



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y
DE POSTGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

EFEECTO DEL ARSENICO SOBRE LA
BIOLOGIA CELULAR DEL LINFOCITO

T E S I S

Que para Obtener el Grado Académico de

MAESTRA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A :

BIOL. LIBIA VEGA LOYO

México, D. F.

Febrero 1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DOCTORA PATRICIA OSTROSKY-WEGMAN.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Patricia Ostrosky-Wegman por el generoso e incondicional apoyo y estímulo de siempre.

A los miembros de mi Comité Tutorial:

Dr. Lino Díaz de León Hernández

Dr. Edmundo de Ibis Lamoyi Velázquez

Dr. Fabio Salamanca Gómez.

Por sus valiosos comentarios, críticas y sugerencias durante el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del jurado:

Dr. Javier Espinosa Aguirre

Dr. Alejandro García Carranca

Dr. Rafael Saavedra Durán

Dr. Mario Altamirano Lozano

Por sus aportes y comentarios en la revisión de este trabajo.

A mis compañeros:

Emilio, Luis, Salomón, Daniel, Guillermo, Ana María, Silvia, Patricia R., Patricia G., Aurora, Angélica, Mahara, Miriam, Juliana, Victoria, Regina, Maricha, Irma y Gloria por hacer del laboratorio un sitio en donde se comparten el trabajo y la amistad.

A mis amigos:

Luis, Eduardo, Oscar, Marco, Leopoldo, Diego, Jacqueline, Virginia y Cynthia por haberme soportado y apoyado durante tantos años.

A mi padre:

Por haber sido mi guía y enseñarme las cosas que son importantes de la vida.

CONTENIDO

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO	4
HIPÓTESIS	5
OBJETIVOS	5
Objetivo General	5
Estrategia Experimental	5
INTRODUCCIÓN GENERAL	6
El Arsénico	6
Metabolismo y Efectos del Arsénico	7
Exposición Ambiental a Arsénico	8
Las Aneuploidías	9
Las Aneuploidías y el Cáncer	10
Determinación de las Aneuploidías	13
ARTICULO I	15
Genotoxic and non-genotoxic effects in arsenic human exposure,	
ARTICULO II	20
Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes "in vitro": an individual susceptibility effect detected.	
DISCUSION GENERAL	39
BIBLIOGRAFÍA	43

RESUMEN

El arsénico es un contaminante ambiental conocido como carcinogénico para el ser humano, aunque sus mecanismos de acción son desconocidos. Puesto que se han observado alteraciones en la segregación cromosómica en individuos crónicamente expuestos a altas concentraciones de arsénico en el agua de bebida, y se ha relacionado la presencia de aneuploidias con los procesos cancerosos (tanto primarios como secundarios), se evaluó el potencial aneuploidogénico del arsenito de sodio "in vitro". Se incubaron muestras de sangre por 72 horas y fueron tratadas con varias concentraciones de arsenito de sodio durante las últimas 24 horas (de $1 \mu\text{M}$ a $1 \times 10^{-10} \mu\text{M}$). Las células se cosecharon y se procesaron las muestras especialmente para el análisis de aneuploidias. Se les dio un tratamiento hipotónico ligero por un periodo corto, se prepararon las laminillas goteando el material directamente sobre la laminilla a poca distancia y dejándolas secar al aire. Se evaluó el número de cromosomas por metafase en 200 células de primera y 200 células de segunda división para cada individuo. Se observó un efecto directamente relacionado con la dosis: la concentración de $1 \mu\text{M}$ fue muy tóxica y no se recobraron células ni metafases suficientes para la evaluación, la concentración más alta de arsenito de sodio que pudo ser evaluada ($10^{-10} \mu\text{M}$) indujo un 28.33% y un 22.4% de células hiperploides (con un número mayor a 46 cromosomas) en células que se dividieron una y dos veces en cultivo respectivamente, y un 29% de células tetraploides ($4n$) en segunda división. Se observó una susceptibilidad individual diferente al efecto producido por el arsenito de sodio, éste efecto se confirmó con el análisis de la producción de aberraciones cromosómicas estructurales en cultivos controles y tratados con arsenito de sodio $1 \times 10^{-2} \mu\text{M}$. Se evaluó el efecto de arresto de mitosis por el arsenito de sodio en cultivos de linfocitos tratados durante 2 horas. Se determinó el índice mitótico (IM) en 5000 células por cada individuo. El arsenito de sodio indujo un 40.24% y un 12.93% (con $10^{-2} \mu\text{M}$ y $10^{-10} \mu\text{M}$ respectivamente) del efecto producido por colcemid (este dato se tomó como el 100% del efecto para cada individuo). Los resultados indican que el arsenito de sodio tiene efecto tanto aneuploidogénico (aneugénico) como citostático (arresto en mitosis). Además se confirmó a través de los tres parámetros evaluados (aneuploidias, arresto en mitosis y aberraciones cromosómicas estructurales), que uno de los individuos participantes en este estudio tuvo una mayor sensibilidad al efecto del arsenito de sodio que el resto de los individuos ($P < 0.05$, prueba de X^2 de heterogeneidad).

ABSTRACT

Arsenic is a well known human carcinogen, although its mechanisms of action are unknown. Altered chromosome segregation has been observed in humans exposed chronically to high concentrations of arsenic in well drinking water and that the presence of aneuploidy have been related with cancer development. Aneugenic potential of sodium arsenite was evaluated "in vitro". Whole blood cultures were incubated for 72 hours and treated with several concentrations of sodium arsenite during the last 24 hours (from 1 μM to 1×10^{-10} μM). Cells were harvested and samples were processed specially for aneuploidy analysis. A short hypotonic treatment was given, slides were air-dried. The number of chromosomes in each of 200 metaphases was scored in first and second division cells for each donor. A dose-related effect was observed: 1 μM was very toxic and not enough metaphases could be recovered for the analysis, the highest sodium arsenite concentration evaluated (10^{-2} μM) induced a 28.33% and a 22.4% of hyperploid cells (with more than 46 chromosomes) in first and second division cells respectively, and a 29% of tetraploid cells (4n) in second division cells. A different individual susceptibility effect was observed and confirmed through the analysis of structural chromosome aberrations in control cultures and cultures treated with sodium arsenite 1×10^{-2} μM . Mitotic arrestant effect of sodium arsenite was evaluated in lymphocyte cultures treated for 2 hours. Mitotic Index (MI) was scored in 5000 cells for each donor. Sodium arsenite induced a 40.24% and a 12.93% (with 10 μM and 10⁻¹⁰ μM respectively) of the effect produced by colcemid (data on colcemid was taken as a 100% of effect for each donor). This results indicate that sodium arsenite has an aneuploidogenic (aneugenic) effect and a cytostatic effect (mitosis arrestant). It was confirmed by the three parameters evaluated (aneuploidy, mitotic arrestant effect and structural chromosome aberrations) that one of the donors had a significant different sensibility to sodium arsenite compared to the other three donors ($P < 0.05$, χ^2 heterogeneity test).

PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

Se ha comprobado que el arsénico es un carcinógeno humano ambiental, a pesar de que se desconocen sus mecanismos de acción es capaz de aumentar la incidencia de cáncer de piel, de vejiga, de riñón y de hígado cuando es ingerido crónicamente en el agua o los alimentos. Existen aún un gran número de comunidades expuestas ambientalmente al arsénico, ya sea a través del aire, del agua o de los alimentos, y esta contaminación puede ser tanto de origen natural como creada por el hombre. En la región de La Comarca Lagunera en México, existen fuentes naturales de arsénico que contaminan los mantos acuíferos de los cuales, las poblaciones aledañas se abastecen de agua potable. En esta región se llevó a cabo un estudio piloto en cultivos de linfocitos de los individuos expuestos a altas dosis de arsénico en el agua de bebida. Los cultivos mostraron un incremento en la producción de aberraciones cromosómicas estructurales y alteración en la cinética de proliferación celular, se encontró además, un alto índice de células poliploides asociadas a la exposición crónica a altas dosis de arsénico en el agua de bebida (Gonsebatt et al., 1992). Puesto que éste primer estudio piloto no fue diseñado específicamente para realizar un análisis de aneuploidías, y se encontró una frecuencia significativamente alta de células poliploides en la población crónicamente expuesta, se decidió realizar un estudio citogenético en cultivos de linfocitos humanos bajo condiciones controladas y específicas para la evaluar la presencia y el número de aneuploidías y, determinar la capacidad aneuploidógena del arsenito de sodio, ya que éste puede ser uno de los posibles mecanismos de carcinogénesis del arsénico.

HIPÓTESIS

Al tener el arsenito de sodio afinidad por los grupos sulfhidrilos de las proteínas, es capaz de interactuar con éstas interfiriendo con su comportamiento normal dentro de las células, de esta manera, si el arsenito de sodio interfiere con la polimerización de la tubulina en el arreglo del huso mitótico, podrá producir células aneuploides y tetraploides e inhibir la segregación cromosómica produciendo arresto de las células en mitosis.

OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad aneugénica del arsenito de sodio.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

- Determinar el número de cromosomas por metafase en 200 células de primera y 200 células de segunda división en cultivos de linfocitos controles y tratados con arsenito de sodio.

- Determinar el número de linfocitos arrestados en mitosis en 5000 células de cultivos controles y cultivos tratados con arsenito de sodio.

-Determinar la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales en 100 metafases de primera división en cultivos de linfocitos testigos y cultivos tratados con arsenito de sodio.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La exposición a sustancias y agentes tóxicos se halla a menudo relacionada con efectos adversos en el desarrollo, la reproducción y/o la supervivencia de los organismos. La Organización Mundial de la Salud considera relevante el estudio y la valoración de los efectos que sobre la salud humana produce la exposición a agentes ambientales. Los estudios epidemiológicos han mostrado que ciertas enfermedades o padecimientos en el ser humano, y muchas de las alteraciones que sufren los ecosistemas naturales, son producto de la presencia en el ambiente de sustancias, productos o conductas nuevas, generados por los cambios tecnológicos y sociales. Tomatis (1990) menciona que el 90% de los diferentes tipos de cáncer conocidos se originan por exposición ambiental u ocupacional. La actividad carcinogénica del arsénico en poblaciones humanas se encuentra documentada (IARC, 1980; WHO, 1981; IARC, 1987; Nordenson et al., 1978; Nordenson y Beckman, 1982), aunque los mecanismos por los cuales ejerce sus efectos se desconocen.

La exposición a concentraciones elevadas de arsénico en el agua de bebida se halla asociada a una tasa mayor de mortalidad por cáncer de piel, vejiga, hígado y riñón, por lo que el tejido linfóide resulta, desde el punto de vista epidemiológico, un tejido sustituto para la identificación de daño, ya que sus componentes celulares monitorean todo el organismo y se encuentran igualmente expuestos al circular por los diferentes tejidos. La exposición crónica a este metaloide altera la proliferación y la integridad del material genético de estas células, lo que los convierte en marcadores sensibles y en un buen tejido de prueba.

EL ARSÉNICO

El arsénico es un elemento ubicuo en la naturaleza y es considerado un carcinógeno ambiental por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC), que además, ha asociado la exposición humana a este metaloide con cáncer broncogénico, cuando la exposición es por inhalación y con cáncer de piel, de vejiga, de hígado y de riñón, cuando la exposición es por ingestión tanto de agua como de alimentos con alto contenido de arsénico (IARC, 1987; Chen y Wang, 1990; Bates y cols., 1992).

Fue el primer metal identificado como un carcinógeno (IARC, 1980) (aunque químicamente es descrito como un metaloide, con propiedades parecidas al fósforo y con toxicidad similar a la de metales pesados como el mercurio y el plomo). Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, en numerosos minerales como los arsenuros de cobre, níquel y hierro, o como sulfuro u óxido de arsénico. Los compuestos metilados que se encuentran en la naturaleza son el resultado de la actividad biológica. El compuesto comercial más importante es el óxido de arsénico (III), que es un producto derivado de la fundición de cobre o hierro (Vahter, 1988). Los compuestos arsenicales son usados principalmente en la agricultura y la silvicultura como pesticidas, herbicidas y silvicidas; se usan pequeñas cantidades en la industria del vidrio y de la cerámica y como aditivo en la alimentación del ganado (WHO, 1981).

Las propiedades de este elemento eran conocidas por los griegos, Hipócrates recomendaba el uso del As_4S_4 para el tratamiento de úlceras. Muchos pueblos europeos utilizaban el arsénico en el alimento del ganado ya que incrementaba el peso. Se recomendaban diferentes soluciones arsenicales como tónico, ya que aumentaban el peso y el vigor de las personas. También se le empleó, ya sea en forma de compuesto inorgánico (solución de Fowler, solución de Donovan) o como organoarsenicales (Salvarsan, Neosalvarsan) para combatir enfermedades como la anemia, la leucemia mielocítica crónica, la psoriasis y el asma bronquial o la sífilis, la disentería amibiana, la tripanosomiasis y la tricomoniasis. En estas aplicaciones clínicas fue en donde se notaron sus efectos adversos, que descontinuaron su uso terapéutico (IARC, 1980). Dentro de estos efectos, la intoxicación aguda presenta dos tipos de manifestaciones diferentes: gastrointestinales (vómito, diarreas y dolores abdominales) y nerviosas (cefalea, crisis convulsivas y pérdida del conocimiento) (Tsuchiya et al., 1977). Las manifestaciones en intoxicaciones crónicas incluyen: neuritis periférica, anemia moderada, leucopenia, problemas cardiovasculares, cirrosis, cáncer hepático primario y hepatobiliar (Díaz-Barriga et al., 1990).

METABOLISMO Y EFECTOS DEL ARSÉNICO

El arsénico se incorpora al organismo por ingestión o por inhalación, ya que la absorción a través de la piel resulta mínima (Vahter, 1988). Cuando se encuentra en solución es más rápidamente incorporado que en estado sólido. Las formas inorgánicas son metabolizadas a través de reacciones de óxido-reducción y metilación (Scott et al., 1994).

El órgano más importante en donde se llevan a cabo las reacciones de metilación es el hígado (Klassen, 1974; Tam et al., 1978; Buchet y Lauwerys, 1985). La reducción de arsénico V⁺ a arsénico III⁺ "in vivo", como reacción preliminar para su metilación se ha demostrado en rata, ratón y conejo (Lerman y Clarkson, 1983; Vahter y Envall, 1983; Vahter y Marafate, 1983). La actividad metilante está localizada en el citosol y el proceso requiere la presencia de glutatión reducido, un pH óptimo entre 7.5 y 8 y la S-adenosilmetionina como donador de metilos "in vivo" (Marafate y Vahter, 1984; Buchet y Lauwerys, 1985). Scott y cols. (1994) han demostrado que el arsénico V⁺ es capaz de oxidar al glutatión reducido con la concomitante reducción del arsenato a arsenito en condiciones de pH similares a las citosólicas.

Los estudios realizados "in vitro" han demostrado que el arsénico tiene actividad clastogénica y comutagénica (Leonard y Lauwerys, 1980; Jacobson-Kram y Montalbano, 1985; Kanematsu et al., 1980; Wan et al., 1982), es decir, que es capaz de dañar al ADN y de aumentar la capacidad mutagénica de una serie de compuestos con actividad genotóxica comprobada, como la luz ultravioleta y la sustancia alquilante metil metano sulfonato (Okui y Fujiwara, 1986; Li y Rossman, 1989). Induce también amplificación génica en proteínas de estrés (Welch, 1992). Inhibe la reparación del daño inducido por la radiación ultravioleta o el metil metano sulfonato (Li y Rossman, 1989; Okui y Fujiwara, 1986).

EXPOSICIÓN AMBIENTAL A ARSÉNICO

En nuestro país existen poblaciones rurales expuestas crónicamente a arsénico inorgánico a través del agua de bebida. Esta exposición se ha asociado con una elevada prevalencia de alteraciones cutáneas y cáncer de piel, aunada a afecciones vasculares periféricas y otras lesiones que disminuyen la calidad y la esperanza de vida (Cebrián, 1983; García-Salcedo y cols., 1984). Estudios similares realizados en Taiwan demostraron que el hidroarsenicismo no sólo se halla asociado a una mayor incidencia de cáncer de piel, sino que también se encuentra incrementada la mortalidad debida a cáncer de vejiga, riñón, pulmón, hígado y colon (Vahter, 1988).

En varios estudios epidemiológicos Nordström y cols. (1978a, 1978b, 1979a, 1979b), encuentran una elevación en la tasa de nacidos muertos y de abortos entre las mujeres que trabajaban o vivían cerca de fundidoras en

Suecia. En Hungría, Börzönyi y cols. (1992) reportan datos similares cuando compararon la frecuencia de nacidos muertos y de abortos entre dos áreas con niveles altos (0.17-0.33 mg/l) y bajos (0.05-0.1 mg/l) de arsénico en el agua de bebida. Por otro lado, se sabe que el 35% de los abortos espontáneos son causados por productos que tienen células con un número cromosómico diferente al diploide (Hassold, 1985).

LAS ANEUPLOIDÍAS

Las células somáticas humanas tienen un número diploide ($2n$) de 46 cromosomas y las células germinales un número haploide (n) de 23. Se define actualmente como aneuploidía al cambio en el número de cromosomas del complemento haploide o diploide (en células germinales o somáticas respectivamente), excluyendo a las células poliploides que presentan números extras de complementos completos ($3n$, $4n$, etc.). Por otro lado se han considerado como heteroploides al conjunto de todas aquellas alteraciones numéricas en los cromosomas. Se ha incluido el término de aneuploidía parcial para describir los casos en los que se presentan deleciones o duplicaciones de alguna región de un cromosoma y que, consecuentemente aumentan o disminuyen la dosis de genes particulares (Salamanca, 1990).

A nivel celular se pueden distinguir una serie de efectos producidos por las aneuploidías, estos incluyen: 1) cambio en la dosis de los genes (pueden ganarse o perderse genes que son reguladores de otros procesos celulares y alterarlos de esta manera), 2) un cambio en el balance de los genes reguladores (del tipo de oncogenes por ejemplo), 3) la expresión fenotípica de alguna mutación recesiva (al perderse el otro alelo, la expresión del primero se vuelve dominante), y 4) un cambio en la estabilidad del genoma (se ha reportado que las células aneuploides tienen una mayor tendencia a perder cromosomas completos o fragmentos de estos en subsecuentes divisiones celulares) (Yunis, 1983).

Se han descrito varios mecanismos por los que pueden producirse células aneuploides y/o poliploides: 1) afectando la polimerización o despolimerización de la tubulina durante el proceso de la formación de microtúbulos y el huso mitótico, 2) dañando elementos esenciales para el funcionamiento de la segregación cromosómica, como los centrómeros y cinetocoros, 3) reduciendo la condensación de los cromosomas y produciendo cromosomas rezagados, 4) dañando los centriolos y produciendo mitosis uni o

multipolares, 5) dañando la membrana nuclear a la cual esta asociada la cromatina, 6) alterando los procesos de citocinesis y no permitir la división del material genético en dos células hijas (Oshimura y Barrett, 1986).

Las sustancias que inducen arresto en mitosis (como el diazepam, el dietilestilbestrol y el colcemid) tienen efectos aneuploidógenos tanto "in vivo" como "in vitro" (Hsu et al., 1983; Liang y Satya-Prakash, 1985; Satya-Prakash et al., 1984; Zijno et al., 1989). Se ha demostrado que varias sustancias con actividad aneugénica tienen también actividad clastogénica, tal como la hidroquinona, y que otros venenos mitóticos no se asocian con este efecto clastogénico, como la colchicina, el econazol, el clorhidrato y el diazepam (Wang-Xu y Adler, 1990).

LAS ANEUPLOIDÍAS Y EL CÁNCER

La investigación en el área de la genética, orientada al estudio de las neoplasias, ha sido fructífera no sólo porque ha permitido importantes avances en el entendimiento del fenómeno de la transformación maligna, sino porque también ha descubierto alteraciones cromosómicas útiles en el diagnóstico y en el pronóstico de las entidades neoplásicas y porque, con el conocimiento reciente acerca de los oncogenes y su funcionamiento, se han abierto perspectivas para la prevención y el tratamiento del cáncer.

Desde los inicios del desarrollo de la citogenética se conoce que los pacientes con anomalías cromosómicas constitucionales presentan elevadas frecuencia de cáncer. Los niños con síndrome de Down (trisomía 21) tienen una frecuencia de leucemia aguda de 10 a 15 veces mayor que la que se presenta en los sujetos normales de la misma edad, también presentan neoplasias reticuloendoteliales, siendo una de las principales causas de muerte en estos individuos; los pacientes con síndrome de Klinefelter tienen frecuencia de cáncer de mama similar a la de las mujeres que no presentan esta enfermedad, pero los pacientes con el síndrome de la disgenesia gonadal mixta, y que presentan un cariotipo 45,X/46,XY o 46,X,dic(Yq) tienen con frecuencia neoplasias del tipo del gonadoblastoma o del disgerminoma (Salamanca, 1990). En los individuos con el síndrome de Turner se presentan varios casos de tumores de la cresta neural. El tumor de Wilms se ha asociado a la presencia de la trisomía del cromosoma 18, y varios retinoblastomas y teratomas a trisomía del cromosoma 13.

Por otra parte, las células malignas muestran, con frecuencia, anomalías del número o de la estructura de los cromosomas. El número modal es el número cromosómico encontrado con mayor frecuencia en la población de células tumorales, y la línea o estirpe celular es la constitución cromosómica más frecuente, teniendo en cuenta tanto alteraciones estructurales como numéricas, esto indica una fuerte asociación del desarrollo y progresión de tumores con alteraciones tanto cualitativas como cuantitativas del genoma.

Es característico encontrar en las células tumorales: aumento o disminución en el número de cromosomas; células pseudodiploides, que son aquellas que contienen un número cromosómico aparentemente normal pero contienen aberraciones estructurales; rompimientos con fracturas, fragmentos acéntricos, cromosomas marcadores, cromosomas diminutos, dicéntricos o en anillo. También suele observarse el fenómeno de la endoreduplicación, cuando los cromosomas se duplican pero no se separan y permanecen unidos por el centrómero (Salamanca, 1990).

Existen datos que indican una fuerte correlación entre la producción de aneuploidias y el desarrollo de neoplasias. Se ha asociado la aneuploidía con eventos primarios de carcinogénesis en algunas neoplasias y como un evento tardío o secundario en otros tumores, de los que podemos encontrar varios ejemplos en la tabla 4.

Se han estudiado varias sustancias carcinogénicas que han demostrado tener actividad aneuploidógena. Los compuestos químicos que afectan tanto a la tubulina como a los microtúbulos producen aneuploidias con gran eficiencia. Ciertos compuestos que son capaces de afectar los grupos sulfhidrilos también inducen aneuploidias. Por ejemplo, el cloruro de metil mercurio, que tiene una gran afinidad por los grupos sulfhidrilos, produce arresto en mitosis en células de mamífero. También existe evidencia de que los grupos sulfhidrilos están involucrados en los procesos de condensación cromosómica (Oshimura y Barrett, 1986) y que pueden inducir cromosomas rezagados que queden fuera de una de las células hijas en la división.

El riesgo a la salud producido por las aneuploidias, en términos de anomalías reproductivas y de desarrollo, ha sido bien reconocido (Hassold, 1985). El papel de los cambios cromosómicos numéricos en la carcinogénesis puede también ser muy importante. Los numerosos ejemplos de cambios cromosómicos numéricos no azarosos en tumores humanos y de

animales implica que tienen un papel biológico importante en la producción y desarrollo de un cáncer.

En los años 70's se estableció que algunos tipos de cáncer humano estaban asociados consistentemente con algunos defectos cromosómicos. En los 80's, el uso de métodos mejorados para cultivar células tumorales y para estudiar cromosomas humanos, han mostrado que los defectos cromosómicos están presentes en la mayoría de las neoplasias y que, estos defectos ocurren con mayor frecuencia en adultos que en niños que desarrollan estas enfermedades (Yunis, 1980).

El hecho de que comúnmente se encuentren duplicaciones o amplificaciones génicas involucradas en el desarrollo de tumores ha indicado que una dosis extra de algunos genes (sobre todo de genes reguladores) puede ser importante en las fases secundarias en los carcinomas (Yunis, 1980).

Se han descrito tumores en los que se presenta un cambio no azaroso en el número de cromosomas. Existe poca evidencia definitiva de estos cambios en tumores sólidos aunque se han reportado algunos casos, la mayoría de las aneuploidías asociadas a procesos cancerosos están descritas en tumores del tipo linfóide (Oshimura y Barrett, 1986), (Tabla 4).

Un número considerable de tumores primarios tienen únicamente cambios numéricos. Recientemente, la trisomía 7 y la monosomía 9 han sido encontradas como el único cambio cariotípico en algunos casos de carcinoma de vejiga (Oshimura y Barrett, 1986).

Se ha sugerido que las aneuploidías y los cambios cromosómicos en general juegan un papel muy importante en las etapas finales de la progresión maligna, también existe evidencia de que la aneuploidía es importante en los procesos de progresión tumoral de algunas neoplasias. Un número considerable de tumores tienen cambios cromosómicos numéricos como el único cambio en el cariotipo no sólo en el cáncer primario sino también en condiciones premalignas (Oshimura y Barrett, 1986).

DETERMINACIÓN DE LAS ANEUPLOIDÍAS

Las pruebas para determinación de la producción de aneuploidías aún no se encuentran bien desarrolladas. Existen varias razones para ello: 1) se necesita invertir mucho tiempo en el conteo de cromosomas, aún más que para el análisis de aberraciones cromosómicas; 2) las preparaciones de cromosomas para análisis citogenético inevitablemente introducen una pérdida artificial de cromosomas al diseminar las metafases que incrementan el nivel basal en el ensayo y, por lo tanto disminuyen su sensibilidad; y 3) aunque se ha dado mucha atención a la no disyunción meiótica, que juega un papel primordial en la generación de aneuploidías constitutivas en el hombre, se le ha puesto poca atención a la inducción de aneuploidías en células somáticas, parcialmente porque los efectos clastogénicos han sido utilizados como indicadores de actividad tanto mutagénica como carcinogénica.

Generalmente se recomienda que los ensayos de aneuploidías se realicen con niveles basales o controles menores al 5% de células aneuploides y que puedan existir pruebas suficientes de la procedencia de un grupo de cromosomas, tales como mantener la misma coloración, condensación, tamaño constante y una distribución espaciada de las células para que los resultados obtenidos en los ensayos no sub- o sobre-estimen el efecto aneuploidógeno de las sustancias (Cimino et al., 1986).

Los sistemas existentes para estudiar aneuploidías en células somáticas de mamíferos están limitados principalmente a ensayos citogenéticos. Este sistema tiene una sensibilidad limitada. Existe una gran necesidad de desarrollar un ensayo genético en el cual se puedan estudiar los efectos aneuploidogénicos de distintos agentes en células de mamífero tanto "in vivo" como "in vitro".

TABLA 4

RELACIÓN ENTRE ANEUPLOIDIAS Y CANCER

Alteración	Cromosoma	Enfermedades asociadas
	1	Cáncer de vejiga
	3	Linfomas, Leucemia linfocítica crónica
	7	Cáncer de colon, linfomas, melanoma
	8	Cáncer de colon, cáncer de vejiga, leucemia mielocítica aguda
	9	Cáncer de vejiga
Trisomías	12	Linfoma, seminoma, leucemia linfocítica crónica
	17	Leucemia mielocítica crónica
	19	Leucemia mielocítica crónica
	21	Leucemia linfocítica aguda
	1q	En una gran variedad
	5p	Cáncer de vejiga
Trisomías Parciales	6p	Melanoma, retinoblastoma
	7q	Melanoma
	12p	Seminoma
	16q	Cáncer de vejiga
	17q	Leucemia mielocítica crónica
	5	Leucemia mielocítica aguda secundaria
	7	Leucemia mielocítica aguda secundaria
Monosomías	16	Retinoblastoma, tumor de Wilms
	17	Retinoblastoma, cáncer de colon
	22	Meningioma
	1p	Neuroblastoma, melanoma, leucemia secundaria
	3p	Pulmón
	6q	Linfoma de Burkitt, melanoma, cáncer de ovarios
	7q	Leucemia linfocítica aguda
Monosomías Parciales	11p	Tumor de Wilms
	11q	Leucemia mielocítica aguda
	13q	Retinoblastoma
	16q	Leucemia mielocítica aguda
	20q	Policitemia

INTERNATIONAL SEMINAR PROCEEDINGS

ARSENIC IN THE ENVIRONMENT AND ITS
INCIDENCE ON HEALTH

May 25 to 29, 1992



150
UNIVERSIDAD DE CHILE
1843-1993

Organizado por:
UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas
Instituto de Desarrollo e Investigación Científica

FALLA DE ORIGEN

GENOTOXIC AND "NON-GENOTOXIC" EFFECTS IN ARSENIC HUMAN EXPOSURE

M.E. GONSEBATT¹, R. MONTERO¹, L. VEGA¹, H. BARBA¹, J. ESPINOSA¹, G. GARCÍA-VARGAS²,
L.M. del RAZO², M.E. CEBRIÁN² and P. OSTROSKY-WEGMAN¹.

ABSTRACT

Two groups of individuals with different exposure by drinking water contaminated with As were studied, searching for genotoxic and "non-genotoxic" markers for human exposure to arsenic (As). Blood and urine samples were collected. Organic arsenic represented 80% of total arsenic excretion, while the remaining was inorganic arsenic. The highly exposed group had higher levels of dimethylated arsenic ($p < 0.05$). The cytogenetic studies performed in whole blood lymphocyte cultures showed a higher although not significant ($p > 0.05$), frequency of complex chromosomal aberrations, and the variation frequency in the HGPRT assay was also not significant. Lymphocyte cycle kinetics and the proportions of polyploid metaphases exhibited significant differences between the groups studied. These observations may show evidence of "nongenotoxic" effects of arsenic human exposure.

Key words: Human monitoring; Arsenic.

INTRODUCTION

Arsenic (As) is a human carcinogen (IARC, 1987). Several studies have shown its "in vitro" mutagenic activity (Jacobson-Kram and Montalbano, 1985), while the information on exposed human subjects is few and contradictory. High frequencies of sister chromatid exchanges (SCE) and chromosomal aberrations (CA) have been reported in individuals exposed to this metal for occupational and medical reasons (Nordenson *et al.*, 1978, 1979; Burdorf *et al.*, 1977; Petres *et al.*, 1977; Wen *et al.*, 1981). Nevertheless there are also negative data (Burdorf *et al.*, 1977; Nordenson *et al.*, 1979). The Environmental Protection Agency (EPA) has considered that these reports have some limitations and therefore the data on As exposure are not conclusive (EPA, 1984).

A study was designed aiming to look for biological markers of arsenic exposure in individuals that drink water with elevated levels of As and that have a high

incidence of cancer and other skin diseases (Cebrián, *et al.*, 1983).

The frequency of SCE, CA and mutations in the hypoxanthine guanine-phosphoribosyltransferase (HGPRT) locus, in peripheral blood lymphocytes from exposed individuals, were evaluated aiming to investigate the genotoxicity of exposure. Additionally, the frequency of hypo and hyperdiploid cells and the lymphocyte proliferation kinetics were scored to look for "nongenotoxic effects". Organic and inorganic arsenic levels in urine were also determined.

MATERIALS AND METHODS

Group selection

11 individuals (9 females and 2 males) from a population with 0.39 mg/L of As in their well-water (98% of it in its pentavalent form and the rest trivalent) were considered as highly exposed individuals, 13

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas, A.P. 70228, UNAM, 04510 México, D.F.

² CUNELSAV, S.A. (México) D.F. (México).

individuals (11 females and 2 males) from a population where As in drinking was 0.060 mg/L were evaluated as a low-exposure group.

For all groups the individuals studied were between 21 and 62 years old.

Data on the clinical state of individuals, the duration of exposure to As via drinking water, smoking and drinking habits, occupational and medical history were obtained by questionnaires and physical examination.

Sampling

Venous and first void urine samples were obtained early in the day, coded and sent by air (approximately 3 h). Blood samples were not refrigerated and upon arrival to the laboratory were rapidly processed to start the lymphocyte cultures and the Hprt assay. Urine samples were stored in plastic bottles at 4°C and protected from light until the analysis was performed.

Determination of As in urine

Urine samples were digested according to Cox (1980). The determinations of organic and inorganic arsenic were made with a Varian AA 175 atomic absorption spectrophotometer equipped with a model 65 vapor generation accessory. All measurements were made using a deuterium background corrector. Freeze-dried urine standard reference material for toxic metals (sam 2670) was analyzed for As and average values within +9% of certified values. Creatinine in urine was measured according to Bounes and Tawassky (1945). As species were determined according to Foa *et al.*, 1984.

Mutagenicity at the Hprt locus

The assay was performed as described elsewhere (Ostrosky-Wegman *et al.*, 1937). Briefly, peripheral blood lymphocytes, separated by Ficoll-Hypaque centrifugation were cryopreserved at -70°C in RPMI 1640 medium with 10% autologous plasma and 7.5% dimethyl sulfoxide, at a cellular density of 10⁷ cells/ml. The cultures for thioquanine (TG) selection were set up after thawing the cells at a density of 5 x 10⁶ cells/ml in RPMI 1640 with 20% autologous plasma, stimulated with PHA and incubated at 37°C for 24 h. BrdU 4 x 10⁻⁴ M final concentration) was added for the last 16 h of culture. Incubation was ended with 0.1M citric acid and cultures were fixed with methanol: acetic acid (7:1.5).

Slides for microscopic evaluation were prepared

and stained by the fluorescence plus Giemsa (FPG) technique (Perry and Wolff, 1974). The label index of control preparations was calculated as follows: LI_c = No. of blue nuclei/5000 evaluated nuclei. In the TG culture preparation, LI_t = No. of blue nuclei (mutants)/total number of nuclei recovered from TG cultures. The VI index is calculated as: LI_t/LI_c.

Cytogenetic studies

Lymphocyte cultures were prepared and harvested at 48 and 72 h as previously reported (Ostrosky-Wegman *et al.*, 1986). Microscopic preparations were stained with the FPG method. The analysis of CA and SCE was performed in 100 consecutive first-division metaphases and in 30 consecutive second divisions metaphases, respectively, all with 46 centromeres. The proportion of polyploid cells and of cells with 44, 45, 46, 47 or 48 chromosomes in 50 consecutive metaphases, was also scored.

The proportion of first, second and third or subsequent (M1, M2 and M3 respectively) metaphases was determined in 100 consecutive mitosis, to carry out the study on proliferation kinetics.

RESULTS

Arsenic levels found in urines are shown in Table 1. The values were corrected in relation to excreted creatinine as a measure of urine concentration. Arsenic excretion by low exposed subjects were on average 10 times lower than those found in highly exposed ones. Dimethylated and methylated arsenic forms constituted in average, in both groups between 70-80% of total arsenic excretion. Highly exposed individuals showed higher proportions of dimethylated arsenic and lower of monomethylated arsenic

Table 1. Arsenic levels speciation in urine samples

	High Exposure	Low Exposure
Arsenic/ creatinine (Ug/ml)	1.565 ± 0.916	0.121 ± 0.090
% Organic Arsenic	83.65 ± 6.07	82.22 ± 9.10
% DM Arsenic	85.70 ± 11.78*	76.48 ± 9.31*
% MM Arsenic	11.30 ± 5.90*	23.51 ± 9.31*
Years of Residence	37.0 (21-62)	34.1 (5-56)

* Chi-square p < 0.05.

DM, dimethylated, MM, monomethylated.

($p < 0.05$), while the percentage of organic arsenic was similar in both groups ($p > 0.05$). 4 highly exposed individuals showed skin lesions such as: hyperkeratosis, hypo- and hyper-pigmentation and skin horns, no skin lesions were found among the lowly exposed. No correlation was found between age, time of residence in the area, skin lesions and excreted As.

The cytogenetic studies revealed no differences

between the frequencies of SCE in both groups (Table 2 A. and B). The types and frequencies of CA are also presented in Table 2. The average percentage of chromosomal aberrations found were similar in the high and the low-exposure groups, nevertheless the frequency of complex chromosomal aberrations like dicentric, rings and translocations, found in the high exposed individuals was 0.73% which is more than four times the percentage found in the low exposed group (0.16%).

Table 2A. Chromosomal aberrations, SCE and Vf in individuals with high exposure

Indiv.	gaps	cr. del.	cr. ex.	cm. del.	\bar{X} SCE \pm S.D.	Vf
1	8	1	1	2	10.5 \pm 3.9	
2	2			1	9.6 \pm 3.9	7.53
3	8		1	1	8.2 \pm 3.8	
4	5				6.5 \pm 2.2	6.99
5	2	2		1	6.5 \pm 2.4	1.66
6	4			1	10.6 \pm 4.1	2.89
7	5	2			7.6 \pm 2.7	
8	4		1	1	7.5 \pm 3.1	9.66
9	4	2	3	5	10.0 \pm 4.2	
10	11	2	2	2	ND	3.28
11	3			2	10.5 \pm 3.2	3.20
%	5.09	0.82	0.73	1.45	8.8 \pm 1.6	5.03 \pm 2.99

Table 2B. Chromosomal aberrations, SCE and Vf in individuals with low exposure

Indiv.	gaps	cr. del.	cr. ex.	cm. del.	cm. ex.	\bar{X} SCE \pm S.D.	Vf
12	4			3		10.5 \pm 3.1	6.36
13	2			1		10.1 \pm 2.4	
14	3					8.0 \pm 2.9	2.25
15	1			1		9.2 \pm 3.1	
16	6	2		1		6.5 \pm 3.1	0.00
17	6	1		3		7.0 \pm 2.3	
18	8	1		2		ND	
19	4					ND	4.57
20	6			1		6.9 \pm 3.0	
21	6	1			1	7.2 \pm 2.5	
22	7	2	1	2	1	9.7 \pm 3.3	1.39
23	8	4	1			16.6 \pm 4.2	1.72
24	1			2		8.2 \pm 3.4	0.68
%	5.11	0.91	0.16	1.32	0.16	9.1 \pm 2.7	2.42 \pm 2.26

cr. del.: chromosome deletion; cr. ex.: chromosome exchanges.
cm. del.: chromatid deletions, cm. ex.: chromatid exchanges.
ND: not determined.

The frequency of lymphocytes resistant to thio-guanine in high exposure subjects was twice as high as that found in low exposure individuals (Table 2), however analysis with the Kruskal-Wallis test showed no significance.

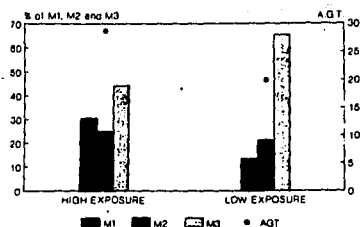
Higher frequencies of polyploid cells were found in the high exposure group ($p < 0.05$) the proportion of hyperdiploid cells also elevated although not significantly ($p > 0.05$) (Table 3).

The analysis of the proportions of M1, M2 and M3 in 48 and 72 h whole blood lymphocyte cultures, showed that there was a higher average percentage of (M1) in the cultures of the high exposure subject, who also had a low proportion of M3. (Figure 1). A chi-square test showed significance $p < 0.05$ at 72 h. The average generation time (AGT) (Ivell and Tice, 1982) was of approximately 19 h for the low exposure group while it was of 28 h for the high exposure group.

DISCUSSION

The exposure to As was determined by measuring As levels in the well water and in the urine of individuals. As concentration in water, for the high exposure group was 8 times higher than the maximum limit recommended by who while the average total As concentration in urine from exposed individuals (Table 1) was 10 times that considered acceptable for non-occupational exposure (WHO, 1981). As the only source of water for these towns is the well water contaminated with As, the duration of residence was considered an accurate measure of chronic exposure (Table 1). Highly exposed individuals showed greater percentages of dimethylated and lower of mono-methylated than the low exposure individuals while the proportion of organic arsenic was similar in both groups. This probably represents a higher capacity

Figure 1. Kinetics of lymphocyte proliferation and A.G.T.



to methylate As due to the chronic exposure to higher doses. Inorganic arsenic represented 20% of total arsenic excretion.

The higher proportion of polyploid cells in the exposed group seems to indicate that As exposure impairs appropriate first cell division and that could result in the slower replication kinetics observed in the lymphocyte cultures from highly exposed individuals.

It has been shown (Gonsebatt *et al.*, this volume) that, *in vitro* inorganic arsenic inhibits lymphocyte stimulation and proliferation, while Walder *et al.*, 1971, reported that immunosuppressed patients developed skin lesions and skin cancer similar to those observed individuals chronically exposed to As (Cebrián *et al.*, 1983; Cebrián, 1987). Thus, chronic As exposure could impair immune cell response, allowing damaged cells in the skin escape immune system surveillance, survive and eventually be transformed in malignant cells.

In conclusion, although some of the individuals

Table 3. Proportions of metaphases with polyploid and aneuploid number of chromosomes

		Number of chromosomes/metaphase					Polyploid
		44	45	46	47	48	
High exposure	M1	0.0690	0.1345	0.7181	0.0600	0.0145	0.0018
	M2	0.0714	0.1349	0.7281	0.0456	0.0079	0.0119*
Low exposure	M1	0.0338	0.1369	0.7861	0.0369	0.0061	0.0030
	M2	0.0615	0.1507	0.7523	0.0338	0.0030	0.0030

* $p < 0.05$.

from the high exposure group showed clinical signs of hydroarsenicism, we could not find a clear genotoxic effect in the parameters studied. "Non genotoxic" mechanism due to As exposure are more evident. Polyploid (quadryploid) second division metaphases are more frequent in the highly exposed group and the cell cycle kinetics delay correlated

with the *in vitro* effects of inorganic arsenic salts on G0-G1 lymphocytes. These facts give evidence for "non genotoxic" mechanisms of action, most likely by inhibiting or interacting with different types of proteins: inhibiting DNA repair (Li and Rossman, 1989), cell division and/or the immunological capacities of individuals.

REFERENCES

- BOURNES, R.W. and H.H. TAWSEY (1945). On the colorimetric determination of creatinine by the Jaffe reaction, *J. Biol. Chem.*, **158**, 581.
- BURDOOP, W., K. KUVYK and J. CERVENKA (1977) Elevated sister chromatid exchange rate in lymphocytes of subjects treated with arsenic, *Hum. Genet.*, **36**, 69-72.
- CERBAN, M.E., A. ALBORNS, M. ACILBAR and E. BLAKELY (1983). Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico, *Hum. Toxicol.*, **2**, 121-133.
- CERBAN, M.E. (1987) Some potential problems in assessing the effects of chronic arsenic exposure in north Mexico. Presented at the American Chemical Society, Division of Environmental Chemistry, 27th Meeting, 27, 114-116.
- COL, D.H. (1980). Arsenic evolution-electrothermal atomic absorption method for the determination of nanogram levels of total arsenic in urine and water, *J. Anal. Toxicol.*, **4**, 207-211.
- CPA (1984). Health Assessment Document for Inorganic Arsenic, Final Report, EPA 600/8-83-021F, Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC.
- FOA, B., COLOMBO, A., MARONI, M., BURATTI, M. and CALZAFERRI, G. (1984). The speciation of the chemical forms of arsenic in the biological monitoring of exposure to inorganic arsenic, *The Science of the Total Environment*, **34**, 241-259.
- GONZALEZ, M.E., L. YAGA, L. HERRERA, R. MONTORO, E. ROSAS, M.E. CERBAN and P. OSTROSKY-WEGMAN (1991). Arsenite and Arsenate inhibit *in vitro* lymphocyte stimulation and proliferation. Seminario Internacional "Presencia de Arsenico en el ambiente y su incidencia en salud". Chile, mayo de 1992.
- IARC (1987). IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans, suppl 7. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- IVETT, J.L. and R.B. TICE (1982). Average generation time: a new method of analysis and quantization of cellular proliferation kinetics, *Environ. Mutagen.*, **4**, 358 (Abstract).
- JACOBSON-KRAM, D. and D. MONTALBANO (1985). The reproductive effects assessment group's report on the mutagenicity of inorganic arsenic, *Environ. Mutagen.*, **7**, 787-804.
- LI, J.-H., and T.G. ROSSMAN (1989). Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis, *Mol. Toxicol.*, **2**, 1-9.
- NORDENSON, I., G. BECKMAN, L. BECKMAN and S. NORDENSON (1978). Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. II. Chromosomal aberrations in workers exposed to arsenic, *Hereditas*, **88**, 47-50.
- NORDENSON, I., S. SALMONSON, E. BLUM and G. BECKMAN (1979). Chromosome aberrations in pyrotic patients treated with arsenic, *Human Genet.*, **48**, 1-8.
- OSTROSKY-WEGMAN, P.R., MONTORO, C., CORTINAS DE NAVA, R. TICE and R. ALBERTINI (1987). The use of bromodeoxyuridine in the human lymphocyte HOPBT somatic CHLAMM assay, *Mutation Res.*, **191**, 211-214.
- OSTROSKY-WEGMAN, P., G. GARCIA, R. MONTORO, B. PINOZ ROMERO, R. ALVAREZ CHACON and C. CORTINAS DE NAVA (1986). Susceptibility to genotoxic effects of nitrosamide in human peripheral lymphocytes exposed *in vitro* and *in vivo*, *Mutation Res.*, **173**, 81-87.
- PEARLY, P. and S. WOLF (1974). New Giemsa Method for differential staining of sister chromatids, *Nature (London)*, **261**, 156.
- PETREI, J., D. BARON and M. HAGERDORN (1977). Effects of arsenic cell metabolism and cell proliferation: cytogenetic and biochemical studies, *Environ. Health Perspect.*, **19**, 223-227.
- WALDER, B.K., M.R. ROBERTSON and J. JEREMY (1971). Skin cancer and immunosuppression, *Lancet*, **ii**, 1282-1283.
- WEN, W.-N., T.-L. LIU, H.-J. CHANG, S. W. WU, L.-L. YAU and K.-Y. JAN (1981). Baseline and sodium arsenite-induced sister chromatid exchanges in cultured lymphocytes from patients with Blackfoot disease and healthy persons, *Hum. Genet.*, **59**, 201-203.
- WHO (1981). *Environmental Health Criteria: Arsenic*, Vol. 19, EHE/WHO, Geneva.

MUTATION RESEARCH ~~LETTERS~~

International Journal on Mutagenesis, Chromosome Breakage and Related Subjects

Dr. J.M. Gentile, Co-Managing Editor
Biology Department
Hope College
Holland, MI 49423-3698, USA
Phone: (616) 394-7714
FAX: (616) 394-7923

Date 10-17-94 Editor Code BJMG MS Number 9424

Title: **Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes in vitro: An individual susceptibility effect**

Authors: **Vega et al**

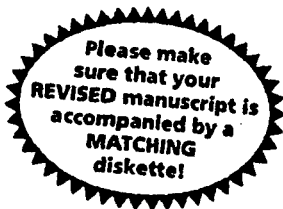
Dear Author(s):

The above paper will be ~~re~~considered for publication in *Mutation Research Letters*, following its revision in accordance with the comments provided by the reviewers (see summary below). We look forward to receiving the revised copy of your manuscript with a point by point explanation of how you have responded to the reviewers' comments.

Summary of Reviewers Comments:

Please see the attached reviews.

Please provide the revised manuscript in hard copy and on a disk. Thank you very much for submitting your work to Mutation Research. We look forward to the receiving the revised manuscript.



Sincerely yours,
for the Editor

**ANEUGENIC EFFECT OF SODIUM ARSENITE ON HUMAN
LYMPHOCYTES "IN VITRO" : AN INDIVIDUAL SUSCEPTIBILITY
EFFECT DETECTED .**

Libia Vega , María E. Gonsebatt , and Patricia Ostrosky-Wegman*.

**Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, A. P. 70228, C.P. 04510,
México D. F., México.**

*** To whom correspondence should be addressed:**

**Instituto de Investigaciones Biomédicas: Apdo. Postal 70228, C. P. 04510.
México, D.F., México.**

Phone number: (905) 622-3846. Fax number: (905) 550-0048.

Summary

Arsenic is a well known carcinogenic environmental pollutant although its mechanism of action remains unknown. Since alterations in chromosome segregation have been observed in individuals exposed to high concentration of arsenic in the drinking water, the aneuploidogenic potential of arsenic was evaluated "in vitro". Whole blood cultures were incubated for 72 hours and treated with various concentrations of sodium arsenite for the last 24 hours. Cells were harvested and samples were processed specially for aneuploidy evaluation. The number of chromosomes in 200 metaphases of first and second division cells were scored. A dose-related effect was observed: the highest concentration (10^{-2} μM) induces a 28.33% and 22.4% of hyperploid cells in first and second division respectively and 29% of tetraploid cells. The colchicine-like effect of arsenic was also evaluated. Mitotic arrest was evaluated in cultures treated for the last two hours. Sodium arsenite can produced a 40.24% and a 12.93% of the colcemid effect (mitotic arrestant effect at 10^{-2} μM and 10^{-10} μM respectively). A different individual susceptibility effect was observed in both parameters and confirmed with the chromosome aberrations levels induced by arsenic in the same donors. Data indicate that sodium arsenite has an aneuploidogenic and a mitotic arrestant effect.

Key Words: Sodium Arsenite, Human Lymphocytes, Aneuploidy, Mitotic Arrest.

INTRODUCTION

Aneuploidy is a deviation from a multiple of the diploid state, that can occur by the presence of an extra chromosome or chromosome segment or by its absence (Hook, 1985). This abnormal distribution of the genetic material among daughter cells is associated with 35% of human spontaneous abortions and has been also observed in association with malignant transformation events (Hassold, 1985; Conti et al., 1986; Oshimura and Barrett, 1986). Environmental exposure to aneuploid agents is therefore of concern.

Chemicals that interfere with the polymerization of tubulin by binding to the sulfhydryl residues of the protein molecules induce mitotic arrest and aneuploidy in laboratory test systems (Hsu and Satya-Prakash, 1985; Liang and Brinkley, 1985). Some of these agents are of environmental importance such as some herbicides, fungicides and organic solvents (Liang and Brinkley, 1985).

Arsenic is a carcinogenic environmental pollutant (IARC, 1987). It is generally thought that the toxicity of arsenic is due to inhibition of critical sulfhydryl containing enzymes by trivalent arsenic (Squibb and Fowler, 1983). Arsenite (As III), the trivalent form of inorganic arsenic has a high affinity for protein sulfhydryl groups (Vahter, 1988). Altered cytoskeletal structures were observed in 3T3 cells treated with arsenite (Chou, 1989). The fluorescently-tagged antikinetochores antibody technique, revealed that arsenite-treated human lymphocytes showed a significant clastogenic activity and an increase of nuclei with more than the two expected (diploid) hybridization regions, suggesting that the trivalent arsenic could also induce chromosome-unbalanced cells (Eastmond and Tucker, 1989).

A chromosome aberration analysis performed in peripheral blood lymphocyte cultures from individuals environmentally exposed to arsenic, revealed a high proportion of polyploid second division cells (Gonsebatt et al., 1992). Since this observation could be the result of arsenic affecting anaphase spindle movement we investigate the potential aneugenic and polyploidogenic (heteroploidogenic) effect of sodium arsenite in human lymphocytes, using bromodeoxyuridine to differentiate first from second division metaphases, and a modified cytogenetic harvesting technique to avoid chromosome loss.

MATERIALS AND METHODS

Two types of experiments were conducted: One experimental protocol was designed to investigate if sodium arsenite could induce aneuploid and/or polyploid cells in actively proliferating lymphocytes, the other was designed to evaluate the induction of mitotic arrest (cytostatic effect). Sodium arsenite (NaAsO_2) obtained from Sigma, was dissolved in sterilized culture medium. Each donor was sampled twice, data reported represent the mean of both experiments.

Aneugenic effect

Peripheral blood was obtained from healthy donors (two males aged 28 and two females aged 23 and 36). Donors did not take any drug for at least one week before sampling. Duplicate 72 hour lymphocyte cultures were started as follows: 0.5 ml of blood in 6 ml of RPMI culture medium supplemented with 1% of L-glutamine and non-essential amino acids (Gibco), $32 \mu\text{M}$ of bromodeoxyuridine (Sigma) and 0.2 ml of phytohemagglutinin (PHA) (Gibco). Cultures were incubated for 72 h at 37°C with exposure to arsenite for the last 24 h before harvesting. The doses tested ranged from 1 to $10^{-10} \mu\text{M}$. Culture media and colcemid $10^{-2} \mu\text{M}$ were used as negative and positive controls, respectively.

Harvesting and scoring.

Two hours before harvesting 0.2 ml of colcemid (Gibco) was added to each culture and incubated for 2 h at 37°C . Cells were centrifuged at $300 \times g$ for 10 min. After the supernatant was removed, the cells were placed in a hypotonic solution: KCl 0.1M (Dauford, 1984) at 37°C during 10 min. Cells were then fixed and washed with chilled methanol-acetic acid 3:1. Slides were prepared specially for aneuploidy scoring, dropping the cells gently on the microscope slides, air dried at room temperature and stained by the Perry and Wolff (1974) method.

200 metaphases at first and second division, respectively, were analyzed to determine the frequency of heteroploid cells, classifying them as hypoploids (when less than 46 chromosomes were present), hyperploids (when more than

46 chromosomes were present) and tetraploids (when approximately 92 chromosomes were present).

Mitotic arrest

To investigate the induction of mitotic arrest by arsenite, whole blood lymphocyte cultures from 5 healthy donors (two males and three females, 4 of them were the same donors as before) were treated with sodium arsenite (same concentrations as before) for the last two hours of culture. Culture media and colcemid 10^{-2} μ M were used as negative and positive controls, respectively.

Harvesting and scoring.

At 72 h, cells were centrifuged (300 x g) for 10 min. After the supernatant was removed, the cells were placed in a hypotonic solution (KCl 0.075M at 37°C) for 30 min. Cells were fixed and washed with methanol-acetic acid 3:1. Slides were prepared and stained as described elsewhere (Gonsebatt et al., 1992b). The proportion of mitotic arrested cells was determined by scoring the mitotic index (MI), as the number of metaphases in 5000 mononuclear cells at least, using the following formula: M.I. = Number of metaphases/ Total number of nuclei scored.

Data obtained with colcemid treatment was taken as 100% of accumulated metaphases for each individual and data obtained with arsenic treatments and control was compared to this value.

Chromosomal structural aberrations

Chromosomal structural aberrations induced by 10^{-2} μ M of arsenic were analyzed in 100 first division metaphases with 46 centromeres, for each individual. The types of aberrations scored were: (a) Breaks. Defined either as those discontinuities in the DNA chain which are larger than the thickness of the chromatid or as a displaced piece. (b) Rearrangements. Included in this group are both chromatid-type figures, characterized by the abnormal arrangement of the arms of one or several chromatids which form multiradial configurations, and inter-chromosomal rearrangements resulting in rings and dicentric. (c) Multifragmentations. This group is comprised of cells in which

more than 10 breaks were observed. (d). Pulverizations. Included in this group are cells in which all of the chromosomes are fragmented.

Statistical analysis

An heterogeneity χ^2 test was used to compare the response of all the individuals among them on the three parameters scored in this study (heteroploid cells, cytostatic effect, and chromosomal structural aberrations). The proportions of heteroploidy and cytostaticity were compared using a Student's "t" test, both at a $P < 0.05$. A variance analysis (three way ANOVA) was used to compare individuals considering all parameters together with a $P < 0.05$. This analysis showed that the individuals maintained the same behavior through all parameters in all the concentrations employed except in the positive control (colcemid $10^{-2} \mu\text{M}$). Increments in all parameters kept the same proportion in the 3 parameters evaluated within all individuals, and the susceptible individual always had a higher proportion than the others in all parameters analyzed.

RESULTS

As shown in tables 1 and 2, arsenite induced hypoploidy, hyperploidy and polyploidy in first and second division cells in all four donors. The frequency of heteroploid cells observed in controls ranged between 4.5 and 5% in first division cells (Table 1), and between 4.5 and 7.5 % in second division cells (Table 2). $10^{-4} \mu\text{M}$ of trivalent arsenic induced similar frequencies of hyperploid and tetraploid cells as those observed in the positive control, and more heteroploid cells than colcemid at the same concentration ($10^{-2} \mu\text{M}$). No effect was observed in two individuals with the lowest dose employed ($10^{-10} \mu\text{M}$).

The frequency of aneuploid first division cells ($y = 2.91(x) + 43.78$, $r^2 = 0.57$) presents the same trend as the frequency of aneuploid second division cells ($y = 3.86(x) + 61.11$, $r^2 = 0.68$) when compared to the dose (Figure 1), levels of heteroploidy in second division cells are higher due to induction of tetraploid cells (Student's "t", $P < 0.05$). As the statistical analysis showed there was an individual that had a different behavior with respect to the sodium arsenite induction of heteroploidy (individual 1) (χ^2 , $P < 0.05$). This donor had

higher levels of aneuploidy and polyploidy induction with the highest doses ($P < 0.05$).

Table 3 shows the mitotic indexes obtained when sodium arsenite was evaluated as a mitotic arrestant. A dose-response effect was observed in each individual (Figure 2) (Student's "t", $P < 0.05$). Chromosomes obtained from arsenic and colcemid treated cultures had the same condensed appearance. Donor one, the most sensitive individual ($P < 0.05$) showed 83% of the effect induced by colcemid at a dose of 10^{-2} μM , while the others had about 30% of the colcemid effect. Arsenic showed less mitotic arrestant effect than colcemid at the same concentration (Table 3).

1 μM of sodium arsenite was very toxic in all experiments even when it was present in the cultures for just two hours. No scorable metaphases were recovered from cultures treated with 1 μM of sodium arsenite.

Chromosomal aberrations scored at 10^{-2} μM of sodium arsenite treatment (Figure 3), supported the data on the different individual susceptibility between the donors of this study. The sensitive individual (1, $P < 0.05$) had a 66% of cells with aberrations and a total of 118 chromosome aberrations in 100 cells analyzed. The most frequent types of damage found were chromatid breaks and cells with multiple chromosome and chromatid breaks. The other donors had about 30% of aberrant cells and a mean of 53 chromosome aberrations in 100 cells. Donor number 1 showed again increased sensitivity (χ^2 for heterogeneity test, $P < 0.05$) with respect to the evaluation of chromosomal structural aberrations (Figure 3).

DISCUSSION

The treatment of proliferating human lymphocytes with sodium arsenite resulted in the induction of aneuploid and polyploid cells. These results are in agreement with the aneuploidogenic effect observed in arsenite-treated human lymphocytes by Eastmond and Tucker (1989). The classical method of counting chromosomes at metaphase results more powerful than the analysis with fluorescently-tagged antikinetochores antibody or FISH techniques, it gives more information, although it is more laborious. Baseline levels around 5% of aneuploid cells were obtained in this study as Cimino et al. (1986) have suggested for "in vitro" testing of aneugenic agents.

There are several mechanisms of aneuploidy induction involving centromeres, kinetochores and proteins of the mitotic spindle (Galloway and Ivett, 1986, Cimino et al., 1986, Barrett et al., 1987). Arsenite affinity for sulfhydryl groups of proteins is well characterized (Vahter, 1988). Liang and Brinkley (1985), reported that compounds that bind to sulfhydryl residues of tubulins and prevent polymerization also induce mitotic arrest. This effect might explain the mitotic arrest induced by As III and the higher frequencies of second division polyploid cells that might originate from disruption of the mitotic spindle and the chromosome migration to the cell poles at the end of the first "in vitro" cell division.

Arsenite induced higher frequencies of chromosome unbalanced cells than colcemid at the same molar concentration, nevertheless colcemid was more effective when we compared the mitotic arrestant capacity. This could indicate that the mitotic spindle inhibition is not complete, or that arsenic has a distinct mechanism of action compared to colcemid.

The differences found in the individual susceptibility could be due to differences in metabolism of the arsenical salts. It is known that some individuals have different capacity of drugs biotransformation (Wiencke and Yager, 1992; Ostrosky-Wegman et al., 1986). Many of these differences are at the genetic level and related to the enzymatic capacity of detoxification.

The exposure of human lymphocytes to arsenite concentrations similar to those observed in the blood of exposed individuals (approximately 1×10^{-6} μM) (Vahter, 1988) induced chromosome unbalanced cells. There is evidence that arsenite (100 μM) altered cytoskeletal structures in 3T3 cells (Chou, 1989), while dimethylarsenic acid (200 μM) induced polyploid V79 cells (Endo et al., 1992). The aneugenic capacity of arsenic salts could be one of the mechanisms by which exposure to this metalloid exerts its co-mutagenic and/or co-carcinogenic effect (Barrett et al., 1989 and Rossman et al., 1986).

TABLE 1. PERCENT OF HETEROPLOIDIES IN FIRST DIVISION CELLS.

DONOR	TREATMENT	% HYPOP.	% 2N	% HYPER.	% 4N	
1	COLCEMID	10.0	82.5	7.5	0	
2		9.0	84.0	7.0	0	
3		10.5	83.0	6.5	0	
4		7.0	90.5	2.5	0	
	X \pm s.e.	9.1 \pm 1.34	85 \pm 3.22	5.8 \pm 1.98	0	
1	As III+ 10 ⁻² μ M	24.0	49.5	28.0	0.5	*
2		20.0	60.5	8.5	1.0	
3		6.5	86.0	6.0	0	
4		15.0	74.5	10.0	0.5	
	X \pm s.e.	16.3 \pm 6.53	67.6 \pm 13.83	13.1 \pm 8.71	0.5 \pm 0.35	**
1	As III+ 10 ⁻⁴ μ M	27.0	67.0	6.0	0	*
2		18.0	71.0	6.0	0	
3		12.0	83.5	4.5	0	
4		12.5	80.0	7.5	0	
	X \pm s.e.	17.4 \pm 6.03	75.4 \pm 6.64	6 \pm 1.06	0	**
1	As III+ 10 ⁻⁶ μ M	17.5	71.0	6.5	0	*
2		7.0	88.5	4.5	0	
3		10.0	86.5	3.5	0	
4		10.0	85.0	5.0	0	
	X \pm s.e.	11.1 \pm 3.88	82.7 \pm 6.89	4.9 \pm 1.08	0	**
1	As III+ 10 ⁻⁸ μ M	10.0	85.0	5.0	0	*
2		5.0	93.5	1.5	0	
3		8.0	90.0	2.0	0	
4		7.5	90.5	2.0	0	
	X \pm s.e.	7.7 \pm 1.78	89.7 \pm 3.05	2.6 \pm 1.38	0	**
1	As III+ 10 ⁻¹⁰ μ M	6.0	92.5	1.5	0	
2		5.5	92.5	2.0	0	
3		6.5	92.0	1.5	0	
4		7.5	91.0	1.5	0	
	X \pm s.e.	6.4 \pm 0.74	92 \pm 0.61	1.6 \pm 0.21	0	**
1	CULTURE MEDIUM	5.0	95.0	0	0	
2		4.0	95.5	0.5	0	
3		4.0	95.5	0.5	0	
4		5.0	95.0	0	0	
	X \pm s.e.	4.5 \pm 0.5	95.2 \pm 0.25	0.25 \pm 0.25	0	

*non-homogeneous values on heteroploidy data, **P<0.05 (student's "t" test), s.e.: standard error, %HYPOP.: percent of hypoploid cells, %HYPER.: percent of hyperploid cells.

TABLE 2. PERCENT OF HETEROPLOIDIES IN SECOND DIVISION CELLS.

DONOR	TREATMENT	%HYPOP.	% 2N	%HYPER.	% 4N	
1	COLCEMID	10.0	78.5	7.5	9.0	
2		12.0	73.0	9.0	6.0	
3		9.0	71.0	8.0	12.0	
4		6.5	83.0	5.0	10.5	
	X±s.e.	9.3±1.98	76.3±4.71	7.3±1.47	9.3±2.22	
1	As III+ 10 ⁻² μM	24.5	49.5	11.5	28.5	*
2		18.5	66.5	9.0	7.5	
3		6.5	73.0	13.0	7.5	
4		16.5	61.0	13.5	9.0	
	X±s.e.	16.5±6.48	62.5±8.62	11.7±1.75	13.2±8.9	**
1	As III+ 10 ⁻⁴ μM	23.0	56.0	12.5	8.5	*
2		19.5	65.0	7.0	8.5	
3		14.0	61.5	12.0	12.5	
4		15.0	66.0	11.5	7.5	
	X±s.e.	17.8±3.61	62.1±3.91	10.8±2.19	9.3±1.92	**
1	As III+ 10 ⁻⁶ μM	12.5	70.0	10.0	7.5	*
2		8.0	79.5	7.5	5.0	
3		14.0	69.5	9.0	7.5	
4		12.5	75.0	7.5	5.0	
	X±s.e.	11.7±2.25	73.5±4.08	8.5±1.06	6.25±1.25	**
1	As III+ 10 ⁻⁸ μM	10.0	77.5	7.5	5.0	*
2		4.0	83.0	6.5	7.5	
3		9.5	82.0	4.0	4.5	
4		10.0	81.5	5.0	3.5	
	X±s.e.	8.4±2.53	81±2.09	5.7±1.35	5.1±1.47	**
1	As III+ 10 ⁻¹⁰ μM	5.0	93.5	1.5	1.0	
2		4.0	90.0	2.5	3.5	
3		8.0	86.5	3.0	2.5	
4		7.5	89.5	2.0	1.5	
	X±s.e.	6.1±1.67	89.9±2.48	2.3±0.56	2.1±0.96	**
1	CULTURE MEDIUM	5.5	93.5	0.5	0.5	
2		7.0	91.5	0	0.5	
3		3.5	94.0	1.0	1.5	
4		5.5	94.0	0.5	0.5	
	X±s.e.	5.4±1.24	93.2±1.03	0.5±0.35	0.7±0.43	

*non-homogeneous values on heteroploidy data, **P<0.05 (student's "t" test), s.e.: standard error, %HYPOP.: percent of hypoploid cells, %HYPER.: percent of hyperploid cells.

TABLE 3. MITOTIC ARRESTANT EFFECT OF SODIUM ARSENITE.

DONOR	TREATMENT	M. I.	% MIT. ARR.	
1		0,043	100	
2		0,0332	100	
3		0,0424	100	
4	COLCEMID	0,0668	100	
5		0,0807	100	
1		0,0002	0,58	
2		0,001	3,01	
3		0,0007	1,77	
4	AS III+	0,0007	1,05	
5	1 μM	0,0007	0,86	
1		0,0358	83,18	*
2		0,0072	21,81	*
3		0,0187	44,29	*
4	AS III+	0,0185	27,72	*
5	10⁻³ μM	0,0195	24,21	*
1		0,145	33,67	*
2		0,0062	18,8	*
3		0,0093	22,01	*
4	AS III+	0,0205	30,31	*
5	10⁻³ μM	0,015	18,57	*
1		0,011	25,55	*
2		0,0075	22,56	*
3		0,008	18,87	*
4	AS III+	0,0182	27,32	*
5	10⁻⁴ μM	0,009	11,14	*
1		0,008	18,58	*
2		0,0055	16,54	*
3		0,006	14,15	*
4	AS III+	0,0162	24,28	*
5	10⁻³ μM	0,007	8,67	*
1		0,005	11,61	*
2		0,005	15,04	*
3		0,0053	12,57	*
4	AS III+	0,0145	21,71	*
5	10⁻¹⁰ μM	0,003	3,71	*
1		0,0006	1,53	
2		0,0014	4,21	
3		0,0008	2,08	
4	CULTURE	0,002	3,01	
5	MEDIUM	0,0024	3,07	

*P < 0.001 (student's "t" test), M.I.: mitotic index, %MIT.ARR.: percent of the mitotic arrestant effect, this was calculated taking the mitotic index values of colcemid treated cultures as 100% for each individual and comparing data to this value.

FIGURE 1

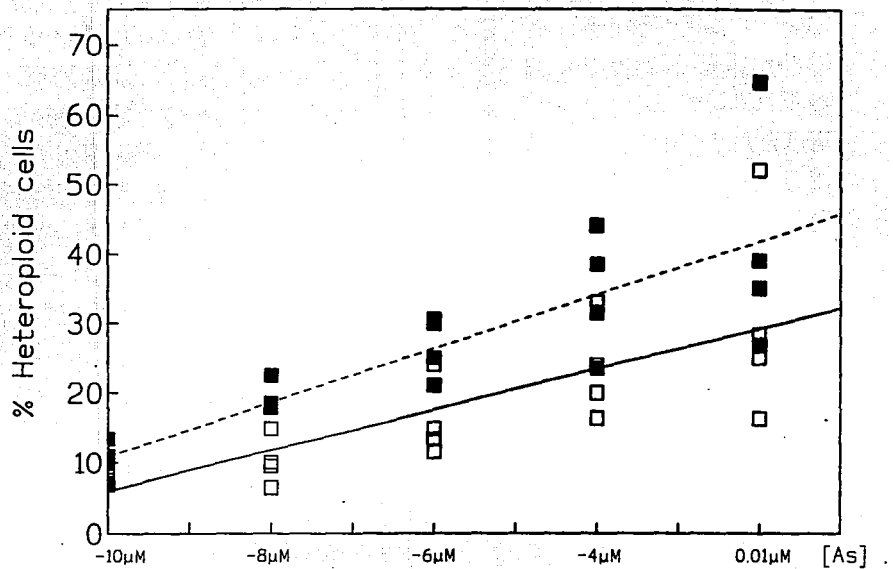


FIGURE 2

MITOTIC ARRESTANT EFFECT OF SODIUM ARSENITE

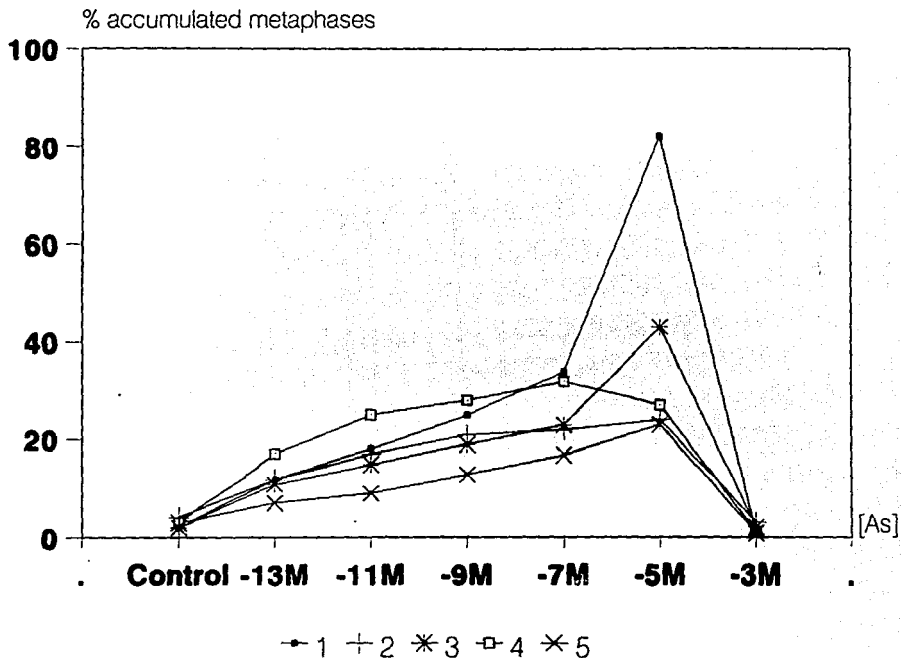
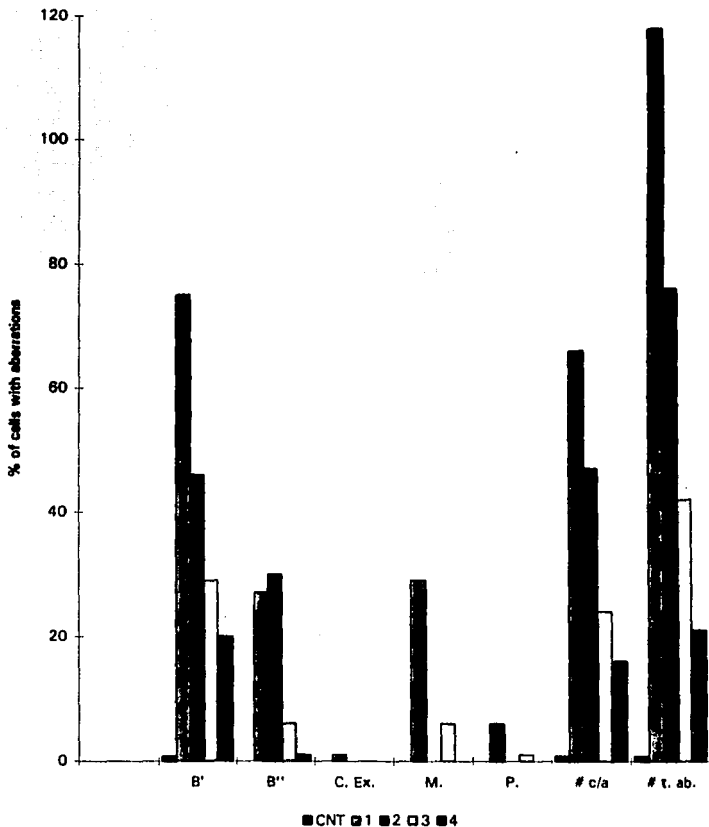


FIGURE 3

Chromosomal Aberrations produced by Sodium Arsenite



CNT: average control of four individuals, B': single break, B'': isobreak, C. Ex.: chromosomal exchange, M: multifragmented cells, P: Pulverized cells, # c/a: number of cells with aberrations, # t. ab: total aberrations scored. 1,2,3,4: individuals.

FIGURE 1. Linear regression of heteroploidies in first and second division cells.

X axis: log. μ molar concentration (1×10^6). ■ first division cells, $r=0.75$, $p=0.0001$ ($y=2.91(x)+43.78$, $r^2=0.57$). □ second division cells, $r=0.82$, $p=0.0001$ cells ($y=3.86(x)+61.11$, $r^2=0.68$).

FIGURE 2. Mitotic arrestant effect of sodium arsenite.

Mitotic Index determined by number of metaphases in 5000 nuclei scored. Mitotic Index in colcemid treated cultures ($1 \times 10^{-2} \mu\text{M}$) was taken as 100% of effect for each individual, mean of two experiments, +: semi standar deviation, X axis: log. μ molar concentration (1×10^6).

FIGURE 3. Chromosomal aberrations induced by Sodium Arsenite ($1 \times 10^{-2} \mu\text{M}$).

CNT: average control of four individuals, B': single break, B'': isobreak, C.Ex: chromosomal exchange, M: multfragmented cells, P: pulverized cells, #c/a: number of cells with aberrations, #t.ab: total aberrations scored, 1,2,3,4: individuals, mean of two experiments.

REFERENCES

- Barrett, J., M. Oshimura, N. Tanaka, and T. Tsutsui (1987) Genetic and epigenetic mechanisms of presumed nongenotoxic carcinogens. In: Butterworth B., and Slaga T., (Eds.), Banbury Report, 25; Nongenotoxic mechanisms in carcinogenesis, Cold Spring Harbor, NY, pp: 311-324.
- Barrett, J., P. Lamb, T. Wang, and T. Lee (1989) Mechanisms of arsenic-induced cell transformation, *Biol. Trace Element Res.*, 21: 421-429.
- Chou I. (1989) Distinct cytoskeletal injuries induced by As, Cd, Co, Cr and Ni compounds, *Biomed. Environ. Sci.*, 2: 358-365.
- Cimino M., R. Tice, and J. Liang (1986) Aneuploidy in mammalian somatic cells "in vivo", *Mutat. Res.*, 167: 107-122.
- Conti C., C. Aldaz, J. O'Connell, A. Klein-Szanto, and T. Slaga (1986) Aneuploidy, an early event in mouse skin tumor development, *Carcinogenesis*, 7: 1845-1848.
- Dauford N. (1984) Measurements of levels of aneuploidy in mammalian cells using a modified hypotonic treatment, *Mutat. Res.*, 139: 127-132.
- Eastmond D., and J. Tucker (1989) Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutag.*, 13: 34-43.
- Endo G., K. Kuroda, A. Okamoto, and S. Horiguchi (1992) Dimethylarsenic acid induces tetraploids in chinese hamster cells, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 48: 131-137.
- Galloway S., and J. Ivett (1986) Chemically-induced aneuploidy in mammalian cells in culture, *Mutat. Res.*, 167: 89-106.
- Gonsebatt M. E., R. Montero, L. Vega, H. Barba, J. Espinosa, G. García-Vargas, L. del Razo, M.E. Cebrián, and P. Ostrosky-Wegman (1992)

- Genotoxic and non-genotoxic effects in arsenic human exposure, Arsenic in the environment and its incidence on health, Chile University, pp: 9-14.
- Gonsebatt M. E., L. Vega, L. A. Herrera, R. Montero, E. Rojas, M.E. Cebrián, and P. Ostrosky-Wegman (1992b) Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation. *Mutat. Res.*, 283: 91-95.
- Hassold T. (1985) The origin of aneuploidy in humans. In: Dellarco, Voytek, and Hollaender (Eds.), *Aneuploidy*, Plenum Press, pp: 103-115.
- Hook E. (1985) Maternal age, parental age, and human chromosome abnormality: nature, magnitude, etiology and mechanisms of effects. In: Dellarco, Voytek, and Hollaender (Eds.), *Aneuploidy*, Plenum Press, pp: 117-131.
- Hsu T., and K. Satya-Prakash (1985) Aneuploidy induction by mitotic arrestants in animal cell systems: possible mechanisms. In: Dellarco, Voytek, and Hollaender (Eds.), *Aneuploidy*, Plenum Press, pp: 279-289.
- International Agency for Research on Cancer (1987) Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Lyon, France, Supplement 6: 71-76.
- Liang J., and B. Brinkley (1985) Chemical probes and possible targets for the induction of aneuploidy. In: Dellarco, Voytek, and Hollaender (Eds.), *Aneuploidy*, Plenum Press, pp:491-506.
- Oshimura M., and C. Barrett (1986) Chemically induced aneuploidy in mammalian cells: mechanisms and biological significance in cancer, *Environ. Mutagen.*, 8: 129-159.
- Ostrosky-Wegman P., G. García, R. Montero, B. Pérez-Romero, R. Alvarez-Chacón, and C. Cortinas de Nava (1986) Susceptibility to genotoxic effects of niclosamide in human peripheral lymphocytes exposed in vitro and in vivo, *Mutat. Res.*, 173: 81-87.

- Perry P., and S. Wolff (1974) New Giemsa method for differential staining of sister chromatid. *Nature*, 261: 156.
- Rossmann T., M. Molina, and C. Klein (1986) Comutagens in *E. coli* and Chinese hamster cells with special attention to arsenite. *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part A: Basic Principles and Mechanisms of Action*. Alan R. Liss. pp: 403-408.
- Squibb K., and B. Fowler (1983) The toxicity of arsenic and its compounds. In: Fowler B., (Ed.), *Biological and Environmental Effects of Arsenic*, Elsevier, New York, pp: 233-269.
- Vahter M. E. (1988) Arsenic. In: Clarkson T., Friberg L., Nordberg G., Sager P., (Eds.), *Biological Monitoring of Toxic Metals*, Plenum, New York, pp: 303-321.
- Wiencke J., and J. Yager (1992) Specificity of arsenite on potentiating cytogenetic damage induced by the DNA crosslinking agent diepoxybutane, *Environ. Mol. Mutagen.*, 19: 195-200.

DISCUSIÓN GENERAL

En linfocitos humanos tratados con arsenito de sodio, y utilizando anticuerpos anticinetocoros para marcar células con micronúcleos, Eastmond y Tucker (1989) mostraron que este compuesto tenía una actividad predominantemente clastogénica (rompimiento de cromosomas), aunque también inducía micronúcleos con cinetocoros. Ya que esto puede implicar una capacidad aneuploidogénica y, debido a que se encontró en un estudio piloto realizado en la región de la Comarca Lagunera en México (Ostrosky-Wegman et al., 1991), que la exposición a altas concentraciones de arsénico en el agua de bebida inducía células poliploides "in vivo" (Gonsebatt et al., 1992, anexo I), el objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial aneuploidogénico del arsenito de sodio.

Los datos obtenidos en el presente estudio muestran que el tratamiento "in vitro" de linfocitos humanos en proliferación con arsenito de sodio, produce células tanto aneuploides (con un número de cromosomas distinto al normal, 46) como poliploides (células con el doble o triple del número cromosómico normal).

Utilizando el método tradicional se obtiene mayor información y resulta ser más sensible en cuanto a las dosis que se pueden utilizar, aunque es más laborioso y requiere de un adiestramiento más prolongado para su evaluación.

Los niveles basales de aneuploidías obtenidos en este estudio se encuentran alrededor del 5%, tal como Cimino y cols. (1986) han sugerido para pruebas de agentes aneugénicos en estudios "in vitro" con células humanas.

Existen varios mecanismos propuestos para la inducción de células aneuploides y poliploides, estos mecanismos involucran a los centrómeros, los cinetocoros, las proteínas del huso mitótico y el bloqueo de la citocinesis celular (Barrett et al., 1987; Cimino et al., 1986; Galloway and Ivett, 1986). Liang y Brinkley (1985) han reportado que los compuestos que son capaces de interactuar y unirse a los residuos sulfhidrílicos de muchas proteínas, pueden también unirse a los de la tubulina y, de esta manera, prevenir o alterar su polimerización (necesaria para la constitución del huso mitótico y la

segregación de los cromosomas en la división celular), induciendo así, aneuploidías y arresto mitótico.

Puesto que la afinidad del arsénico por los grupos sulfhidrilos está bien caracterizada (Vahter, 1988), este mecanismo puede explicar el efecto de arresto mitótico producido por el arsenito de sodio y también, la alta frecuencia de células poliploides en segunda división, éstas se pueden originar debido a la alteración del huso mitótico y la migración de los cromosomas hacia los polos celulares al final de la primera división "in vitro".

El arsenito de sodio indujo una frecuencia de células aneuploides (tanto hipoploides como hiperploides) y poliploides mayor que el colcemid con la misma concentración molar ($1 \times 10^{-2} \mu\text{M}$). Por otro lado, el colcemid fue más efectivo que el arsenito de sodio en inducir arresto mitótico (40% del efecto del colcemid). El hecho de no encontrar la misma proporción entre los dos diferentes efectos con estas sustancias puede indicar que la inhibición de la formación del huso mitótico, por parte del arsenito de sodio, no es completa o, que el arsénico tiene un mecanismo de acción diferente del colcemid en la producción de estos efectos.

Se sabe que el colcemid se une fuertemente a un sitio en el dímero de tubulina que no está expuesto cuando el dímero se encuentra ya ensamblado formando microtúbulos y, que por lo tanto, bloquea la elongación de los microtúbulos para formar el huso mitótico, pero no lo altera una vez formado (Salmon et al., 1984).

Las diferencias encontradas en la susceptibilidad individual pueden deberse a diferencias en el metabolismo de las sales arsenicales o de la biodisponibilidad del compuesto, ya que se conoce que el arsénico puede unirse a otras proteínas presentes en el suero de los individuos (reduciéndose de esta manera la concentración efectiva de arsenito de sodio que puede interactuar con los linfocitos), puede unirse a otras células presentes en la sangre (como a los eritrocitos, por ejemplo), o puede simplemente deberse a diferencias en la eficiencia de detoxificación celular (puesto que el arsénico puede ser secuestrado por enzimas y proteínas y eliminado de la célula).

Dentro de los mecanismos de eliminación del arsénico se encuentra la vía del glutatión, y la capacidad de producción y reciclaje de esta proteína se encuentra directamente relacionada con la eficiencia en la eliminación de los compuestos. Muchas de estas diferencias están a nivel genético y se relacionan con la capacidad enzimática de detoxificación celular y de recuperación de los tejidos.

Se sabe que los individuos tienen diferente capacidad para biotransformar drogas (González y Gelboin, 1993; Nebert, 1989; Elizondo et al., 1994) y que pueden tener, al mismo tiempo, una distinta capacidad de eliminación, excreción y acumulación de sustancias. En algunos estudios de mutagenicidad "in vitro" se han reportado diferencias en la sensibilidad de los individuos estudiados.

Ostrosky-Wegman y cols. (1986) reportaron que, en un estudio sobre la genotoxicidad de la niclosamina en pacientes tratados "in vivo", en tres de estos se produjo una elevación en la cantidad de aberraciones cromosómicas después del tratamiento en tanto que en otros dos pacientes no cambiaron los niveles basales de aberraciones cromosómicas detectados. Además se observó que en tratamientos "in vitro" de linfocitos humanos con esta droga, el 50% de los individuos estudiados tuvieron un incremento en la inducción de aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas y el otro 50% no sufrió cambio en los niveles basales de estos dos parámetros.

Por otro lado Elizondo y cols. (1994) han reportado una clara diferencia en la susceptibilidad individual en pacientes tratados con metronidazol. En este estudio se encontró que el 25% de los individuos estudiados presentaban un incremento en el índice mitótico y el 83% de los individuos presentaban una cinética de proliferación más acelerada. Wiencke y Yager (1992) han reportado una diferente susceptibilidad al efecto sinérgico del arsénico y el diepoxibutano.

La exposición de linfocitos humanos a arsénico en concentraciones similares a las que se presentan en la sangre de individuos ambientalmente expuestos, aproximadamente $1 \times 10^{-6} \mu\text{M}$ (Vahter, 1988), induce células aneuploides. Existe evidencia de que el arsenito de sodio, a concentraciones de $100 \mu\text{M}$, puede alterar la estructura y función del citoesqueleto en células

3T3 (Chou, 1989), y de que el ácido dimetilarsénico ($200\mu\text{M}$), que es uno de los compuestos de excreción en individuos expuestos, induce células poliploides en células V79 (Endo et al., 1992).

El hecho de encontrar frecuencias de abortos espontáneos más elevadas en mujeres que estuvieron expuestas, tanto ambiental como ocupacionalmente, a altas dosis de arsénico (Nordström et al., 1978a; 1978b; 1979a; 1979b; Börzönyi et al., 1992), puede ser otro indicador de que se generan productos con información genética de más o faltante (Hassold, 1986).

La capacidad aneugénica de las sales de arsénico puede ser uno de los mecanismos por los cuales este metaloide produce un efecto co-mutagénico y co-carcinogénico (Barrett et al., 1989; Rossman et al., 1986), y que, aunado a otros efectos, tales como el clastogénico (Wan et al., 1982), el de inhibición de ligasas (Li y Rossman, 1989) y el de amplificación génica (Welch, 1992), conllevan al individuo a desarrollar procesos cancerosos.

BIBLIOGRAFÍA

- Bates M., Smith A., Hopenhayn-Rich C. Arsenic ingestion and internal cancers: a review. *Am. J. Epidemiol.* 135: 462-476 (1992).
- Börzsönyi M., Berecny A., Rudnai P., Csanady M., Horvath A. Epidemiological studies on human subjects exposed to arsenic in drinking water in Southeast Hungary. *Arch. Toxicol.* 66: 77-78 (1992).
- Buchet J., Lauwerys R. Study of inorganic arsenic methylation by rat liver in vitro: relevance for the interpretation of observations in man. *Arch. Toxicol.* 57: 125-129 (1985).
- Cebrián M. Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico. *Hum. Toxicol.* 2: 121-133 (1983).
- Chen C., Wang C. Ecological correlation between arsenic level in well water and age-adjusted mortality from malignant neoplasms. *Cancer Res.* 50: 5470-5474 (1990).
- Díaz-Barriga F., Lamas E., Mejía J., Carrizales L., Santoyo M., Vega L., Yañez L. Arsenic-Cadmium interactions in rats. *Toxicology* 64: 191-203 (1990).
- Elizondo G., Montero R., Herrera J., Hong E., Ostrosky-Wegman P. Lymphocyte proliferation kinetics and sister-chromatid exchanges in individuals treated with metronidazole. *Mutat. Res.* 305: 133-137 (1994).
- García-Salcedo J., Portales A., Blakely E., Díaz R. Estudio transversal de una cohorte de pacientes con vasculopatía por intoxicación crónica arsenical en poblados de los municipios de Francisco I. Madero y San Pedro, Coah., México. *Rev. Fac. Med. (Torreón)* 1: 12-16 (1984).
- Gonzalez F., Gelboin H. Role of human cytochrome P-450s in risk assessment and susceptibility to environmentally based disease. *J. Toxicol. Environ. Health* 40: 289-308 (1993).

- Hus T., Liang J., Shirley L. Aneuploidy induction by mitotic arrestants. Effects of diazepam on diploid Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 122: 201-209 (1983).
- IARC. Monograph on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some metal and metallic compounds. Vol. 23, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France (1980).
- Jacobson-Kram D., Montalbano D. *Environm. Mutagenesis.* 7: 787 (1985).
- Kanematsu N., Hara M., Kada T. *Mutat. Res.* 77: 109 (1980).
- Klassen C. Biliary excretion of arsenic in rats, rabbits and dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 29: 107-108 (1974).
- Lerman S., Clarkson T. The metabolism of arsenite by rat. *Fund. Appl. Toxicol.* 3: 309-314 (1983).
- Leonard A., Lauwerys R. *Mutat. Res.* 75: 49 (1980).
- Li J., Rossman T. Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis. *Molec. Toxicol.* 2: 1-9 (1989).
- Liang J., Satya-Prakash K. Induction of aneuploidy by mitotic arrestants in mouse bone marrow. *Mutat. Res.* 155: 61-70 (1985).
- Nebert D. The Ah locus: genetic differences in toxicology, cancer, mutations and birth defects. In: R. O. McClellan (Ed.), *CRC Critical Reviews in Toxicology.* V. 20, CRC Press, Boca Raton, FL, pp: 153-174 (1989).
- Nordenson I., Beckman G., Beckman L., Nordström S. Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. *Hereditas* 88: 47-50 (1978).
- Nordenson I., Beckman L. Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. *Hereditas* 96: 175-181 (1982).

- Nordström S., Beckman L., Nordenson I. Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. Variation in birth weight. *Hereditas* 88: 43-46 (1978a).
- Nordström S., Beckman L., Nordenson I. Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. III Frequencies of spontaneous abortions. *Hereditas* 88: 51-54 (1978b).
- Nordström S., Beckman L., Nordenson I. Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. V Spontaneous abortion among females employees and decreased birth weight in their offspring. *Hereditas* 90: 291-296 (1979a).
- Nordström S., Beckman L., Nordenson I. Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. VI congenital malformations. *Hereditas* 90: 297-302 (1979b).
- Okui T., Fujiwara Y. Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the co-mutagenic effect in V79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 172: 69-76 (1986).
- Salamanca F. *Citogenética Humana*. Ed. Panamericana, México, pp:83-85, 235-240 (1990).
- Salmon E., McKeel M., Hays T. Rapid rate of tubulin dissociation from microtubules in the mitotic spindle in vivo measured by blocking polymerization with colchicine. *Journal of Cell Biology* 99: 1066-1075 (1984).
- Satya-Prakash K., Hsu T., Wheeler W. Metaphase arrest, anaphase recovery and aneuploidy induction in Chinese hamster cells following exposure to mitotic arrestants. *Anticancer Res.* 4: 351-356 (1984).
- Scott N., Hatleid K., MacKenzie N., Carter D. Reactions of arsenic (III) and arsenic (V) species with glutathion. *Chem. Res. Toxicol.* 6: 102-106 (1994).

- Tam K., Charbounneau S., Bryce F., Lacroix G. Separation of arsenic metabolites in dog plasma and urine following intravenous injection of ^{74}As . *Annal. Biochem.* 86: 505-511 (1978).
- Tomatis L. *Cancer: Causes occurrence and control.* (IARC, Sci. Pub. 100), Lyon, France (1990).
- Tsuchiya K., Ishinishi N., Fowler B. *Toxicology of metals.* Springfield, V. B. national Technical Information Service, USA (1977).
- Vahter M., Envall J. In vivo reduction of arsenate in mice and rabbits. *Environ. Res.* 32: 14-24 (1983).
- Vahter M., Marafate E. Intracellular interaction and metabolic fate of arsenite in mice and rabbits. *Chem. Biol. Interac.* 47: 29-44 (1983).
- Wan B., Christian R., Sokup S. Studies of cytogenetic effects of sodium arsenicals on mammalian cells in vitro. *Environm. Mut.* 4: 493-498 (1982).
- Wang-Xu, Adler I. Clastogenic effects of known and suspect spindle poisons studied by chromosome analysis in mouse bone marrow cells. *Mutagenesis* 5: 371-374 (1990).
- Welch W. Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev.* 72: 1063-1081 (1992).
- WHO. *Arsenic, Environmental Health Criteria.* 18, World Health Organization, Ginebra (1981).
- Yunis J. The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* 221: 227-236 (1983).
- Zijno A., Quaggia S., Pacchierotti F. A cytogenetic approach to evaluate in vivo somatic aneuploidy. Effects of diethylstilbestrol on mouse somatic cells. *Mutagenesis* 4: 62-66 (1989).