadas con la presencia o ausencia de sistemas de transporte adecuados. Un ejemplo es el arsénico trivalente para el que se ha demostrado que el tamaño de la partícula y la solubilidad son de importancia para la absorción (Camner et al. 1986). Los arsenitos trivalentes son poco solubles y los arsenatos pentavalentes lo son más. Los arsenicales orgánicos suelen ser absorbidos de manera deficiente del aparato digestivo. La absorción a través de la piel está en función de la liposolubilidad, siendo la forma trivalente más liposoluble que la pentavalente (Correia y Becker, 1989).

La principal ruta de excreción del As en humanos es el riñón. Normalmente los compuestos orgánicos son eliminados sin cambio, pero los inorgánicos son metilados parcialmente *in vivo*, antes de ser excretados. La eliminación es rápida. Cerca del 50% de una dosis absorbida de arsénico inorgánico se elimina a través del riñón en dos días (Léonard y Lauwerys, 1980). Las otras rutas de excreción son la bilis, la piel, las uñas y el pelo (Stokinger, 1981). Después de la absorción en la sangre, los arsenicales se distribuyen rápida y ampliamente a todos los tejidos del cuerpo. Después de 20 horas de haber sido inyectado en pacientes cancerosos

masculinos, el arsenito de sodio marcado radiactivamente se encuentra principalmente en el hígado, en comparación con otros tejidos; en relación con éste (100%), se encuentra en los riñones un 65%, en bazo, corazón, yeyuno y médula, cerca del 33%; en pulmones, páncreas, músculos y estómago, 16%; en tiroides y piel, 16%; y en cerebro, 5% (Stokinger, 1981).

Hay muchos factores que inciden en el alcance con el que los metales son excretados por la bilis. Un ejemplo es la diferencia dependiente de la valencia que muestra el arsénico. Cammer et al. (1986), reportaron que al inyectar dos sales a ratas, el arsenato -As(V)- fue excretado hasta un límite de 1% en 2h; mientras que de arsenito -As(III)- se excretó por la bilis aproximadamente diez veces más, para este compuesto se ha demostrado la existencia de circulación enterohepática; ésta disminuyó la excreción fecal neta, ya que la concentración de As en la bilis fue varios cientos de veces mayor que la del plasma, es probable que la excreción biliar implique un sistema de transporte activo. La excreción en la forma trivalente es lenta, y se lleva a cabo principalmente por la vía fecal, en tanto que la forma pentavalente se excreta con más rapidez en la orina, en forma metilada (Correia y Becker, 1989). Se han encontrado diferencias marcadas en la excreción de arsénico a las 48 hr: conejos (70%), hombre (30.5%) y ratas (< 10%) (Stokinger, 1981).

En relación con su distribución en el cuerpo se le encuentra en el siguiente orden: eritrocitos (95 a 99% unido a globina) (24 horas); luego hígado, pulmón, riñón, pared del aparato digestivo, bazo, músculos, tejido nervioso (dos semanas); después piel, cabello y hueso (años); la tabla IV muestra los valores de arsénico en distintos órganos y tejidos del cuerpo humano, reportados para Escocia y Japón.

En la actualidad su único uso terapéutico es en el tratamiento de la tripanosomiasis que afecta al SNC (Correia y Becker, 1989).

### **Efectos genotóxicos del arsénico**

Además del impacto tóxico posterior a la exposición a los

**Tabla IV. Concentración de As en órganos y tejidos humanos (Ishinishi et al. 1986).**

Tejido / Órgano	Concentración de arsénico (mg/kg)		
	Escocia (peso.seco)		Japón (peso.húm.)
	Media	Rango	Media
Adrenales	0.029	0.002-0.293	
Aorta	0.031	0.003-0.570	
Sangre total	0.038	0.001-0.920	
Hueso	0.057	0.010-0.240	0.118 (fémur)
Hueso			0.074 (costilla)
Cerebro	0.013	0.001-0.036	0.034
Cabello	0.460	0.020-8.17	0.174
Corazón	0.024	0.002-0.078	0.041
I. grueso			0.025
I. delgado			0.022
Riñón	0.033	0.002-0.363	0.041
Hígado	0.028	0.005-0.246	0.042
Pulmones	0.082	0.006-0.514	0.047
Músculo	0.063	0.012-0.431	0.029
Uñas	0.300	0.020-2.90	0.892
Ovario	0.037	0.013-0.260	
Páncreas	0.045	0.005-0.410	0.020
Próstata	0.046	0.010-0.090	
Piel	0.090	0.009-0.590	0.064
Diafragma	0.020	0.001-0.132	0.021
Estómago	0.037	0.003-0.104	0.022
Dientes	0.050	0.003-0.635	0.078
Timo	0.015	0.003-0.332	
Tiroides	0.042	0.001-0.314	
Utero	0.031	0.010-0.188	0.036

contaminantes, existen otros efectos que pueden representar un riesgo aún mayor para los organismos, ya que implican la alteración del material genético.

Las alteraciones genéticas pueden ocurrir en las células somáticas del cuerpo donde posiblemente son uno de los factores de iniciación en el desarrollo de procesos malignos. Sin embargo, también ocurren en las células que se convertirán en gametos; en este caso contribuirán a un aumento en la carga génica de las poblaciones (Kazantzis y Lilly, 1986). La tabla V muestra algunos ensayos realizados para distintos compuestos de arsénico.

Existen reportes tanto positivos como negativos en pruebas de mutagénesis en bacterias (sistema *rec*), en relación con los compuestos de arsénico usados (Kazantzis y Lilly, 1986). El arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_3$ ), el arsenato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ) y el dimetil-ditiocarbamato arsénico [ $(\text{CH}_3)_2\text{AsS}_2\text{CNH}_2$ ], causan daño al ADN en el ensayo *rec* con *Bacillus subtilis*, pero se han obtenido resultados negativos con metil-arsenato ( $\text{CH}_3\text{AsNa}_2\text{O}_3$ ) y metil-arsenato de calcio ( $\text{CH}_3\text{AsCaO}_3$ ). En los ensayos de reversión con *Escherichia coli*, se han reportado resultados negativos con arsenato de sodio ( $\text{AsHNa}_2\text{O}_4$ ), pero positivos con arsenito de sodio (Léonard y Lauwerys, 1980).

Se considera que este compuesto es peligroso por su capacidad para afectar los mecanismos de reparación del daño genético. La interferencia del arsénico con los procesos de reparación normal del ADN en *E. coli* han sido revisados por Rossman et al. (1986a y b); Kazantzis y Lilly, (1986) y la IARC, (1987).

Se ha encontrado que muchas sales inorgánicas de metales como las del litio, berilio, cromo, hierro, cobalto, cobre, arsénico, rubidio, paladio, cadmio, bario, oro, mercurio y talio, inhiben el aparato mitótico (C-mitosis) en las plantas; con muchos de estos metales, el umbral de C-mitosis es considerablemente más bajo que el inducido por la colchicina (Kazantzis y Lilly, 1986).

En *Drosophila*, el arsenato de sodio incrementa de manera significativa el entrecruzamiento, caracterizado a través del incremento en las clases de intercambios simples en la prueba de pérdida cromosómica con el cromosoma X (Walker y Bradley, 1969; Ahmed y Walker, 1972).

En un estudio sobre la citotoxicidad y el efecto citogenético



**Tabla V.** Resumen de pruebas de genotoxicidad con algunos compuestos de arsénico.

Organismo/Sistema	Compuesto	Fórmula	Prueba	Res.
<i>Bacillus subtilis</i>	triclora de arsénico	AsCl <sub>3</sub>	rec	+
	arsenito de sodio	NaAsO <sub>2</sub>	rec	+
	dimetil-ditiocarbamato de As	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsS <sub>2</sub> CNH <sub>2</sub>	rec	+
	metil-arsenato de sodio	CH <sub>3</sub> AsNaO <sub>3</sub>	rec	-
	metil-arsenato de calcio	CH <sub>3</sub> AsCaO <sub>3</sub>	rec	-
<i>E. coli</i>	arsenito de sodio	NaAsO <sub>2</sub>	reversión	+
	arsenato de sodio	Na <sub>2</sub> NaAsO <sub>4</sub>	reversión	-
	octil-amonio de metil arsenato	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> NH <sub>4</sub> AsCH <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	reversión	-
	dodecil-amonio de metil arsenato	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> NH <sub>4</sub> AsCH <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	reversión	-
<i>S. typhimurium</i>	ác. metil-arsénico	CH <sub>5</sub> AsO <sub>3</sub>	reversión	-
	metano-arsenato monosódico	CH <sub>4</sub> AsNaO <sub>3</sub>	reversión	-
<i>Penicillium typhoides</i>	ác. dimetil-arsénico	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> AsO <sub>2</sub>	fert. pólen	+
<i>Beta vulgaris</i>	ác. dimetil-arsénico	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> AsO <sub>2</sub>	fert. pólen	-
<i>Zea mays</i>	ác. p-metil-fenil-arsénico	CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> AsO <sub>3</sub>	ab. cromosóm.	+
	ác. p-clorofenil-arsénico	ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> AsO <sub>3</sub>	ab. cromosóm.	+
	ác. p-nitrofenil-arsénico	NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> AsO <sub>3</sub>	ab. cromosóm.	+
<i>Allium cepa</i>	ác. metil-clorofenil-arsénico	CH <sub>3</sub> ClC <sub>6</sub> H <sub>3</sub> AsO <sub>3</sub>	ab. cromosóm.	+
<i>D. melanogaster</i>	arsenato de sodio	Na <sub>2</sub> NaAsO <sub>4</sub>	increm. de recomb.	+
<b>Mamíferos in vitro:</b>				
Células de ratón	ác. alquil-arsénico	R-AsO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	ab. cromosóm.	+
	ác. dialquil-arsénico	R <sub>2</sub> -AsO(OH)	ab. cromosóm.	+
	ác. alquilamino-trimetil-arsénico	R-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> AsO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	ab. cromosóm.	+
linfocitos humanos	arsenito de potasio	KAsO <sub>2</sub>	ab. cromosóm.	+
	arsenito de sodio	NaAsO <sub>2</sub>	ab. cromosóm.	+
	arsenato de sodio	Na <sub>2</sub> NaAsO <sub>4</sub>	ab. cromosóm.	+
	diethylamina-acetarsona	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> AsN <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	ab. cromosóm.	+
fibroblastos humanos	arsenito de sodio	NaAsO <sub>2</sub>	ab. cromosóm.	+
<b>Mamíferos in vivo:</b>				
céls germinales de ratón	arsenito de sodio	NaAsO <sub>2</sub>	letales dominantes	+7
céls tumorales de linfocitos humanos			ab. cromosóm.	+

*in vitro* del arsenito ( $\text{NaAsO}_2$ ) y el arsenato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ) en células CHO, se observó que ambos son clastógenos e incrementan en forma significativa la frecuencia de aberraciones cromosómicas; el arsénico trivalente, ( $\text{NaAsO}_2$ ), fue de cinco a diez veces más efectivo que el pentavalente ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ), lo que posiblemente se deba a que cierta cantidad de arsénico pentavalente es convertido a la forma trivalente por las células CHO. En conclusión ambos, arsenito y arsenato, mostraron ser clastógenos efectivos (Wan et al. 1982).

La citotoxicidad, las aberraciones cromosómicas y las mutaciones (para la resistencia a 6-tioguanina) se incrementan en forma sinérgica al incubar células CHO irradiadas con UV en medio con arsenito de sodio (Lee et al. 1985).

En ratón, los tratamientos agudos con As sólo incrementan la frecuencia de letales dominantes cuando se administran en forma crónica con TEPA (Léonard y Lauwerys, 1980).

El arsénico trivalente produce un pequeño incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas y micronúcleos en células de médula ósea de ratón tratado *in vivo* y aberraciones cromosómicas en células humanas y de roedores *in vitro*, mientras que el pentavalente induce aberraciones cromosómicas en células de humanos y roedores *in vitro* (IARC, 1987).

Se ha registrado un incremento significativo de aberraciones cromosómicas posterior a la exposición de un cultivo de leucocitos a arsenito de sodio ( $2.9 \times 10^{-9}$  a  $1.8 \times 10^{-8}\text{M}$ ) y arsenato de sodio ( $5.8 \times 10^{-9}\text{M}$ ); y un cultivo de fibroblastos a arsenito de sodio ( $2.9 \times 10^{-9}$  a  $5.8 \times 10^{-8}\text{M}$ ). Se encontraron resultados similares cuando se agregó arsenato de sodio a cultivos de infocitos en concentraciones entre  $3 \times 10^{-5}$  y  $5 \times 10^{-8}$  g/ml de medio de cultivo (Léonard y Lauwerys, 1980).

Otro estudio sobre la citotoxicidad y el efecto citogenético *in vitro* del arsenito de sodio en linfocitos humanos mostró que la inhibición del crecimiento celular se relacionó directamente con la dosis; la línea de regresión indicó una clara relación entre la concentración y la presencia de metafases aberrantes. También se

encontró un incremento de ICH relacionado con la dosis, con el mismo rango de dosis con el que produce rompimientos ( $0.5-1.0 \times 10^{-6}$  M) (Wan et al. 1982).

En otro ensayo, se analizaron linfocitos de 13 personas expuestas al arsénico y se encontró un incremento importante en la frecuencia de fragmentos acéntricos, puentes cromatídicos y cromosomas dicéntricos en el grupo expuesto; este comportamiento fue concordante con estudios previos *in vitro* realizados por el mismo grupo. En forma paralela, se observó un incremento similar en pacientes tratados con arsenicales. En Suecia, se ha reportado un incremento en la frecuencia de huecos, aberraciones cromatídicas y cromosómicas en trabajadores de la fundición. Sin embargo, no se ha obtenido una relación evidente entre la exposición y la frecuencia de las alteraciones anteriores (Kazantzis y Lilly, 1986).

Acerca de la capacidad de los compuestos de arsénico para inducir intercambio de cromátidas hermanas, existen resultados discordantes. Crossen (1983), utilizó linfocitos humanos para evaluar los efectos de arsénico tri- y pentavalente, y no encontró diferencias que pudieran adjudicarse a la exposición. Por otra parte, se encontraron frecuencias altas de ICH en linfocitos de seis personas que habían ingerido As, y posteriormente presentaron síntomas asociados con el uso de éste, e inclusive, múltiples procesos cutáneos malignos (Kazantzis y Lilly, 1986).

En un estudio de personas expuestas a arsénico trivalente en el agua de beber, no se encontró aumento en la frecuencia de ICH o aberraciones cromosómicas (Vig et al. 1984). Personas expuestas ocupacionalmente, o pacientes tratados con arsénico mostraron niveles incrementados de aberraciones cromosómicas y/o ICH (Nordenson y Beckman 1982). El arsénico trivalente induce ICH en células humanas y de roedores *in vitro*; el pentavalente induce ICH *in vitro* (IARC, 1987).

El arsénico trivalente produce transformación en células de criceto sirio, aunque no induce mutaciones en células de roedores *in vitro*; induce conversión génica en levaduras; en bacterias no causa mutaciones ni induce profagos. El pentavalente, induce trans-

formación en células embrionarias de criceto sirio, pero no produce mutaciones o rompimiento de hebras de ADN en células de roedores *in vitro*; induce conversión génica en levaduras y no produce mutaciones en bacterias (IARC, 1987).

La tabla VI muestra un resumen de los efectos genotóxicos de compuestos de arsénico reportado por la IARC (1987). Como se observa, las evidencias experimentales para clasificar al arsénico no son abundantes, a pesar de que los arsenicales han sido estudiados a lo largo de muchos años. Aquellos eventos genéticos terminales para los que el arsenito y arsenato son claros inductores son: recombinación mitótica y conversión génica, en eucariotes inferiores; aberraciones cromosómicas en células animales

**Tabla VI. Resumen de los efectos genotóxicos de arsénico (III) y (V) (IARC, 1987).**

Sistemas de submamíferos																	
Arsénico:	Proc.		Eucariotes inferiores					Plantas			Insectos						
	D	G	D	R	G	A	D	G	C	R	G	C	A				
(III)	*	.	.	**	.	.	.	.	.	.	.	.	**				
(V)	.	.	.	**	.	.	.	.	.	.	.	.	**				
Sistemas de mamíferos																	
<i>In vitro:</i>																	
Células animales																	
Células Humanas																	
	D	G	S	M	C	A	T	I	D	G	S	M	C	A	T	I	
(III)	.	.	.	**	+	.	.	.	?	.	.	.	.	.	.	.	
(V)	*	.	?	**	-	.	.	.	?	.	.	.	.	.	.	.	
<i>In vivo:</i>																	
Animales																	
Humanos																	
	D	G	S	M	C	DL	A	D	S	M	C	A					
(III)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
(V)	.	.	.	**	**	.	.	.	?	.	.	.	.	.	.	.	.

Claves: A, aneuploidías; C, aberraciones cromosómicas; D, daño al ADN; III, mutaciones letales dominantes; G, mutaciones génicas; I, inhibición de comunicación intercelular; M, micromediano; R, recombinación mitótica y conversión génica; S, intercambio de cromátidas hermanas; T, transformación celular; \*; el grupo de trabajo únicamente dispuso de un solo trabajo válido.

y humanas *in vitro*; transformación en células animales *in vitro*. Por otra parte, ambas sales no inducen mutaciones génicas en procariontes; aneuploidías en insectos; mutaciones génicas y micronúcleos en células animales *in vitro*. En relación con otros efectos, ambos compuestos muestran una actividad diferencial, en la que el arsénico trivalente resulta aparentemente más potente.

El As y los compuestos arsenicales han sido valorados por la Organización Mundial de la Salud, las evidencias de carcinogenicidad son suficientes en los seres humanos, insuficientes en animales y limitadas en las pruebas de corta duración; así, el resumen de evaluación de riesgo carcinogénico del As para los seres humanos lo ubica en el grupo 1 (IARC, 1987).

La información derivada de estudios epidemiológicos se ha enfocado a analizar el impacto de la exposición laboral, así como la de poblaciones localizadas en zonas contaminadas. Es importante considerar que este tipo de exposición se da en la mayoría de las ocasiones en forma combinada con otros contaminantes, por lo que los efectos del arsénico y los otros contaminantes se encuentran confundidos.

En un estudio piloto sobre arsenicismo en México, se analizó la disminución en la proliferación de linfocitos como una respuesta inmune debida a la exposición crónica a arsénico. El grupo expuesto lo formaban nueve mujeres y dos hombres que habían bebido agua, con un contenido promedio de 0.39 mg/l de arsénico; el 98% de éste en forma pentavalente y el resto trivalente. Este grupo se comparó con otro con exposición baja, con valores de 0.019 a 0.026. Aunque el As ha sido asociado con algunas enfermedades malignas en humanos, es probable que el mecanismo de acción no se relacione con la inducción de daño directo al ADN, sino mas bien, éste funciona como cocarcinógeno con una variedad de agentes, o puede interferir con las capacidades inmunológicas de los individuos (Ostrosky et al., 1991).

En un estudio para determinar si el arsenito de sodio potencia la clastogenicidad y mutagenicidad de los agentes que provocan puentes en el ADN, se encontró que el As es co-genotóxico con cis-

diaminodicloroplatino (II) (cis-Pt(II)), 8-metoxipsoralen (MOP) y luz UV en células CHO y fibroblastos humanos *in vitro*. Además, el As mostró ser co-genotóxico con la radiación UV (un agente S-dependiente), sin embargo, se encontraron dificultades para confirmar la co-genotoxicidad del As con agentes S-independientes, por lo que se considera que ésta se limita a los agentes S-dependientes, o bien, la cogenotoxicidad del As es S-dependiente (Lee et al. 1986). Paralelamente se analizó la posibilidad de que el As inhiba la reparación de lesiones, induzca lesiones sujetas a error, o interfiera con la replicación del ADN. Se ha reportado que reacciona con los grupos tiol de las proteínas, para inhibir la síntesis de ADN en linfocitos humanos cultivados y la reparación del daño inducido por UV en *E. coli* (Fong et al., 1980; Nakamuro y Sayato, 1981; Knowles y Benson, 1983 y McCabe et al. 1983). Resultados preliminares han mostrado que el As inhibe la síntesis *de novo* programada de ADN, inducida por UV e interfiere con la síntesis *de novo* (Lee et al. 1986).

Muchos inhibidores de la reparación y/o de la replicación son potenciadores de aberraciones cromosómicas inducidas por varios clastógenos (Natarajan et al. 1982); la co-genotoxicidad y la comutagenicidad del As puede ser más peligrosa que la genotoxicidad directa del mismo.

Debido a que los rearrreglos cromosómicos están asociados con varios tipos de cáncer en roedores y humanos (Radman et al. 1982), se puede pensar que la co-clastogenicidad del arsénico pueda acelerar el proceso de carcinogénesis (Lee et al., 1986).

Estudios realizados en trabajadores de la fundición no ferrosa, indican que éstos tienen riesgo de cáncer pulmonar relacionado con la exposición estimada al arsénico y presentan además un contenido incrementado de varios metales, aún muchos años después de cesar la exposición laboral (Nordberg et al. 1986). El riesgo de cáncer de pulmón es siete veces superior al promedio, en trabajadores de la fundición que están expuestos a trióxido de arsénico (Léonard y Lauwerys, 1980).

Como ocurre con el níquel y el cromo, el intervalo de latencia

entre la primera exposición al arsénico y el desarrollo de cáncer es prolongado. Se han estimado intervalos de latencia promedio de 34, 39, y 41 años para la exposición alta, media y ligera, respectivamente. Se considera que 25 años de exposición al As a concentraciones cercanas a  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$  pueden llevar a un incremento de casi tres veces en la mortalidad por cáncer de pulmón (Kazantzis y Lilly, 1986).

Se ha implicado a la exposición crónica al arsénico con la etiología de hemangiosarcoma (hemangioepitelioma) del hígado, en algunos casos asociada con cirrosis hepática; también se ha reportado que el cáncer de los sistemas linfático y hematopoyético, y el de otros órganos, ocurre con frecuencia después de la exposición y eventualmente se acompaña con cáncer de piel (Kazantzis y Lilly, 1986). Sin duda, muchos otros factores, como la exposición a la luz del sol, pueden jugar un papel importante, ya que la frecuencia de formaciones malignas es mucho más alta en la gente de edad avanzada (Yeh, 1973 y Weisburger, 1990).

Se ha observado una alta producción de tumores malignos en pulmón de ratas después de una sola instilación intratraqueal de una mezcla de arsenato de calcio, sulfato de cobre y óxido de calcio (Nordberg et al. 1986). Pershagen et al. (1986), indujeron carcinomas pulmonares en cricetos por instilación intratraqueal de trióxido de arsénico; un reporte reciente confirma la asociación entre arsénico y procesos malignos en cricetos (Weisburger, 1990).

Para explicar la aparente contradicción entre los datos experimentales con animales y estudios epidemiológicos, se ha propuesto que el arsénico puede actuar como un co-carcinógeno o potenciador del proceso carcinogénico, más que como un carcinógeno directo (Kazantzis y Lilly, 1986). Un ejemplo de una interacción aditiva, es cuando dos metales ejercen su acción en el mismo sitio, sus formas de acción son similares y uno o ambos potencian la acción del otro. El resultado de dicha acción aditiva es la suma de los efectos que pueden ser estimados de las relaciones dosis-efecto y dosis-respuesta de los constituyentes de la mezcla. Este tipo de acción aditiva se aplica al arsénico y al plomo en relación con la

excreción de coproporfirina (Nordberg et al. 1986).

#### **Interacción del As con otros metales**

El arsénico y el selenio forman iones similares, por lo que se espera que entre ellos se genere una interacción antagónica; ambos elementos pertenecen a la clase de los compuestos que pueden ser metilados *in vivo*, por lo que se supone que compiten por los sitios activos, sin embargo, se ha mostrado que el arsénico disminuye la toxicidad del selenio; probablemente al incrementar la excreción del selenio por vía biliar (Nordberg et al. 1986).

El arsénico trivalente es un protector mas eficiente contra la toxicidad del selenio que el pentavalente. Por otro lado, la inyección de compuestos de arsénico incrementa la toxicidad de los derivados metilados de selenio. Se sabe también que este último, incrementa la excreción biliar del arsénico, y que las dietas con altos niveles de selenio causan disminución de las concentraciones de arsénico en los órganos. El arsénico inorgánico no parece ser mutagénico en sistemas bacterianos. En los eucariontes, el daño cromosómico inducido por arsenito puede ser contrarrestado por exposición simultánea a selenita *in vitro*. En bacterias y en células humanas, el arsénico puede interferir con los mecanismos de reparación del ADN (Nordberg et al. 1986).

Sin embargo, no hay datos concluyentes en seres humanos que apoyen los hallazgos de las interacciones arsénico-selenio de animales de laboratorio. En autopsias, se ha encontrado que el cociente arsénico-selenio en el tejido pulmonar de trabajadores de la fundición fue algo mayor entre aquellos con procesos malignos que entre trabajadores que murieron por otras razones. Esto puede indicar un efecto protector del selenio (Nordberg et al. 1986).

La influencia del cadmio y el plomo en la toxicidad del arsénico ha sido estudiada también por Mahaffey y Fowler (1986) en experimentos con animales. El plomo incrementa aditivamente la excreción de protoporfirinas en ratas tratadas con arsénico, mientras que el cadmio no tiene efecto. Las dosis usadas en este estudio fueron en proporción más altas que las alcanzadas en



ambientes laborales, por lo que no fue posible obtener conclusiones con respecto al significado de estos resultados para el hombre, sin embargo, la exposición combinada a cadmio, plomo y arsénico no es poco común en los ambientes industriales (Nordberg et al. 1986).

### Epidemiología

Los estudios epidemiológicos son esenciales para valorar las relaciones dosis-efecto o dosis respuesta para metales tóxicos, debido a que los humanos y los animales difieren en el metabolismo y la toxicidad de la mayoría de los metales (Kjellström, 1986). La tabla VII presenta valores estimados del riesgo que representan algunos contaminantes del aire, posibles carcinógenos para los seres humanos.

Como referencia, el valor de 1 para la dioxina implica que la probabilidad del desarrollo de un proceso canceroso después de respirar este com-

**Tabla VII.** Unidad de riesgo superior estimada para probables carcinógenos contaminantes del aire (Anderson, 1988).

Compuesto	Límite superior de la unidad de riesgo estimada
Acril-nitrilo	$7 \times 10^{-5}$
Cloruro de alilo	$5 \times 10^{-8}$
Arsénico	$4 \times 10^{-3}$
Benceno	$7 \times 10^{-6}$
Berilio	$6 \times 10^{-4}$
Nitroso-dietil-amina (DEN)	$2 \times 10^{-2}$
Nitroso-dimetil-amina (DMN)	$5 \times 10^{-3}$
Dioxina (2,3,7,8-tetracloro)-c	1
Dibromuro de etileno	$6 \times 10^{-5}$
Dicloruro de etileno	$7 \times 10^{-6}$
Oxido de etileno	$2 \times 10^{-4}$
Formaldehído	$5 \times 10^{-5}$
Manganeso	$4 \times 10^{-4}$
Níquel	$6 \times 10^{-4}$
N-nitroso-N-etilurea (ENU)	$1 \times 10^{-2}$
N-nitroso-N-metilurea (MNU)	$7 \times 10^{-1}$
Percloro etileno	$2 \times 10^{-6}$
Tricloruro de etileno	$3 \times 10^{-6}$
Cloruro de vinilo	$4 \times 10^{-6}$
Cloruro de vinilidino	$4 \times 10^{-5}$

\* La unidad de riesgo incrementado sobre la esperanza de vida que se asocia con la inhalación de  $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  del químico sobre una esperanza de vida de 70 años para un hombre de 70 kilos. Se ha estimado que la potencia de la dioxina es 1600 veces mayor que la del DEN a los menores niveles de exposición; por lo que la exposición durante la esperanza de vida a  $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , el límite superior de riesgo es del 100 % para la presencia de cáncer.

puesto ( $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ), es del 100 %; el arsénico ocupa el sexto sitio en orden de importancia, después de carcinógenos potentes como: dioxina, N-nitroso-N-metilurea (MNU), N-nitroso-N-etilurea (ENU), Nitroso-dietil-amina (DEN), Nitroso-dimetil-amina (DMN), arsénico (Anderson, 1988).

En estudios epidemiológicos solamente tres metales han sido clasificados como carcinógenos humanos: níquel, cromo y arsénico. La evidencia para carcinogenicidad del As se basa en observaciones en grupos ocupacionales y también en grupos generales de población, expuestos a través del alimento, el agua o drogas (Kazantzis y Lilly, 1986).

Los estudios epidemiológicos en áreas con diferentes frecuencias de la enfermedad del pie negro y donde los niveles de As en el agua de beber son de 0.35 a 1.14 mg/l sugieren riesgos elevados de cáncer de vejiga, riñón, piel, pulmón, hígado y colon, en hombres y mujeres (IARC, 1987). En la Región Lagunera (Coahuila, México), una población rural aislada ha estado expuesta crónicamente al As en el agua para beber. El hidroarsenicismo en esa región se ha asociado con una alta incidencia de cáncer de piel (Ostrosky et al. 1991).

En el cáncer de piel inducido después de medicación con preparaciones arsenicales —en particular con arsenito de potasio (solución de Fowler)— la mayoría de los cánceres se desarrollan 15 años después de la administración del compuesto arsenical, los pacientes recibían en promedio 28 g de arsénico durante el curso del tratamiento (Kazantzis y Lilly, 1986; IARC, 1987). No obstante, no se ha obtenido una asociación clara con otros tipos de cáncer, como se ha confirmado por otro estudio de cohortes en individuos tratados con la solución de Fowler, en el que no se encontró relación entre cáncer prostático y el tratamiento de la sífilis con arsénico (IARC, 1987).

En trabajadores de la industria del vidrio (fino), se ha encontrado aproximadamente el doble de riesgo de cáncer de pulmón y estómago con exposición a arsénico, pero que también se han expuesto a otros metales potencialmente carcinógenos y a asbestos.

El cáncer de estómago es especialmente frecuente entre los sopladores de vidrio, lo que sugiere una asociación con el contacto oral por pipas contaminadas. También se ha observado una asociación entre el cáncer de pulmón en trabajadoras expuestas al arsénico y al mercurio (IARC, 1987).

Trabajadores de viñedos alemanes y franceses que emplearon pesticidas en aerosol con arsénico, desarrollaron envenenamiento crónico después de un período de exposición de 12 a 14 años; la exposición había sido fuerte, con una ingesta estimada de más de 5.0 g durante un período de 12 años (Kazantzis y Lilly, 1986).

Pocos estudios epidemiológicos han intentado elucidar las interacciones entre el arsénico y otros factores. Sólo dos reportes indican una interacción positiva entre arsénico y dióxido de azufre, en relación al cáncer de pulmón en trabajadores de la fundición; fue difícil separar los efectos de los dos agentes ya que estos estuvieron combinados en la mayoría de las situaciones. Los trabajadores de los hornos, con la mayor exposición a ambos agentes, presentaron el riesgo más alto de cáncer de pulmón (Tabla VIII); en autopsias practicadas a trabajadores expuestos se encontraron niveles elevados de As, Sb, Cd, Cr, Co, Pb y La (Axelson et al. 1986; Nordberg et al. 1986 y Lee y Fraumeni, 1986). Un estudio de casos y controles donde se analiza la importancia del tabaquismo en trabajadores de la fundición, mostró la siguiente proporción estandarizada por edad en relación con la muerte por cáncer de pulmón: 3.0 para no fumadores expuestos, 4.9 para fumadores no expuestos y 14.6 para fumadores expuestos, lo que indica un efecto multiplicativo de las dos exposiciones (Perschagen, 1981 y Pershagen et al. 1986).

No hay datos adecuados de carcinogenicidad por arsenicales orgánicos (IARC, 1987). La evidencia experimental de las interacciones entre arsénico inorgánico e hidrocarburos aromáticos policíclicos es contradictoria. Se han encontrado indicaciones de un efecto potenciador por el trióxido de arsénico sobre los carcinomas pulmonares inducidos por benzo(a)pireno en ratas expuestas mediante instilaciones intratraqueales. No se observaron

**Tabla VIII. Riesgo de cáncer (límite superior) sobre la esperanza de vida para la exposición a arsénico\* (Anderson, 1988).**

Fuente	Expuestos en los dos grupos superiores	Niveles superiores de exposición (X 10 <sup>-4</sup> mg/kg/día)	Riesgo de cáncer asociado con la esperanza de vida para el límite superior	Casos por año estimados para los límites superiores
Fundición del cobre	43,800	2.7-1.5	2-1 X 10 <sup>-3</sup>	1.5-0.821
Fundición del plomo	3400	0.69-0.27	6-2 X 10 <sup>-4</sup>	0.029-0.017
Fundición del zinc	37,000	0.69-0.27	6-2 X 10 <sup>-4</sup>	0.32-0.13
Pizca de algodón	32	15.4-6.9	13-6 X 10 <sup>-3</sup>	0.0061-0.0027
Manufactura de pesticidas	1480	0.026-0.014	2-1 X 10 <sup>-5</sup>	0.0004-0.00025
Manufactura del vidrio	11,580	0.69-0.014	6-2 X 10 <sup>-4</sup>	0.099-0.040

\* Tomado del Grupo de evaluación del arsénico, del Grupo de evaluación de carcinógenos de la EPA, 1980.

tumores pulmonares malignos en animales a los que se les administró únicamente trióxido de arsénico. También Pershagen et al. (1986) encontraron signos de una interacción positiva con benzo(a)pireno para tumores pulmonares adenomatosos.

La contradicción entre las evidencias experimentales y epidemiológicas indica que el arsénico es un co-carcinógeno y no un carcinógeno primario (Léonard y Lauwerys, 1980 y Manahan, 1991).

Los efectos de la exposición a metales en la reproducción se reconocieron desde mediados del siglo XIX, cuando el plomo se asoció con esterilidad, abortos espontáneos y muerte fetal y neonatal después de la exposición ocupacional de hombres y mujeres al plomo (Sager et al. 1986).

### **Efectos teratogénicos**

Muchos metales son potentes tóxicos sistémicos en animales y en seres humanos. Así, la toxicidad sistémica en la madre puede afectar indirectamente al producto, lo que resulta en crecimiento

retardado o anormal del feto, o del animal en desarrollo. Por consiguiente, es importante distinguir entre efectos directos e indirectos de los metales en la reproducción y el desarrollo; e identificar a los que afectan ambas entidades directamente, a niveles menores que aquellos con los que causan toxicidad sistémica. En el caso de ciertos metales o compuestos del mismo metal, la pregunta de interés es si un efecto reproductivo o en el desarrollo constituye el efecto crítico; por ejemplo, la interferencia con el desarrollo del SNC. Los efectos de los metales en la función reproductiva femenina pueden surgir de la acción sobre un número de tejidos durante el desarrollo, o después de la madurez. La respuesta ante la exposición a metales por un organismo en desarrollo es, con frecuencia, diferente cualitativa y cuantitativamente de la observada en adultos. Las sensibilidades diferenciales de animales en desarrollo y adultos puede resultar de una distribución mayor del metal en la descendencia, o porque el tejido en desarrollo responde a concentraciones menores del metal. Aun más, la placenta o el producto pueden ser el blanco primario para el daño y derivar en desarrollo anormal (Sager et al. 1986).

Aunque el arsénico es mutagénico en una variedad de sistemas de prueba, virtualmente no hay datos disponibles que asocien la exposición al arsénico con funciones reproductivas alteradas en mujeres. En un estudio multigeneracional en ratas, donde machos y hembras fueron expuestos continuamente a 5 ppm. de arsenito en el agua de beber, no se encontró ninguna disminución en la fertilidad (Sager et al. 1986).

A pesar de las bien documentadas respuestas de mutagenicidad para el arsénico inorgánico (Léonard y Lauwerys, 1980), los estudios sobre el efecto de compuestos de arsénico en la reproducción masculina no son claros.

En un reporte sobre la acción de As(III) y As(V) en los gametos y embriones de los erizos de mar *Paracentrotus lividus* y *Sphaerechinus granularis*, se utilizaron arsenito y arsenato de sodio. Un aspecto relevante de la genotoxicidad del arsénico consistió en la inducción de anormalidades del intestino después de

tratar al esperma con As(III) o As(V). El daño observado en la diferenciación fue acompañado por una marcada espermiotoxicidad por As(III) pero no por el As(V). Este comportamiento contrasta con la mayor efectividad del As(V) para inducir tanto defectos del desarrollo, como anormalidades mitóticas (Pagano et al. 1982).

En cuanto a la teratogénesis de este compuesto, se ha encontrado disminución en el tamaño de la descendencia de ovejas alimentadas con As durante la gestación; al igual que en embriones de pollo, la administración intravenosa de arsenato de sodio (20 mg/kg) a hembras de criceto dorado gestantes (*Crisetus auratus*) resulta en exencefalia, cuando se inyecta alrededor del octavo día de la gestación; al ser inyectado en estados posteriores de la embriogénesis crítica, otras malformaciones incluyeron anomalias genitourinarias, labio y paladar hendido, microanoftalmia y deformidades en las orejas. Parece ser que el selenio protege de los efectos teratogénicos del arsénico en criceto dorado; la selenita reduce los efectos teratogénicos del arsenato, cuando se dan ambos compuestos por vía intravenosa en cricetos (Nordberg et al. 1986). Todos estos indicios son concordantes con la observación de que, en su forma aniónica, el arsénico pasa a través de las membranas placentarias de los mamíferos. Los arsenicales orgánicos, que han sido utilizados en el pasado en grandes cantidades en mujeres preñadas y con sífilis, aparentemente no cruzan la placenta del gato, conejo o humanos con gran facilidad, pero son almacenados en la placenta en concentraciones elevadas (Léonard y Lauwerys, 1980); sin embargo, otros autores consideran que el arsénico puede atravesar la placenta y provocar daño fetal (Correia y Becker, 1989).

El As incorporado accidentalmente en una fórmula láctea fue responsable de que un gran número de infantes fueran expuestos en Japón hace varios años. Estudios continuos con estos niños han revelado que el trióxido de arsénico, cuando se ingiere en cantidades suficientes para producir síntomas clínicos en infantes, causa la aparición subsecuente de deficiencias neuroconductuales permanentes. Estas anormalidades persistentes incluyen alteraciones

dermatológicas, estatura reducida, electroencefalogramas anormales, IQ reducidos y pérdida de la capacidad auditiva. Como en el caso del metil-mercurio, la naturaleza del daño al infante es cualitativamente diferente de la del envenenamiento por arsénico en adultos (Sager et al. 1986).

La administración posnatal de arsénico a dosis subletales produce poco efecto en animales experimentales. Ratas alimentadas posnatalmente con 1.5 mg/kg/d de trióxido de arsénico a partir del día 7 al 21 posparto no parecen diferir de las controles en la presencia de alteraciones; a 15 mg/kg/d se presentó una mortalidad del 50%. En monos rhesus infantes alimentados con 3.75 a 7.5 mg/kg/d de arsénico se manifiesta mortalidad elevada; no obstante, ningún efecto en el crecimiento o en el desarrollo se encontró entre los sobrevivientes (Sager et al. 1986).

Dencker y colaboradores (1986), reportaron que el arsenito es más teratogénico que el arsenato y han propuesto que esto se debe a diferencias en la citotoxicidad directa de las dos formas de arsénico. La formación de cartílago en fibroblastos de pollo en diferenciación hacia condrocitos se inhibe en un 50% por 5-10  $\mu\text{mol/l}$  de As(III), pero no es afectada por 200  $\mu\text{mol/l}$  de As(V); lo que sugiere que las células en diferenciación responden selectivamente a las dos formas del arsénico (Sager et al. 1986). La tabla IX muestra algunos de los principales efectos teratogénicos inducidos por arsenicales.

### **Ensayos de genotoxicidad**

El monitoreo y la valoración de los efectos sobre la salud humana, derivados de la exposición a agentes ambientales de todo tipo, se consideran aspectos centrales para el **Programa de Salud Ambiental de la Organización Mundial de la Salud** (World Health Organization's Environmental Health Programme). El conocimiento de la presencia e identidad de agentes peligrosos en el ambiente y el alcance de la exposición a éstos es extremadamente importante en la interpretación y utilidad de los resultados obtenidos a través de las poblaciones humanas expuestas y los efectos sobre la salud

**Tabla IX. Principales efectos teratogénicos inducidos por compuestos arsenicales.**

Tipo de daño	Exposición, organismo/ compuesto	Referencia
<b>Humanos:</b>		
Malformaciones congénitas (-)	fundición/As y otros metales	Nordstrom <i>et al.</i> 1986a y b
Peso bajo al nacimiento (+)	trabajadoras de la fundición	Nordstrom <i>et al.</i> 1986a y b
Acumulación en placenta sin alcanzar al feto	tratamiento de sífilis/ arsenito inorgánico	Underhill y Amatruda, 1986; Eastman, 1986
Niveles ↑ de arsenito en tejidos de neonatos muertos 11 hrs. postparto	ingesta por la madre antes del parto/As	Lugo <i>et al.</i> 1986
<b>Animales:</b>		
Letalidad fetal o toxicidad materna	roedores/[I] de arsenito y arsenato	Leonard y Lauwerys, 1980; Ferm y Hanlon, 1986
Distribución de As(III) y As(V) en fetos	roedores	Lindgren <i>et al.</i> 1986
Acumulación de As(V) en el esqueleto fetal	roedores en gestación tardía	Lindgren <i>et al.</i> 1986
Paso libre por placenta al embrión	cricketos	Hanlon y Ferm, 1986
Acumulación de As en piel y tracto g.i. unido con queratina en el epitelio en desarrollo	roedores/As	Dencker <i>et al.</i> 1986
Paso de placenta al feto	roedores/dimetil-arsénico	Dencker <i>et al.</i> 1986
Ef. Teratogénicos: anencefalia, agenesia renal, costillas malformadas	cricketos por i.p. /15-20 mg/kg de arsenato de sodio	Ferm y Carpenter, 1986; Ferm <i>et al.</i> 1986
Defectos en tubo neural y cambios histopatológicos en mesénquima cefálica	roedores/ arsenatos	Willhite, 1986
Defectos urogenitales específicos	ratas preñadas, i.p./ 30 mg/kg de As	Burk y Beaudoin, 1986
Niveles ↓ de ADN, ARN y proteínas, embriones (10 d.)	ratas inyectadas 24 hrs. antes/ arsenato 45 mg/kg	Fisher, 1986

(-), negativo; (+), positivo

(IPCS, 1985).

En relación con cualquier tipo de evento terminal: toxicidad, mutagénesis, carcinogénesis o teratogénesis, se considera en general, que existe una relación dosis-respuesta, si un cambio en la dosis de un compuesto químico causa un cambio cuantificable en el efecto observado (Pfitzer y Vouk, 1986).

Parece justificable usar datos de animales para predecir el riesgo para la salud en el hombre. Sin embargo, las dificultades



de extrapolación de datos basicamente cualitativos obtenidos de una especie a otra son considerables (Sawicki, 1980; Pfitzer y Vouk, 1986; Brusick, 1987 y Travis, 1988).

El primer problema es el número de organismos experimentales que pueden ser usados. Normalmente en un experimento se utilizan de 100 a 1000 unidades experimentales; el tamaño de la población humana expuesta y que requiere ser protegida puede ser tan grande como  $10^6$ - $10^8$ . Además, las poblaciones animales usadas en los experimentos son -por lo general- homogéneas, mientras que las humanas son altamente heterogéneas. Los animales de laboratorio son saludables, mientras que las poblaciones humanas incluyen subpoblaciones que son débiles o estan enfermas y, por lo tanto, pueden ser mas susceptibles a los efectos de una sustancia química. También hay diferencias en relación con la nutrición y la presencia de otros factores en el ambiente humano que pueden modificar la respuesta a los compuestos químicos tóxicos. Aun más, puede haber diferencias en los sitios receptores. El tamaño de los diversos animales es también de interés, ya que determina el número de células susceptibles y el tiempo de residencia del agente químico en el organismo. Así, para la misma dosis en términos de mg/kg de peso corporal, los tejidos humanos pueden estar más expuestos que los del ratón; por lo que se recomienda expresar la dosis por unidad de superficie corporal más que por peso corporal, esta conversión reduce considerablemente las diferencias entre las especies. La duración del ciclo de vida es otra variable que influye ampliamente en la respuesta. El hombre vive 35 veces mas que un ratón y, por consiguiente, tiene mas divisiones celulares y una probabilidad mayor para sufrir cambios neoplásicos. En síntesis, de manera general, el hombre parece ser más susceptible a los efectos de los agentes químicos que los pequeños roedores utilizados rutinariamente en el laboratorio (Pfitzer y Vouk, 1986)

Se considera que un compuesto determinado es **genotóxico** si se ajusta a la siguiente definición operacional propuesta por un comité de trabajo de la ICPEMC (International Commission for

**Tabla X. Categorías de genotoxicidad\* (Brusick, 1987).**

Ensayo	Sec.de ba- es	Integridad del ADN	Intercambios o rearrregios	Segregación crom.	Integridad crom.
Letales dominantes				2°	1°
Locus específico en ratón	1°				2°
Translocaciones here- dables				2°	1°.
Citogenética in vivo					1°
Citogenética in vitro					1°
ICH			1°		2°
<b>Mutaciones génicas:</b>					
Céls. de mamífero	1°				
Drosophila, SLRLT	1°				
E. coli, WP2	1°				
Salmonella	1°				
Recombinación en le- vaduras	2°		1°		
Micronucleos en roe- dores				2°	1°
Reparación del ADN en bacterias		1°			
Manchas mosaico en ratón	+				+
Morfología de la ca- beza espermática en ratón	n.d.				

\* cada prueba se clasifica por sus mecanismos establecidos o primarios, aunque no se excluye que otros mecanismos puedan estar involucrados en la producción del fenotipo o la respuesta observada: 1°, primaria; 2°, secundaria; +, equivalente. Para que un compuesto sea declarado no genotóxico debe ser negativo en las cinco categorías; n.d., la prueba aun está en validación para excluir la inducción de fenocopias.

Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens): "un agente que produce una respuesta positiva (por ejemplo, : mutación, síntesis no programada de ADN, rompimiento cromosómico) en cualquier bioensayo que mida cualquier evento genético terminal". La comisión de la ICPEMC intentó también desarrollar una definición para no genotoxicidad. Se señalan criterios aún más estrictos para definir a un **no genotóxico** y especificar que un agente químico es inactivo en una serie de pruebas de bioensayo que cubren cinco tipos de eventos terminales considerados como críticos para la

producción de daño genético (Tabla X). Se requiere la inactividad en las pruebas que miden los siguientes tipos de genotoxicidad para considerar a un compuesto químico como no genotóxico:

1. Modificación de la secuencia de bases del ADN (sustitución, adición o delección de nucleótidos).
2. Alteración de la integridad del ADN (aductos, rompimientos, puentes cruzados).
3. Rearreglos del ADN (efectos recombinogénicos, ICH inclusive).
4. Alteración de la segregación de cromosomas.
5. Daño a la integridad cromosómica (estructural) (Brusick, 1987).

El número y tipo de pruebas disponibles para su inclusión en una **batería de prueba** es grande e incluye organismos blanco de niveles filogenéticos divergentes. No existen métodos para excluir el uso de pruebas específicas, sin embargo, el monitoreo, implica una valoración preliminar, la cual parece ser un papel apropiado para las pruebas en submamíferos y las pruebas *in vitro*.

La siguiente lista proporciona varias de las características para que un bioensayo sea candidato como prueba de monitoreo:

1. Debe identificar agentes con afinidad por el ADN, y compuestos con toxicidad no específica por macromoléculas. Las interacciones deben ser medidas como efectos primarios al ADN, mutaciones puntuales (génicas) o alteraciones cromosómicas (Tabla X).
2. Tener capacidad metabólica adecuada para la biotransformación.
3. Ser reproducible. Los estudios diseñados deben garantizar tamaños de muestra adecuados para la determinación reproducible de respuestas positivas o negativas.
4. La transferibilidad de la prueba entre laboratorios debe estar documentada. Las pruebas que sólo puedan ser realizadas en un laboratorio no son adecuadas para monitoreo rutinario (Tabla XI) (Brusick, 1987).

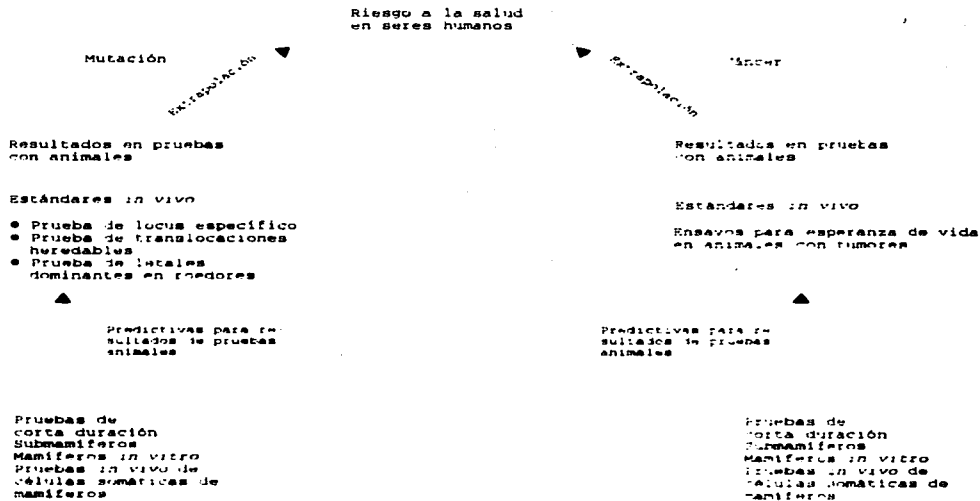
La selección de una metodología se basa en varios aspectos. Para la mayoría, una batería de prueba representa la experiencia y sesgo del investigador, así como sus recursos financieros para

**Tabla XI.** Resumen de las características de los grupos de pruebas identificadas como rutinarias por el Programa Gene-Tox de la EPA (Brusick, 1987).

Nombre de la prueba	Tipo de prueba			Tipo de lesión detectada			Aplicable para riesgo germinal
	Estatus filogenético	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	Mutación génica	ab. cromosómica	Daño directo al ADN	
Mutación reversa, <i>S. typhimurium</i> /microsomal	Bacteria	X		X			No
Mutación reversa, <i>E. coli</i>	Bacteria	X		X			No
Reparación del ADN, <i>E. coli</i>	Bacteria	X				X	No
SLRL, <i>D. melanogaster</i>	Insecto		X	X			Si
Análisis cromosómico	Células de mamífero	X			X		No
ICH	Células de mamífero	X				X	No
Análisis mutación V79 HGPRT	Células de mamífero	X		X			No
Análisis de cromosomas de médula ósea	Roedores		X		X		No
Micronúcleos	Roedores		X		X		No
Letales dominantes	Roedores		X		X		Si

realizarla. Algunas baterías se construyen para predicción de carcinogénesis; otras se enfocan a riesgo genético con énfasis en la mutagénesis de células germinales de ratón. Alcanzar ambos objetivos con una sola batería es poco probable, porque la batería de prueba más adecuada para cada evento tóxico se deriva de un tipo independiente de datos (Fig. 13) (Brusick, 1987).

El uso ventajoso de las pruebas individuales requiere un



**Fig. 13** Alcances de las pruebas de corta duración para predecir mutágenos y carcinógenos para animales (Brusick, 1987).

conocimiento adecuado de cómo predice cada prueba la mutación de células germinales o el desarrollo de un tumor en modelos animales. Una batería de pruebas que ha sido optimizada para monitorear carcinógenos en roedores no puede ser usada para monitorear mutágenos de células germinales (Tabla XII).

Las pruebas *in vivo*, pueden ser aplicadas después de sus análogas *in vitro* respectivas. La tabla XIII presenta una relación de pruebas *in vitro* y sus correspondientes modelos *in vivo*. Un reporte reciente del programa Gene-Tox de la EPA, comparó un amplio rango de pruebas de corto término para predicción de daño en células germinales. El reporte indica que las pruebas de manchas en ratón, síntesis no programada del ADN *in vivo*, y la prueba de

**Tabla XII.** Variables involucradas en la estimación de riesgo en células germinales y somáticas (Brusick, 1987).

Parámetro de comparación	Células somáticas	Células germinales
Presión selectiva sobre nuevos mutantes	Ligera, las células sólo tienen división mitótica	Alta, la división de las células meióticas hace evidente tipos específicos de mutación, como los efectos cromosómicos
Barreras ante los agentes mutagénicos	Pocas si los agentes se distribuyen sistémicamente	Similares a las de las células somáticas, más barreras gonadales y sanguíneas
Diferencias sexuales	Mínimas, alguna influencia de hormonas sobre el metabolismo en órganos específicos	Significativas por los diferentes procesos involucrados en la gametogénesis entre ii y iii de mamíferos
Facilidad para la detección de efectos inducidos	Cada animal dosificado representa una población de células expuestas	El análisis requiere generalmente grandes poblaciones de animales, ya que cada descendiente representa un sólo gameto expuesto
Tamaño de la muestra expuesta que puede ser analizada	Poblaciones extremadamente grandes, generalmente se registran 10 EX5 a 10 EX7 células sobrevivientes	Generalmente muestras de tamaño reducido, menos de 10 EX5 animales en todos los casos
Tipo de lesión genética detectada	Aberraciones cromosómicas y mutaciones génicas son fácilmente detectadas	Típicamente, aberraciones cromosómicas, las mutaciones puntuales requieren estudios amplios para detectarse con seguridad

micronúcleos predicen en forma eficiente los resultados obtenidos con el ensayo de locus específico de ratón; y que la síntesis no programada de ADN *in vivo*, las prueba de letales dominantes, ICH *in vitro*, anormalidades esperáticas y translocaciones heredables de *Drosophila*, parecen ser buenas predictoras de la prueba de traslocaciones heredables de ratón (EPA, 1988). Las tablas XIV y XV, sintetizan, la aplicación apropiada de varias pruebas para baterías de mutagénesis o carcinogénesis.

Tradicionalmente, la estimación del riesgo genético se ha derivado del estudio de mutaciones en gametos femeninos y masculinos, ya que estas células constituyen el sustrato para las generaciones futuras. Sin embargo, más recientemente, se ha incrementado la atención en las células somáticas debido a los

**Tabla XIII. Ensayos *in vitro* y estudios posteriores *in vivo* que miden eventos genéticos terminales comparables (Brusick, 1987).**

Ensayos <i>in vitro</i>	Modelos <i>in vivo</i> recomendados después de las pruebas <i>in vitro</i>
Mutación génica: Ames u otra bacteriana Linfoma de ratón CHO (HGPRT) Levaduras, mutación o reversión	Mutación génica: Mosaico somático en pelo de ratón SLRL en <i>Drosophila</i> Locus específico o letales dominantes en ratón
Aberraciones cromosómicas: Análisis citogenéticos <i>in vitro</i> en varias líneas celulares	Aberraciones cromosómicas: Micronúcleos en roedores Análisis de metafases de médula ósea en roedores Letales dominantes (células germinales) Translocaciones heredables (células germinales) Aberraciones cromosómicas en células germinales
UDS en hepatocitos primarios	UDS en hepatocitos de rata <i>in vivo/in vitro</i>
ICH	ICH <i>in vivo</i> en médula ósea u otros tipos celulares
Formación de aductos <i>in vitro</i> (Unión al ADN)	Unión al ADN en órganos blanco seleccionadas con marcaje químico o con $P^{32}$
Transformación celular <i>in vitro</i>	Ensayo del foco hepático en ratas

avances en la tecnología y a la aceptación de que el daño en éstas se adiciona de manera significativa a la carga de enfermedades; específicamente como factor causante de procesos malignos, alteraciones teratogénicas y enfermedades cardíacas. A nivel general, se ha observado que la falta de inducción de mutación en las células somáticas *in vivo* debe indicar una falta correspondiente de riesgo germinal, sin embargo, la falta de respuesta inducida en las células germinales no implica ausencia de respuesta en las células somáticas.

#### ***Drosophila* como sistema de prueba**

La única prueba rutinaria de mutación génica en insectos es la de **Letales Recessivos Ligados al Sexo (SLRLT, Sex Linked Recessive Lethal Test)**, en *Drosophila melanogaster*. Puede detectar mutaciones puntuales en células germinales; se ha sugerido que puede usarse

**Tabla XIV.** Aplicación de métodos generales de pruebas genéticas para valoración de mutágenos y carcinógenos. Categorías de prueba I-III\* (Brusick, 1987).

Tipo primario de identificación	I. Detección in vitro de inducción de mutación y daño cromosómico	II. Detección in vivo de inducción de mutación y daño cromosómico		III. Detección in vitro /in vivo de daño genotóxico que no deriva en alteraciones somáticas o germinales heredables
		Somático	Germinal	
Identificación de posibles carcinógenos para animales	A	A	NA	A
Identificación de posibles mutágenos para animales	A	A	A	(NA)
Análisis de riesgo de alteraciones genéticas heredables	NA	NA	A	NA
Análisis de riesgo para efectos carcinogénicos	NA	(A)	NA	NA
Identificación de mutágenos para animales	NA	A	A	NA

A, aplicable; NA, no aplicable; ( ), circunstancias especiales

para estimar riesgos heredables. Su principal limitación se asocia con las dificultades encontradas frecuentemente, para determinar cuantitativamente la dosis real administrada a las moscas por alimentación. En consecuencia, se requieren amplios estudios preliminares de toxicidad para valorar la ingesta del compuesto, previos a la ejecución de la prueba, para asegurar la exposición apropiada; especialmente en estudios donde se analizan probables no genotóxicos. Por medio de las técnicas de microinyección se pueden resolver los problemas de la ingesta del material de prueba (Brusick, 1987).

El estudio de los diferentes estadios de la espermatogénesis en *Drosophila*, ha mostrado que existe especificidad en la respuesta a mutágenos (Chandley y Bateman, 1962; Abrahamson et al. 1983); y el tipo de metabolismo microsómico y desintoxicación encontrados, tanto en ratones como en moscas, es suficientemente similar para



**Tabla XV.** Aplicación de pruebas genéticas para evaluación de mutágenos, carcinógenos, impacto ambiental y riesgo (Brusik, 1987).

Tipo de ensayos genético	Categoría de la prueba	Función			
		ICP	IMP	EA	ER
<b>Ensayos microbianos</b>					
Prueba de Ames	I	++	+	+	NA
WP2 y derivados	I	+	+	NA	NA
Pruebas de reparación bacterianas	III	+	NA	NA	NA
Mutación en levaduras	I	+	++	NA	NA
Recombinación mitótica en levaduras	III	+	+	NA	NA
<b>Pruebas in vitro con células de mamíferos</b>					
Linfoma de ratón	I	+	++	NA	NA
Ensayo de mutación CHO o V79	I	+	++	NA	NA
Ensayo UDS	III	++	NA	NA	NA
Aberraciones cromosómicas	I	+	++	+	NA
ICH	I/III	++	NA	+	NA
Transformación celular	III	++	NA	NA	NA
<b>Ensayos in vivo de mamíferos</b>					
Letales dominantes	II	NA	++	NA	+
Análisis citogenético	II	+	+	+	++
Análisis de micronúcleos	II	+	+	NA	(+)
Anormalidades de la cabeza espermática	II/III	NA	(+)	NA	(+)
Translocaciones heredables en ratón	II	NA	+	NA	++
Locus específico en ratón	II	NA	++	NA	++
Formación de aductos en el ADN	III	(+)	(+)	NA	++
<b>Ensayos in vivo con submamíferos</b>					
Ensayos con <i>Drosophila</i>	II	+	++	(+)	(+)
Citogenética vegetal	II	NA	(+)	+	NA

\* ICP, identifica carcinógenos potenciales; IMP, identifica mutágenos potenciales; EA, se aplica para evaluación ambiental; ER, se aplica para evaluación de riesgo; +, aplicable; ++, > +; NA, no aplicable; (+), aplicación posible bajo ciertas condiciones.

que a *Drosophila melanogaster* se le otorgue el estatus de "Mamífero Honorario" (Clark, 1982; Hällström et al. 1982 y 1984). Así, resulta eficiente en la detección de metabolitos de vida corta

debido a que no requiere la adición de un sistema metabólico exógeno (Zijlstra y Vogel 1988a y b). Sin embargo, las diferencias filogenéticas imponen restricciones en la extrapolación de los resultados de las moscas a los mamíferos. Al ser un eucarionte multicelular, este díptero, posee una organización celular y cromosómica similar a los mamíferos, su ciclo de vida es de 10 días, lo que permite el rápido análisis de mucha progenie y posibilita el empleo de dosis crónicas, agudas y fraccionadas (Kilbey et al. 1981).

Mientras que la metodología básica de la SLRLT esta estandarizada (Lee et al. 1983 y Woodruff et al. 1984), las líneas de *Drosophila* varían de laboratorio a laboratorio. El uso de líneas deficientes en reparación se encuentra bajo análisis para determinar si ofrecen ventajas sobre las usadas tradicionalmente (Zimmering y Deitemeyer, 1981).

La prueba de letales recesivos ligados al sexo, está diseñada para detectar la inducción de lesiones genéticas heredables en gran parte del genoma de *Drosophila*. Se requieren dos generaciones para la detección de letales recesivos en el cromosoma X, el cual representa cerca del 20% del genoma completo. Se estima que aproximadamente 700 a 800 de los 1000 loci del cromosoma X son susceptibles de ser alterados para dar origen a mutaciones letales recesivas (Lee et al. 1983).

Entre las ventajas de esta prueba destacan tres que son cruciales; ha sido validada por el estudio de más de 450 mutágenos y carcinógenos, es aceptada por las autoridades reguladoras internacionales como una prueba de primer nivel para genotoxicidad y el método está estandarizado (Woodruff et al., 1984; Valencia et al. 1985; Yoon, 1985; Woodruff et al. 1985 y Zimmering et al. 1985). Sin embargo, presenta algunas desventajas:

- 1) El método estándar es poco sensible estadísticamente, se requiere un incremento cercano a 7 veces la basal para encontrar diferencias significativas a  $P < 0.05$ .
- 2) Es poco sensible para cierto grupo de carcinógenos. Por ejemplo, aquellos agentes que sólo causan cambios en el número

cromosómico —los venenos del huso mitótico—; no son detectados. Tampoco es sensible al importante grupo de carcinógenos que comprenden las aminas aromáticas y los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Al respecto se discute si esto se debe a falta de penetración, metabolismo "defectuoso" o, por el enmascaramiento de eventos genéticos altamente específicos con frecuencias bajas, por otros que ocurren en frecuencias mucho más altas. Algunos autores sugieren que el cromosoma X de *Drosophila* tiene sitios calientes para mutación (Kramers et al. 1984).

- 3) La prueba es específica para daño en células germinales. Por lo cual no puede analizarse la relación mutagénesis-carcinogénesis.

Por las grandes ventajas que presenta *Drosophila melanogaster*, se han desarrollado otras metodologías que, sin estar incluidas en las baterías de prueba básicas, ofrecen información relevante en la evaluación de agentes químicos.

La prueba de pérdida total o parcial de cromosomas (SCLT, Sex Chromosome Loss Test), detecta aquellos compuestos que tienen la capacidad de alterar tanto la integridad numérica (no-disyunción y pérdida total), como la estructural (pérdida parcial) de los cromosomas.

El tiempo requerido para realizar esta prueba es similar al de las pruebas de mutación somática, aunque técnicamente es más difícil; sin embargo, éste es significativamente menor en comparación con la prueba de letales recesivos ligados al sexo. No detecta mutaciones puntuales (Zimmering, 1987). La realización de la SCLT es posterior a las pruebas de primer nivel, ya que no es adecuada para detectar riesgo mutagénico, sino para investigar posibles mecanismos de acción de los mutágenos sobre la integridad cromosómica y el aparato mitótico.

Tanto en la SLRLT como en la SCLT, mediante el uso del sistema de camadas es posible traducir el patrón espacial de la espermatogénesis de *Drosophila* en un arreglo temporal de camadas sucesivas, lo que permite diferenciar entre mutágenos (compuestos directos) y

promutágenos (compuestos indirectos). Es aceptado que los mutágenos químicos pueden mostrar especificidad de estadio, es decir, presentar efectos más o menos marcados en las diferentes etapas del desarrollo de las células germinales; por lo que resulta esencial analizar la progenie constituida por espermatozoides, espermatidas tempranas y tardías, y espermatoцитos tratados. Los machos de tipo silvestre tratados son apareados sucesivamente con hembras vírgenes a intervalos regulares de 2 o 3 días. Un promedio de 2 a 5 hembras por macho son adecuadas para muestrear todas las células germinales que están maduras. Se considera que un período de muestreo total de 7 a 9 días (3 a 4 camadas) es suficiente para probar un mutágeno (IPCS, 1985).

El empleo de células somáticas de *Drosophila* es una metodología novedosa que permite detectar la capacidad de los agentes químicos para inducir mutación y recombinación a nivel somático (Graf et al. 1983). Este tipo de estudios cobran cada día más importancia pues las evidencias experimentales indican una fuerte asociación entre la actividad recombinogénica y la carcinogenesis (Radman y Kinsella, 1980 y Cairns, 1981); además la iniciación del proceso canceroso está relacionada con un cambio en la información genética de las células.

Con la **prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART, Somatic Mutation and Recombination Test)** se han analizado a la fecha más de 250 compuestos (Vogel, 1985 y 1988; Vogel et al. 1988; Vogel y Nivard, 1993), este sistema valora en una generación (10 días) y muestrea un número elevado de células por organismo. Se emplean células de los discos imagales de las larvas, los que posteriormente darán origen a distintas partes del cuerpo del imago o adulto. Estas células están determinadas genéticamente y permanecen en un número reducido, hasta que se aproxima la metamorfosis, entonces sufren una serie de divisiones mitóticas para dar origen a diversas estructuras del adulto: ojos, antenas, alas, patas (Demerec, 1965). Si a lo largo del proceso de diferenciación celular ocurre alguna alteración que cambie la información genética de las células en división (mutación, pérdida o

ganancia de cromosomas y recombinación mitótica), esta modificación en la información será transmitida a las células hijas descendientes de la célula alterada original, lo que genera un clon celular que se observará como una mancha distinguible, cuando se emplean los marcadores fenotípicos apropiados (García-Bellido y Merriam, 1971b; García-Bellido y Dapena, 1974 y Graf et al. 1984). El tamaño de la mancha es un indicador del tiempo en que ocurrió la alteración; es posible distinguir entre compuestos directos, e indirectos, ya que los segundos requieren ser activados metabólicamente por el organismo para ser biotransformados a derivados reactivos y producen, por lo tanto, manchas de tamaño menor.

Se han desarrollado diversas variantes de esta prueba. La primera en ser propuesta utiliza dos marcadores autosómicos que regulan la expresión de las células que darán origen a los tricomas de las alas de la mosca (Graf et al. 1984). Las manchas mutantes pueden ser sencillas, originados por: delección, no disyunción, mutación puntual y recombinación mitótica entre los marcadores empleados; o gemelas, si se derivan de recombinación entre el marcador proximal y el centrómero. Se analiza la progenie con constitución trans-heteróciga (que es susceptible de recombinación) y se descarta la portadora del cromosoma balanceador.

La comparación de la frecuencia de manchas inducida en hembras y machos, es particularmente interesante, ya que los machos de *Drosophila* no presentan de manera natural recombinación en sus células germinales; sin embargo, a nivel de células somáticas, se ha encontrado que los valores adjudicables a recombinación son similares en ambos sexos (Becker, 1976).

Otra prueba similar, utiliza células que darán origen a los ojos de la mosca (Vogel y Ramel, 1988). Se ha considerado que esta prueba es similar a la de locus específico de ratón y, de forma análoga, analiza la respuesta de un solo locus (white) ante compuestos genotóxicos. Detecta los mismos eventos que la prueba de ala, sin embargo, es interesante comparar la respuesta en ambas variantes, ya que el marcador utilizado en la segunda se localiza en el cromosoma X, por lo que el análisis de la respuesta en

hembras y machos permite conocer la aportación de los eventos debidos a recombinación intragénica; ya que los machos son hemicigos para el marcador.

Otra diferencia importante entre ambos sistemas consiste en la constitución anatómica de los dos órganos utilizados. El ala está constituida por dos monocapas celulares (dorsal y ventral) con desarrollo independiente y una dinámica de divisiones mitóticas básicamente exponencial (García-Bellido y Merriam 1971a), los tricomas son procesos cuticulares unicelulares y el tamaño mínimo de expresión es de 1 célula. Por otra parte, el ojo es una estructura tridimensional que consta aproximadamente de 800 subunidades estructurales llamadas omatidias, que están formadas por 24 células (Baker et al. 1990), de las cuales sólo dos —las células pigmentadas primarias—, proporcionan la variable de respuesta, por lo que al estar afectada una omatidia, realmente se cuantifica a 2/24 células que constituyen cada subunidad. Así, el significado de una mancha simple chica en ambas estirpes celulares, no es comparable.

Se ha comparado la sensibilidad de diferentes líneas que portan marcadores en distintos cromosomas, lo que les confiere un contexto genético diferente y, en consecuencia, diferente sensibilidad (Clement et al. 1988). En 1991 Frölich y Würigler incorporaron a la prueba de las alas dos cromosomas de una cepa resistente al insecticida DDT (Dapkus y Merrell, 1977), sin embargo, aunque en apariencia se incrementó la sensibilidad de las líneas involucradas, no se mejoró la capacidad de discriminación de genotóxicos y el registro de la información se hizo confuso por la aparición de artefactos debidos a genes ligados con aquellos responsables del metabolismo. En el mismo año, se propuso un patrón de cruce con el que se mantiene la sensibilidad para la detección, pero se eliminan los factores de confusión en el registro (Graf y Van Shaik, 1992; Graf et al. 1991); con las modificaciones anteriores se han probado promutágenos (Graf y Singer 1992 ; Graf et al. 1992).

En relación con la prueba que utiliza las células de los ojos, se ha comparado la capacidad de detección de líneas de *Drosophila*

con metabolismo diferencial (Vogel et al. 1991, con lo que la versatilidad de este sistema se ha incrementado posibilitando inclusive, el análisis de eventos genéticos finos como la recombinación intragénica (Vogel y Nivard, 1993).

En síntesis estos ensayos son técnicamente más fáciles de realizar, mucho más rápidos y económicos, algunos autores consideran que estadísticamente son más satisfactorios que el método de letales recesivos ligados al sexo (Fahmy y Fahmy, 1984). Las mutaciones en las células somáticas pueden ser más relevantes para valorar carcinogenicidad. Cuando el mismo compuesto ha sido probado simultáneamente en células germinales y somáticas, las pruebas somáticas han mostrado una sensibilidad comparable o aún mayor, especialmente para los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Así, las evidencias sugieren que, en general, estos ensayos responden a un rango similar de compuestos en niveles de dosis equivalentes, ambas son sensibles a deleciones pequeñas, una forma de daño que se considera relevante para el riesgo genotóxico en los seres humanos.

El objetivo general de la presente tesis es: **determinar los efectos genotóxicos inducidos por dos sales de arsénico, arsenito ( $\text{NaAsO}_2$ ) y arsenato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ) en *Drosophila melanogaster*.** Como objetivos particulares se definieron los siguientes:

- 1) Estudiar la inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo utilizando dos rutas de administración.
- 2) Evaluar la capacidad de las dos sales de arsénico para inducir no disyunción y pérdida de los cromosomas sexuales.
- 3) Valorar el impacto genotóxico de las dos sales en diferentes estirpes de las células germinales, mediante el análisis de camadas.
- 4) Determinar los efectos genotóxicos de las dos sales en las células somáticas de las alas y de los ojos de *Drosophila*.
- 5) Comparar el papel que desempeña el metabolismo en los linajes celulares de las alas y de los ojos, ante la exposición a las dos sales de arsénico.
- 7) Comparar el efecto genotóxico inducido por las dos sales de

arsénico en células de la línea germinal y de la línea somática.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### Compuestos químicos:

Arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ); arsenato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ); sacarosa ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ). Todos los compuestos fueron adquiridos de Baker.

### Concentraciones:

En ensayos preliminares se obtuvo la toxicidad (Concentración Letal Media ( $\text{LC}_{50}$ ) para ambas sales. 100  $\mu\text{g}$  de tipo silvestre (Canton-S) de 48 hrs. de edad, privados de alimento por 4 hrs., se inyectaron con aproximadamente 0.4  $\mu\text{l}$  de distintas concentraciones de cada una de las sales de arsénico, disueltas en sacarosa al 5%; después de 4 horas se colocaron en frascos lecheros de 250 ml de capacidad con aproximadamente 60 ml. de medio de cultivo fresco (Ramos et al. 1993). A las 48 horas de la inyección se cuantificó el número de moscas muertas y se obtuvo el porcentaje en relación con el total de moscas tratadas. El procedimiento se repitió al menos en tres ocasiones hasta confirmar la repetibilidad en la respuesta, en cada caso se inyectó un grupo de machos con el solvente, sacarosa al 5%. La  $\text{LC}_{50}$  para arsenito de sodio fue 150 ppm; y para arsenato de sodio, 500 ppm. Con base en los valores determinados como  $\text{LC}_{50}$ , se seleccionaron dos concentraciones menores de ambos compuestos para realizar los experimentos: arsenito de sodio [50, 100 y 150 ppm] y arsenato de sodio [100, 250 y 500 ppm]. Los testigos concurrentes en todos los experimentos se trataron con sacarosa al 5%.

### Diseño:

Se describen por separado las metodologías para células germinales y para células somáticas, así como para cada prueba particular y tipo de exposición. La figura 14, muestra el esquema general utilizado en la presente tesis e indica el tiempo de



Pruebas somáticas

Pruebas germinales

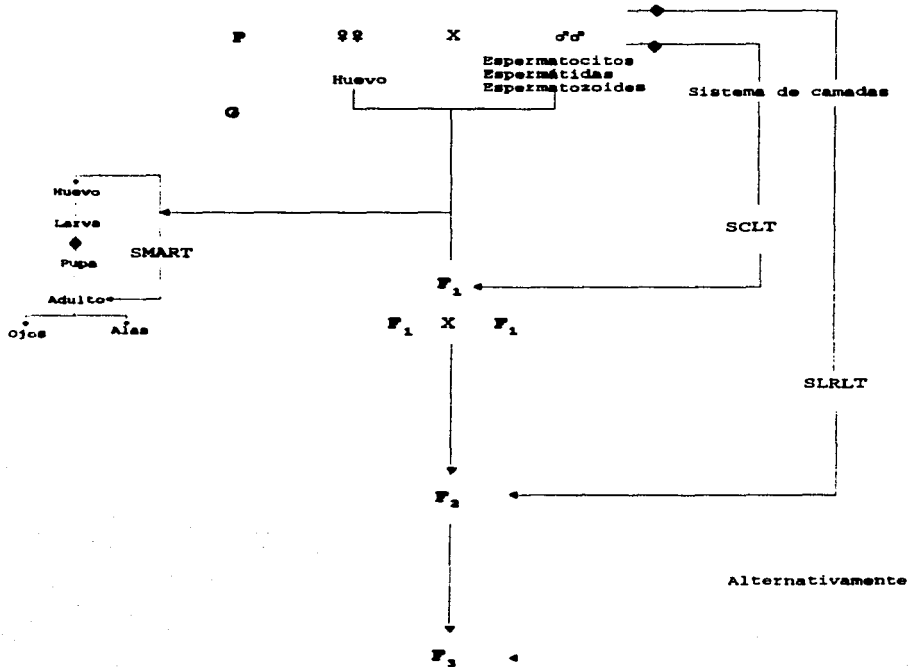


Fig. 14 Esquema que muestra las pruebas de genotoxicidad y los puntos terminales de evaluación, ♦ = tiempo de aplicación del tratamiento.

tratamiento en cada una de ellas.

## A. Células germinales

### Sistema de Camadas

Se utilizó el siguiente sistema de camadas: A, 0-2 días; B, 3-5 y C, 6-8, para recobrar los espermatozoides, espermatidas tempranas, tardías y espermatocitos secundarios durante el tratamiento. Los machos tratados se cruzaron con hembras vírgenes en proporción 1♂:3♀♀, al inicio del experimento. Dos días después, los machos fueron transferidos a medio de cultivo fresco con ♀♀ vírgenes; se hizo un tercer cambio a los 3 días. Se colectó la progenie de cada camada durante cinco días, posteriormente se eliminó a los progenitores.

#### 1. Prueba de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo (SLRLT)

Se tratan machos de tipo silvestre y se cruzan con hembras vírgenes portadoras de un cromosoma balanceador (*Basc*), que inhibe la recombinación en las hembras de la siguiente generación —los machos no presentan ésta de manera natural—, por lo que se transfiere el cromosoma tratado sin modificación (Fig. 15). El empleo de marcadores fenotípicos permite distinguir a las hembras F1 y a las F2 portadoras del cromosoma X del macho tratado y un cromosoma marcador, de aquellas con otra constitución. Las hembras F1 portadoras del cromosoma tratado intacto heredarán éste a la mitad de la progenie F2. Si éste cromosoma es portador de cualquier mutación letal recesiva ligada al sexo, no permitirá que los machos que lo reciban sean viables, lo cual se detecta por la ausencia de una clase fenotípica (machos de tipo silvestre) en la F2.

#### Líneas y cruzas:

♀♀ *Basc/Basc* X ♂♂ Canton-S. El cromosoma balanceador *Basc* [In(1) *sc<sup>SIL</sup> sc<sup>BR</sup>+S, sc<sup>S1</sup> sc<sup>B</sup> w<sup>a</sup> B*] porta inversiones múltiples que abarcan casi la longitud total del cromosoma, por lo que inhibe la recombinación en el cromosoma X; lleva además dos marcadores con

expresión fenotípica:  $w^a$ , para el color de los ojos (rosa-durazno) y B, que en condición homocigótica produce ojos en forma de una barra y en los heterocigotos, ojos en forma arrifonada. Para una descripción más detallada consultar Lindsley y Grell (1968). Los  $\sigma\sigma$  Canton-S son de tipo silvestre.

1.1 Tratamiento a adultos  
Machos de menos de 48 hrs. de edad, privados de alimento por 4

hr., se inyectaron con aproximadamente 0.4  $\mu$ l de las concentraciones seleccionadas para cada compuesto. Después de 4 hr. se aparearon con hembras vírgenes, de acuerdo al sistema de camadas. La siembra se hizo en forma individual; se colocaron 1 $\sigma$  y 3 $\sigma\sigma$  en cada tubo homeopático de 9 cm de alto X 2 cm de  $\phi$ , que contenía 5 ml de medio de cultivo fresco. A los 15 días se cuantificó el número de  $\sigma\sigma$  y  $\sigma\sigma$  de la  $F_1$  descendiente de cada macho tratado. Cada hembra  $F_1$  se sembró en tubos homeopáticos con medio fresco, haciendose familias para obtener la  $F_2$ . Después de 15

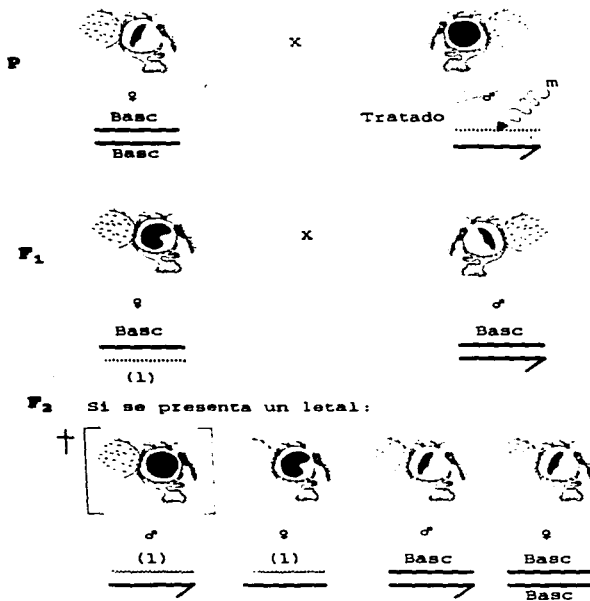


Fig. 15 Prueba de letales recesivos ligados al sexo (SLRL) en *Drosophila melanogaster* (IPCS, 1985).

días se analizó la progenie de cada tubo para determinar la presencia o ausencia de machos de tipo silvestre; en caso de ser necesario —de acuerdo con los criterios de registro— las hembras portadoras del cromosoma tratado y el balanceador (heterocigotas) se sembraron nuevamente en tubos homeopáticos, con medio de cultivo fresco, para obtener la  $F_3$  y así, confirmar o descartar la presencia de una mutación letal (Fig. 15). Para cada concentración se inyectaron 100  $\sigma\sigma$  progenitores y se realizaron dos experimentos. Se compararon los resultados obtenidos en las dos series experimentales para confirmar la repetibilidad en la respuesta, en cuyo caso se procedió a sumarlos para incrementar el tamaño de muestra.

### 1.2 Tratamiento a larvas

Para determinar la importancia de la ruta de administración en la genotoxicidad de las dos sales, se eligió un tratamiento subcrónico a larvas.

Un cultivo maduro de moscas Canton-S se transfirió a frascos con medio fresco durante un período de 8 hr., para sincronizar la edad de la progenie. A las 48 hrs. se administró 1 ml. de la solución de prueba sobre la superficie del medio de cultivo de cada frasco. Una vez que emergieron las moscas adultas se procedió a cruzar a los machos con hembras vírgenes de la línea *Basc* en proporción 1 $\sigma$ :3 $\varphi\varphi$ . Para el sistema de camadas y la siembra de las cruza progenitoras se procedió de la manera ya descrita.

#### Criterios de registro:

Los tubos homeopáticos se revisaron bajo el microscopio de observación, para determinar la presencia de machos de aspecto silvestre (ojos de color rojo y con forma redondeada) en la progenie recobrada, en cuyo caso se cuantificaba como progenie regular. Si no se encontraban moscas de esta clase, se contaba el número de hembras heterocigotas, para determinar si se alcanzaba el criterio de 16  $\varphi\varphi$  portadoras:0  $\sigma\sigma$  de tipo silvestre, para declarar la presencia de una mutación letal recesiva ligada al sexo. Si el número de  $\varphi\varphi$  portadoras era menor a 16, éstas se sembraban en tubos

homeopáticos para obtener la  $F_3$  y completar el número crítico de hembras. Cuando aún en la  $F_3$  no se cumplía este criterio, se procedía a eliminar este registro, ya que la progenie del macho tratado en cuestión, no puede clasificarse, ni como regular, ni como letal.

#### Análisis estadístico:

Se comparó la frecuencia de letales de los lotes testigo y tratados mediante las pruebas de Kastenbaum-Bowman (1970), a  $P = 0.05$ . En caso de recobrase más de un letal, descendiente del mismo macho tratado en las camadas sucesivas, se estimó mediante la distribución Poisson según Gocke et al. (1982), la probabilidad de que fuera una mutación amplificada en las gonias, en cuyo caso se eliminaba el registro de ese macho.

#### 2. Prueba de no disyunción y pérdida de cromosomas sexuales, (SCLT).

Se tratan machos con constitución genética conocida; ya que se utilizan marcadores fenotípicos en los cromosomas X y Y, cuyo seguimiento en la generación  $F_1$  permite detectar los eventos de pérdida parcial de los marcadores, principalmente aquellos sobre el cromosoma Y y la pérdida total, sea del cromosoma X o del Y. Los eventos genéticos terminales implican la pérdida parcial de cromosomas, básicamente por efectos clastogénicos y aneuploidías provocadas por pérdida y/o no-disyunción de los cromosomas (Fig. 16).

#### Líneas y cruza:

$\varphi\varphi y^2 w^a / y^2 w^a \times \sigma\sigma y / B^S Y y^+$ . Los tres alelos de la serie "yellow" (1-00)  $w^a$ , codifican para el color del cuerpo de las moscas. El alelo silvestre es completamente dominante sobre la expresión de todos los alelos que constituyen la serie y codifica para el color del cuerpo gris-pardo característico de las moscas de tipo silvestre y, pelos y cerdas negros; "yellow 2" ( $y^2$ ), produce color de cuerpo amarillo, con pelos y cerdas negros; "yellow" (y), es responsable del color amarillo del cuerpo, con pelos y cerdas



	$y$	$\frac{y^2 w^2}{y^2 w^2}$	Fenotipo
Progenie regular	$\frac{y}{y}$	$\frac{y^2 w^2}{y^2 w^2}$	$\sigma$
	$\frac{B^s Yy^+}{B^s Yy^+}$	$\frac{y^2 w^2 / B^s Yy^+}{y^2 w^2 / B^s Yy^+}$	$\sigma$
Progenie excepcional	n.d. X-Y $\frac{y/B^s Yy^+}{y/B^s Yy^+}$	$\frac{y^2 w^2 / y/B^s Yy^+}{y^2 w^2 / y/B^s Yy^+}$	$\sigma$
	P.D. ( $y^+$ ) $\frac{B^s Y}{B^s Y}$	$\frac{y^2 w^2 / B^s Y}{y^2 w^2 / B^s Y}$	$\sigma$
	P.D. ( $B^s$ ) $\frac{Yy^+}{Yy^+}$	$\frac{y^2 w^2 / Yy^+}{y^2 w^2 / Yy^+}$	$\sigma$
	$\frac{\circ}{\circ}$	$\frac{y^2 w^2 / \circ}{y^2 w^2 / \circ}$	$\sigma$

$y^+$ , alelo silvestre, cuerpo café con pelos y cerdas negras;  $y^2$ , cuerpo amarillo con pelos y cerdas negras;  $y$ , cuerpo amarillo con pelos y cerdas café;  $w^2$ , ojos color rosa-durazno;  $B^s$ , la forma de los ojos es una barra extrema (Lindsley y Grell, 1972).

**Fig. 16** Prueba de no-disyunción y pérdida de cromosomas sexuales (SCLT) en *Drosophila melanogaster*.

café. "white-apricot",  $w^a$  (1-1.5), codifica para el color rosa durazno de los ojos y es recesivo frente al de tipo silvestre  $w^+$ , que produce ojos rojos. El alelo  $B^S$  (1-57.0), controla la forma del ojo, transformándolo a una barra extrema, es dominante sobre el alelo de tipo silvestre,  $B^{S+}$  (Lindsley y Grell, 1968).

#### Tratamiento:

Se siguió el método de inyección indicado para la prueba de letales. Se trataron 100 machos por lote y se cruzaron en proporción 1♂:3♀♀ con hembras vírgenes de menos de 72 hrs. de edad. La crua fue masiva: 25 machos tratados y 75 hembras vírgenes se colocaron en frascos lecheros de 250 ml de capacidad que contenían 60 ml de medio de cultivo fresco y se procedió a realizar los transvasos para el sistema de camadas. A los 15 días de iniciado el tratamiento se analizó el fenotipo de ♀♀ y ♂♂ de la  $F_1$ , y se cuantificó el número de moscas regulares, así como las excepcionales para aneuploidías y pérdida parcial de los marcadores del cromosoma Y,  $y^+$  y  $B^S$  (Fig. 16). Se realizaron al menos dos experimentos, cuyos resultados fueron comparados para determinar la repetibilidad en la respuesta; si las diferencias no eran significativas se procedía a sumar los resultados de ambos experimentos.

#### Análisis estadístico:

Se compararon las frecuencias de aneuploidías y las de pérdida parcial para los grupos testigo y tratados mediante las tablas de Kastenbaum-Bowman (1970), a  $P = 0.05$ .

### B. Células somáticas

#### 3. Prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART)

#### Tratamiento:

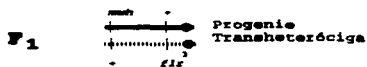
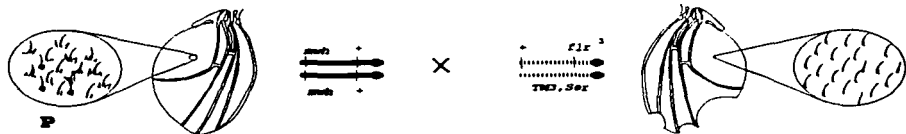
En todas las pruebas de mutación y recombinación somáticas, ♀♀ vírgenes de menos de 72 hrs. de edad se cruzaron con ♂♂ de menos de 48 hrs. de edad. Tres días después, los progenitores se transfirieron

ron a frascos con medio fresco por un período de 8 horas para homogenizar la edad de la progenie. Posteriormente se colectaron las larvas de  $72 \pm 4$  horas de edad mediante un gradiente de sacarosa al 20 % (Nothigär, 1970). Se colocaron aproximadamente 100 larvas en tubos homeopáticos, con una gasa de nylon en uno de los extremos y un tapón de poliuretano en el otro; cada tubo se introdujo en vasos de precipitado de 10 ml de capacidad que contenían 50 mg de celulosa en polvo (Merck) y 0.3 ml de la solución de prueba. Después de 6 horas de tratamiento, las larvas se enjuagaron con agua corriente y se colocaron en frascos lecheros con medio de cultivo fresco, donde permanecieron hasta completar su desarrollo. Se hicieron al menos dos repeticiones de cada experimento y se compararon los resultados obtenidos en las series experimentales, así como en los testigos concurrentes; si no existían diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) se sumaban los resultados para incrementar el tamaño de muestra. En las pruebas con células del ala el tamaño de muestra se marcó en 40 alas por lote, para las pruebas con células de los ojos, éste fue de 250 ojos por lote.

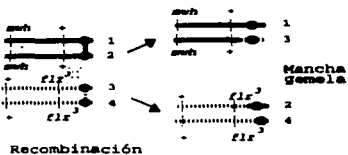
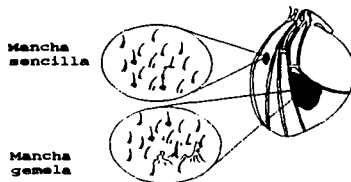
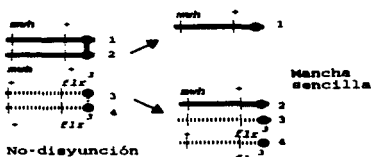
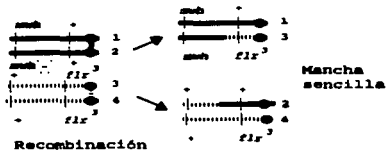
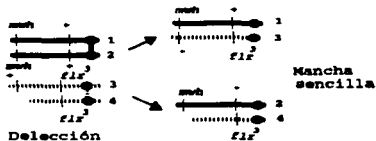
### 3.1 Cruza estándar (alas) (Fig. 17).

Líneas: ♀♀ *mwh* / *mwh* X ♂♂ *flr*<sup>3</sup> / *TM3*, *Ser*. El marcador recesivo *mwh* (3-00) regula la expresión de los tricomas de las alas, produce tres o más tricomas en lugar de uno por célula como se encuentra en las moscas de tipo silvestre. El alelo *flr*<sup>3</sup> (3-38.8), es letal temprano en condición homocigota, pero resulta viable a nivel celular; modifica a los tricomas en estructuras amorfas con expresividad variable. El cromosoma balanceador *TM3*, *Ser* [*In*(3*LR*)-*TM3*, *y*<sup>+</sup> *ri* *p*<sup>p</sup> *sep* *bx*<sup>34\*</sup> *e*<sup>Ser</sup>], se utiliza para mantener estable en cultivos al alelo *flr*<sup>3</sup>; porta múltiples inversiones que abarcan casi la totalidad del cromosoma e inhiben la recombinación en el cromosoma 3, el alelo marcador del balanceador (*Ser*), es fácilmente distinguible porque produce muescas en los bordes terminales de las alas; es totalmente dominante sobre el silvestre, *Ser*<sup>+</sup>. Para una descripción mas detallada de los marcadores consultar a Lindsley y





Formación de clones mutantes que se expresan como manchas simples y gemelas:



**Fig. 17** Prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en células de las alas de *Drosophila melanogaster*.

Grell (1968), Lindsley y Zimm (1985) y, García-Bellido y Dapena (1974).

### 3.2 Cruza de alta bioactivación mejorada (alas)

♀♀ *ORR/ORR; ORR/ORR; flr<sup>3</sup> / TM3, Ser X σσ mwh / mwh*. La línea de hembras porta los cromosomas 1 y 2 de la línea *OR(R)*, resistente al DDT, que muestran un alto nivel constitutivo en la actividad del citocromo P-450 (Dapkus y Merrell, 1977).

#### Procesamiento del material:

Se separó la progenie transheterocigota, de la portadora del cromosoma balaceador (*Ser*). Las moscas se fijaron en alcohol al 70 %, posteriormente se elaboraron preparaciones con 20 alas de hembras y 20 de machos por laminilla, de acuerdo a Graf et al. (1984).

#### Registro microscópico de las alas:

Se revisaron las alas a 400X y se cuantificó el número y tipo de manchas, que de acuerdo con los eventos indicados en la figura 17, pueden ser simples chicas (1 a 2 células), simples grandes (> 3 células), o gemelas (si presentan los dos marcadores mutantes formando parte de la mancha mosaico). Se considera que dos manchas se originan por procesos independientes si se encuentran separadas por 3 o mas hileras de tricomas de tipo silvestre (Fig. 17).

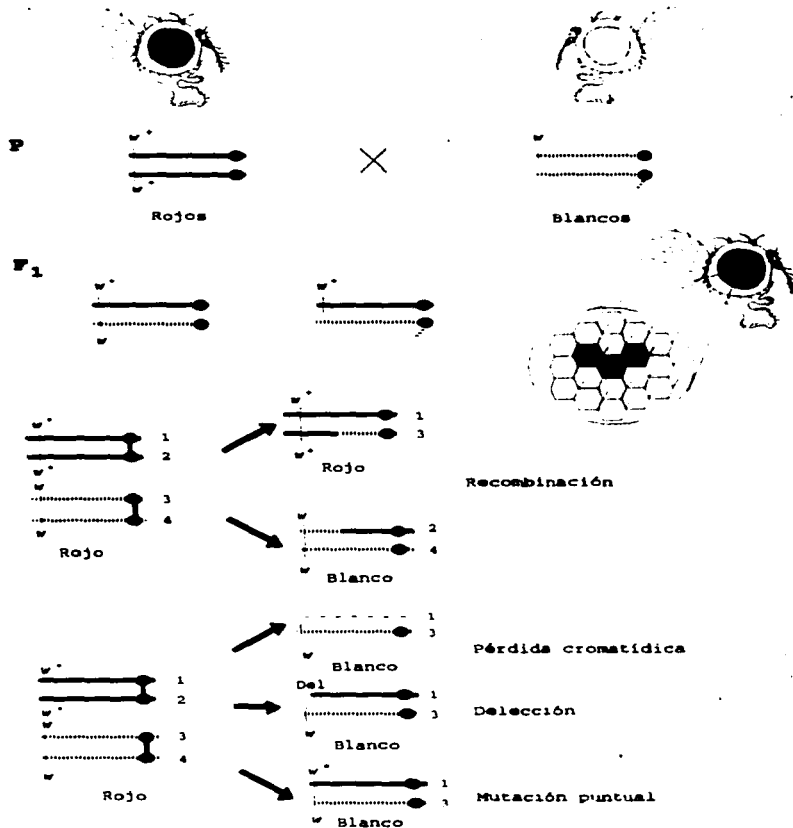
#### Análisis estadístico:

Se compararon las frecuencias obtenidas para manchas simples chicas y grandes, y para manchas gemelas en los lotes testigo y experimentales mediante el procedimiento de decisión múltiple de Frei y Würgler (1988), las tablas de Kastenbaum-Bowman (1970) y el programa de cómputo SMART (Würgler no publicado).

### 3.3 Cruza estándar (ojos) (Fig. 18).

#### Líneas:

♀♀ *y / y X σσ w / Y*. En las moscas  $\underline{y}$  (1-00), el color del cuerpo es



**Fig. 18** Prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en las células de los ojos de *Drosophila melanogaster*.

amarillo, con pelos y cerdas de color café. EL marcador recesivo, w (1-1.5) produce ojos de color blanco. Ambos marcadores están ligados al X; en la progenie, las hembras tienen el cuerpo de color gris-pardo, característico del tipo silvestre y los machos lo tienen amarillo; en ambos sexos el color de los ojos es rojo.

### 3.4' Cruza metabólica (ojos)

Líneas:

♀♀ Hikone-R w / w X ♂♂ Hikone-R + / Y

La línea Hikone-R fue aislada de un área tratada con insecticidas en el Japón; es resistente a éstos (DDT) y a otras sustancias tóxicas. En la progenie, las hembras presentan los ojos color rojo y los machos, color blanco, por lo que solamente se revisan las primeras.

Registro de manchas mosaico:

Las moscas se colocaron en una solución de 1 parte de Tween 80, 9 de alcohol etílico y 90 de agua. Se analizaron los ojos de hembras y machos descendientes de la crua estándar y de las hembras descendientes de la crua con metabolismo diferencial a 120X, con iluminación de una fibra óptica (Fiberlite Mod. 170D, Dolan-Jenner Inc.), se cuantificó el número y tamaño de las manchas mosaico encontradas en cada ojo. Dos manchas mutantes se consideran independientes si se encuentran separadas entre sí por 4 o mas hileras de omatidias no afectadas (Fig. 18) (Vogel, 1985).

Análisis estadístico:

Las frecuencias de manchas mosaico encontradas en los lotes testigo y tratados se compararon mediante el procedimiento de decisión múltiple de Frei y Würzler (1988) a P = 0.05.

### III. RESULTADOS

La tabla XVI y la figura 19 muestran los resultados obtenidos en la prueba de letales recesivos ligados al sexo después de inyectar a los machos con arsenito de sodio. Solamente en la concentración de 100 ppm. se encontró inducción de letales. En la camada A, el porcentaje es el doble (0.67 %) del lote testigo (0.32 %), sin embargo, no llegó a ser significativo ( $P > 0.05$ ). En B, el incremento es altamente significativo ( $P < 0.01$ ) y en C, tampoco fué estadísticamente significativo. La concentración más alta (150 ppm), que corresponde a la  $LC_{50}$  no pudo analizarse, aunque los

Tabla XVI. Resultados obtenidos en la prueba SLRL después de inyectar machos Canton-S con  $NaAsO_2$ .

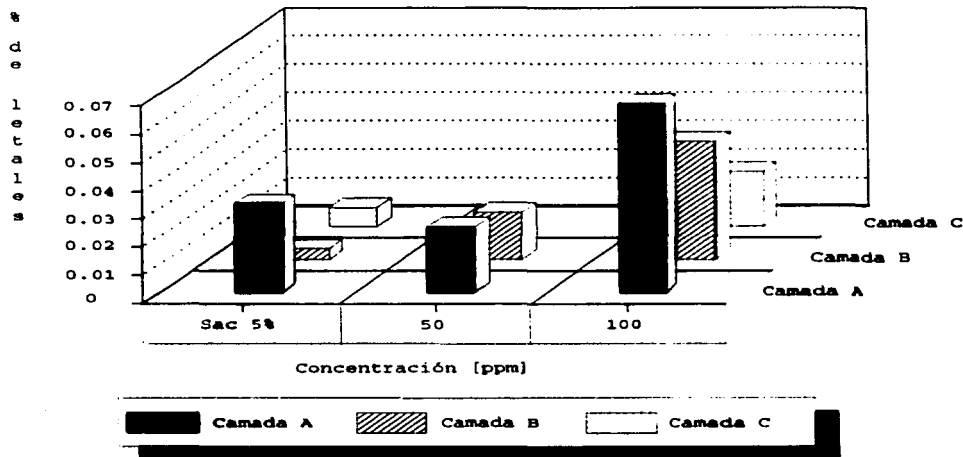
Camada	[ppm]	dó trat.	♀♀ F <sub>1</sub>	♀♀ fert	letales	Frec (%)
A (0-2)	Sac. 5%	206	2362	1851	6	0.32
	50	135	1517	1320	3	0.23
	100	136	2404	1886	12	0.67
B (3-5)	Sac. 5%	148	2727	2351	1	0.04
	50	108	1964	1712	3	0.17
	100	154	2421	2394	10	0.42**
C (6-7)	Sac. 5%	176	3476	2853	2	0.07
	50	105	1924	1584		
	100	132	1989	1532	3	0.20

Análisis estadístico con las tablas de Kastenbaum-Bowman (1970); \*\* =  $P < 0.01$

machos progenitores fueron viables para realizar el sistema de camadas; sin embargo, el número de progenie recobrada fue muy baja y los resultados poco consistentes.

Debido a la toxicidad encontrada en los experimentos por inyección se decidió utilizar la ruta de alimentación y prolongar la exposición al compuesto extendiendo el tratamiento a machos de  $48 \pm 4$  hrs. de edad larvaria, que permanecieron en el medio de cultivo hasta entrar a la metamorfosis.

Con este tratamiento se encontró una relación concentración respuesta en la camada B (excepto para 100 ppm), la frecuencia (%) de letales inducidos en 150 ppm. es cuatro veces la del lote testi-



**Fig. 19** Frecuencia de letales recesivos ligados al sexo inducidos por inyección de  $\text{NaAsO}_2$  a  $\sigma\sigma$  Canton-S.

go, sin embargo, el incremento no fue estadísticamente significativo ( $P > 0.05$ ) (Tabla XVII y Fig. 20).

El arsenato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ), se probó a 100 y 200 ppm., ya que igual que en el caso del arsenito, la toxicidad en los lotes experimentales no permitió realizar los experimentos con las concentraciones seleccionadas previamente.

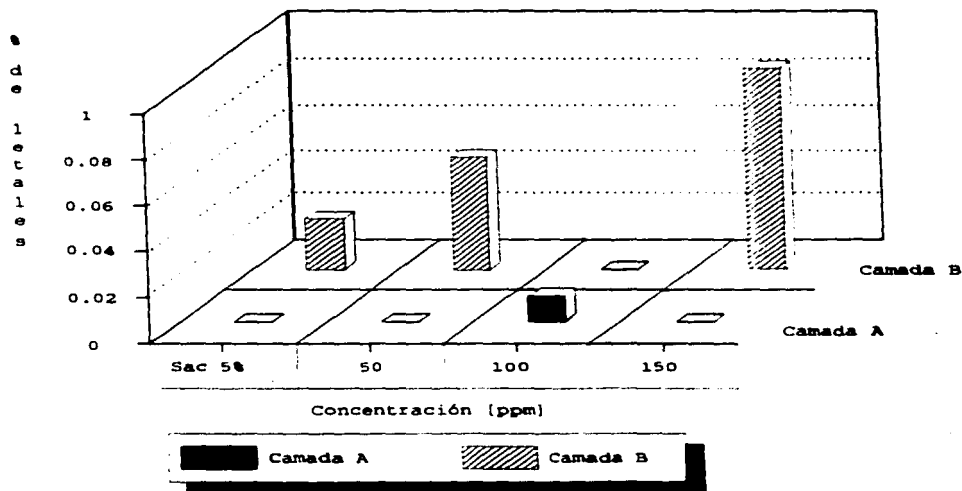
En el tratamiento por inyección a machos adultos se produjo un claro incremento en la frecuencia de letales en la camada A, tanto a 100 como a 200 ppm. (0.28 y 0.21, respectivamente) (Tabla XVIII y Fig. 21), aunque éste solo fue significativo para la primera concentración ( $P < 0.05$ ). No se obtuvo respuesta en la camada B; y en la C, solamente se incrementó estadísticamente el porcentaje de letales a la concentración mayor ( $P < 0.05$ ).

En el tratamiento por alimentación, la respuesta positiva se obtuvo únicamente en la camada A, en la cual el porcentaje de

**Tabla XVII. Resultados obtenidos en la SLRLT después de alimentar subcrónicamente a larvas Canton-S  $48 \pm 4$  hrs. con  $\text{NaAsO}_2$ .**

Camada	[ppm]	$\delta\delta$ trat.	$\sigma\sigma$ F <sub>1</sub>	$\sigma\sigma$ fert	letales	Frec. (%)
A (0.02)	Sac. 5%	82	852	513		
	50	98	1249	965		
	100	88	1173	886	1	0.11
	150	57	776	489		
B (3-5)	Sac. 5%	68	589	459	1	0.22
	50	107	1404	1022	5	0.49
	100	85	988	584		
	150	51	643	455	4	0.88
C (6-7)	Sac. 5%	45	354	209		
	50	68	756	556		
	100	53	592	377		
	150	17	175	101		

Análisis estadístico con las tablas de Kastenbaum-Bowman (1970);  $P = 0.05$

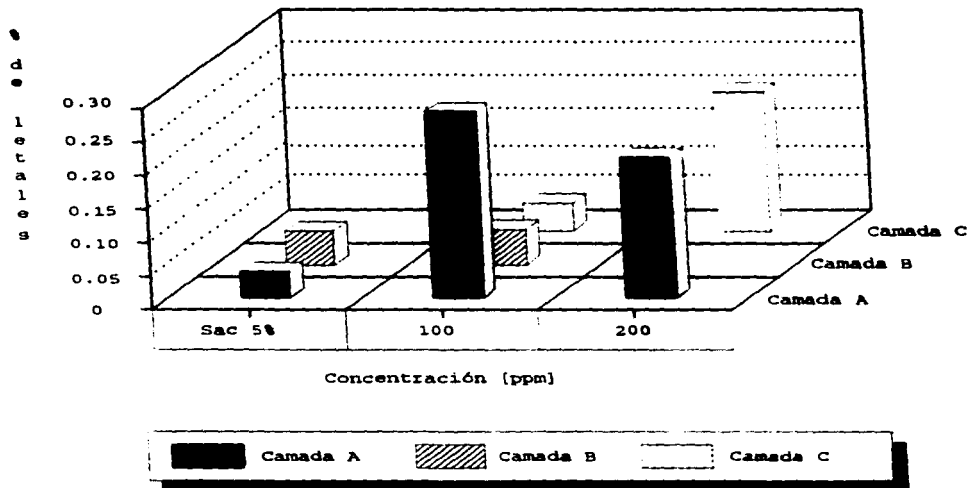


**Fig. 20. Frecuencia de letales recesivos ligados al sexo obtenida al alimentar larvas Canton-S con  $\text{NaAsO}_2$ .**

**Tabla XVIII. Resultados obtenidos en la SLRLT después de inyectar machos Canton-S con  $\text{Na}_2\text{SAsO}_4$ .**

Camada	[ppm]	♂ trat.	♀ F <sub>1</sub>	♀♀ fert	letales	Frec. (%)
A (0-2)	Sac. 5%	164	2845	2432	1	0.04
	100	187	4190	3611	10	0.28*
	200	190	3574	3321	7	0.21
B (3-5)	Sac. 5%	129	2317	2085	1	0.05
	100	117	2013	1829	1	0.05
	200	107	2139	1943		
C (6-7)	Sac. 5%	120	2456	2210		
	100	113	2485	2214	1	0.04
	200	84	1836	2333	5	0.21*

Análisis estadístico con las tablas de Kastenbaum-Bowman (1970); \* =  $p < 0.05$



**Fig. 21 Frecuencia de letales recesivos ligados al sexo inducidos por inyección de  $\text{Na}_2\text{SAsO}_4$  a ♂ Canton-S.**

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



letales inducido a 100 ppm. fue altamente significativo ( $P < 0.01$ ), en comparación con el lote testigo (Tabla XIX y Fig. 22).

Con la prueba de no disyunción y pérdida de cromosomas sexuales, el arsenito y el arsenato de sodio no mostraron ser genotóxicos.

La tabla XX muestra los resultados obtenidos con el arsenito de sodio. En todas las camadas las frecuencias para pérdida parcial de los marcadores del cromosoma Y, y las de aneuploidias, no fueron diferentes de las testigo.

Para el arsenato de sodio, los resultados fueron similares, en ninguno de los casos las frecuencias de eventos excepcionales difirieron de las del lote testigo (Tabla XXI) ( $P > 0.05$ ).

Los resultados obtenidos con las dos sales en las pruebas de mutación somática se presentan en las tablas XXII a la XXVI y en las figuras 23 a la 29.

La tabla XXII, presenta las manchas mosaico obtenidas después de tratar larvas transheterocigas con arsenito y arsenato de sodio. El arsenito de sodio fue negativo para todos los tipos de manchas a 50 y 100 ppm., pero a 150 ppm. dió resultados positivos para manchas chicas, e indeterminados para totales. No se encontraron manchas gemelas en ninguna de las concentraciones probadas (Fig. 23). El número de divisiones celulares fue similar al del testigo, sin embargo, se observó una relación inversa con éste, conforme se incrementó la concentración.

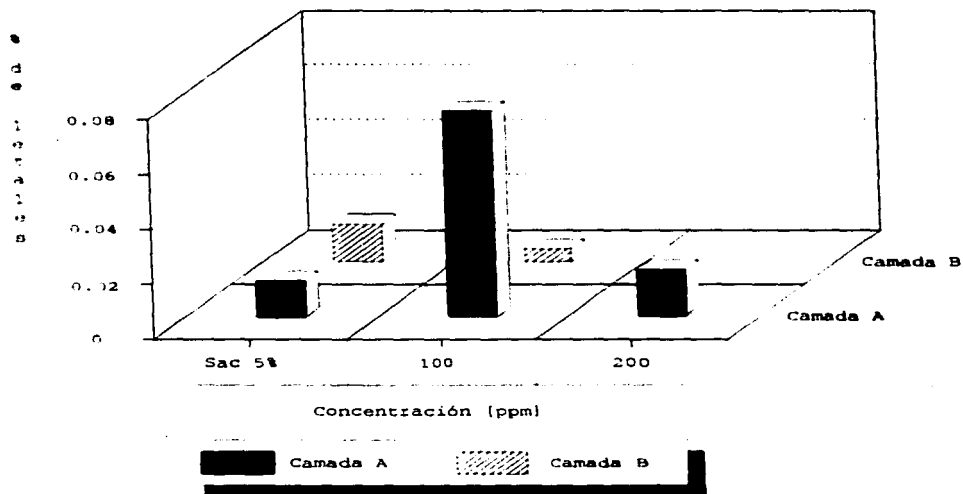
En relación con el arsenato de sodio, la respuesta fue negativa para todo tipo de manchas a 100 ppm., sin embargo, a 250 y 500 ppm. se observaron incrementos en las frecuencias de manchas simples chicas con respecto al testigo (0.21), aunque estadísticamente estos fueron indeterminados (0.33 y 0.30, respectivamente). El número de divisiones celulares promedio, si bien fue menor en todos los casos que el del lote testigo, no mostró relación con respecto a las concentraciones probadas (Fig. 24).

Al utilizar las cepas con actividad metabólica incrementada, la respuesta que se encontró, para el arsenito de sodio, fue negativa a 50 y 150 ppm. e indeterminada para manchas simples chicas a 100 ppm. (Tabla XXIII y Fig. 25). El número de divisiones celulares promedio fue igual al testigo (1.73) en 50 y 100 ppm.

**Tabla XIX. Resultados obtenidos en la SLRLT después de alimentar larvas Canton-S de  $48 \pm 4$  hrs. de edad con  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ .**

Camada	(ppm)	dó trat.	?? F <sub>1</sub>	?? fert	Letales	Frec. (%)
A (0.02)	Sac. 5%	147	1890	1543	2	0.13
	100	163	1945	1599	12	0.75**
	200	162	2151	1727	3	0.17
B (3-5)	Sac. 5%	133	1837	1480	2	0.14
	100	127	2299	1980	1	0.05
	200	149	2080	1801		
C (6-7)	Sac. 5%	129	1397	1124		
	100	121	1398	1285		
	200	134	1535	1218		

Análisis estadístico con las tablas de Kastenbaum-Souren (1970); \*\* =  $P < 0.01$



**Fig. 22 Frecuencia de letales recesivos ligados al sexo obtenida por alimentación de larvas Canton-S con  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ .**

**Tabla XX.** Resultados obtenidos en la SCLT después de inyectar  $\sigma\sigma$  y /  $B^S$  Y  $y^+$  con  $NaAsO_2$ ,  $99 y^2 w^a / y^2 w^a$ .

Camada	[ppm]	??	óó	Total	CL %	PL %	99 XXY
A (0-2)	Sac. 5%	2733	2154	4,887	0.06		
	50	2636	2084	4,720	0.12		0.02
	100	2409	2087	4,496	0.06		0.04
	150	2826	2356	5,182	0.05		0.04
B (3-5)	Sac. 5%	2287	2869	5,156	0.02		0.03
	50	2267	1992	4,259	0.05		0.02
	100	2462	2132	4,594	0.06		
	150	2533	2266	4,799	0.02		
C (6-7)	Sac. 5%	2981	2646	5,627	0.03		0.03
	50	2604	2292	4,896	0.02		0.06
	100	2450	2138	4,588	0.08	0.04	
	150	2651	2399	5,050	0.04		0.02

Análisis estadístico, tablas de Kastenbaum-Bowman (1970); P = 0.05; CL, pérdida total y PL, pérdida parcial de cromosomas.

**Tabla XXI.** Resultados obtenidos en la SCLT después de inyectar  $\sigma\sigma$  y /  $B^S$  Y  $y^+$  con  $Na_2HASO_4$ ,  $99 y^2 w^a / y^2 w^a$ .

Camada	[ppm]	??	óó	Total	CL %	PL %	99 XXY
A (0-2)	Sac. 5%	1675	1393	3,068	0.13		0.03
	100	1573	1390	2,963		0.07	0.03
	250	1688	1359	3,047	0.07		
	500	1444	1262	2,706	0.04		0.04
B (3-5)	Sac. 5%	1446	1254	2,700	0.04		
	100	1238	925	2,163	0.14		
	250	1280	1093	2,373	0.04		0.04
	500	1100	1129	2,229		0.04	0.09
C (6-7)	Sac. 5%	1707	1438	3,145	0.06	0.03	0.03
	100	1421	1167	2,588	0.04		0.08
	250	1552	1252	2,804			
	500	1248	1132	2,380	0.04		0.04

Análisis estadístico con las tablas de Kastenbaum-Bowman (1970); P = 0.05

(1.75 y 1.73, respectivamente) y fue menor en 150 ppm. (1.61).

Para el arsenato de sodio, la respuesta fue negativa para todo

**Tabla XXII.** Manchas mosaico inducidas por arsenito y arsenato de sodio en larvas transheterocigas *mwh + / + flr<sup>3</sup>*. Exposición: 72 X 6 hrs.

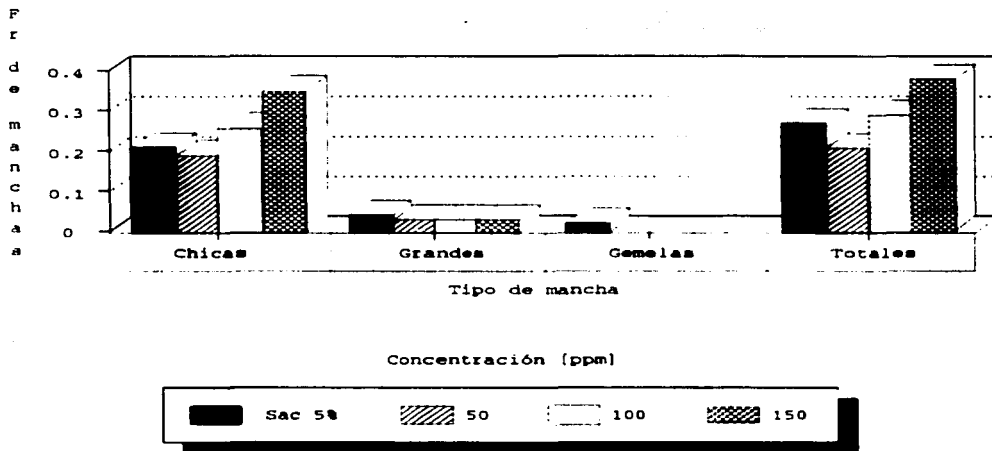
Compuesto [ppm]	Núm. de alas	Manchas				Div. celu- lares Prom.	Freq. 10 <sup>-5</sup>
		Simplex chicas m=2	Simplex Grandes m=5	Gemelas m=5	Totales m=2		
Sac. 5%	294	62 (0.21)	13 (0.04)	5 (0.02)	80 (0.27)	1.88	1.1
<b>NaAsO<sub>2</sub></b>							
50	80	15 (0.19)	2 (0.03)		17 (0.21)	1.65	0.9
100	80	21 (0.26)	2 (0.03)		23 (0.29)	1.45	1.1
150	77	27 (0.35)*	2 (0.03)		29 (0.38) <sup>1</sup>	1.29	1.5
<b>Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub></b>							
100	37	10 (0.27)			10 (0.27)	1.50	1.1
250	80	26 (0.33) <sup>i</sup>			26 (0.33)	1.12	1.3
500	79	24 (0.30) <sup>i</sup>		1 (0.01)	25 (0.32)	1.48	1.3

Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado): +, positivo; (+), débil positivo; i, indeterminado; P = 0.05.

tipo de manchas, en todas las concentraciones probadas (100, 250 y 500 ppm.); en las concentraciones menor y mayor, los valores obtenidos para manchas simples chicas y grandes y para manchas totales fueron inclusive menores que los del testigo. Los resultados se muestran en la tabla XXIII y en la figura 26. En contraste, los valores de divisiones celulares promedio en 100 y 500 ppm (1.69 y 1.72) fueron similares al testigo (1.73) y en 250 ppm. fue mayor (2.12).

Los resultados para ambas sales en la prueba de mutación y recombinación somáticas en células de los ojos de moscas estándar, se muestran separados por sexo, la tabla XXIV corresponde a hembras y la XXV a machos.

En todas las concentraciones probadas, el arsenito de sodio



**Fig. 23** Frecuencia de manchas mosaico inducidas por NaAsO<sub>2</sub> en larvas *mwh + / + flr*<sup>3</sup>. Exposición 72 X 6 horas.

resultó positivo ( $P < 0.05$ ) en hembras; indujo incrementos en la frecuencia de manchas totales inducidas en las tres concentraciones, aunque en la más alta, ésta disminuyó ligeramente (16.7, 24.5 y 21.1 %). Las manchas chicas (1 a 4 omatidias afectadas) fueron incrementadas en mayor medida que las grandes (> 4 omatidias), aunque las segundas también fueron más frecuentes que las testigo (Tabla XXIV y Fig. 27a). En relación con la distribución de las manchas por tamaño, se encontró que solamente en la concentración más alta, ésta fue similar a la testigo; mientras que en 50 y 100 ppm. disminuyó ligeramente el porcentaje de manchas chicas y se incrementó el de grandes. El número de clones estimado por cada  $10^4$  células fue mayor al testigo en todas las concentraciones y el tamaño promedio de clon no fue modificado.

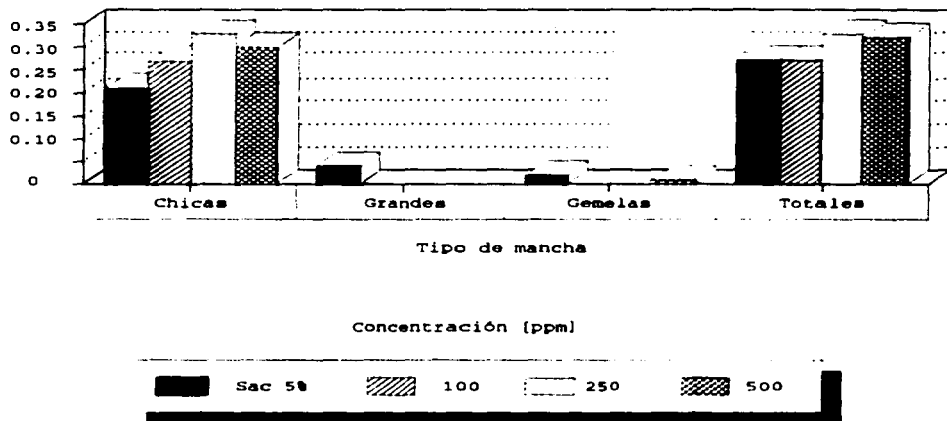


Fig. 24 Frecuencia de manchas mosaico inducidas por  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$  en larvas *mvh + / + flr*<sup>3</sup>. Exposición 72 X 6 horas.

En los machos (Tabla XXV), ante la exposición a la misma sal, la frecuencia inducida mayor de manchas totales se encontró en la concentración más baja (22.9 %), que equivale a tres veces la del lote testigo (8 %); para la siguiente concentración se obtuvo una respuesta menor (13.5 %), pero también positiva y en 150 ppm. se incrementa nuevamente hasta 19.5 % ( $P < 0.05$ ). La frecuencia de manchas chicas siguió la misma tendencia, pero en las grandes, solamente en 50 ppm. se obtuvo una frecuencia del doble de la testigo (Fig. 27b). El mismo comportamiento se observa en la frecuencia estimada de clones por cada  $10^4$  células, sin embargo, con respecto al tamaño promedio de clon, en las primeras dos concentraciones (50 y 100 ppm.), éste fue mayor que el del testigo (4.5, 4.1 y 3.7, respectivamente); mientras que en 150 ppm., el

**Tabla XXIII.** Manchas mosaico inducidas por arsenito y arsenato de sodio en larvas transheterocigas OR(R), + flr<sup>3</sup> / mwh +. Exposición: 72 X 6 hrs.

Compuesto [ppm]	Núm. de alas	Manchas				Div. celu lares Prom.	Frec. 10 <sup>3</sup>
		Simples chicas m=2	Simples Grandes m=5	Gemelas m=5	Totales m=2		
Sac. 5%	80	34 (0.43)	9 (0.11)	1 (0.01)	44 (0.55)	1.73	2.3
<b>NaAsO<sub>2</sub></b>							
50	34	10 (0.29)	2 (0.06)		12 (0.35)	1.75	1.4
100	40	22 (0.55) <sup>i</sup>	3 (0.08)	1 (0.03)	26 (0.65)	1.73	2.7
150	80	36 (0.45)	5 (0.06)		41 (0.51)	1.61	2.1
<b>Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub></b>							
100	80	10 (0.12)	3 (0.04)		13 (0.16)	1.69	0.7
250	46	18 (0.39)	5 (0.11)	1 (0.02)	24 (0.52)	2.12	2.1
500	80	26 (0.32)	5 (0.06)	1 (0.01)	32 (0.40)	1.72	1.6

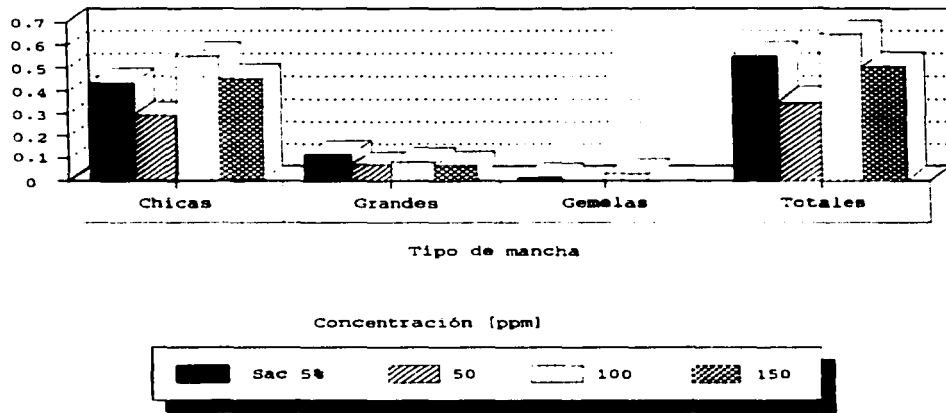
Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado): +, positivo; (+), débil positivo; i, indeterminado; P = 0.05.

promedio fue menor (3.0). En relación con la distribución del total de manchas obtenidas, en 50 ppm. hubo un porcentaje menor de manchas chicas (71.4), en 100 fue igual al testigo (79.7) y en 150 fue mayor (87.5).

El arsenato de sodio mostró en general un efecto menos potente que el arsenito, sin embargo, la respuesta en hembras y machos fue diferente.

La frecuencia de manchas totales inducidas por el arsenato en las hembras se incrementó conforme a la concentración utilizada y en todos los casos fue positiva (P < 0.05) (Tabla XXIV y Fig. 28a). La frecuencia de manchas chicas se incrementó también conforme a la concentración, mientras que la de grandes, aunque fue superior a la testigo en todas las concentraciones, no guardó dicha relación. El

F  
r  
e  
c  
u  
e  
n  
c  
i  
a

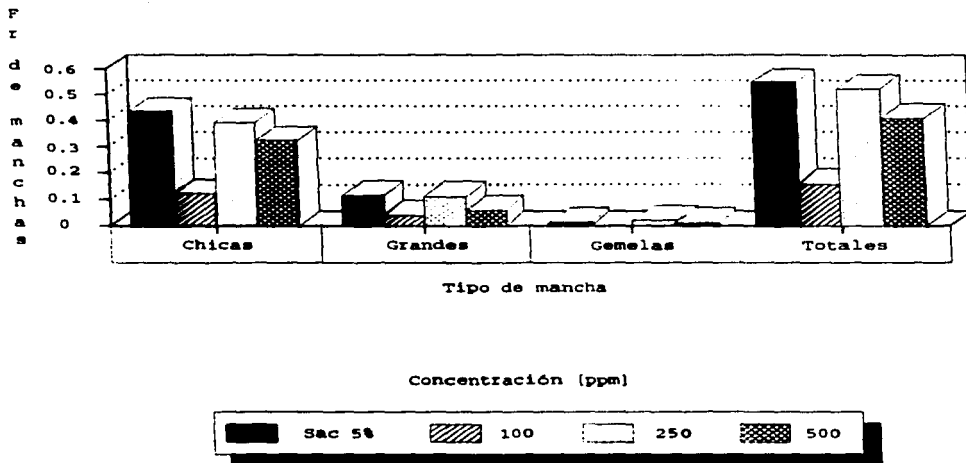


**Fig. 25** Frecuencia de manchas mosaico inducidas por  $\text{NaAsO}_2$  en larvas ORR,  $mwh + / + flr^3$ . Exposición 72 X 6 horas.

número de clones estimados por cada  $10^4$  células en el testigo (9.7), se incrementó al doble en 100 ppm. (18.8), disminuyó en 250 (17.0) y se incrementó nuevamente en 500 ppm. (28.6). Lo mismo se observó en relación con el tamaño promedio de clon, que para el lote testigo fue de 4.0, y para los lotes experimentales: 5.2, 3.8 y 5.5. En relación con la distribución por tamaño del total de las manchas encontradas, el porcentaje de manchas chicas fue menor en todos los casos que el del control: 67.6, 76.5 y 72 %, respectivamente para 100, 250 y 500 ppm., es decir, que en los lotes experimentales, el porcentaje de manchas de más de cuatro omatidias afectadas fue mayor que la del lote testigo (32.4, 23.5 y 28.0).

En comparación, los machos respondieron con una frecuencia mayor en la concentración más baja (17.5) ( $P < 0.05$ ) y en las





**Fig. 26** Frecuencia de manchas mosaico inducidas por  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$  en larvas *ORR*, *mwh* + / + *flr*<sup>3</sup>. Exposición 72 X 6 horas.

siguientes concentraciones la magnitud de ésta disminuyó gradualmente (10.8 y 8.9, para 250 y 500 ppm., respectivamente); ninguna de las últimas fue diferente estadísticamente de la frecuencia basal (Tabla XXV y Fig. 28b). La distribución del total de manchas recobradas en el lote testigo y en 100 ppm. fue similar, en 250 disminuyó el porcentaje de manchas chicas y en 500 ppm. éste se incrementó. El número de clones estimados por cada  $10^4$  células fue mayor en 100 y 250 ppm. al testigo y en 500 fue similar, pero en relación inversa con la concentración. El tamaño promedio de clon fue igual al testigo para la concentración de 100 ppm., mayor para 250 (4.1) y ligeramente menor para 500 ppm. (3.5).

En las cepas con actividad metabólica diferencial (Tabla XXVII y Fig. 29), el arsenito resultó nuevamente positivo en todas las

**Tabla XXIV. Manchas mosaico inducidas por arsenito y arsenato de sodio en hembras w<sup>+</sup> / w.**

Compuesto [ppm]	Núm. de ojos	Manchas			Distribución (%)		Tamaño prom. de clon	Clones por 10 <sup>4</sup> células
		Totales/ Fr.(%)	1-4 (%)	>4 (%)	1-4 (%)	>4 (%)		
Sec. 5%	1116	107 (9.6)	87 (7.8)	20 (1.8)	81.3	18.7	4.0	9.7
<b>NaAsO<sub>2</sub></b>								
50	384	64 (16.7) <sup>+</sup>	49 (12.8)	15 (3.9)	76.6	23.4	3.9	16.3
100	593	145 (24.5) <sup>+</sup>	113 (19.1)	32 (5.4)	77.9	22.1	3.9	23.8
150	436	92 (21.1) <sup>+</sup>	77 (17.7)	15 (3.4)	83.7	16.3	4.2	22.2
<b>Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub></b>								
100	236	34 (14.4) <sup>+</sup>	23 (9.7)	11 (4.7)	67.6	32.4	5.2	18.8
250	382	68 (17.8) <sup>+</sup>	52 (13.6)	16 (4.2)	76.5	23.5	3.8	17.0
500	481	100 (20.8) <sup>+</sup>	72 (15.0)	28 (5.8)	72.0	28.0	5.5	28.6

Análisis estadístico según Frei y Würzler (1988); +, positivo; (+), débil positivo; i, indeterminado; P= 0.05.

concentraciones aunque la magnitud de la respuesta se dió en el siguiente orden; 150 (33.2), 50 (27.6) y 100 (26.7), en relación con la frecuencia de manchas totales del lote control (18.3). Las frecuencias inducidas de manchas chicas y grandes se comportaron de la misma manera (Fig. 29a). En relación con el número de clones estimados por cada 10<sup>4</sup> células, la respuesta fue directamente proporcional y significativa (P< 0.05) con las concentraciones utilizadas. El tamaño promedio de clon, aunque tuvo algunas desviaciones fue similar al testigo. Del total de manchas recobradas, el porcentaje de manchas chicas del lote testigo correspondió a 87.2 y el de grandes 12.8. Para los lotes experimentales, el porcentaje de manchas grandes fue mayor en todos los casos: 16.7, 16.1 y 19.8 respectivamente para 100, 250 y 500 ppm.

La respuesta para el arsenato de sodio fue positiva en las dos primeras concentraciones (P < 0.05), con frecuencias de 23.0 y 23.6 % para manchas totales. En la concentración de 500 ppm. la

**Tabla XXV. Manchas mosaico inducidas por arsenito y arsenato de sodio en machos w<sup>+</sup>/Y.**

Compuesto [ppm]	Núm. de ojos	Manchas			Distribución		Tamaño prom. de clon	Clones por 10 <sup>6</sup> células
		Totales/ Fr. (%)	1-4 (%)	>4 (%)	1-4 (%)	>4 (%)		
Sec. 5%	839	67 (8.0)	53 (6.3)	14 (1.7)	79.1	20.9	3.7	7.4
<b>NaAsO<sub>2</sub></b>								
50	428	98 (22.9) <sup>+</sup>	70 (16.4)	28 (6.5)	71.4	28.6	4.5	25.8
100	511	69 (13.5) <sup>+</sup>	55 (10.8)	14 (2.7)	79.7	20.3	4.1	13.8
150	411	80 (19.5) <sup>+</sup>	70 (17.0)	10 (2.4)	87.5	12.5	3.0	14.6
<b>Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub></b>								
100	291	51 (17.5) <sup>+</sup>	40 (13.7)	11 (3.8)	78.4	21.6	3.7	16.2
250	492	53 (10.8)	40 (8.1)	13 (2.6)	75.5	24.5	4.1	11.0
500	776	69 (8.9)	57 (7.3)	12 (1.5)	82.6	17.4	3.5	7.8

Análisis estadístico según Frei y Würzler (1988); +, positivo; (+), débil positivo; i, indeterminado; P= 0.05.

**Tabla XXVI. Manchas mosaico inducidas por arsenito y arsenato de sodio en hembras Hikone-R w/w<sup>+</sup>.**

Compuesto [ppm]	Núm. de ojos	Manchas			Distribución		Tamaño prom. de clon	Clones por 10 <sup>6</sup> células
		Totales/ Fr. (%)	1-4 (%)	>4 (%)	1-4 (%)	>4 (%)		
Sec. 5%	1025	188 (18.3)	146 (16)	24 (2.3)	87.2	12.8	3.1	14.2
<b>NaAsO<sub>2</sub></b>								
50	500	138 (27.6) <sup>+</sup>	115 (23.0)	23 (4.6)	83.3	16.7	3.0	20.7
100	630	168 (26.7) <sup>+</sup>	141 (22.4)	27 (4.3)	83.9	16.1	3.3	22.0
150	638	212 (33.2) <sup>+</sup>	170 (26.6)	42 (6.6)	80.2	19.8	3.1	25.8
<b>Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub></b>								
100	612	141 (23.0) <sup>+</sup>	116 (19.0)	25 (4.1)	82.3	17.7	3.8	21.9
250	754	178 (23.6) <sup>+</sup>	144 (19.1)	34 (4.5)	80.9	19.1	3.8	22.4
500	570	110 (19.3)	96 (16.8)	14 (2.5)	87.3	12.7	2.8	13.5

Análisis estadístico según Frei y Würzler (1988); +, positivo; (+), débil positivo; i, indeterminado; P= 0.05.

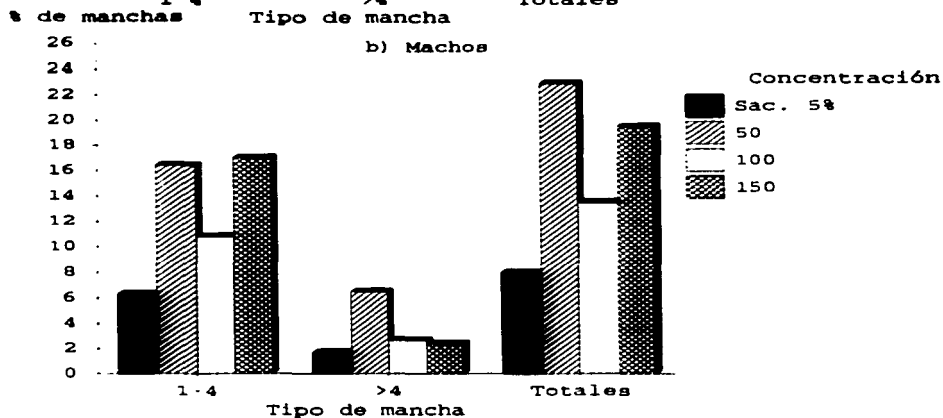
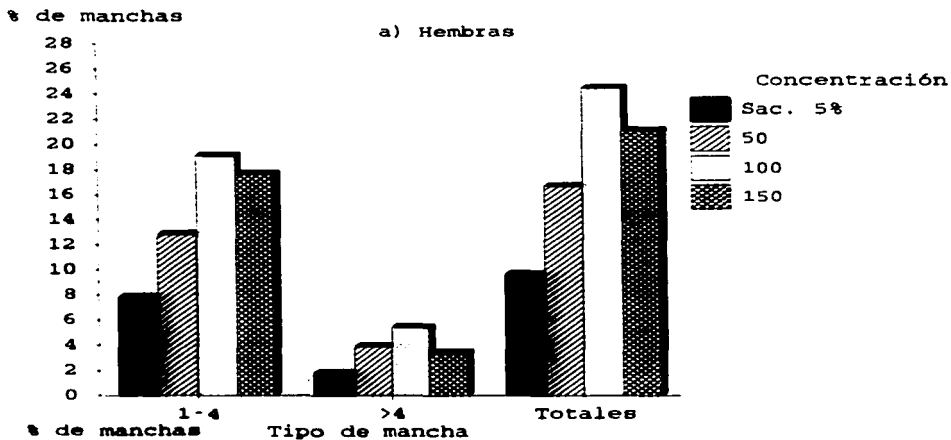


Fig. 27 Frecuencia de manchas inducidas por  $\text{NaAsO}_2$  en a) hembras  $w^+/w$  y b) machos  $w^+/Y$ . Exposición 72 X 6 horas.

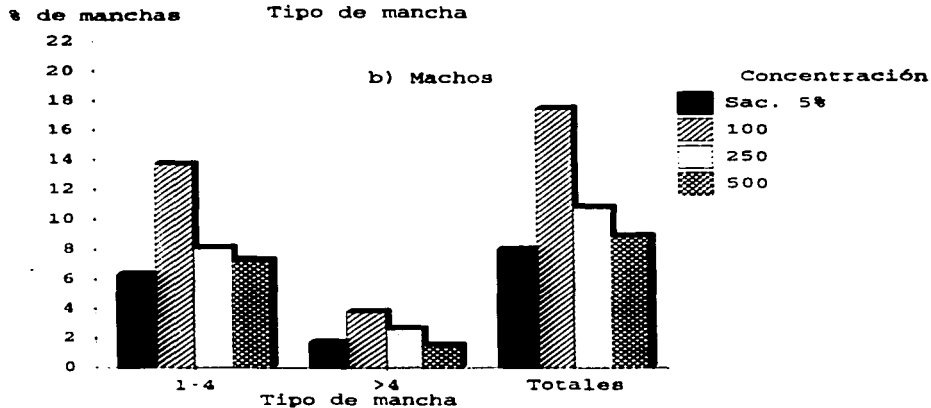
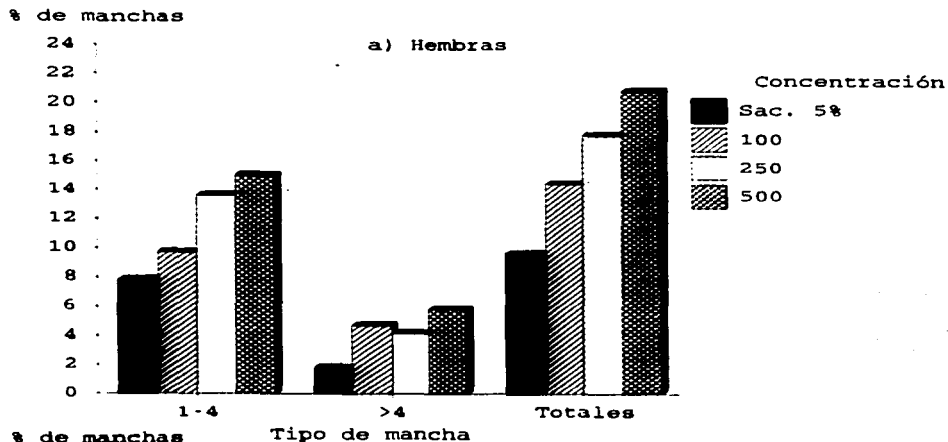
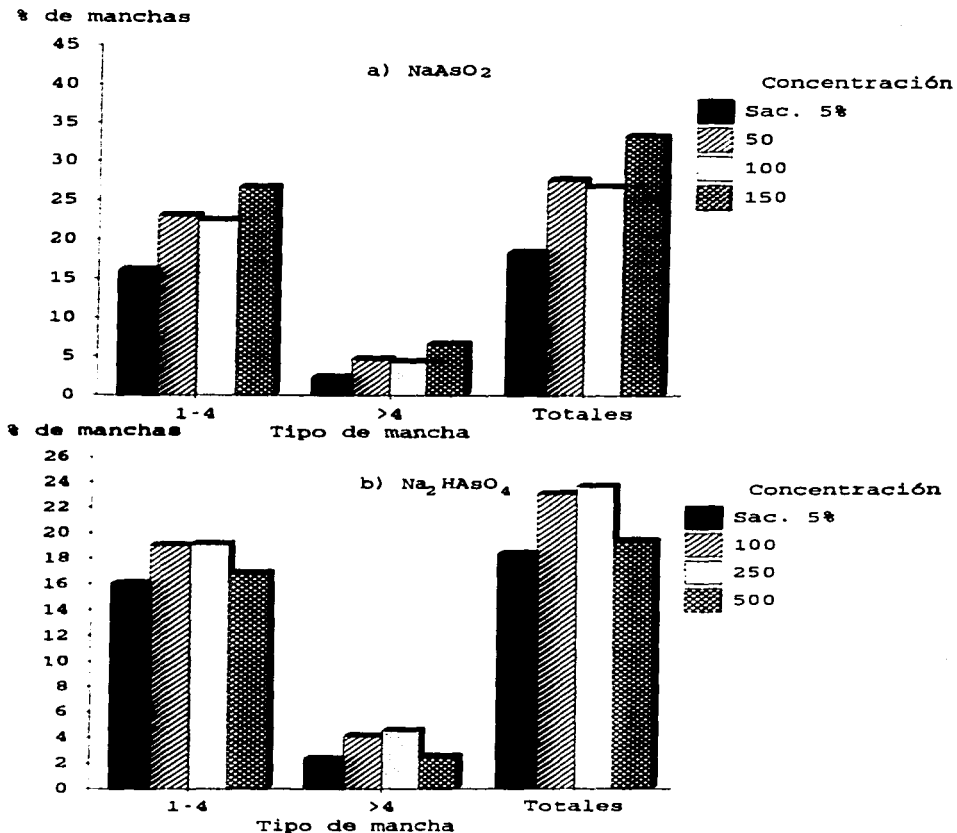


Fig. 28 Frecuencia de manchas inducidas por  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$  en a) hembras  $w^+/w$  y b) machos  $w^+/Y$ . Exposición 72 X 6 horas.



**Fig. 29** Frecuencia de manchas mosaico inducidas por a)  $\text{NaAsO}_2$  y b)  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$  en hembras Hikone-R w/w<sup>+</sup>. Exposición 72 X 6 horas.

frecuencia fue semejante a la del testigo. Las frecuencias de manchas chicas y grandes con 100 y 250 ppm. fueron mayores a las testigo; pero con 500 ppm. fueron similares al testigo (Fig. 29b). El número de clones estimados por  $10^4$  células fue mayor en las dos primeras concentraciones, con 21.9, 22.4 y menor con 500 ppm. (13.5), respectivamente para 100, 250 y 500 ppm.. El tamaño promedio de clon en las dos primeras concentraciones (3.8 en ambas) fue mayor al del testigo (3.1) y menor en 500 ppm. (2.8). Con respecto a la distribución por tamaño de manchas, el lote testigo y el de 500 ppm. guardaron la misma relación para manchas chicas (0.87) y grandes (0.13), mientras que en 100 y 250 ppm., se presentó una mayor proporción de manchas grandes, 17.7 y 19.1, respectivamente.

#### IV. DISCUSION

Los efectos que ejercen los agentes xenobióticos en los seres vivos son diversos y de complejidad variable, debido a la participación de múltiples aspectos, entre los que se encuentran, por una parte, las propiedades fisicoquímicas de los compuestos involu- crados, su solubilidad en agua y otras sustancias, la estabilidad química en el ambiente, las interacciones con otras sustancias existentes; y por otra parte, características intrínsecas de los organismos como: edad, sexo, estado de salud o enfermedad y sus antecedentes genéticos, entre otros.

Además, la duración e intensidad de la exposición, y la ruta por la que ingresa el compuesto a los organismos contribuyen a modular la naturaleza de los efectos provocados. Las vías naturales de ingreso incluyen: inhalación, ingestión y contacto a través de las superficies expuestas; en las plantas es importante además, la absorción radicular. Son también de interés en toxicología, otras rutas de ingreso consideradas artificiales: inyección intramuscular, subcutánea, intraperitoneal e intravenosa.

De acuerdo con la ruta de ingreso el xenobiótico debe atravesar una serie de barreras que -en combinación con las

propiedades particulares del compuesto- restringen o facilitan su entrada. El análisis de las modificaciones que ocurren, en relación con la vía de ingreso, ha permitido distinguir entre dos tipos de compuestos: aquellos que provocan el mismo efecto, independientemente de la ruta de entrada o directos; en comparación con los que provocan efectos mayores cuando son biotransformados por el organismo, o indirectos. La N-nitroso-dimetil-amina (DMN) es un ejemplo de los segundos. Cuando se administra por alimentación, el orden de la respuesta es muchas veces mayor que la que se obtiene si una dosis equivalente es inyectada en *Drosophila*. En contraste, se ha observado que el metil-metano-sulfonato (MMN), provoca el mismo orden de respuesta en tratamientos por alimentación, o por inyección (Vogel y Natarajan, 1979).

El efecto del metabolismo disminuye en relación con la ruta de ingreso, de acuerdo con la siguiente relación: alimentación > intramuscular > intradérmica > intraperitoneal > intravenosa.

Para la determinación de los efectos genotóxicos del arsenito ( $\text{NaAsO}_2$ ) y el arsenato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HASO}_4$ ) en las células germinales de *Drosophila melanogaster*, se seleccionaron dos metodologías que miden distintos eventos genéticos terminales, la prueba de letales recesivos ligados al sexo (SLRLT) y la prueba de no disyunción y pérdida de cromosomas sexuales (SCLT). La primera detecta un amplio rango de alteraciones que abarcan desde mutaciones puntuales, hasta grandes rearrreglos que deriven en una condición letal recesiva. La segunda, detecta aquellas alteraciones que conducen a fallas en la segregación regular de los cromosomas, ya sea por alteración de la constitución de éstos, o por mal funcionamiento de la maquinaria de división; además de la pérdida parcial de cromosomas - por la constitución del cromosoma Y que- sin llegar a ser letal, hacen evidente la capacidad de los agentes sujetos a prueba para romper a los cromosomas (agentes clastogénicos).

En forma paralela se compararon dos rutas de administración de las sales: inyección y alimentación. El tratamiento por inyección implica la administración del compuesto en una sola exposición y en concentraciones relativamente elevadas (50, 100 y 150 ppm. para



arsenito; y 100, 250 y 500 ppm. para arsenato de sodio).

El conocimiento que se tiene de la biología de *Drosophila melanogaster*, ha permitido analizar células germinales en distintas etapas de maduración (Chandley y Bateman, 1962) y que, por lo tanto, tienen la posibilidad de responder en diferente forma ante la misma exposición. Experimentalmente se ha mostrado que algunos agentes químicos manifiestan especificidad de acción en determinadas estirpes celulares (Abrahmson et al. 1983). En el sistema de camadas se realizan transvases sucesivos en los cuales se recobran todas las células germinales posmeióticas, presentes al momento del tratamiento en un lapso de tiempo de una semana aproximadamente. En el esquema utilizado, la primer camada (A), esta constituida básicamente de espermatozoides maduros (primeros 2 días a partir del tratamiento); la segunda (B), contiene un residuo de espermatozoides, predominan las espermátidas tardías y contiene en menor proporción espermátidas tempranas; en la tercera camada (C), la población más numerosa es de espermátidas tempranas y una fracción menor de espermatoцитos tempranos.

La tabla XVI y figura 19, muestran los resultados obtenidos en la prueba de letales después de inyectar machos Canton-S con 50 y 100 ppm. de arsenito de sodio. En la camada A, la frecuencia de letales en el lote testigo (0.32%) es superada solamente por la obtenida en 100 ppm. (0.67), aunque la diferencia no resultó significativa ( $P > 0.05$ ). En B, la misma concentración induce una frecuencia casi diez veces mayor a la testigo ( $P < 0.01$ ); en 50 ppm. se incrementa en un factor de 4 la frecuencia de mutaciones letales, sin ser significativa. En la última camada, solamente se obtuvo respuesta en 100 ppm., que finalmente resultó negativa. Los machos tratados con 150 ppm. no produjeron descendencia.

El tratamiento por inyección implica una exposición aguda en el que se reduce la participación del metabolismo al eliminar las barreras que debe atravesar el compuesto para llegar al blanco. La respuesta discreta en la camada A y, evidente en B, podría indicar la posibilidad de que el arsenito haya sido biotransformado. Entre las estirpes celulares involucradas, se considera que las esper-

mátidas conservan aún la capacidad para metabolizar a los compuestos, ya que es hasta el proceso de la espermiogénesis, cuando se elimina el retículo endoplásmico restante. Sin embargo, la respuesta menor en la camada C podría deberse también a: muerte de una fracción de las células afectadas; que la forma reactiva del arsénico tenga una vida media corta; o bien, a que el metabolito haya sido conjugado a un derivado no reactivo. La falta de progenie que se presentó con 150 ppm. apoya a la primera opción, lo que concuerda, además, con reportes experimentales que señalan al arsenito de sodio como un probable citotóxico (Wan et al. 1982).

Dada la respuesta anterior, se decidió reducir la intensidad de la exposición, pero incrementar su duración, de manera que el compuesto fuera ingerido en cantidades mínimas, pero en forma continua. En el tratamiento por alimentación superficial, a larvas de  $48 \pm 4$  hrs., se utilizaron las mismas concentraciones, pero se adicionó solamente 1 ml de éstas en 50 ml. de medio de cultivo fresco, de modo que las concentraciones de exposición aproximadas:

Concentración en 1 ml. de solución [ppm.]	Concentración aprox. en 50 ml de medio de cultivo [ppm.]
50	1
100	2
150	3

fueron mucho mas bajas que las anteriores; la exposición directa al compuesto fue de aproximadamente 96 horas.

La tabla XVII y figura 20 sintetizan la respuesta obtenida. En las camadas A y C no se recobró respuesta; en B, las frecuencias de mutaciones letales mostraron una relación concentración-respuesta (excepto en 100 ppm), aunque no alcanzaron a ser significativas ( $P > 0.05$ ). A pesar de que el tratamiento no tuvo la potencia necesaria para definir estadísticamente los resultados, llama la atención que el pico de acción se centró nuevamente en la camada B

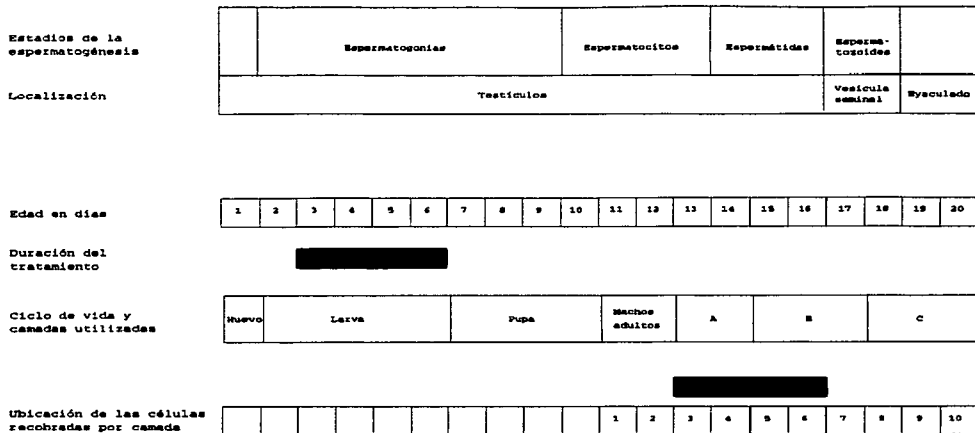
y la incipiente respuesta a concentraciones mínimas de arsenito.

La duración del tratamiento (96 horas) fue suficientemente larga para que las células germinales fueran expuestas desde estados tempranos. En los testículos de larvas recién emergidas solo se encuentran espermatogonias y, en larvas de 28 horas de edad, la población germinal esta constituida por espermatogonias y espermatocitos primarios, condición en la que permanece hasta poco antes de la pupación (Demerec, 1965); por lo que la relación entre la frecuencia de letales y la concentración que se manifiesta en la camada B, no puede interpretarse a través de la especificidad de acción del arsenito en alguna estirpe celular.

De acuerdo con la duración de cada estadio de la espermatogénesis de *Drosophila* reportada por Chandley y Bateman (1962), el esquema de camadas utilizado, y el tiempo de exposición al arsenito, es claro que en la camada A se recupera una población mixta de células, de las cuales, el 50 % no estuvo expuesta durante las 48 horas previas al tratamiento y el resto sí. Por otra parte, 2/3 partes de la población de células que constituyen la camada B, corresponden todavía a la fase de ingestión del compuesto, razón por la cual se observa un incremento en la frecuencia. La respuesta negativa en la camada C confirma la conclusión anterior, ya que el 100 % de los gametos que la constituyen, no corresponden al tiempo de incorporación del arsenito de sodio (Fig. 30).

De las dos sales analizadas en este estudio, el arsenato de sodio ha mostrado en general, menor capacidad para inducción de mutaciones, aberraciones cromosómicas, y se le asocia en menor grado con el desarrollo de eventos carcinogénicos y teratogénicos (Léonard y Lauwerys, 1980). Sin embargo, al ser probado para la inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo, la respuesta fue aparentemente mayor.

En el tratamiento por inyección, resultó positivo para 100 ppm. en la camada A (0.28) ( $P < 0.05$ ); en 200 ppm. aunque la frecuencia obtenida es 5 veces la testigo, la diferencia no fue significativa. En B, no hubo inducción de letales y, en C, ésta fue significativa solamente a 200 ppm. (Tabla XVIII y Fig. 21). Se



**Fig. 30** Ubicación de los gametos recobrados en las camadas A, B y C en la SLRLT. Exposición a larvas (48 X 96 horas).

encuentran dos picos de actividad, aunque el principal corresponde a la camada A, por lo que podría considerarse que el arsenato es un mutágeno de acción directa. La disminución en la frecuencia a 200 ppm. puede ser el resultado de la toxicidad del compuesto, ya que, al igual que en el caso del arsenito, tampoco se pudo probar la concentración mas alta por ser demasiado tóxica.

Por otra parte, la ausencia de respuesta en B y el pico de actividad encontrado en C, podría tener dos posibles explicaciones: 1) si el arsenato actúa en forma directa, es rápidamente metabolizado y el producto también es reactivo, aunque menos potente que el compuesto original y 2) existe especificidad de acción para las espermátidas y/o espermatocitos que se recuperan en la camada C.

Para el arsenato de sodio también se realizó la prueba de

letales por alimentación de larvas. Las concentraciones utilizadas después de agregar 1 ml. de solución al medio de cultivo fresco se indican a continuación:

Concentración en 1 ml. de solución [ppm.]	Concentración aprox. en 50 ml de medio de cultivo [ppm.]
100	2
200	4

Los datos obtenidos mediante este tratamiento (Tabla XIX y Fig. 22) apoyan a la primera explicación, en el sentido de que el arsenato actúa de forma directa, ya que la respuesta fue altamente significativa ( $P < 0.01$ ) en la camada A, a 100 ppm. (0.75); es probable, que el ligero incremento en la frecuencia a 200 ppm. se deba a la muerte de las células afectadas, en virtud de que la población celular que se recupera en la camada B, corresponde aún al período activo de exposición (Fig. 30).

En el tratamiento a larvas, las células germinales que se encuentran son principalmente gonias y espermatoцитos y existe la posibilidad de amplificación mitótica de los eventos de mutación, por lo que debe estimarse la probabilidad de que letales múltiples en camadas sucesivas tengan un origen común (Gocke et al. 1982). Es importante aclarar, que en todas las series de SLRL, los eventos presentados en las tablas, fueron de origen independiente.

La prueba de no disyunción y pérdida de cromosomas sexuales (SCLT), ha sido utilizada en mutagénesis con la finalidad de determinar la capacidad de compuestos con riesgo potencial, para inducir rompimientos de cromosomas y detectar alteraciones en la segregación normal de éstos. Es una metodología alternativa que contribuye a conocer el posible mecanismo de acción de sustancias de interés. Entre las ventajas que presenta está su duración, la cual abarca una sola generación ( $F_1$ ), en la que se registran los

eventos inducidos sin recurrir a 1 o 2 generaciones más como en el caso de la prueba de letales.

Entre las versiones que se han desarrollado, destaca el uso de distintos tipos de cromosomas con marcadores fenotípicos e, incluso, mutaciones que afectan los mecanismos de reparación (*mei<sup>9a</sup>*, *mei-41*, *mus 101*, *mus 104*, *mus 302*, y otras mas). Se ha comparado entre dos tipos de cromosomas X para el macho, en varilla y en anillo, y se ha mostrado que responden a eventos terminales distintos. Würgler y Graf (1982) han sugerido que los eventos que conducen a la pérdida del cromosoma X en anillo se asocian con alteraciones del tipo de intercambio de cromátidas hermanas (se forma un dicéntrico que provoca la pérdida del cromosoma); lo anterior fue apoyado por Kramers (1985) al comparar el efecto del trenimon en cepas de *Drosophila* con los dos tipos de cromosomas. La frecuencia de pérdida del cromosoma X fue diferente en los dos tipos de moscas: X en anillo > X en varilla.

El cromosoma Y compuesto ( $B^S$  Y  $y^+$ ), permite además, analizar la pérdida parcial de los genes marcadores. El alelo  $B^S$ , es un fuerte indicador de rompimiento cromosómico; el fenotipo que produce se asocia con un efecto de posición y, por consiguiente, es poco probable que revierta al tipo silvestre como resultado de un evento mutacional no relacionado con rompimientos. Por su parte, el alelo recesivo  $y^+$ , en adición a los eventos de rompimiento, puede resultar de mutaciones puntuales ( $y^+ \rightarrow y$ ) (Zimmering, 1983).

En comparación con la prueba de letales, la de SCL, es mucho menos eficiente para fines de detección de daño inducido, ya que se requieren concentraciones más elevadas, que aquellas que inducen frecuencias altamente significativas de letales, para obtener resultados positivos. Estos niveles llegan incluso a producir artefactos porque inducen la presencia de metabolitos que no se encuentran a concentraciones bajas, lo que deriva en la producción de falsos positivos (Zimmering, 1983). Estadísticamente el sistema es muy similar a la prueba de mutación somática en ojo si se prueba la pérdida parcial de cromosomas. No obstante, si se cuantifica la pérdida total más la parcial, el ensayo se hace estadísticamente

más preciso que los otros dos, debido a que la frecuencia espontánea es casi 10 veces mayor; es un método único para analizar daño cromosómico, y puede no detectar mutágenos puntuales (Zimmering, 1987)

Al inyectar arsenito de sodio a machos y  $B^S$  Y  $y^+$ , no se incrementó la frecuencia de eventos excepcionales en ninguna de las concentraciones usadas, ni se vió actividad alguna, diferente a la mostrada por el lote testigo en las camadas A-C (Tabla XX). Con el arsenato de sodio, la respuesta fue la misma (Tabla XXI).

La menor sensibilidad de la prueba que detecta rompimientos cromosómicos, en comparación con la prueba de letales, ha sido valorada desde hace varios años (Vogel y Natarajan, 1979). Sin embargo, dos aspectos son importantes en cuanto a la respuesta obtenida.

En la prueba de letales (tratamiento por inyección), las concentraciones probadas fueron menores (50 y 100 para  $NaAsO_2$ ; 100 y 200 para  $Na_2HAsO_4$ ), ya que tanto 150 ppm. en arsenito, como 250 y 500 ppm. en arsenato fueron demasiado tóxicas para los moscas tratadas ( $\sigma\sigma$ ), las cuales no sobrevivieron mas allá de tres días. Sin embargo, en la prueba de SCL, aunque el tamaño de muestra reducido obligó a realizar mas de tres series experimentales, sí fue posible dar los tratamientos con estas concentraciones en todas las camadas.

En los dos tipos de pruebas germinales se utilizan cromosomas sexuales y, por el patrón de segregación de éstos, en ambas, el cromosoma X pasa de padres a hijas, mientras que el cromosoma Y va directamente de padres a hijos -a menos que ocurra no disyunción y se presenten  $\varphi\varphi$  XXY-, por lo que la mayor sensibilidad de los machos Canton-S tratados en la prueba de letales, no es explicable a través de diferencias con respecto al tipo de cromosomas involucrados -a menos que ésta se asociara con el cromosoma Y compuesto-. De esta manera, solamente la presencia de las dos formas alélicas del gene "yellow" ( $y$ ) y el alelo  $B^S$ , constituyen la principal diferencia entre los machos.

No obstante, el planteamiento de las pruebas no ofrece mas

elementos para explicar los resultados, en relación con la participación de los marcadores mencionados.

En las hembras *Basc*, la presencia del cromosoma balanceador evita la posibilidad de recobrar progenie recombinante y mantiene al cromosoma tratado intacto hasta la siguiente generación ( $F_2$ ), en la que se cuantifica la magnitud del daño inducido. En la prueba de pérdida cromosómica, éste se valora en la primera generación inmediata al tratamiento, por lo que es probable que sea enmascarado por la presencia del cromosoma  $y^2 w^a$ , normal.

En relación con la toxicidad a la progenie, se ha determinado que las hembras proficientes en reparación, inducen la reparación de parte del daño de los gametos masculinos, durante la primera replicación, previa a la fertilización (Kammermeyer y Zimmering, 1985), sin embargo, los dos tipos de hembras utilizados son proficientes en reparación por lo que tampoco la diferencia en las hembras es adjudicable para explicar la diferente respuesta.

No obstante lo anterior, se ha reportado que aún en líneas de moscas proficientes en reparación, existen diferencias en el tipo y magnitud del daño recobrado. Sankaranarayanan y Ferro (1985) mostraron que existen diferencias entre las líneas *ebony* y *Canton-S* en relación con efectos maternos. Se trataron machos con marcadores genotípicos apropiados con diversos agentes mutagénicos, posteriormente se cruzaron con los dos tipos de hembras y se comparó la inducción de translocaciones autosómicas y pérdida de cromosomas X en anillo en espermatozoides maduros. Los resultados mostraron que en las hembras *ebony* la frecuencia de translocaciones fue mayor, mientras que la frecuencia de machos XO fue menor que con las *Canton-S*. Los autores concluyeron que el sistema de reparación de las hembras *ebony* es menos eficiente y sujeto a error que el de las hembras *Canton-S*.

Otro ejemplo de las posibles diferencias entre líneas son los estudios llevados al cabo por Phillips y Pitt (1985) para caracterizar las ARN polimerasas de *Drosophila melanogaster* durante el desarrollo temprano y que han puesto en evidencia la presencia de 6 formas identificables de éstas en el embrión (formas  $I_a$ ,  $I_b$ ,  $II_a$ ,



II<sub>b</sub>, III<sub>a</sub> y III<sub>b</sub>), de las cuales, una (la forma II<sub>a</sub>) parece estar localizada citoplásmicamente y esta presente solo en huevos no fertilizados y embriones pregastrulares; mientras que otra (forma II<sub>b</sub>), aparece sólo en la gastrulación y permanece durante el resto del desarrollo. La forma II<sub>a</sub>, no ha sido detectada en niveles significativos, en núcleos de embriones de *Drosophila*, lo que indica su posible localización extranuclear. Se ha propuesto que puede ser constituyente de las ARN polimerasas de la hembra adulta de *Drosophila*. Lo anterior ha sido propuesto también por Nishiura (1981), quien ha reportado la presencia de dos formas de ARN polimerasas en extractos de ovarios aislados de hembras adultas y de sólo una en extractos de hembras adultas ovariectomizadas. Si la presencia y actividad de las ARN polimerasas se asocia con la dote genética de las moscas usadas, podría ser una fuente de variación en la respuesta obtenida en el presente trabajo.

La siguiente etapa de este estudio, abarcó el uso de células somáticas. Entre las muchas ventajas que ofrece *Drosophila* en la valoración del daño que inducen los agentes xenobióticos, destaca recientemente el impulso en la investigación del daño no heredable que constituye un factor condicionante de la calidad de vida de los organismos, en la misma generación en la que ocurre la exposición a éstos.

En la prueba de mutación y recombinación somáticas con células de las alas de *Drosophila*, el arsenito de sodio indujo incremento en la frecuencia de manchas simples chicas, el cual solo fue ligero con 100 ppm.; y resultó significativo en la concentración más alta (150 ppm.). En la última, también produjo aumento en la frecuencia de manchas totales, sin embargo, éste no alcanzó a definirse como positivo (Tabla XXII y Fig. 23). No se detectó ningún efecto en manchas simples grandes y en gemelas.

Los resultados obtenidos en el presente estudio no coinciden con los reportados por Tripathy et al. (1990) para los mismos compuestos en la prueba SMART, pero con exposiciones a larvas de 72 horas durante 48 horas. Las concentraciones que utilizaron fueron 32.5 y 65 ppm. de arsenito de sodio y 46.5-93 ppm. para el

arsenato. Para el primer compuesto, la respuesta fue totalmente negativa para todo tipo de manchas y para el segundo, registraron un ligero incremento de manchas simples grandes y gemelas, sin embargo, el diagnóstico estadístico fue indeterminado; es probable que las diferencias entre los dos estudios se deban a que si bien, las concentraciones usadas fueron más bajas, el tipo de exposición (48 horas) podría haber potenciado el efecto tóxico de ambas sales.

El tipo de mancha: simple o gemela, es indicador de eventos terminales diferentes; mientras que la primera puede ser originada por delección, mutación puntual, no disyunción y recombinación (entre los dos marcadores genotípicos), las manchas gemelas surgen por un tipo específico de recombinación (entre el marcador proximal,  $flr^3$  y el centrómero (Fig. 17). La nula respuesta del arsenito de sodio en la inducción de este tipo de manchas, excluye aparentemente la participación de la recombinación somática en la respuesta obtenida.

El tamaño de la mancha, por su parte, da una orientación del tiempo en el que se indujo la formación del clon mutante. Clones inducidos en el desarrollo temprano producen manchas mosaico de gran tamaño y aquellos que surgen hacia el final del mismo, son de tamaño pequeño y, en general, se han asociado con la biotransformación mediante el metabolismo de la larva. En el lote testigo, el tamaño promedio de clon se encuentra alrededor de 2 divisiones celulares (1.88), por lo que es probable que la mayoría de las manchas de origen espontáneo sean reparadas a lo largo del desarrollo y únicamente se recobren aquellas que ocurren hacia el final de éste. El número promedio de divisiones celulares en los tres lotes experimentales fue menor al del testigo y guardó relación inversa con la concentración, lo que puede ser debido a muerte celular de una parte de los clones afectados.

Al expresar la frecuencia de inducción de clones sobre  $10^{-5}$  células, se observa que los valores se incrementan en relación directa con la concentración, por lo que puede concluirse que la distribución de manchas obtenidas refleja la presencia del arsenito. La fórmula para estimar la frecuencia de inducción fue

propuesta por Szabad et al. (1983); posteriormente Frei et al. (1992) la modificaron, sin embargo, dado que ambas fórmulas se basan en el tamaño de clon promedio y éste no siempre se encuentra en relación con la potencia del tratamiento (principalmente por muerte celular), en este estudio se limita su uso, para determinar si se relacionan con la frecuencia de manchas totales inducida en cada concentración, y para comparar entre las dos sales de arsénico utilizadas.

El efecto del arsenato de sodio fue menos evidente. Incrementó la frecuencia de manchas simples chicas en relación con el testigo (0.21), aunque sólo ligeramente (Tabla XXII y Fig. 24). En 100 y 250 ppm. el incremento se relaciona con la concentración, pero en 500 ppm. tiende a disminuir, probablemente por muerte celular provocada por la toxicidad del compuesto. Al igual que con el arsenito, no se encontró respuesta para manchas simples grandes y para manchas gemelas.

Con respecto al número promedio de divisiones celulares, nuevamente es menor que el espontáneo. En 250 ppm. que es la concentración con mayor frecuencia de manchas simples chicas, el número de divisiones es aún menor; esto confirma que una parte de los clones no se está recobrando por muerte de parte de las células afectadas, o -en caso de que ocurra recombinación entre los marcadores- es enmascarado por la expresión de tipo silvestre en el clon vecino resultante.

La frecuencia de inducción de clones por  $10^{-5}$  células, no manifiesta relación con la concentración, debido a que como se mencionó anteriormente, se basa en el tamaño promedio de clon y, en la concentración de 250 ppm. que es en la que se espera la frecuencia de inducción mayor, el tamaño promedio de clon es el más bajo (1.12).

Ambos compuestos en la prueba de mutación y recombinación somáticas, que utiliza las células de las alas de la mosca, sólo manifestaron actividad en relación con manchas simples chicas, por lo que además de la muerte celular, el metabolismo debe de tener participación en la respuesta. La capacidad metabólica de la larva

y el adulto de *Drosophila* ha sido analizada por varios autores (Clark, 1982; Hällström et al. 1982 y 1984; Zijlstra y Vogel, 1987a y b) y ha sido confirmada a través del estudio de promutágenos y procarcinógenos a los cuales es sensible *Drosophila* (Graf et al. 1984, Graf et al. 1992).

El siguiente paso en la caracterización de los efectos genotóxicos de las dos sales de arsénico consistió en utilizar la cruz mejorada de alta bioactivación, propuesta por Graf y Van Schaik (1992). En esta cruz se utilizan hembras en las que se incorporan los cromosomas 1 y 2 de la línea Oregon (R), resistente al DDT, seleccionada por Dapkus y Merrell (1977). Esta nueva línea, mejora la detección de promutágenos que requieren de activación metabólica dependiente del complejo enzimático P-450, ya que muestran un alto nivel constitutivo de éste.

La tabla XXIII y la figura 25 presentan la síntesis de la respuesta obtenida con arsenito de sodio. La frecuencia de manchas totales en el lote testigo fue ligeramente mayor a la citada por Graf y Van Schaik (1992) (0.55 y 0.45, respectivamente; sin embargo, es probable que la diferencia se deba al tamaño de muestra utilizado. En la concentración mas baja (50 ppm.) la frecuencia de manchas totales resultó menor a la control, posiblemente por la misma razón, ya que el número de alas registrado es bajo (34).

En la concentración intermedia, se encontró una frecuencia ligeramente superior a la del testigo (0.65), pero estadísticamente negativa. En 150 ppm. el número de manchas totales es más bajo que con 100 ppm., probablemente por efecto tóxico del arsenito. La misma tendencia se observa para estas concentraciones en relación con el número promedio de divisiones celulares, y con la frecuencia de inducción por  $10^{-5}$ .

Al analizar la distribución por tipo de mancha, se encontró la misma tendencia en las simples chicas y grandes; aunque llama la atención que en las últimas, las frecuencias obtenidas en las tres concentraciones son menores a la del testigo. Con respecto a las manchas gemelas, indicadoras de recombinación, no se obtuvo respuesta.

De lo anterior, no es claro si de alguna forma el arsenito depende del metabolismo para la inducción del daño que se recobra con la líneas estándar. En las larvas de la cruz (HB) mejorada, la desintoxicación del arsenito puede haber sido mas eficiente, aunque no deja de presentarse el efecto tóxico de esta sal, como se observa en la reducción de la respuesta en la concentración mas alta.

Los resultados para el arsenato de sodio fueron similares (Tabla XXIII y Fig. 26). Para ningún tipo de mancha y en ninguna concentración la exposición indujo diferencias significativas en relación con el lote testigo. Sin embargo, se presenta nuevamente, aunque mas evidente, el hecho de que los valores obtenidos para los tipos de manchas son, en general, mas bajos que los del lote testigo. Es probable, que la presencia del arsenato en el ambiente celular interfiera de alguna forma con la viabilidad de la células que han sufrido alguna alteración -aún de origen espontáneo-, o con los mecanismos de reparación y provoque que las lesiones, al no poder ser reparadas, tengan un efecto letal. En resumen, la cruz mejorada de alta bioactivación, no mejoró la definición de la respuesta inducida por ambas sales, lo que en términos generales es una indicación de que el metabolismo no tiene un papel primordial en el efecto genotóxico del arsénico.

El segundo tipo de pruebas de mutación y recombinación somáticas, empleado en esta tesis utiliza las células de los ojos para valorar la inducción de daño genético. Se ha propuesto que detecta esencialmente los mismos eventos terminales que la versión de las alas (Vogel y Zijlstra, 1987a y b). Recientemente, Vogel y Szakmáry (1990), reportaron que las diferencias encontradas entre las pruebas con células de las alas y células de los ojos son debidas a una mayor capacidad de la última para detectar eventos de recombinación somática inducida (recombinogénesis); esto lo comprobaron al introducir en el sistema  $w / w^+$ , un cromosoma con múltiples inversiones, que reduce la posibilidad de recuperar productos de la recombinación, ya que la frecuencias de manchas, cuando el cromosoma invertido no está presente, son mucho mayores.

Los resultados obtenidos en el sistema  $w / w^+$  para el arsenito de sodio se muestran en las tablas XXIV y XXV y en la figura 27a y b.

En hembras, la frecuencia de manchas totales fue estadísticamente significativa en todas las concentraciones probadas. Las frecuencias de manchas totales, manchas pequeñas (de 1 a 4 omatidias afectadas) y grandes ( $>$  de 4 omatidias) se incrementaron en 50 y 100 ppm. de acuerdo con la concentración, pero en 150 se redujeron ligeramente (Fig. 27a). La misma tendencia se encontró con respecto a la frecuencia estimada por  $10^4$  células. En relación con el tamaño promedio de clon, no se observó variación importante con respecto al testigo. Del total de manchas recobradas, el porcentaje de manchas mosaico de más de 4 omatidias para las primeras dos concentraciones (23.4 y 22.1%), fue mayor que el del testigo (18.7), sin embargo, en 150 ppm. que presenta una frecuencia menor de manchas, la proporción de simples grandes es menor (16.3). Este resultado es consistente con el efecto tóxico encontrado con las células de las alas.

En el caso de los machos (Fig. 27b), la mayor respuesta de manchas totales se localizó en la concentración de 50 ppm., después tendió a disminuir y en 150 ppm. se incrementó nuevamente, pero sin sobrepasar la de la concentración menor. Al comparar las frecuencias de manchas chicas se encontró la misma tendencia que para las manchas totales, sin embargo, en relación con la frecuencia de manchas grandes, las frecuencias disminuyeron en relación inversa con la concentración, lo que indica que el arsenito de sodio resulta más tóxico para los machos debido a la condición heméciga de éstos con respecto al marcador utilizado, por lo que el incremento en la frecuencia en 150 ppm. puede deberse a la condición heterocigota de éstas. La frecuencia estimada de inducción por  $10^4$  células mostró la siguiente relación:  $50 > 150 > 100$ . Al clasificar el total de manchas en chicas (1-4 omatidias) y grandes ( $>$  4), se observa como fue el caso con las hembras, que en la mayor frecuencia inducida (en este caso, con 50 ppm.), se tiene una mayor proporción de manchas grandes (28.6 vs 20.9); en 100 ppm.

se conserva la misma relación que en el testigo. En 150 ppm. las manchas mosaico de tamaño grande fueron menos abundantes que en el testigo (12.5%).

Los resultados obtenidos con el arsenito de sodio hacen evidente que en efecto, la prueba que utiliza a células de los ojos de *Drosophila* resulta más sensible que la de las alas. La misma respuesta se ha obtenido en otras series experimentales realizadas en el laboratorio de Genética (Ordaz, 1991). Sin embargo, no son concordantes con los de Vogel y Szakmány, ya que si el principal evento terminal que detecta esta prueba es la recombinación, al recobrar mas respuestas significativas que en la prueba de las alas, se esperaría que la respuesta de las hembras fuera mayor a la de los machos. Si se comparan las respuestas más importantes obtenidas por sexo, es evidente que en los machos, la sensibilidad fue aún mayor. Para 100 ppm. la frecuencia de manchas mosaico en hembras es 2.6 veces la testigo, mientras que en machos, con 50 ppm. se obtuvo un incremento de 2.9 veces.

La condición heméciga del macho, con respecto al cromosoma X, no permite recobrar eventos de recombinación entre cromosomas. Por lo que debe excluirse a este tipo de recombinación como el responsable de la respuesta encontrada. Por supuesto, no puede decirse lo mismo de la recombinación intragénica, aunque ésta no puede valorarse directamente con esta prueba.

Por su parte, el arsenato de sodio resultó positivo para la inducción de manchas mosaico en todas las concentraciones, al utilizar hembras heterócigas (Fig. 28a). La respuesta se incrementó de acuerdo con la concentración para manchas totales y chicas en 100 y 500 ppm.; el tamaño promedio de clon y la frecuencia estimada de inducción de clones por  $10^4$  células, se incrementaron en relación con la concentración, excepto en 250 ppm. en la que el tamaño promedio de clon fue menor al testigo y la frecuencia estimada por  $10^4$  células fue menor que la de 100 ppm. (3.8 y 17.0). La distribución del total de manchas por tamaño mostró una mayor proporción de clones grandes en 100 ppm. (1.7 veces la testigo), en la siguiente concentración ésta se redujo, aunque siguió siendo

mayor; para volver a incrementarse en 500 ppm. El salto en la respuesta podría ser el efecto de la toxicidad que provoca muerte de parte de las células afectadas, por lo que los valores encontrados pueden ser una subestimación del número real de células dañadas.

Lo anterior fue confirmado al comparar los resultados con los obtenidos para machos.

La frecuencia de inducción de manchas totales solamente fue significativa ( $P < 0.05$ ) para la concentración más baja (100 ppm.), y disminuyó inversamente con la concentración, para los otros dos lotes experimentales, tanto para manchas totales, como para chicas y grandes. La frecuencia de inducción por  $10^4$  células se comportó de igual forma, no así, el tamaño promedio de clon, que fue igual al control en las concentraciones extremas, y resultó ligeramente mayor en la intermedia (250 ppm.). La distribución de las manchas totales obtenidas por tamaño no se alteró en 100 ppm., pero en 250 ppm. el porcentaje de manchas grandes fue un poco mayor (24.5), y en 500 ppm., ésta cae por debajo del testigo (17.4).

Los datos obtenidos indican que después de 100 ppm. el arsenato de sodio resulta demasiado tóxico y probablemente induce muerte celular. La diferencia en la frecuencia inducida en hembras y machos, puede deberse a que en las hembras existe mayor probabilidad de sobrevivencia de las células afectadas por la presencia de los dos cromosomas X -principalmente si el efecto se asocia con eventos de mutación-, por otro lado, abre la posibilidad de que en el caso de las primeras, la recombinación tenga una función importante para soportar parte del daño inducido. O bien, que la forma de acción del arsenato tenga mas de una alternativa.

La última etapa de este estudio consistió en probar ambas sales utilizando una línea de moscas resistentes a insecticidas, entre éstos, al DDT: ♀♀ Hikone-R w / w X ♂♂ w<sup>+</sup> / Y. Los resultados obtenidos se sintetizan en la tabla XXVI y la figura 29 para los dos compuestos de arsénico.

De acuerdo con el análisis estadístico propuesto por Frei y Würgler (1988), el arsenito de sodio resultó positivo en todas las



concentraciones probadas, mientras que el arsenato sólo lo fue en las dos concentraciones menores ( $P < 0.05$ ).

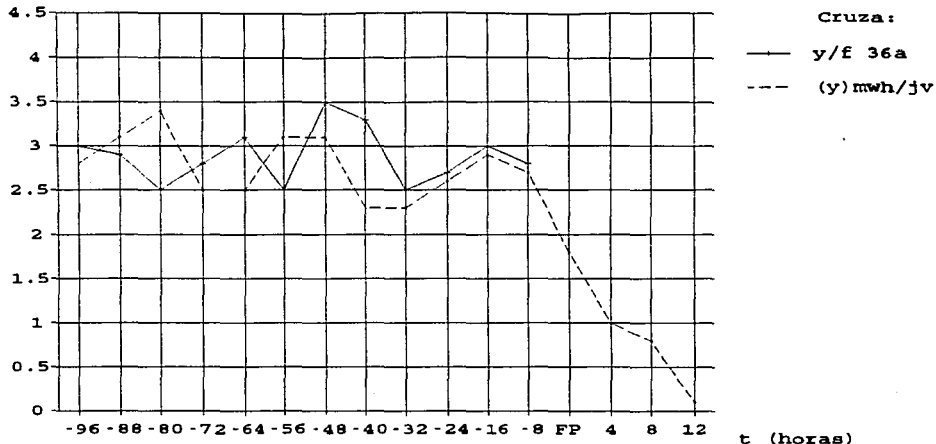
En el caso del primero, el efecto provocado por 50 y 100 ppm. fue el mismo y se incrementó en 150 ppm. El tamaño promedio de clon no se vió modificado. La frecuencia de inducción por  $10^4$  se incrementó de acuerdo con la concentración, al igual que la proporción de manchas grandes, que en los tres casos fue mayor a la testigo.

El arsenato de sodio provocó en apariencia la misma respuesta con 100 y 250 ppm., para la frecuencia de manchas mosaico, el tamaño promedio de clon y la proporción de manchas mosaico  $> 4$  omatidias, pero la frecuencia de inducción por  $10^4$  células fue mayor para 250 ppm. (Tabla XXVI). Con 500 ppm. el tamaño promedio de clon y la frecuencia de inducción por  $10^4$  células fueron menores incluso, que los testigo. Este resultado es totalmente concordante con los obtenidos con las otras pruebas, por lo que apoya la conclusión de que la disminución en la respuesta debe adjudicarse a la muerte celular provocada por la presencia del arsenato de sodio.

Los resultados obtenidos hacen evidente que independientemente de la participación del metabolismo diferencial, la prueba que utiliza células de los discos imagales que darán origen a los ojos de las moscas es, de manera general, más sensible ante la exposición a las dos sales de arsénico. Por lo que es importante determinar las posibles razones de esta respuesta.

Los estudios de García-Bellido y Merriam (1971a y b) sobre los parámetros clonales que determinan el desarrollo de los terguitos de la mosca, mostraron que la recombinación somática inducida en marcadores localizados en el cromosoma X es mayor, que cuando éstos se ubican en el brazo izquierdo del cromosoma 3. Compararon la frecuencia y tamaño de manchas y ("yellow") inducidas por rayos X (1500r) en larvas de *Drosophila* con diferentes estados del desarrollo y constitución genética: 1)  $y / f^{36a}$  y 2)  $Df(1)sc^{\theta}$ ,  $y^- / y$ ;  $Dp(1:3)sc^{74}$ ,  $y^+jv / mwh$ . El tamaño de los clones inducidos durante el periodo larvario permanece esencialmente constante. Los clones

No. de cetas (y)/clon



**Fig. 31** Número de cetras amarillas (y) por clon en función de la edad al tiempo de la irradiación y en relación con la formación del pupario (García-Bellido y Merriam 1971b).

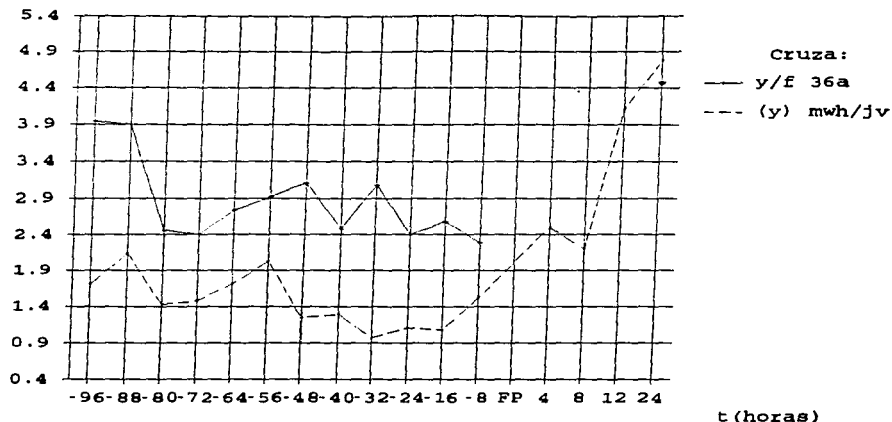
productos de la recombinación en el primer y tercer cromosoma son similares en tamaño, como se observa en la figura 31.

El otro parámetro fue la frecuencia de clones y inducida en diferentes estadios del desarrollo. El cromosoma X parece presentar 6 veces más eventos de recombinación somática que los ocurridos en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (Fig. 32).

Así, la diferencia en los valores recobrados por estos autores son explicados parcialmente por la naturaleza distintiva de los cromosomas involucrados, probablemente la proporción de heterocromatina sea de importancia en la frecuencia de los eventos detectados.

Por otra parte, cabe la posibilidad de que la variación se

clones (y) / abdomen



**Fig. 32** Frecuencia de clones recombinantes amarillos (y) inducidos por rayos X en diferentes estados del desarrollo (García-Bellido y Merriam 1971b).

asocie además con los procesos de determinación y diferenciación de las células que constituyen los dos tipos de órganos del adulto. El ala de las moscas está constituida por monocapas celulares (dorsal y ventral), en las que durante la diferenciación, cada célula genera un tricoma o pelo sobre la superficie del ala (Petersen et al. 1985).

El ojo de *Drosophila* consiste de un arreglo hexagonal de aproximadamente 800 omatidias. Cada omatidia esta compuesta de 8 células receptoras y 12 células accesorias. En relación con su morfología, patrón de proyección del axon y sensibilidad, las células fotorreceptoras pueden clasificarse en tres clases funcionales (R1-R6, R7 y R8). El arreglo de los tipos celulares en la omatidia

es generado durante el último estadio larvario y el estado de pupa (Basler y Hafen, 1991). La cantidad y diversidad de genes que participan en los diferentes pasos de la formación de un ojo compuesto de *Drosophila*, ponen de manifiesto la complejidad del ala y los ojos. La tabla XXVII, presenta algunos de los genes que participan en la formación de un ojo de la mosca.

Es interesante analizar la participación de los genes del tipo de *rough (ro)*, ya que al funcionar como receptores de tirosina quinasa podrían ser indicadores de sitios de acción específicos para algunos compuestos. Aunque no existe relación aparente entre este gene y los resultados obtenidos, es importante mencionar que tanto en las series experimentales con arsenito y arsenato de sodio, y en las líneas estándar y la Hikone, se observaron alteraciones en la formación regular de las omatidias, confiriendo a los ojos un aspecto rugoso y carcomido, el cual fue interpretado como debido a la toxicidad del arsénico, sin embargo, sería importante realizar otro tipo de estudios que analizaran la relación entre las sales de arsénico y genes responsables de la función de receptores específicos.

Un ejemplo de este tipo de asociación ha sido reportado por Sentry et al. (1993), quienes utilizaron a *Drosophila* como modelo experimental para estudiar la destrucción celular condicional, un proceso natural durante la metamorfosis de la larva. Entre los productos utilizados para estudiar los genes que participan en la destrucción condicionada se encuentra un polipéptido tóxico, la toxina de la difteria producida por *Corynebacterium diphtheriae*. Mediante estudios previos caracterizaron que las células fotoreceptoras del ojo compuesto de *Drosophila*, y de manera específica, el gene *ninaE*, sirve de blanco localizado para esta toxina. *NinaE* se expresa abundantemente en un subconjunto de las células fotoreceptoras (R1-R6) que forman parte de cada omatidia del ojo compuesto de la mosca. Mediante técnicas de biología molecular se introdujo una secuencia para la toxina en relación con el promotor de *ninaE* y se siguió el desarrollo de estas moscas modificadas. Los resultados mostraron que los ojos de los adultos recobrados

**Tabla XXVII.** Algunos de los genes requeridos en el desarrollo de los ojos de *Drosophila melanogaster* (Basler y Hafen, 1991).

Tipo celular	Gene	Fenotipo mutante	Producto génico
Todos los tipos celulares	<i>Noch</i> ( <i>N</i> )	La falla en la función <i>Noch</i> en el surco morfo-genético provoca que demasiadas células entren a una ruta neural; también afecta todos los pasos posteriores del ensamblaje de las omatidias	Proteína unida a la membrana con repeticiones EGF (ganancia de función tipo <i>Ellipse</i> )
Todos los tipos celulares	genes neuro-génicos: <i>neu</i> , <i>mam</i> , <i>DI</i> , <i>E(spl)</i>	Clones celulares mutantes en el ojo que causan alteración en el arreglo de las omatidias; éstas frecuentemente contienen células fotoreceptoras en exceso	No conocido
R8	<i>Ellipse</i> ( <i>Elp</i> )	Muy pocos grupos de omatidias inician el desarrollo	Mutación dominante en el gene de los receptores de <i>Drosophila</i> EGF (DER)
R8	patrón aberrante en la retina ( <i>rap</i> )	El inicio del desarrollo de las omatidias en el surco es irregular	No conocido
R8	<i>scabrous</i> ( <i>sca</i> )	El inicio del desarrollo de las omatidias en el surco es irregular	Proteína putativa con homología al fibrinógeno; se expresa primariamente en R8
R1-6	<i>rough</i> ( <i>ro</i> )	Afecta la identidad de R2/R5; el ensamblaje correcto es detenido en el estado de 3 células	Proteína homeodominante expresada en R2, R3, R4 y R5
R1-6	<i>seven-up</i> ( <i>svp</i> )	Letal en embriones, en clones celulares mutantes, R3/4 y R1/6 se desarrollan como células R7	Proteína nuclear con homología a receptores esteroides, expresada en R3/4 y R1/6
R7	<i>bridge-of-sevenless</i> ( <i>boss</i> )	Ausencia de células R7, no autónomo, requerido exclusivamente en R8	Proteína de membrana con 7 dominios transmembranales putativos

presentaban anomalías a nivel estructural: la morfología de las células R1-R6 estaba severamente alterada, mientras que las células vecinas R7 y R8 eran normales; adicionalmente, las células pigmentarias estaban ausentes o eran anormales, aunque en apariencia el gene *ninaE* no se encuentra relacionado con las células

productoras de pigmento.

**Tabla XXVII.** Continuación

Tipo celular	Gene	Fenotipo mutante	Producto génico
R7	<i>sevenless</i> ( <i>sev</i> )	Ausencia de células R7, la función <i>sev</i> solo se requiere en R7	Receptor de tirosina-quinasa; expresado en una subpoblación de células precursoras de omatidas; la activación constitutiva de la quinasa resulta en la formación de células R7 adicionales
R7	<i>Son-of-sev- enless</i> ( <i>Sos</i> )	Supresor de un alelo hipomórfico de <i>sevenless</i> ; autónomo; los alelos de pérdida de función son letales; también interactúa con <i>Elipso</i>	No conocido
R7	<i>seven-in- absentia</i> ( <i>sina</i> )	Ausencia de células R7, la función de <i>sina</i> solo es requerida en R7	Proteína nuclear con dominios putativos de unión a metales, la expresión no está restringida a R7

Lista de genes que funcionan en el ensamblaje de omatidas. No se incluyen los genes involucrados en la diferenciación y función de las células fotoreceptoras.

Por otra parte, los tres principales efectos bioquímicos conocidos del arsénico son: coagulación de proteínas, formación de complejos con coenzimas, e inhibición de la producción de ATP.

Más recientemente, la participación del selenio (Se) en relación con el  $As^{3+}$  ha surgido, de forma aun más crítica que la del azufre (S), particularmente con respecto a las teorías sobre el desarrollo de procesos cancerosos asociados con arsenicales. Es mucho menos abundante en la corteza terrestre (proporción Se:S, 1:6000-30000) y por consiguiente, su contenido en el cuerpo es crítico, se ha encontrado que la GSH peroxidasa (GSH.Px) es una enzima dependiente de selenio. La GSH-Px es esencial para el mantenimiento de la integridad de las células sanguíneas rojas, entre otras funciones. Debido a que se ha demostrado la irreversibilidad de complejos de cobre, plata y oro con GSH-Px a partir de trazas de estos elementos, se sugirió como posible una acción semejante por parte del  $As^{3+}$  (Stokinger 1981). De esta forma, podrían ser vaciados del cuerpo almacenes de selenio enzimática-

mente activo.

Lo anterior, acompañado con el incremento de evidencias para el papel pivote del Se en la prevención del cáncer, ofrece una explicación racional para el desarrollo o falta de desarrollo de la hiperqueratosis y cáncer por arsénico, dependiendo de las cantidades relativas de Se y As (Nordberg et al. 1986). En parte, aclara también la falta de consistencia en las investigaciones enfocadas a detectar cáncer inducido por compuestos de As en animales; las dietas animales son de dos a tres veces más ricas en Se que las dietas humanas.

Tradicionalmente, la estimación del riesgo genético se ha derivado del estudio de mutaciones en gametos femeninos y masculinos, ya que estas células constituyen el sustrato para las generaciones futuras. Sin embargo, el estudio de la respuesta en las células somáticas es relevante debido principalmente a que el daño en las células somáticas se adiciona de manera significativa a la carga de enfermedades; específicamente como factor causante de procesos malignos, alteraciones teratogénicas y enfermedades cardíacas.

A nivel general, se ha observado que la falta de inducción de mutación en las células somáticas *in vivo* debe indicar una ausencia de riesgo germinal. Sin embargo, la respuesta obtenida en este estudio con las dos sales de arsénico, no apoya el concepto anterior.

Al ser propuestas inicialmente, se consideró que las pruebas de mutación y recombinación somáticas podrían sustituir a la tradicional de letales recesivos y, además, mejorarían con mucho, la sensibilidad de las pruebas de pérdida cromosómica y no disyunción. Sin embargo, conforme se ha progresado en la ejecución de las pruebas con células somáticas, ha resultado evidente que la naturaleza de los eventos genéticos terminales puede ser similar, pero no igual. Ya que en adición a las diferencias entre los dos tipos de linajes celulares, deben considerarse la importancia de la duración e intensidad de la exposición, entre otros factores.

En experimentos con la prueba de letales dominantes en ratones

y análisis citogenético de la médula ósea, se ha observado que la aplicación repetida de TEPA, THIOTEPA, EMS, ciclofosfamida o arsenito de sodio, produce igual o mayor daño que la misma dosis total en una sola aplicación, por lo que el riesgo genético inducido por la exposición crónica a un agente químico puede ser tan importante como el inducido por una exposición aguda (Sram, 1976).

Sin embargo, a través de los resultados obtenidos en este estudio, se hizo evidente que en ocasiones la menor toxicidad del arsenato de sodio favoreció la expresión de alteraciones genéticas, en contraste con el arsenito de sodio que al resultar altamente tóxico en la mayoría de las pruebas realizadas, provocó la muerte de las células u organismos afectados.

En la tabla XXVIII, se sintetizan los resultados obtenidos en las SRLT, SCLT y SMART llevadas al cabo en este estudio. La respuesta mutagénica inducida por ambas sales se centra en las pruebas de mutación somática, siendo consistente con el probable mecanismo de un agente químico asociado con procesos cancerosos. La menor sensibilidad de las células germinales en la SRLT es aparente, ya que los criterios de decisión de los procedimientos estadísticos aplicados varían en forma considerable. Así, para la prueba de letales se requiere incrementar la frecuencia control en aproximadamente 7 veces, mientras que en SMART ala (manchas simples chicas y totales) y ojo, solamente es necesario duplicarla.

Es muy probable que la poca claridad en la respuesta mutagénica de los compuestos de arsénico se deba a que son sumamente tóxicos. Así, la débil respuesta aparente en la prueba de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo debe ser el resultado de la acción selectiva de los compuestos probados, los cuales fueron detectados de forma diferencial dada su toxicidad. El arsenito de sodio indujo una respuesta altamente significativa en la camada B y no se recobraron letales en la camada A cuando se administró por inyección a machos; tampoco incrementó la frecuencia de letales cuando se administró por alimentación durante 96 horas a larvas de 48 horas de edad, es importante considerar que con esta ruta de administración, las concentraciones fueron sumamente bajas (1, 2 y



**Tabla XXVIII.** Resumen de los resultados obtenidos con arsenito y arsenato de sodio en las pruebas germinales y somáticas.

Compuesto	SLRLT						SCLT			SMART						
	I.A.			A.L.			I.A.			Alas		Ojos				
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	E	M	E		M		
Camada												♀♀	♂♂	♀♀		
<b>NaAsO<sub>2</sub></b>																
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
100	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	i	-	+	+	+
150	nd	nd	nd	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
<b>Na<sub>2</sub>HASeO<sub>4</sub></b>																
100	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
200	-	-	+	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
250	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	i	-	-	-	+	-	+
500	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	i	-	-	-	+	-	-

I.A., inyección de adultos; A.L., alimentación de larvas; E, estándar; M, líneas con metabolismo diferencial; Análisis estadístico ( $\alpha = 0.05$ ): +, resultado positivo; -, resultado negativo; i, resultado indeterminado; nd, no determinado; ++,  $\alpha = 0.01$ .

3 ppm). La prueba cromosómica no aportó información de la genotoxicidad del arsenito. En SMART de las alas utilizando líneas estándar indujo manchas chicas de manera significativa y en la prueba de los ojos indujo manchas totales de manera significativa, sin embargo, las frecuencias de manchas grandes obtenidas en la prueba de los ojos en hembras y machos, hizo evidente que en las pruebas aplicadas solamente se recobró parte del daño, ya que la toxicidad del arsenito inactiva o elimina a parte de las células afectadas -como se observa en la disminución de la frecuencia de manchas grandes en la prueba de los ojos en el caso de los machos-, el metabolismo diferencial en las pruebas somáticas no proporcionó mayor información acerca de este compuesto.

Por su parte, la menor toxicidad del arsenato permitió recobrar mayor cantidad de datos en relación con sus efectos genotóxicos. En la prueba de letales recesivos, fue detectado en las camadas A y C de manera significativa cuando se administró por inyección a los adultos; la respuesta se ubicó en forma altamente

significativa en la camada A cuando se administró durante 96 horas a larvas de 48 horas de edad (2 y 4 ppm). Al igual que en el caso del arsenito, la prueba cromosómica no aportó información sobre la genotoxicidad del compuesto. En la prueba somática de las alas, indujo manchas chicas pero las frecuencias no fueron significativas y no se recobró ninguna mancha grande. La respuesta fue totalmente negativa en al utilizar moscas con metabolismo diferencial. En la prueba de los ojos, indujo de manera significativa manchas totales y pequeñas en relación con la concentración en hembras, también incrementó la frecuencia de manchas grandes, pero en un patrón menos definido; en los machos se presentó aun más evidente el efecto de la toxicidad, ya que tanto la frecuencia de manchas totales, chicas y grandes mostraron una relación inversa con las concentraciones utilizadas, lo cual se interpreta como el resultado de la toxicidad del arsenato de sodio. Tampoco en el caso del arsenato el metabolismo diferencial aportó mayor información.

Los resultados generales no son iguales al estudio de Tripathy et al. (1990), que reportaron que ambas sales no son genotóxicas en la prueba de mutación somática de las alas, ya que de acuerdo con los datos de la presente tesis, tanto las concentraciones como la exposición usadas por estos autores fueron excesivas dada la toxicidad del arsenito y del arsenato de sodio.

Los objetivos planteados para este estudio se cumplieron al hacer evidente la capacidad de ambas sales para inducir alteraciones genéticas, tanto en células germinales como en somáticas. Como resultado de la evaluación de los efectos genotóxicos del arsenito y el arsenato de sodio, se puede considerar que principalmente debido a su toxicidad, ambos son mutágenos débiles de acción directa y muy probablemente co-carcinógenos, al facilitar la acción de otros compuestos, ya sea por la inhibición de la incorporación de energía necesaria para el metabolismo de los organismos, o por inducir lesiones que sensibilicen a las células dañadas. Es importante continuar los estudios con compuestos de arsénico enfatizando las exposiciones prolongadas con concentraciones mínimas, y aclarar la interacción de los compuestos arsenicales

con genes específicos que participan en los ciclos de energía, así como con aquellos relacionados con la iniciación de procesos cancerosos.

## **V. CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten obtener las siguientes conclusiones:

- 1) El arsenito de sodio es más tóxico que el arsenato al ser evaluado en la prueba de letales recesivos por inyección de machos adultos.
- 2) El arsenato de sodio resultó ser más genotóxico que el arsenito de sodio en la prueba de letales recesivos por inyección de machos adultos.
- 3) En la prueba de letales, la acción directa del arsenito no fue evidente, ya que solo se detectó en los tratamientos por inyección en la camada B; mientras que el arsenato presentó dos picos de acción, que manifiestan: la acción mutagénica directa del compuesto (tratamientos por inyección de adultos y alimentación de larvas) y probablemente, la actividad de un metabolito reactivo (tratamiento por inyección de adultos). En el caso del arsenato se observó especificidad de acción en las camadas A (espermatozoides) y C (espermátidas y espermatoцитos).
- 4) La prueba de letales recesivos fue altamente sensible al detectar la presencia de concentraciones mínimas de ambas sales de arsénico en tratamientos crónicos (alimentación de larvas).
- 5) Ninguna de las sales de arsénico indujo pérdida parcial o total de cromosomas sexuales, ni eventos de no-disyunción.
- 6) En la SMART con células de las alas, ambos compuestos mostraron actividad en relación con manchas simples chicas (inducidas al final del desarrollo, o producto de muerte celular selectiva). La participación de metabolismo diferencial incrementado redujo el efecto de ambas sales debido probablemente a un mecanismo de desintoxicación más eficiente.
- 7) En la SMART con células de los ojos, se obtuvo la mayor inducción de alteraciones que con las otras pruebas y fue diferente

en hembras y en machos, sin embargo, las altas frecuencias recobradas no permiten asociar su origen exclusivamente mediante -recombinación mitótica, probablemente participan también la localización de los marcadores fenotípicos (cromosoma X) y probablemente, otros genes asociados con el ciclo energético del ácido cítrico y/o con el patron de desarrollo de las estructuras analizadas.

8) El uso de líneas resistentes a insecticidas (Hikone-R), no mejoró la sensibilidad de la prueba de mutación y recombinación somáticas con respecto a las sales probadas.

9) La inducción de alteraciones genotóxicas fue mayor en células de la línea somática, aunque probablemente está reflejando más de una forma de acción de ambos compuestos.

10) El arsenito de sodio fue en general más tóxico que el arsenato, pero es probable que el segundo tenga un potencial de riesgo mayor al permitir (en apariencia) que mayor proporción de células afectadas logren permanecer en el organismo expuesto.

## V. REFERENCIAS

Abrahamson S., K. Houtchens, X. Li Jia y P. Foureman (1983) Germ cell comparative *Drosophila* mutagenesis: sensitivity and mutation pattern in chemically treated stem cells, Environ. Mutagen. 5: 891-905.

Ahmed Z.U. y G.W.R. Walker (1972) Studies on the effect of urethane, selenocystine and sodium mono-hydrogenarsenate on crossing over in the X-chromosome of *Drosophila melanogaster*, Can. J. Genet. Cytol., 14: 719.

Alloway B.J. Ed. (1990) Heavy metals in soils, Blackie, Londres, pp. 83 - 99.

Anderson, E.L. (1988) Overview of risk assessment. En: Carcinogen risk assessment Travis, C., Plenum Press, Londres, pp. 8 y 9.

- Axelsson O., E. Dahlgren, C.D. Jansson y S.O. Rehnlund (1986) Br. J. Ind. Med., 35:8-15. En: Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects Friberg L., Nordberg G.F. y V.B. Vouk Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 319-322, 343-344, 352, 361-364.
- Baker A.J.M. y P.L. Walker (1990) Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants, En: Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects, Shaw A.J. Ed., CRC Press, Florida, pp. 163.
- Baker N., M. Mlodzik y G. Rubin (1990) Spacing differentiation in the developing *Drosophila* eye: a fibrinogen-related lateral inhibitor encoded by *scabrous*, Science 250: 1370-1376.
- Basler K y E. Hafen (1991) Specification of cell fate in the developing eye of *Drosophila*, BioEssays 12: 621-631.
- Becker H.J. (1976) Mitotic recombination. En: The Genetics and Biology of *Drosophila* Ashburner M. y E. Novitski Eds., Academic Press, Londres, pp. 1020-1083.
- Beijer K. y A. Jernelöv (1986a), Sources, transport and transformation of metals in the environment, En: Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk, Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, 68-74, 76 y 77.
- Beijer K. y A. Jernelöv (1986b) General aspects and specific data on ecological effects of metals, En: Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk, Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, 253-266.
- Brimblecombe P. (1979) Atmospheric arsenic, Nature, 280: 104-105.

- Brusick D. (1987) Principles of Genetic Toxicology, 2a. ed., Plenum Press, Londres, pp. 69, 82, 86, 91, 105, 109-110, 129.
- Burk D. y A.R. Beaudoin (1986) Teratology 16: 247-260. En: Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk Eds. Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 415.
- Cairns J. (1981) The origin of human cancers, Nature, 289: 353-357.
- Camner P., T.W. Clarkson y G.F. Nordberg (1986), Routes of exposure, dose and metabolism of metals En: Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 88-89, 91, 96-101, 103-107.
- Cassaret L.J. y M.D. Doull Eds.(1975) Toxicology. The basic science of poisons, Macmillan, Londres, pp. 11-133.
- Chandley A.C. y A.J. Bateman (1962) Timing of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* using tritiated thymidine, Nature 4812: 299-300.
- Clark (1982) The use of larval stages of *Drosophila* in screening for some naturally occurring mutagens. Mutation Res. 2: 89-97.
- Clarkson T.W. (1986) Effects - general principles underlying the toxic action of metals. En: Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk, Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 128, 131, 134, 138, 142 - 144, 146.
- Clements J., D. Howe, M. Phillips y N.K. Todd (1988) The *Drosophila* wing test: A comparison to the sensitivity of different

strains, *Mutation Res.*, 203: 117-123.

Correia M.A. y C.E. Becker (1989) Agentes quelantes e intoxicación con metales pesados, Cap. 61, *Farmacología, La Prensa Médica Mexicana*, pp. 752-753.

Crossen P.E. (1983) Arsenic in SCE in human lymphocytes, *Mutation Res.* 119: 415-419.

Dapkus D. y D.J. Merrell (1977) Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long term selected population of *Drosophila melanogaster*, *Genetics* 87: 685-697.

Demerec M. Ed. (1965) *Biology of Drosophila*, Hafner Publishing Co., 632 p.

Dencker L., B. Danielsson, A. Khayat y A. Lindgren (1986) Reproductive and Developmental Toxicity of Metals pp. 607-631. En: *Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects*, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk, Eds. Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 416.

Eastman N.J. (1986) *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 21: 60-64. En: *Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects*, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk, Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, p. 414.

Edmonds J.S. y K.A. Francesconi (1977) Methylated arsenic from marine fauna, *Nature* 265:436.

Edmonds J.S. y K.A. Francesconi (1981) Arseno-sugars from brown kelp (*Ecklonia radiata*) as intermediates in cycling of arsenic in a marine ecosystem, *Nature* 289:602-603.

EPA (1988) Carcinogen assessment group's risk assessment on

arsenic, National Technical Information Service PB 81-20613.  
En: Carcinogen Risk Assessment, Travis, C., Plenum Press,  
Londres, pp. 8 y 9.

Fahmy M.J. y O.G. Fahmy (1984) Mutat. Res., 100: 339. En: Mutagenicity testing, a practical approach, Venit S. y J.M. Parry, IRL Press, Washington, pp. 161.

Ferm V.H. y S.J. Carpenter (1986) J. Reprod. Fertil., 17: 199-201. En: Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, p. 415.

Ferm V.H., A. Saxon y B.M. Smith (1986) Arch. Environ. Health 22: 557-560. En: Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 415.

Ferm V.H. y D.P. Hanlon (1986) Reproductive and Developmental Toxicity of Metals pp. 399-416. En: Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, p. 415.

Fishbein L. (1981) Sources, transport and alterations of metal compounds: An overview. I. Arsenic, Beryllium, Cadmium, Chromium, and Nickel, Environ. Health Pers. 40: 43-64.

Fisher D.L. (1986) Environ. Res., 28: 1-9. En: Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, p. 416.

Fong K., F. Lee, R. Bockrath (1980) Effects of sodium arsenite on single strand DNA break formation and post-replication repair in *E. coli* following UV irradiation, Mutation Res. 70: 151-



- Frei H. y F.E. Würgler (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result, *Mutation Res.* 203: 297-308.
- Frei H., J. Clements, D. Howe y F.H. Würgler (1992) The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*, *Mutation Res.* 279: 21-33.
- Frölich A. y F. Würgler (1991) The "high bioactivation" cross for the smart assay with the wing, *DIS* 70:246-247
- García-Bellido A. y J. Dapena (1974) Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila*, *Mol. Gen. Genet.* 128: 117-130.
- García-Bellido A. y J. R. Merriam (1971a) Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*, *Dev. Biol.* 24: 61-87.
- García-Bellido A. y J. R. Merriam (1971b) Clonal parameters of tergite development in *Drosophila*, *Dev. Biol.*, 26: 265-276.
- Gocke E., K. Eckhardt, M. T. King y D. Wild (1982) Some statistical aspects of spontaneous sex-linked recessive lethal mutations in *Drosophila*, *Mutation Res.* 104: 239-242.
- Graf U. y D. Singer (1992) Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 8 (1): 15-27.
- Graf U. y N. Van Shaik (1992) Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in

*Drosophila melanogaster*, Mutation Res. 271: 59-67.

Graf U., N. Van Shaik y R. Pacella (1991) Improved "high bioactivation" cross for the smart wing assay, DIS 70: 247-248

Graf U. M. Badoux y E. Hollinger (1992) The carcinogen DAB is highly genotoxic in the improved high bioactivation cross of the *Drosophila* wing spot test (SMART), DIS 71: 235-236.

Graf U., H. Juon, A.J. Katz, H.J. Frei, F.E. Würgler (1983) A pilot study on a new *Drosophila* spot test. Mutation Res. 120: 233-239.

Graf U., F. Würgler, A. Katz, H. Frei, H. Juon, C. Hall y P. Kale (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, Environ. Mutagen. 6: 153-188

Hällström I., J. Magnusson y C. Ramel (1982) Relation between the somatic toxicity of dimethylnitrosamine and a genetically determined variation in the level and induction of cytochrome P-450 in *Drosophila*, Mutation Res. 92: 161-168.

Hällström I., A. Blanck y S. Atuma (1984) Genetic variation in cytochrome P-450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*, Biochem. Pharmacol., 33: 13-20.

Hanlon D.P. y V.H. Ferm (1986) Experientia 33: 1221-1222. En: Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk, Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 415.

IARC (1987) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity, Vols. 1-42, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 100-106,

IPCS (1985) Guide to short-term test for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals. Environ. Health Criteria 51. WHO, Geneva, pp. 14-15.

Ishinishi N., K. Tsuchiya, M. Vahter y B.A. Fowler (1986), Arsenic. En: Handbook on the Toxicology of Metals. II. Specific Metals, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk, Eds. Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 319-383.

Jennette K. W. (1986) Environ. Health Perspect, 40: 233-252. En: Handbook on the Toxicology of Metals. II. Specific Metals, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk, Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 319-383.

Kammermeyer K.L. y S. Zimmering (1985) Influence of the females genotype in processing premutational lesions induced by ethylnitrosourea (ENU) in male germ cells of *Drosophila*, Mutation Res. 144: 77-79.

Kastenbam-Bowman (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, Mutation Res. 26: 243, 248.

Kazantzis G. (1986) Diagnosis and treatment of metal poisoning-general aspects. En: Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk, Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 298.

Kazantzis G. y L.J. Lilly (1986) Mutagenic and carcinogenic effects of metals. En: Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk, Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 319-322, 343-344, 352, 361-364.

Kilbey B.J., D.J. MacDonald, C. Auerbach, F.H. Sobels y E.W.

- Vogel (1981) The use of *D. melanogaster* in tests for environmental mutagens. *Mutation Res.* 85: 141-146.
- Kjellström T. (1986) Epidemiological methods for assessing dose-response and dose-effect relationships. En: *Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects*, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk, Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 206, 210-211, 219-220.
- Knowles F.C. y A.A. Benson, (1983) The biochemistry of arsenic. *TIBS* 8:178.
- Koren H (1991) *Handbook of Environmental Health and Safety. Principles and Practices*, Lewis Publishers, 2a. ed. Vol. I, pp. 109, 147-148, 243-244, 252, 449, 457.
- Kramers P.G.N. (1985) Trenimon-induced sex chromosome loss in *Drosophila*: different dose-responses for ring-X loss as compared to rod-X loss and Y-marker loss, *Mutation Res.* 142: 29-35.
- Kramers P.G.N., A.O. Schalet, E. Paradi y L. Huiser-Hoogteyling (1984) *Mutation Research* 107: 187. En: *Mutagenicity testing, a practical approach*, Venit S. y J.M. Parry, Eds., IRL Press, Washington, pp. 149-184.
- Lantzy R.J. y F.T. Makenzie (1979) Atmospheric trace metals: Global cycles and assessment of man's impact, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 43: 511-525.
- Lee A.M. y J.F. Fraumeni (1986) *J. Natl. Cancer Inst.*, 42: 1045-1052. En: *Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects*, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 362.

- Lee T.C., R.Y. Huang y K.Y. Jan (1985) Sodium arsenite enhances the cytotoxicity, clastogenicity, and 6-thioguanine-resistant mutagenicity of ultraviolet light in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Res.* 148:83-89.
- Lee T.C., K.C. Lee, Y.J. Tzeng, R.Y. Huang y K.Y. Jan (1986), Sodium arsenite potentiates the clastogenicity and mutagenicity of DNA crosslinking agents, *Environ. Mutagen.* 8:119-128.
- Lee W. R., S. Abrahamson, R. Valencia, E. S. von Halle, F. E. Würgler y S. Zimmering (1983) The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*, *Mutation Res.* 123:183-279.
- Léonard A y R.R. Lauwerys (1980) Carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity of arsenic, *Mutation Res.* 75: 49-62.
- Lindgren A., M. Vahter y L. Dencker (1986) *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 51: 253-265. En: *Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects*, Friberg L., G.F. Nordberg y V.B. Vouk Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 416.
- Lindsley D. L. y E. H. Grell (1968) Genetic variations of *Drosophila melanogaster*, Carnegie Institution of Washington Publication 627, 475 p.
- Lindsley D. L. y G. Zimm (1985) The genome of *Drosophila melanogaster*. Part 1: genes a - k, DIS 62, p. 121.
- Lugo G., G. Cassidy y P. Palmisano (1986) *Am. J. Dis. Child.*, 117: 328-330. En: *Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects*, Friberg L., G.F. Nordberg y V.B. Vouk Eds. Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 414.
- Macnair M.R. (1990) The genetics of metal tolerance in natural

- populations, En: Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects, Shaw A.J., Ed., CRC Press, Florida, pp. 242.
- Mahaffey K.R. y B.A. Fowler (1986) Environ. Health Perspect. 19, 165-172. En: Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk (1986) Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 178.
- Manahan S.E. (1984) Environmental Chemistry, Willard Grant Press, 4a. ed. Boston, pp. 506-508.
- Manahan S.E. (1991) Environmental Chemistry, Lewis Publishers, 5a. ed. USA, pp. 148, 152, 493-499, 504
- McCabe M., D. Maguire, M. Nowak (1983) The effects of arsenic compounds on human and bovine lymphocytes mitogenesis *in vitro*. Environ. Res. 31: 322-331.
- Nakamuro K. y Y. Sayato, (1981) Comparative studies of chromosomal aberrations induced by trivalent and pentavalent arsenic, Mutation Res.88: 73-80.
- Nash III T.H. (1990) Metal tolerance in lichens, En: Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects, Shaw A.J., Ed, CRC Press, Florida, pp. 122, 125.
- Natarajan A.T., I. Csukas, F. Degrassi, A.A. van Zeeland, R. de Salvia y M. Fiore (1982) Influence of inhibition of repair enzymes on the induction of chromosomal aberrations by physical and chemical agents. En: Natarajan A.T., G. Obe y H. Altmann (Eds.). Progress in Mutation Res. 4: 47-59.
- Nishiura J.T. (1981) DNA-dependent RNA polymerases from *Drosophila melanogaster* adults: Isolation and partial characterization, Biochemical Genetics 19:15.

- Nordberg G.F., J. Parizej, G. Pershagen y L. Gerhardsson (1986) Factors influencing effects and dose-response relationships of metals. En: Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 175, 177-178, 187-189.
- Nordenson I. y L. Beckman (1982) Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. VII. Reanalysis and follow-up of chromosomal aberrations in workers exposed to arsenic, *Hereditas*, 96: 175-181.
- Nördström S., Beckman L. e I. Nordenson (1986a) *Hereditas* 88: 43-46. En: Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 414.
- Nördström S., Beckman L. e I. Nordenson (1986b) *Hereditas* 90: 291-296. En: Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 414.
- Norval E. y L.R.P. Butler (1974) Trace metals in man's environment and their determination by atomic absorption spectroscopy, *S.A. Med. J.* 48: 2624.
- Nöthiger (1970) Sucrose density separation: A method for collecting large numbers of *Drosophila* larvae, *DIS* 45: 177.
- Ordaz T.G. (1991) Valoración de la prueba para detección de mutación y recombinación somática (SMART) en las células del ojo de *Drosophila melanogaster*. Tesis (Bióloga) UNAM 78p.
- Oscarson D.W., P.M. Huang, C. Defosse y A. Herbillon (1981), Oxidative power of Mn(IV) y Fe(III) oxides with respect to As(III) in terrestrial and aquatic environments, *Nature* 291:

- Ostrosky W.P., M.E. Gonsebatt, R. Montero, L. Vega, H. Barba, J. Espinosa, A. Palao, C. Cortinas, G. García, L.M. del Razo y M. Cebrián (1991) Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico, *Mutation Res.* 250: 477-482.
- Pagano G., A. Esposito, P. Bove, M. de Angelis, A. Rota, E. Vamvakinos y G.G. Giordano (1982) Arsenic-induced developmental defects and mitotic abnormalities in sea-urchin development, *Mutation Res.* 104: 351-354.
- Pershagen G. (1981) The carcinogenicity of arsenic. *Environ. Health Persp.* 40: 93-100.
- Pershagen G., S. Wall, A. Taube y L. Linnman (1986) *Scand. J. Work Environ. Health*, 7, 302 - 309. En: *Handbook on the Toxicology of Metals. II. Specific Metals*, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 362-363.
- Pershagen G., G. Nordberg y N. E. Björklund (1986) *Environ. Res.* 34: 227-241. En: *Handbook on the Toxicology of Metals. II. Specific Metals*, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 344-387.
- Petersen N.S., B.J. Bond, H.K. Mitchell y N. Davison (1985) Stage-specific regulation of actin genes in *Drosophila* wing cells, *Develop. Genetics* 5: 219-225.
- Pfitzer E.A. y V. Vouk (1986) General considerations of dose-effect and dose-response relationships, En: *Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects*, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp.



- Phillips J.P. y A. Pitt (1985) The RNA polymerases of *Drosophila melanogaster* during early development, *Biochemical Genetics* 23 (9/10): 655-676.
- Radman M. y A.R. Kinsella (1980) Chromosomal events in carcinogenic initiation and promotion: implications for carcinogenicity testing and cancer prevention strategies. En: *Molecular and cellular aspects of carcinogen screening tests*, Montesano R., H. Bartsch y L. Tomatis Eds., International Agency for Research on cancer. Lyon, pp. 75-90.
- Radman M., P. Jeggo y R. Wagner (1982) Chromosomal rearrangement and carcinogenesis. *Mutation Res.* 98: 249-264.
- Ramos M. P., H.M. Abundis, J. C. Gaytan, M. G. Ordaz, P. G. Orozco, J. Maldonado, J. Hernández, E. González, P. Reyes, E. Galicia, J. A. Muñoz (1993) *Manual de laboratorio de genética para Drosophila melanogaster*, McGraw-Hill, México, 131 p.
- Reed R.H. y G.M. Gadd, (1990) Metal tolerance in eucaryotic and prokaryotic algae. En: *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*, Shaw A.J., Ed., CRC Press, Florida, pp. 111-112.
- Rodionov A.N., R.I. Kalendarev, G.V. Tchikvaidze y J.A. Eiduss (1979) A new phase in solid state arsenic, *Nature*, 281: 10.
- Rossman T., M.S. Meyn y W. Troll (1986a) *Environ. Health Persp.*, 19: 229-233. En: *Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects*, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 189.
- Rossman T., M.S. Meyn y W. Troll (1986b) *Mutation Res.*, 40: 125-

130. En: Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 343.

Sager P.R., T.W. Clarkson y G.F. Nordberg (1986) Reproductive and developmental toxicity of metals, En: Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 391-392, 395-396, 401, 403, 414-417, 422-423.

Sankaranarayanan K. y W. Ferro (1985) Studies on mutagen-sensitive strains of *Drosophila melanogaster*. VIII. Further data on differences between *Canton-S* and *ebony* strains with respect to maternal effects for the X-ray induction of autosomal translocations and ring-X chromosome losses in mature spermatozoa, *Mutation Res.* 150: 225-234.

Sawicki E., (1980) Handbook of Environmental Genotoxicology, Vol. I Environmental Aspects, CRC Press, Florida, pp. 141 y 168.

Sentry J.W., M.M. Yang y K. Kaiser (1993) Conditional cell ablation in *Drosophila*, *BioEssays* 15: 491-493.

Sram R.J. (1976) Relationship between acute and chronic exposures in mutagenicity studies in mice. *Mutation Res.*, 41, 25-42.

Stokinger H.E. (1981) The metals, En: Patty's industrial hygiene and toxicology, Clayton G.D. y F.E. Clayton Eds., John Wiley & Sons, 3a. ed. Nueva York, pp. 1517-1531.

Szabad J., I. Soós, G. Polgár y G. Héjja (1983) Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal tests, *Mutation Res.* 113: 117-133.

- T.G.M.A. (1986) Task group on metal accumulation, Environ. Physiol. Biochem., 3: 65-107, En: Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Friberg L, G.F. Nordberg y V. B. Vouk Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, p. 92.
- Travis, C., (1988) Carcinogen risk assessment, Plenum Press, Londres, pp. 8 - 9.
- Tripathy N.K., F.E. Würgler y H. Frei (1990) Genetic toxicity of six carcinogens and six non-carcinogens in the *Drosophila* wing spot test, Mutation Res. 242: 169-180.
- U. S. Public Health Service (1962) Public Health Service drinking Water Standards.
- Underhill F.P. y F.G. Amatruda (1986) J. Am. Med. Assoc 81: 2009-2015. En: Handbook on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk Eds. Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, p. 414.
- Valencia R., J.M. Mason, R.C. Woodruff y S. Zimmering (1985) Chemical mutagenesis testing in *Drosophila* III. Results of 48 coded compounds tested for the National Toxicology Program. Environ. Mutagen. 7: 325-348.
- Vig B.K., M.L. Figueroa, M.N. Cornforth y S.J. Jenkins (1984) Chromosome studies in human subjects chronically exposed to arsenic in drinking water, Am. J. Ind. Med., 6: 325-338.
- Vogel E.W., (1985) Summary report on the performance of the *Drosophila* assays, En: Progress in Mutation Research, Vol. 5, Ashby J. de Serres Eds., Elsevier. pp 47-57.
- Vogel E.W., (1988) Summary report on the performance of the *Drosophila* assays, En: Evaluation of short-term tests for

carcinogens, Ashby J., F.J. de Serres, M.D. Shelby, B.H. Margolin, M. Ishidate y G.C. Becking Eds., Report of the International Program on Chemical Safety's Collaborative Study on *in vivo* Assays II, , WHO, Cambridge, pp. 277-285.

Vogel E. y A. Natarajan (1979) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkilating agents in eukaryotic systems. II. Total and partial sex chromosome loss in *Drosophila*. *Mutation Res.* 62: 101-123.

Vogel E.W. y C. Ramel (1988) Mutagenesis assays with *Drosophila*. En: Evaluation of short-term tests for carcinogens. Ashby J., F.J. de Serres, M.D. Shelby, B.H. Margolin, M. Ishidate y G.C. Becking Eds., Report of the International Program on Chemical Safety's Collaborative Study on *in vivo* Assays II, WHO, Cambridge, pp. 277-285.

Vogel E. W. y J. A. Zijlstra (1987a) Mechanistic and methodological aspects of chemically-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*, *Mutation Res.* 182: 243-264.

Vogel E. W. y J. A. Zijlstra (1987b) Somatic cell mutagenicity in *Drosophila melanogaster* in comparison with genetic damage in early germ-cell states. *Mutation Res.* 180: 189-200.

Vogel E.W. y M.J.M. Nivard (1993) Performance of 181 chemicals in a *Drosophila* assay predominantly monitoring interchromosomal mitotic recombination, *Mutagenesis* 8(1): 57-81.

Vogel E. W. y A. Szakmáry (1990) Basic principles and evaluation of results of assays measuring genotoxic damage in somatic cells of *Drosophila*, *Mutation and the Environment, Part B*, Wiley-Liss, Inc., pp. 149-158.

Vogel E., Barbin A., M. Nivard y H. Bartsch (1991) Nucleophilic

selectivity of alkylating agents and their hypermutability in *Drosophila* as predictors of carcinogenic potency in rodents. Carcinogenesis, in press

Vogel E.W., V.E. Bulyzhenkov, K. Fujikawa, U. Graf. V.I. Ivanov, B. Kilbey y F.E. Würzler (1988) Summary report on the performance of the *Drosophila* assays. En: Evaluation of short-term test for carcinogens, Ashby J., F.J. de Serres y M.D. Shelby Eds., Int. Program on chemical safety's collaborative study on *in vivo* assays, 2. Cambridge University Press/WHO, Cambridge, pp. 2.277-2.285.

Walker G.W.R. y A.M. Bradley (1969) Interacting effects of sodium monohydrogenarsenate and seleno-cystine on crossing over in *Drosophila melanogaster*, Can. J. Genet. Cytol., 11: 677-688.

Wan B., R.T. Christian y S.W. Soukup (1982) Studies of cytogenetic effects of sodium arsenicals on mammalian cells *in vitro*, Environ. Mutagen. 4:493-498.

Weis P y J.S. Weis (1991) The developmental toxicity of metals and metalloids in fish. En: Metal Ecotoxicology. Concepts & Applications, Newman M.C. y A.W. McIntosh, Eds. Lewis Publishers, USA, pp. 160.

Weisburger E.K. (1990) Carcinogenic Natural Products in the Environment. En: Advances in Modern Environment Toxicology: Environmental and Occupational Cancer: Scientific Update, 1990, Mehlman M.A. Ed., Princeton Scientific Publishing, Nueva Jersey, pp. 3, 13.

WHO (1981) Environmental Health Criteria 18: Arsenic. World Health Organization, Geneva.

Willhite C.C. (1986) Exp. Mol. Pathol., 34: 145-158. En: Handbook

on the Toxicology of Metals. I. General Aspects, Friberg L, G.F. Nordberg y V.B. Vouk Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, p. 416.

Woodruff, R.C., J.M. Mason, R. Valencia y S. Zimmering (1984) Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*: I. Comparison of positive and negative control data for sex-linked recessive lethal mutations in three laboratories, Environ. Mutagen. 6: 189-202

Woodruff C. R., Mason J. M., Valencia R. y Zimmering S. (1985) Chemical mutagenesis testing in *Drosophila* V. Results of 53 coded compounds tested for the national toxicology program, Environ. Mutagen. 7: 677-702

Würgler F.E., y U. Graf (1982) Stability of *Drosophila melanogaster* chromosomes replicating for the first time in a repair-deficient cell. Mutation Res. 92: 99-106.

Yeh S. (1973) Skin cancer in chronic arsenicalism, Human Pathol., 4: 469-485.

Yoon J.S., J.M. Mason, R. Valencia, R.C. Woodruff y S. Zimmering (1985) Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. IV. Results of 45 coded compounds tested for the national toxicology program. Environ. Mutagen. 7: 349-367.

Zijlstra J. y E.W. Vogel (1988a) Influence of inhibition of the metabolic activation on the mutagenicity of some nitrosamines, triazines, hydrazines and seniciphylline, Mutation Res. 202: 251-267

Zijlstra J. Vogel E.W. (1988b) Metabolic inactivation of mutagens in *Drosophila melanogaster*, Mutation Res. 198: 73-83.

- Zimmering S. (1983) The *mei-9<sup>a</sup>* test for chromosome loss in *Drosophila*: A review of assays of 21 chemicals for chromosome breakage, *Environ. Mutagen.* 5: 907-921.
- Zimmering S. (1987) Aneuploidy in *Drosophila*, Alan R. Liss, Inc. 32 p.
- Zimmering S. y N. Deitemeyer (1981) A further note on the utility of the excision repair-deficient *mei-9<sup>a</sup>* females of *Drosophila melanogaster* in detecting chromosome breakage induced by procarbazine in male germ cells, *Environ. Mutagen.* 3: 293-295
- Zimmering S., J.M. Mason, R. Valencia y R.C. Woodruff (1985) Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. II. Results of 20 coded compounds tested for the National Toxicology Program, *Environ. Mutagen.* 7: 87-100.