

33
24

RECEIVED
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
1995



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

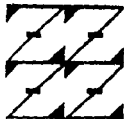
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

FALLA DE ORIGEN

ESTUDIO DE LA INDUCCION DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS,
ASOCIACION DE SATELITES E INTERCAMBIO DE CROMATIDAS
HERMANAS EN LINFOCITOS HUMANOS *in vitro* TRATADOS
CON CARBONATO DE LITIO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
SIERRA MARTINEZ MONICA

DIRECTOR DE TESIS; DR. MARIO ALTAMIRANO LOZANO



LO HUMANO
EJE
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D.F.

Septiembre de 1995



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 LABORATORIO DE CITOGENÉTICA,
MUTAGÉNESIS Y TOXICOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LA FACULTAD DE
ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA CAMPO-II DE LA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE MÉXICO BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. MARIO A.
ALTAMIRANO LOZANO.**

AGRADECIMIENTOS

**Al Dr. Mario A. Altamirano Lozano
por el apoyo y orientación para
realizar está tesis.**

**A la Dra. Ma. Dolores Vergara
Por el apoyo y comprensión que
me ha brindado.**

Al los miembro del jurado:

**Dr. Mario A. Altamirano Lozano
M. en C. Ma. Lourdes Mora García
M. en IBSH, Elia Roldán Reyes
Dra. Isabel Soto Cruz
M. C. Armando Sauer Ramírez**

**Por sus comentarios y sugerencias
en la revisión de esté trabajo**

DEDICATORIA

A mi madre

Sofia Martínez C.

**Por alentarme en los
momentos más difíciles
de mi vida**

A Gilberto Adame L.

**Por todos los momentos
que compartimos juntos**

A mis hermanos:

**José, Víctor Manuel,
Mercedes y Elizabeth
con cariño**

INDICE

	pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS METALES	2
CARACTERISTICAS GENERALES DEL LITIO	3
GENETICA TOXICOLOGICA	8
SISTEMA DE PRUEBA <i>in vitro</i>	9
ABERRACIONES CROMOSOMICAS	10
ASOCIACION DE SATELITES	14
INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS	16
JUSTIFICACION	20
HIPOTESIS	21
OBJETIVOS	22
MATERIAL Y METODO	23
RESULTADOS	29
DISCUSION DE RESULTADOS	36
CONCLUSIONES	51
COMENTARIOS FINALES	52
REFERENCIAS	53

RESUMEN

El Carbonato de litio (Li_2CO_3) es un compuesto metálico utilizado a nivel terapéutico como un antidepresivo en desordenes mentales unipolares y bipolares (maniaco-depresivo y psicosis-esquizofrénica), también tiene una amplia variedad de usos en la industria incluyendo: la metalurgia, la cerámica, el aire acondicionado, la química y de lubricación (grasas).

En éste trabajo se evaluó el efecto genotóxico del Li_2CO_3 en linfocitos humanos *in vitro*, para esto se analizaron las aberraciones cromosómicas (AC), asociación de satélites (AS) e intercambio de cromátidas hermanas (ICH), así como también, Índice mitótico (IM), cinética del ciclo celular (CCC) y tasa de proliferación linfocítica (TPL).

Se realizaron cultivos de 48 y 72 horas, los tratamientos fueron aplicados a las 24 horas de iniciados los cultivos y se utilizaron tres dosis diferentes de Li_2CO_3 : 0.25, 0.50 y 1.00 mmol/ml. Los resultados obtenidos mostraron que para las AC se incrementó el total de células con AC con respecto al testigo (6.33% para 0.25, 6.53% para 0.50 y 6.31% para 1.0 mmol/ml vs. testigo 0.99%), siendo significativo con $P < 0.005$ (con prueba de ji cuadrada) mostrando un comportamiento clastogénico. El total de células con AS también mostró un incremento (34.3 ± 0.08 para 0.25, 45.25 ± 0.34 para 0.5, 33.3 ± 0.42 para 1.0 mmol/ml vs. testigo 28.6 ± 0.317) siendo significativos para todas las dosis con una $P < 0.05$ (prueba de "t" student), mostrándose como un posible compuesto aneuploidógeno. Por otro lado se encontró un incremento en la frecuencia de ICH's por célula en todas las dosis con respecto al testigo (7.68 ± 0.33 para 0.25, 6.87 ± 0.26 para 0.50 y 7.31 ± 0.43 tratados vs 5.75 ± 0.26 al testigo) siendo significativo con un $P < 0.05$ (prueba de "Z" para proporciones).

Con respecto a la CCC, se encontró que el porcentaje de células que se encontraban en primera (I), segunda (II) o tercera división (III), solo se modificó en la dosis más alta (1.0 mmol/ml) siendo esta diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo (I= 26, II= 43, III=31 vs. I= 23.5, II= 35.5, III=41). Con respecto a la tasa de proliferación linfocítica de los cultivos tratados con 0.25, 0.50, 1.00 mmol/ml de Li_2CO_3 fue de 22.0, 22.1 y 23.7 horas, respectivamente, observándose un ligero incremento en el tiempo de generación promedio al compararlos con el testigo (21.9 horas). Finalmente, cuando se analizó el IM se observó que este disminuyó en los cultivos tratados lo cual demuestra que el Li_2CO_3 tiene un efecto citotóxico.

INTRODUCCION

CARACTERISTICAS DE LOS METALES

De los 109 elementos identificados cerca de 80 son considerados como metales, lo cual representa la mayor parte de la Química Inorgánica.

Los metales son usualmente definidos con base a sus propiedades físicas que presentan en estado sólido, las propiedades físicas de los metales tales como: el brillo, la alta reflexión, alta conductividad eléctrica, alta conductividad térmica, etc., por lo cual tienen un gran significado en la Tecnología (Vouk, 1986; Storker y Walter, 1988).

Los metales en estado sólido son caracterizados por su estructura cristalina, por el tipo específico del enlace químico en el que los electrones son deslocalizados y móviles, y por sus propiedades magnéticas. Estas propiedades físicas de los metales tienen un valor limitado para el entendimiento de los efectos tóxicos (Sisler *et al.*, 1980).

Desde el punto de vista Toxicológico, una definición más útil de un metal esta basada en sus propiedades de iones en solución acuosa, ya que un metal es un elemento, el cual bajo ciertas condiciones biológicas pueden reaccionar perdiendo uno o más electrones para formar un catión, además la solubilidad de los metales en agua y en otros líquidos es de gran importancia en esta área, ya que esta es uno de los factores que favorecen la absorción de estos elementos por tejidos biológicos (Storker, 1988; Zumdahl, 1991).

IMPORTANCIA DE LOS METALES EN LOS ORGANISMOS

Muchos de los metales son indispensables para la vida, aunque solo se encuentre en pequeñas cantidades en los tejidos del cuerpo, incluso algunos de ellos tienen afinidad por elementos particulares (Bolaños, 1990; Newna y McIntosh, 1991).

Dentro de las clasificaciones para los metales una importante es la que los agrupa en metales pesados y ligeros. Los metales pesados son aquellos cuya densidad es superior a 5 g/cm^3 mientras que los ligeros presentan una densidad inferior a éstos (Smith, 1973; Duffus, 1983). De estos algunos elementos son considerados traza, o

elementos que se encuentran presentes en la corteza terrestre en una concentración de 100 ppm o menor (Duffus, 1983; Lenhinger, 1982).

A partir de 1970 se sumaron 11 elementos a la lista de compuestos ultratraza que son nutrientes esenciales (Nielse, 1988), éstos elementos son: Arsénico, Boro, Bromo, Cadmio, Flúor, Plomo, Litio, Níquel, Silicio, Estaño y Vanadio, indicando que el Arsénico, Boro, Níquel, y Silicio son elementos altamente esenciales y además tienen un papel muy importante en el proceso de Salud-Enfermedad (Nielse *et al.*, 1988).

Los elementos metálicos se encuentran en todos los organismos vivos, donde desempeñan una gran variedad de funciones, ya sea como elementos estructurales, estabilizadores de la estructura biológica, componentes de los mecanismos de control (músculos y nervios) o funcionan con compuestos o activadores enzimáticos del sistema redox (Vouk, 1986). Algunos de los metales tienen funciones biológicas importantes formando en la mayoría de los casos complejos con otras moléculas, por ejemplo, las metaloporfirinas (Clorofila y Hemo). La capacidad de la molécula de la clorofila para absorber luz se relaciona con la estructura tipo polieno de los anillos de la porfirina. El magnesio, metal asociado al átomo de nitrógeno de los 4 anillos pirrólicos da rigidez a la estructura molecular e incrementa la tasa de conversión del estado latente-excitado, lo cual resulta de la absorción de los fotones de la molécula para ser posteriormente transferidos a la cadena respiratoria (REDOX) (Vouk, 1986; Lenhinger, 1982).

También se puede mencionar el caso de las proteínas férricas no hémicas como las ferroxinas, a moléculas biológicas que tienen cobalto o cobalaminas, como la vitamina B₁₂ y muchas enzimas activadas por estos elementos (p.e Mg⁺), o las llamadas metaloenzimas, de los que hay 50 diferentes (20 con zinc, 15 con cobre, etc.) (Vouk, 1986; Lenhinger, 1982).

CARACTERISTICAS GENERALES DEL LITIO

El litio es un metal que se encuentra ampliamente distribuido a través del mundo en una gran variedad de minerales principalmente en silicatos aluminicos. En la tabla 1 se muestran algunos minerales que contienen Litio (Li₂O). El litio se encuentra en la hidrosfera en bajas concentraciones (11 ppm en agua de mar) y en ciertos minerales acuáticos (Clayton, 1987; Storkinger, 1981; Carson *et al.*, 1987).

TABLA 1. CONTENIDO DE LITIA EN ALGUNOS MINERALES

MINERAL	COMPOSICION QUIMICA	CONTENIDO APROXIMADO DE LITIA* (%)
Pentalita	$LiAlSi_2O_6$	2-4
Lepidolita	$K_2Li_2Al_2Si_4O_{11}$	3-4
Espeodomena	$LiAlSi_2O_6$	4-7
Amblygonita	$LiAlFPO_4$	8-9
Fosfato Sódico Dilitio	Li_2NaPO_4	19-21

TOMADO DE CLAYTON, 1987.

* Litia: deficiencia del compuesto óxido de litio (Li_2O)

PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS

El átomo de litio posee un solo electrón de valencia. El litio es el primer miembro del grupo IA o grupo de los metales alcalinos constituidos por Li, Na, K, Rb, Cs, y Fr, todos los cuales se caracterizan por tener un solo electrón en el orbital s más allá de la capa central electrónica tipo gas noble (distinto al Cu, Ag y Au), sin embargo el tamaño singularmente pequeño del átomo del litio y del ion Li^+ hace que se manifiesten algunas diferencias apreciables en su comportamiento químico (Cotton, 1987; Clarkson, 1987).

El litio es un metal blando, blanco plateado y mucho menos reactivo que otros metales, posee un número atómico de 3 y peso molecular 6.94, es relativamente liviano, siendo su densidad de 0.53 g/cm^3 , posee el mayor de los puntos de fusión y ebullición 180.5°C y 1336.0°C respectivamente de todos los metales alcalinos (Clarkson, 1987; Cotton, 1987; Clayton, 1987).

El litio tiene muchas formas univalentes (tabla 2). El hidruro de litio y $LiAlH_4$ se descomponen en agua; el mayor número de compuestos son altamente solubles (Clarkson, 1987), aunque las sales de litio son menos solubles en agua que las demás sales correspondientes al grupo que pertenece, ya que por ejemplo el potasio y el sodio tienen funciones biológicas importantes (p.e. osmo-regulación, balance ácido-base en el organismo, transmisión de impulsos nerviosos), mientras que las funciones biológicas del litio son menos importantes (Hammond y Beliles, 1980; Storkinger, 1981; Clayton, 1987).

TABLA 2. PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DEL LITIO Y DE ALGUNOS DE SUS COMPUESTOS.

FORMA DE LITIO	P. M. g/mol	DENSIDAD δ	P. F. °C	P. E. °C	SOLUBILIDAD
LITIO (Li)	6.94	0.5348(20°C)	180.5	1336±	LiOH + H ₂ , ALCOHOL, SOL. ACIDOS, LIQ. NH ₃
HIDRURO DE LITIO (LiH)	7.95	0.82	680	-	LiOH + H ₂
HIDRURO ALUMINICO DE LITIO (LiAlH ₄)	37.95	0.917	125	-	H ₂ O FRIA; 30g/100 ml ETHER
HIDROXIDO DE LITIO HIDRATADO (LiOH · H ₂ O)	41.96	1.51	-	-	223g/l (10°C), 268g/l (80°C); SOL. ALCOHOL
BROMURO DE LITIO (LiBr)	86.85	3.464 (25°C)	550	1265	1.45Kg/l (5°C); 2.54 Kg/l (90°C), 730g /40°C EN ALCOHOL; SOL. ETHER
CLORURO DE LITIO (LiCl)	42.40	2.068	605	1353	454g/l (20°C), 1275g/l (100°C); SOL. ALCOHOL, ETHER, ACETONA
CARBONATO DE LITIO (Li ₂ CO ₃)	73.89	2.11 (17.5°C)	723	1310(760)	133g/l (20°C), 7.2g/l (100°C), SOL. ACIDOS; INSOL. ACETONA, NH ₃ , ALCOHOL
OXIDO DE LITIO (Li ₂ O)	29.88	2.013 (25.5%)	>1700	1200	66.7g/l (0°C), 100g/l (100°C)
ESTEREAATO DE LITIO (LiC ₁₇ H ₃₅ O ₂)	290.41	-	220.5	-	0.1g/l (18°C); SOL ALCOHOL; ETHER, ACETONA

Tomado de Clarkson, 1987

USOS DEL LITIO

Los minerales de litio y compuestos afines tienen una amplia variedad de usos en la industria incluyendo; la metalurgia, la cerámica, el aire acondicionado, la química y manufactura farmacéutica, y de lubricación (grasas) (Clayton, 1987).

El carbonato de litio es usado terapéuticamente como un antidepresivo (Carson *et al.*, 1987; Hartma, 1989), sin embargo, los mayores consumidores de litio son las industrias de grasas y cerámicas. Los ésteres de litio u otras formas de ácidos grasos se emplean como las grasas de uso múltiple o sustituyen a una multitud de grasas especializadas logrando captar alrededor de la tercera parte del total del mercado de grasa automotriz (Clarkson, 1987).

Es importante el uso del litio en la cerámica específicamente en la formulación del barniz para porcelana. La mayor acción del litio es como fundente metálico. En mezclas de cerámica, el litio facilita la pérdida de CO_2 produciendo el Li_2O (lítica) como un constituyente de las mezclas de óxidos del cual muchas cerámicas están compuestas. Alternativamente los minerales de silicatos de LiAl pueden ser usados directamente (Dempsey y Meltzer, 1977).

El hidróxido de litio es usado como un aditivo para dar larga vida a las baterías alcalinas. El cloruro de litio es usado como agente para soldar y como flujo abrasivo: las aleaciones de LiCu y LiAg son usados como vectores abrasivos, mientras que el perclorato de litio se ha sugerido como un oxidador para las mezclas de propelentes sólidos ya que ofrece un alto porcentaje de O_2 disponibles más que otros percloratos de menor peso atómico. El litio también es usado como un residuo en la manufactura de metales y en síntesis orgánica.

La exposición industrial de litio ocurre durante su extracción, a partir de sus derivados en la preparación de varios compuestos de litio, aceites y barnices, y más recientemente por exposición a hidruros de litio, sin embargo un nuevo proceso de extracción, que utilizan sistemas acuosos en el cual reducen sustancialmente la exposición en comparación con el proceso antiguo de calcinación (Dempsey y Meltzer, 1977; Clayton, 1987).

EXPOSICION Y LIMITES DE EXPOSICION

El litio es ampliamente encontrado en plantas y animales. Los niveles diarios necesarios han sido estimados en 2 mg (Hammond y Bellies, 1980), mientras que las dosis terapéuticas son de 90 a 1,800 mg/día (Shepard, 1980).

a) Peso total en el cuerpo

Snyder *et al.*, (1975) calcula un peso de 670 μg de litio en tejido blando de referencia, estimado en un hombre de 70 kg (en mg/día), mientras que los niveles en comida y fluidos es de 2.0 μg ; pérdidas en orina, 0.8 μg , en heces 1.2 μg y trazas en otras rutas (uñas, leche etc.)

TOXICOLOGIA

a) Absorción

El litio es fácilmente absorbido en el tracto digestivo. La distribución entre los órganos es casi uniforme. En grandes partes es intracelular. El litio tiende a competir con el sodio. Su toxicidad no solo depende de su acumulación sino de la cantidad de sodio, ya que conforme la concentración de sodio disminuye aumenta la toxicidad del litio (Clayton, 1981). Las concentraciones normales en el plasma es ~ 17 μg Li/lit (Zaldívar, 1980; Hammnod y Bellies, 1980; Clayton, 1987, Clarkson, 1987; Carson *et al.*, 1987).

b) Causas y Efectos

Cuando se suministra una dosis de carbonato de litio por primera vez, este causa náuseas, vomito y dolor abdominal, sin embargo cerca de una hora después de cada dosis, estos síntomas pronto desaparecen (Serman y Schaumberg, 1980; Sansone y Zeigler, 1985; Hartman, 1989).

El cuadro clínico que se presenta por su toxicidad crónica incluye principalmente efectos en el tracto gastrointestinal, en el sistema nervioso central y renal, mientras que

los signos agudos son falta de salivación y en algunos casos se presenta diarrea y efectos en el sistema nervioso central que incluyen; tumores musculares, hiperirritabilidad muscular y fasciculaciones. En signos renales se incluyen; poliuria, elevación de nitrógeno no protéico y termina con oligouria (Weingartner y Linola, 1985; Clayton, 1987; Hartman, 1989).

GENETICA TOXICOLOGICA

Además del potencial toxicológico de los metales, también se ha descrito que estos son capaces de inducir mutaciones, alteraciones cromosómicas y modificar el proceso reproductivo de los mamíferos, como en el caso del cromo, plomo, zinc, cadmio y mercurio (ECETOC, 1983; Villanueva *et al.*, 1988), o como en el caso del sodio y potasio, los cuales en altas concentraciones afectan el nivel osmótico de las células e inducen rupturas en los cromosomas (Sharma y Talukder, 1987).

Como respuesta a este tipo de eventos, desde hace algunos años se desarrollo un área de trabajo que se denominó Genética Toxicológica, la cual se dedica al estudio sistemático de los efectos de los agentes físicos, químicos y biológicos presentes en el ambiente, sobre los sistemas genéticos de los organismos, así como de las consecuencias de tipo genético para el futuro de las especies (Prival, 1980; Moutschen, 1982).

Junto con la Genética Toxicológica se han iniciado otras disciplinas que vienen a apoyar este tipo de estudios, por ejemplo, la Epidemiología Molecular y Celular. Esta es un aspecto de la Genética Toxicológica que pretende encontrar marcadores tempranos de daños genéticos que pudieran traducirse en la detección y prevención de trastornos genéticos y cáncer, a través del conocimiento de la magnitud de la exposición, la dosis biológica activa y los cambios biológicos iniciales (marcadores) (Gonsebatt *et al.*, 1992).

El hecho de que la naturaleza del material genético, sea esencialmente la misma en todos los organismos ha permitido utilizar una serie de modelos biológicos de prueba para obtener información útil sobre el potencial de los agentes químicos que inducen cambios hereditarios (Prival, 1980; Moutschen, 1982).

Con base en el nivel de detección del daño genético, los diferentes sistemas biológicos de prueba se pueden separar en cuatro grupos:

Grupo 1: Aquellas que detectan el posible daño al DNA a nivel molecular, dan información suficiente para clasificar los agentes como mutágenos potenciales

Grupo 2: Las que detectan mutaciones a nivel celular, ya sea de manera directa o indirecta, mediante el empleo de microorganismos, plantas superiores, células en cultivo ó mamíferos completos, lo que permite tener un mayor poder de resolución.

Grupo 3. Son todos aquellos sistemas que establecen los efectos directos de los agentes mutagénicos sobre los cromosomas.

Grupo 4. Recopilan una serie de ensayos a largo plazo, que hacen evidentes el efecto de los agentes sobre la descendencia de los organismos tratados.

SISTEMA DE PRUEBA *in vitro*

Dentro de los sistemas biológicos de prueba utilizados, los modelos *in vitro* como el cultivo de células de mamífero se han considerado como uno de los sistemas ideales para evaluar los efectos citogenéticos de una gran variedad de agentes mutagénicos, donde el cultivo de linfocitos es uno de los más utilizados para este fin (Natarajan y Obe, 1982; Kaczmarek *et al.*, 1987).

Desde el punto de vista mutagénico, el linfocito ofrece una serie de ventajas que lo hacen muy interesante, como el hecho de presentar una vida media de 2 a 4 años, lo que permite que se acumulen lesiones en su DNA, además de encontrarse en un estado definido del ciclo celular (Go), el cual y mediante la adición de agentes mitogénicos como la fitohemaglutinina pueden ser inducidos a la división en condiciones controlables. Por último estas células han demostrado poseer una baja actividad de reparación, por lo que durante mucho tiempo ha sido uno de los sistemas ideales para el estudio del efecto de la exposición crónica a bajas concentraciones de mutágenos y realizar una gran variedad de análisis como: aberraciones cromosómicas en metafase, asociación de satélites, intercambio de cromátidas hermanas, cinética de la división celular, micronúcleos en interfase, mutaciones letales dominantes, infidelidad de la síntesis del ADN y últimamente

electroforesis unicelular (Evans y O'Riordan, 1975; Natajara y Obe, 1982; Albertini *et al.*, 1982; Moutschen, 1982; Dean y Danford; 1984; Singh *et al.*, 1988).

ABERRACIONES CROMOSOMICAS

Se ha podido establecer que los daños causados en el ADN producidos por los agentes químicos, físicos o biológicos se pueden transformar en:

1) **Mutaciones;** definidas como un cambio imprevisto heredable en un cromosoma o gen. No siempre las mutaciones aparecen inmediatamente, pero pueden aparecer en las siguientes generaciones de forma severa. Las mutaciones se pueden presentar:

a) A nivel de genes, ocasionados por un cambio en la secuencia de nucleótidos ya sea por eliminación, adición o sustitución.

b) A nivel de cromosoma (llamadas aberraciones), caracterizadas por el cambio en el número o estructura física de los cromosomas. Las aberraciones incluyen rompimientos que provocan pérdidas o rearreglos de fragmentos cromosómicos. No se pueden diferenciar en todos los casos entre una mutación génica y cromosómica.

Las aberraciones numéricas pueden tener variaciones en el número de sus cromosomas que impliquen múltiplos del número haploide, denominadas euploidias, o cambios en los cuales solo uno o algunos cromosomas están involucrados, a las que se conocen como aneuploidias.

En las euploidias se repiten varias veces al número haploide (n) de 23, por lo que una célula de $3n$ tendrá 69 cromosomas y constituye una triploidia, si tiene $4n$ tendrá 92 y es una tetraploidia, etc. En general los números mayores al diploide se denominan poliploidias. Estas no son tan importantes como causa de malformaciones en los recién nacidos, pero si repercuten en forma significativa en la reproducción humana, ya que causa abortos tempranos. Los productos que llegan al nacimiento son generalmente prematuros, malformados, con retraso psicomotor, fallecen horas después del nacimiento (Guizar, 1988).

Las aneuploidías son más conocidas por ser las responsables de originar un gran número de malformaciones congénitas al nacimiento. Estas se presentan como resultado de una no separación cromosómica (no disyunción) o por rezago de un cromosoma durante la anafase de la división celular (Rostenberg, 1980; Levin, 1982)

Por su parte, los tipos de aberraciones estructurales se clasifican en dos tipos: cromosómicos y cromatídicos (figura 1) (Scott, 1983; Evans, 1984; Forni, 1984; Brusick, 1987; Li y Heflich, 1991), éstos pueden ser:

a) Deleciones terminales que son uno o dos fragmentos que aparecen del resultado del rompimiento simple a través del cromosoma o cromátida.

b) Deleciones pequeñas o "minutas" (intersticiales, isodiamétricas)

c) Anillos acéntricos, estos son pares de segmentos de cromátida sin incluir al centrómero y en el cual se juntan para formar un anillo.








d) Inversiones, pueden ser paracéntricas (no incluye el centrómero) o pericéntricas (incluye al centrómero).

e) Traslocaciones recíprocas (intercambio simétricos) involucra rompimiento de dos cromosomas y el intercambio recíproco de estos segmentos entre cromosomas.

f) Dicéntricos o aberraciones policéntricas (intercambio asimétricos) surgen del intercambio entre dos o más cromosomas de estructura policéntrica y una asociación de fragmentos acéntricos.

g) Gaps, son espacios o huecos en la secuencia del cromosoma

II. Alteraciones en la división celular: manifestadas como un retraso o inhibición de mitosis anormales, formación de células poliploides y lisis puntuales (García, 1992).

TIPO DE ABERRACION	DIAGRAMA	COMENTARIO
A. TIPO CROMOSOMICA		INVOLUCRA AMBAS CROMATIDAS DE UN CROMOSOMA EN LOCI IDENTICOS.
(1) GAP O LESION ACROMATICA		LA REGION CROMOSOMICA DISTAL DEL GAP ESTA ALINEADA CON LA REGION PROXIMAL.
		LA REGION NO TEÑIDA NO ES MAYOR QUE EL DIAMETRO DE UNA CROMATIDA
(2) FRAGMENTO CROMOSOMICA O DELECCION TERMINAL		INVOLUCRA SOLO UN CROMOSOMA. LA PARTE CENTRICA DELECCIONADA MUCHAS VECES NO ES IDENTIFICADA
(3) INTERCAMBIO		INVOLUCRA 2 O MAS LESIONES EN UNO O DIFERENTES CROMOSOMAS.
(4) ENTRE CROMOSOMAS; C/C (DOS CENTROMEROS)	DICENTRICO + FRAGMENTO	DE UN INTERCAMBIO ENTRE DOS CROMOSOMAS EN G, EL FRAGMENTO ES PARTE DE UN INTERCAMBIO Y NO DEBE SER CUANTIFICADO COMO UN EVENTO SEPARADO.
(5) DENTRO DE UN CROMOSOMA; C/C (I) ENTRE BRAZOS		EL FRAGMENTO ES PARTE DE UN INTERCAMBIO Y NO DEBE SER CUANTIFICADO COMO UN EVENTO SEPARADO. EL FRAGMENTO ES LOCALIZADO EN CADA ANILLO (O DICENTRICO) Y LOS FRAGMENTOS RESTANTE SON CLASIFICADOS COMO UNA DELECCION ISOLOCUS.
(ii) DENTRO DE UN BRAZO	ANILLO ACENTRICO + FRAGMENTO	
		LA PARTE CENTRICA DE ESTE INTERCAMBIO MUCHAS VECES NO PUEDE SER IDENTIFICADO. PEQUEÑOS ANILLOS ACENTRICOS SON LLAMADOS "MINUTES DOBLES" O DELECCIONES INTERSTICIALES.
	ANILLO ACENTRICO	
B. TIPO CROMATIDICO		USUALMENTE INVOLUCRA UNA CROMATIDA DE CADA CROMOSOMA EXCEPTO EN LOS FRAGMENTOS ISOCROMATIDICOS.
(1) GAP		LA REGION NO TEÑIDA NO ES MAYOR QUE EL DIAMETRO DE UN CROMATIDA.
(2) FRAGMENTO CROMATIDICO O DELECCION		LA REGION NO TEÑIDA ES MAYOR QUE EL DIAMETRO DE UNA CROMATIDA
	FRAGMENTO ALINEADO	

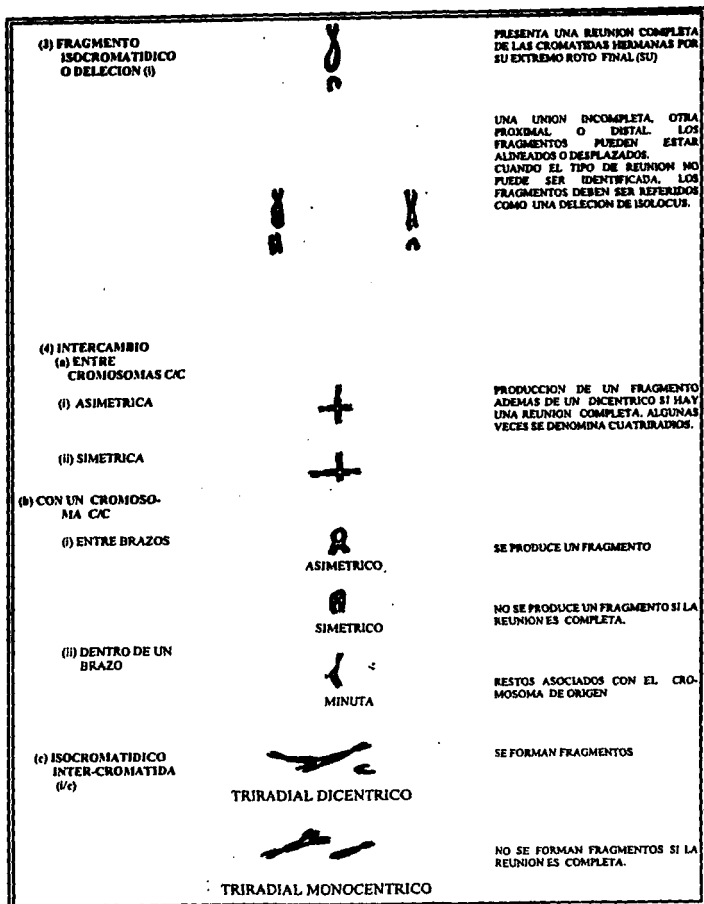


FIGURA 1. TIPO DE ABERRACIONES ESTRUCTURALES (TOMADO DE DEAN Y DANFORD, 1984)

ASOCIACION DE SATELITES

En preparaciones de cromosomas metafásicos humanos, algunos de los cromosomas acrocéntricos de los grupos D y G se han observado asociados o unidos por los satélites, alineados cada uno hacia el otro con gran proximidad. Este fenómeno es conocido como "asociación de satélites" (AS) (Zang y Back, 1968; Houghton, 1979; Verma *et al.*, 1983). Este fenómeno ocurre tanto en la mitosis como en la meiosis de manera natural ya que es resultado de la interacción de los cromosomas acrocéntricos para formar los nucléolos, por la acción de las regiones organizadoras nucleolares (Houghton, 1979).

CRITERIOS DE EVALUACION DE ASOCIACION DE SATELITES

En el análisis de la asociación de satélites examinados por cualquier técnica convencional, los criterios varían de investigador a investigador, sin embargo en términos prácticos, los cromosomas acrocéntricos son considerados asociados cuando cumplen las siguientes consideraciones:

I. La distancia entre los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos debe ser no más grande que la longitud de los brazos largos de los cromosomas del grupo G de la metafase en cuestión (figura 2a).

II. Las distancias mayores, arriba de la longitud de los brazos de los cromosomas del grupo G son aceptados cuando la asociación del compañero este orientada exactamente sobre el mismo eje longitudinal (figura 2b).

III. Si la orientación de los brazos cortos de un cromosoma acrocéntrico adicional es directa hacia la asociación principal y no se queda por abajo de la "línea del centrómero" de cualquiera de los cromosomas participantes dentro de la asociación de satélites. Se define la "línea del centrómero" como aquella que lo cruza y es perpendicular al eje longitudinal (figura 2c).

IV. Las distancias grandes de las asociaciones son aceptadas si entre los brazos cortos de los cromosomas éstos se encuentran conectados por un hilo visible y claro, con una composición semejante a los mismos (figura 2d) (Zang y Back, 1968).

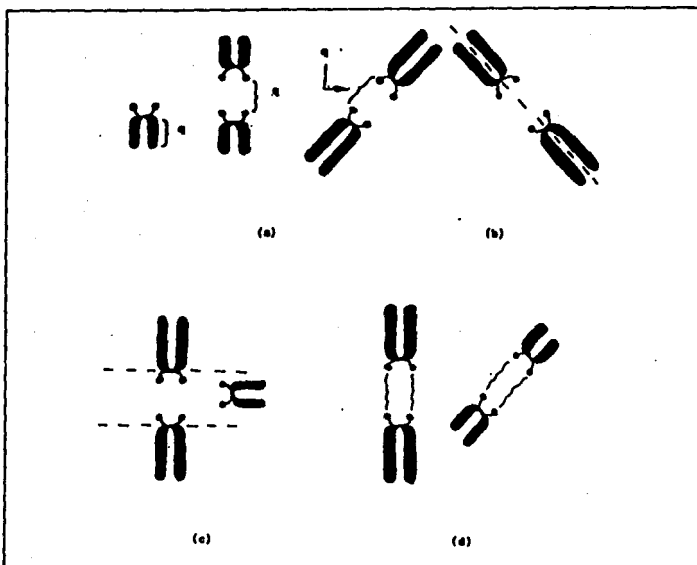


FIGURA 2. MODELO DE ASOCIACION DE SATELITES SEGUN EL CRITERIO DE EVALUACION DE ZANG Y BACK (1968)

IMPORTANCIA DE LAS ASOCIACIONES DE SATELITES

El estudio de las asociaciones de satélites toma mayor importancia en la actualidad, ya que cuando los cromosomas acrocéntricos forman los nucléolos, el

fenómeno de asociación de satélites, observado en metafase, y su permanencia a través del ciclo celular, parece originar una predisposición a alteraciones cromosómicas numéricas (Mattei, *et al.*, 1976; De Capoa, 1976; Gani, 1978; Bento, 1983; Verma, *et al.*, 1983; Migliore, *et al.*, 1993; Zhong, *et al.*, 1994)

Ohn *et al.*, (1961) sugieren que en muchos casos el material nucleolar se funde en la mayoría de los nucléolos a fin de formar un único nucléolo grande, originando que las regiones organizadoras nucleolares (RON) y los sitios adyacentes a ellas, en dos o más cromosomas, sigan próximos durante la interfase. En la profase las RON están más extendidas, de tal modo que las dos partes de los cromosomas aparecen en lados diametralmente opuestos de el nucléolo, por lo que es evidente la posibilidad de que durante el proceso de división celular se pueda romper una RON que está sobre tensión en las regiones adyacentes, lo que resultaría en las frecuentes traslocaciones entre los cromosomas acrocéntricos dada la proximidad entre ellos.

Por otro lado Ferguson-Smith y Handmarker (1961) propusieron la hipótesis de que la asociación de satélites sería un factor determinante de la no disyunción autosómica durante la meiosis o posiblemente durante las primeras divisiones del cigoto.

Las traslocaciones más frecuentes observadas entre los cromosomas acrocéntricos humanos involucra los cromosomas número 13 y 14 (del tipo D/D) y los cromosomas 14 y 21 (tipo D/G) (Bento, 1983). Coincidentemente estos cromosomas presentan también mayor frecuencia de asociaciones (Ohn *et al.*, 1961; Ardito, 1978). Estas observaciones apoyan la hipótesis de que una alta tendencia a la asociación de satélites aumenta el riesgo de traslocaciones y aneuploidías (Bento, 1983; Verma, *et al.*, 1983; Migliore, *et al.*, 1993; Zhong, *et al.*, 1994).

INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS

Uno de los métodos más utilizados y fáciles para probar el efecto de un agente mutagénico en el DNA es induciendo intercambios de cromátidas hermanas (ICH's).

Los ICH's involucran la ruptura en puntos idénticos de ambas cromátidas con posterior intercambio y reparación, sin pérdida de ADN ni cambios en la morfología cromosómica (Mudry *et al.*, 1981, Latt *et al.*, 1981; Sasaki, 1982; Perry y Thomson, 1984; Morales, *et al.*, 1990). El ICH se visualiza con una tinción diferencial de dichas

cromátidas, cuando se exponen células en división a la acción de 5-bromodeoxiuridina durante dos ciclos celulares. A este respecto, varios grupos de investigación sugieren que la frecuencia de ICH es un excelente indicador para seleccionar mutágenos y carcinógenos por ser un método más sensible que la valoración de aberraciones cromosómicas (Mudry *et al.*, 1981; Latt *et al.*, 1981; Sorsa, 1984; Perry y Thomson, 1984).

McClintock (1938), observó por primera vez en cromosomas en forma de anillo del maíz, la formación de cromosomas dicéntricos, que significaban el doble del tamaño inicial. Esto en la actualidad se sabe que correspondía a un ICH. Posteriormente Taylor en 1958 obtenía la primera evidencia directa de los ICHs en células de *Bellavaria romana*, utilizando métodos autorradiográficos, que consistieron en la incorporación de la timidina tritiada (TH³), en la primera de las dos divisiones, obteniendo al final una de las cromátidas marcada y otra no, siendo esto la evidencia de la duplicación semiconservativa y la presencia de una sola molécula de DNA por cromátida. En éstos cromosomas se observó la presencia frecuente de intercambios de fragmentos de una cromátida a la otra del mismo cromosoma, a la cual se le llamó intercambio de cromátidas hermanas.

TECNICAS PARA LA TINCION DIFERENCIAL DE CROMATIDAS HERMANAS

Cuando se describió el método autorradiográfico tenía poca resolución, por lo cual se desarrolló otro método basado en la incorporación de un análogo de base de la timidina, la 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU), al ADN en sustitución de la timidina tritiada, ya que la BrdU era un nucleósido halogenado análogo a la timidina, que podía ser incorporado a las cadenas de ADN en formación (Latt, *et al.*, 1981).

La incorporación de BrdU al ADN está basada en tres postulados (según Tice *et al.*, 1975):

- a. La teoría uninémica de la cromátida.
- b. La duplicación del tipo semiconservativo.
- c. La segregación al azar de los cromosomas durante la división celular.

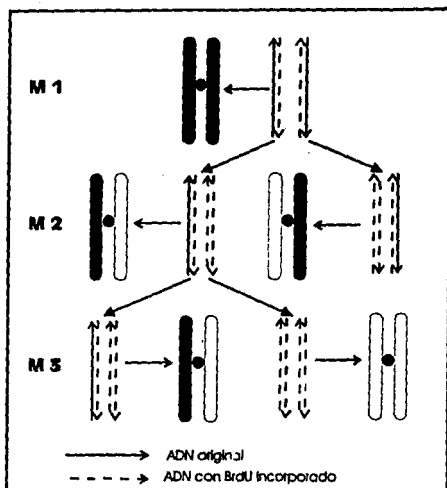


FIGURA 3.- MODELO DE INCORPORACIÓN DE BROMODESOXIURIDINA (BrdU) EN EL ADN DE LAS CROMÁTIDAS HERMANAS DURANTE 3 CICLOS DE REPLICACIÓN (M1 = Primera metafase, M2 = Segunda metafase, M3 = Tercera metafase)

Zakharov y Egolina (1972) observaron que cuando cultivaron células de criceto Chino durante dos ciclos sucesivos en presencia de BrdU y posteriormente se teñían los cromosomas con Giemsa, las dos cromátidas se condensaban diferencialmente, identificando una incorporación diferencial de la BrdU al ADN (figura 3).

Lait (1973), dio una alternativa de alta resolución fluorométrica al método de diferenciación de las cromátidas mediante en uso de un fluorocromo, la bízbenzímida Hoechst- 33258, como indicador de la incorporación del análogo de base (BrdU), en el ADN de leucitos, durante dos ciclos de división celular. El observó que la fluorescencia del Hoechst se reducía en las cromátidas con su ADN bifilarmente sustituido con BrdU, y que las cromátidas unifilarmente sustituidas fluorescían más.

En 1974, Perry y Wolff describieron una técnica llamada fluorescencia más Giemsa (FPG), la cual consistía en el uso de los colorantes Hoechst 33258 y Giemsa con las que obtuvieron preparaciones de cromosomas con las cromátidas teñidas diferencialmente pero de manera permanente. Para ello utilizaron células cultivadas de criceto Chino (CHO), a las que dejaron dos ciclos de replicación en presencia de la bromodesoxiuridina. Cuando tñieron con el Hoechst y revelaron con la Giemsa, la cromátida que incorporó BrdU en solo uno de los filamentos del ADN adquirió un color más intenso con la Giemsa en comparación con la cromátida que incorporó BrdU en ambos filamentos, logrando obtener una gran resolución en el análisis de los intercambios entre cromátidas hermanas.

Se han reportado otras metodologías para obtener la tinción diferencial de las cromátidas hermanas (Korenberg y Freedlander, 1974; Scheres *et al.*, 1977; Takayama y Sakanishi, 1977; Schwartzman *et al.*, 1984) que permiten observar los ICH's en segmentos tan pequeños como sea posible con la resolución del microscopio de luz.

CINETICA DEL CICLO CELULAR (CCC)

Con la incorporación de la BrdU en el ADN y utilizando el método de tinción diferencial de cromátidas hermanas, se pueden identificar células en metafase que han pasado por uno, dos, tres o más ciclos de replicación (CCC). Después de un ciclo de duplicación en presencia de BrdU los cromosomas en metafase poseen el 100% de las cromátidas unifilarmente sustituidas, observándose las cromátidas oscuras. Cuando las células han pasado por dos ciclos de duplicación los cromosomas presentan el 50% de sus cromátidas unifilarmente sustituidas y el otro 50% de las cromátidas bifilarmente sustituidas con BrdU, viéndose el 50% teñidas en forma clara y el otro 50% teñidas en forma oscura. Las células que han pasado por tres ciclos presentan el 25% de sus cromátidas unifilarmente sustituidas y el 75% bifilarmente sustituidas, observándose un 75% de cromátidas teñidas claras y el 25% restantes teñidas oscuras (Tice *et al.*, 1976; Crossen y Morgan, 1977; Roldán, 1992). Esta técnica de tinción diferencial permite conocer el tiempo de proliferación linfocítica.

JUSTIFICACION

En los últimos años, la población se ha visto expuesta a numerosas sustancias que producen daño al material genético, entre las que se incluyen drogas terapéuticas de uso general y prolongado como vitaminas, antiinflamatorios, tranquilizantes, anticonceptivos orales y medicamentos, los cuales que están considerados como inócuos, de uso general y prolongado.

El carbonato de litio es usado desde la década de los treinta para el manejo profiláctico de desordenes mentales unipolares y bipolares. Aunque clínicamente es totalmente efectivo, el litio ha sido comparativamente bajo en el índice terapéutico. En dosis excesivas el litio tiene alteraciones secundarias como la inducción de coma, colapsos cardiovasculares y la muerte. Las dosis de carbonato de litio utilizadas varía de 90 a 1,800 mg/día, el cual es fácilmente absorbido por el tracto digestivo y su distribución entre los órganos es casi uniforme.

En la literatura el estudio de los efectos del litio es abundante, sin embargo desde el punto de vista de la Genética Toxicológica existen datos contradictorios sobre su acción sobre los cromosomas. Debido a esto, en el presente trabajo se estudió el efecto genotóxico del carbonato de litio sobre los cromosomas de linfocitos humanos *in vitro* evaluando la frecuencia de aberraciones cromosómicas, de asociación de satélites, de intercambio de cromátidas hermanas y las alteraciones sobre la división celular (Índice mitótico, cinética de proliferación linfocítica y cinética de ciclo celular).

HIPOTESIS

Se sabe que el carbonato de litio es utilizado diariamente a nivel terapéutico en altas dosis, llegando a tener efectos tóxicos de tipo nervioso, renal o cardíaco, y en algunos casos, causar la muerte. Debido a su efecto tóxico y por antecedentes genotóxicos de algunos metales como en el caso del sodio y potasio (metales que pertenecen al mismo grupo) que tienen efectos clastogénicos, al aplicar carbonato de litio en diferentes dosis (0.25, 0.50 y 1.0 mmol/ml) a cultivos de linfocitos humanos, éste compuesto será capaz de inducir aberraciones cromosómicas, asociación de satélites, intercambio de cromátidas hermanas y de modificar el proceso de división celular.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el posible efecto genotóxico y citotóxico del carbonato de litio en cultivos de linfocitos humanos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Evaluar el efecto del carbonato de litio sobre el índice mitótico en cultivos de linfocitos humanos de 48 y 72 horas.

2.- Evaluar el efecto del carbonato de litio sobre la inducción de aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos humanos de 48 horas.

3.- Cuantificar el número y tipo de aberraciones cromosómicas inducidas por el carbonato de litio en los cultivos de linfocitos.

4.- Analizar el efecto del carbonato de litio sobre la inducción de asociación de satélites en linfocitos humanos *in vitro*.

5.- Analizar el efecto del carbonato de litio sobre la inducción de intercambio de cromátidas hermanas, la tasa de proliferación linfocítica y la cinética del ciclo celular en linfocitos humanos cultivados durante 72 horas.

MATERIAL Y METODOS

A partir de donadores clínicamente sanos (hombres), se extrajeron 5ml de sangre periférica con una jeringa heparinizada. Posteriormente 0.5 ml de está sangre se cultivó en tubos de cultivo cónicos (Corning) conteniendo 5 ml de medio McCoy 5A (Sigma Chem. Co.) y suplementado con 0.25 ml de fitohemaglutinina (PHA-P, Sigma, Chem. Co.) y se incubó a 37°C durante 48 ó 72 horas.

ANALISIS DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS Y ASOCIACION DE SATELITES (CULTIVOS DE 48 HORAS)

A las 48 horas de iniciados, a cada cultivo se le adicionó 0.1 ml de colchicina (2 mg/10 ml) y se dejó que completaran las 48 horas.

Una vez transcurrido este tiempo los cultivos se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante y el botón celular se sometió a un choque hipotónico con una solución de cloruro de potasio (KCl) 0.075M por 20 min a 37°C. Posteriormente se realizó otra centrifugación a 1000 rpm y las células se fijaron con una solución de metanol-ácido acético (3:1), se realizaron tres cambios de la solución fijadora dejándose 10 min. entre cada cambio. Por último se goteó el botón celular en portaobjetos, se dejaron secar al aire y se tificaron con Giemsa (1:30 en agua de la llave) durante 10 min. Posteriormente se observaron al microscopio.

INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (CULTIVOS DE 72 HORAS)

A las 24 horas de iniciados los cultivos, a cada tubo se le adicionó 0.1 ml de una solución de 5-bromodesoxiuridina (BrdU, Sigma Chemical Co.) para tener una concentración final de 5µg/ml de cultivo. A las 70 horas se le adicionó 0.1 ml de una solución de colchicina (Merck; 2 mg/ml) obteniendo una concentración final de 4 µg/ml de cultivo y se dejaron hasta completar 72 horas. Transcurrido este tiempo se realizó la misma técnica anteriormente descrita hasta el gotéo de las laminillas.

TINCION DIFERENCIAL DE CROMATIDAS HERMANAS

Una vez hechas las preparaciones se tificaron con una solución de Hoechst-33258 (0.1 µg/ml) durante 20 min. en la oscuridad.

Posteriormente las laminillas se lavaron con agua corriente y se irradiaron con luz ultravioleta (UV) por 20 minutos sumergidas en una solución de KCl 0.075M. Transcurrido este tiempo se incubaron por 20 minutos, en una solución salina de citatos 2 X SSC (cloruro de sodio al 0.03M + citrato de sodio al 0.03M), a 60°C finalmente las preparaciones se lavaron y se tificaron con solución de Giemsa (1:30) en agua corriente durante 20 min. Finalmente se lavaron al chorro de agua y se dejaron secar al aire.

COMPUESTO QUIMICO

Se empleó carbonato de litio (Li_2CO_3 ; Sigma Chemical Co.) el cual se disolvió en agua destilada y se esterilizó por filtración con membrana millipore (0.45µ) para su utilización.

TRATAMIENTOS

Todos los tratamientos se aplicaron a las 24 horas, tanto en el caso de los cultivos a las 48 como en los de 72 horas.

Las concentraciones de Li_2CO_3 utilizadas fueron: testigo; 0.25; 0.50 y 1.00 mmol/ml de cultivo.

EVALUACIONES Y DISEÑO ESTADISTICO

INDICE MITOTICO

Para calcular el índice mitótico (IM) se revisaron 1000 células de cada uno de los cultivos de linfocitos humanos. Se cuantificaron las células en metafase y las células en interfase. Al resultado se le aplicó la siguiente fórmula para obtener el índice mitótico:

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

Una vez obtenidos los resultados de índice mitótico, éstos se analizarán mediante la prueba de "Z" para diferencia de proporciones (Z) (Roldán, 1992).

ABERRACIONES CROMOSOMICAS

En los cultivos de 48 horas, se analizaron 100 metafases al azar por cada tratamiento, registrando y cuantificando el número y tipo de aberraciones (numéricas y estructurales).

Para su análisis estadístico se aplicó ji cuadrada (X^2 con tabla de contingencias de 2×2).

ASOCIACION DE SATELITES

En cultivos de 48 horas se analizaron 100 metafases al azar para cada tratamiento y se cuantificó:

- Número de células con asociación de satélites (AS).
- Número de AS en cada metafase y tipo de asociación, tomando en consideración los criterios de Zang y Back (1968).
- El número de AS con dos o más cromosomas asociados.
- El número de células con una o más asociaciones.
- Los porcentajes de participación de los cromosomas del grupo D y G.

Para el análisis estadístico de la frecuencia de células con asociación, asociaciones por célula, cromosomas por asociación, así como el número de células con una o más cromosomas y para los diferentes tipos de asociaciones se aplicó la "t" de student, mientras que para determinar las diferencias entre las proporciones de cromosomas asociados D y G se aplicó la prueba de Ji cuadrada (χ^2 para bondad de ajuste).

CINETICA DE CICLO CELULAR, TASA DE PROLIFERACION LINFOCITICA E INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS

Para la determinación de la cinética del ciclo celular se observaron 100 metafases al azar por concentración en los cultivos de 72 horas y se cuantificaron las células de primera (Foto 1a), segunda (Foto 1b) y tercera o sucesivas divisiones (Foto 1c). Los resultados se analizaron mediante la prueba de Ji cuadrada (χ^2 para bondad de ajuste).

Para obtener la Tasa (Tiempo) de Proliferación Linfocítica (TPL) a los datos obtenidos del análisis de la cinética de ciclo celular se les aplicó la siguiente fórmula (Ivette y Tice, 1982):

$$TPL = \frac{\text{Tiempo de BrdU en el medio}}{1(I) + 2(II) + 3(III)} \times 100$$

TPL= Tiempo promedio de división de los linfocitos en cultivo.

En donde I, II, III, representa las proporciones de células en primera, segunda y tercera o divisiones subsecuentes respectivas.

El análisis de la frecuencia de ICHs se realizó al observar 50 metafases bien extendidas de segundo ciclo de duplicación, cuantificando el número y tipo de ICH's, considerando a los intercambios terminales como uno y los intersticiales como dos (figura 4).

Para la distribución de ICH's por célula se aplicó la prueba de Ji cuadrada, mientras que para la frecuencia de ICH por metafase se aplicó la prueba de "t" de Student.

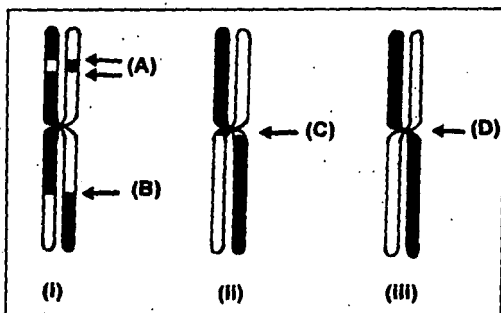


FIGURA 4. INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS.

(I) TRES INTERCAMBIOS; A) INTERCAMBIO DOBLE O INTERSTICIAL, B) INTERCAMBIO SENCILLO.

(II) UN INTERCAMBIO, C) INTERCAMBIO QUE NO INCLUYE EL CENTROMERO.

(III) UN INTERCAMBIO, D) INTERCAMBIO QUE INCLUYE A LAS DOS CROMATIDAS Y AL CENTROMERO.

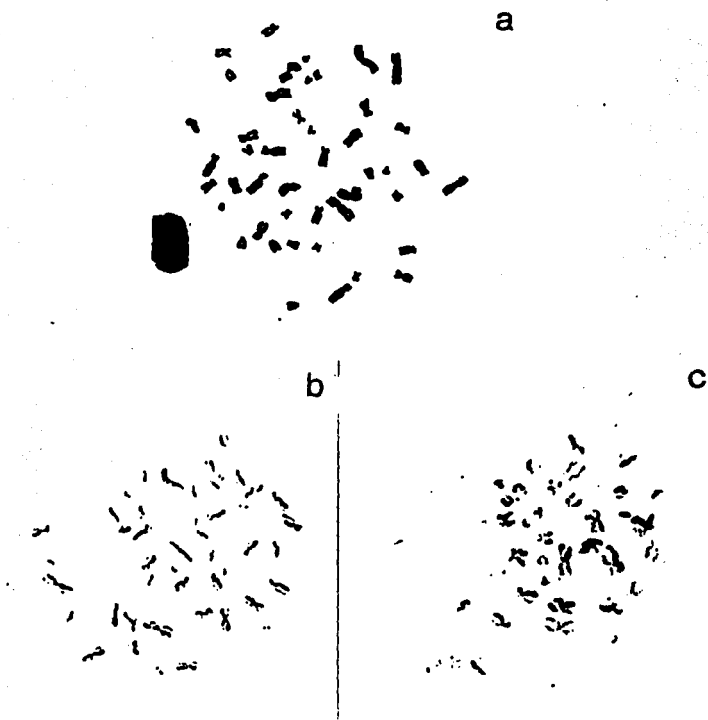


FOTO 1.- a) METAFASE EN PRIMERA DIVISION; b) METAFASE EN SEGUNDA DIVISION;
c) METAFASE EN TERCERA DIVISION.

RESULTADOS

INDICE MITOTICO (IM)

En la tabla 3, se muestran los resultados del índice mitótico de los cultivos testigos y de los tratados con Li_2CO_3 en cultivos de 48 y 72 horas.

TABLA 3. EFECTO DEL CARBONATO DE LITIO SOBRE EL INDICE MITOTICO EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS .

TRATAMIENTO (mmol/ml)	I.M. (48 HRS.) (%)	I.M. (72 HRS) (%)	N
TESTIGO	1.139	1.368	16000
0.25	0.895	1.030**	16000
0.50	0.641*	1.112**	16000
1.00	0.414*	0.679**	16000

* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ VS. EL TESTIGO CON PRUEBA DE "Z" PARA DIFERENCIA DE PROPORCIONES

Al comparar el índice mitótico del testigo (1.139%) con los tratados (cultivo de 48 horas) se observó que en las dosis de 0.50 y 1.00 mmol/ml este disminuye (0.641 y 0.414 %). En ambos casos las diferencias fueron significativas ($P < 0.05$).

En los cultivos de 72 horas se encontró que el índice mitótico de los tratados disminuye conforme se aumenta la dosis de Li_2CO_3 . Para el lote testigo se obtuvo un IM de 1.368%, mientras que para 0.25 mmol/ml fue de 1.030% , para 0.50 mmol/ml fué de 1.112% y para 1.0 mmol/ml fué de 0.679%. En todos los casos la disminución fue estadísticamente significativo ($P < 0.005$).

ABERRACIONES CROMOSOMICAS (AC)

En la tabla 4, se muestran las alteraciones cromosómicas en cultivos de 48 horas. Al comparar el total de células con aberraciones cromosómicas del testigo (0.99%), con los tratados se encontró un incremento (6.33% para 0.25 mmol/ml, 6.53% para 0.50 mmol/ml y 6.31 % para 1.00 mmol/ml). Al analizar el número y tipo de aberraciones

estructurales (fragmentos y gaps) se encontró que los fragmentos dobles y sencillos fueron estadísticamente significativos al comparar los cultivos tratados con los resultados obtenidos en el testigo (para el testigo correspondieron el 0.33% y 0.0%, y para los tratados con 0.25 mmol/ml el 2.6% y 1.0%, con 0.5 mmol/ml el 2.69 y 0.76%, con 1.0 mmol/ml el 3.15 y 1.05%). Por otro lado al comparar la frecuencia de los Gaps del testigo (0.0%) con los tratados, se encontró que solo se incrementó significativamente en las dosis de 0.25 mmol/ml (2.0%) y 0.50 mmol/ml (1.53%).

TABLA 4. ABERRACIONES CROMOSOMICAS (A.C) INDUCIDAS POR EL Li_2CO_3 EN LINFOCITO HUMANOS *in vitro* A 48 HORAS.

TRATAMIENTO (mmol/ml)	TOTAL DE CELAC (%)	FRAGMENTOS		POLIPLOIDIAS (%)	GAPS (%)
		SENCILLOS (%)	DOBLES (%)		
TESTIGO	3/300 (0.99)	1/300 (0.33)	0/330 (0.0)	2/300 (0.66)	0/300 (0.0)
0.25	18/300* (6.33)	6/300* (2.6)	3/300* (1.0)	2/300 (0.66)	6/300* (2.0)
0.50	17/260* (6.53)	7/260* (2.69)	2/260* (0.76)	4/260* (1.53)	4/260* (1.53)
1.00	12/190* (6.31)	6/190* (3.15)	3/190* (1.05)	4/190* (2.10)	0/190 (0.0)

* P < 0.005 VS TESTIGO CON PRUEBA DE JI CUADRADA

Al analizar la frecuencia de las aberraciones numéricas (Poliploidias), se encontró que en las dosis de 0.50 mmol/ml (1.53%) y 1.0 mmol/ml (2.10%) hubo un incremento de estas alteraciones al compararlo con el testigo (0.66 %) (P < 0.005).

ASOCIACION DE SATELITES (AS)

En la tabla 5, se muestran los resultados del total de células con AS, AS por célula, frecuencia de la participación de asociación de los cromosomas D y G y el número de metafases observadas, tanto en los cultivos testigos como en los tratados.

Al analizar el total de células con AS se observó un incremento del los tratados con respecto al testigo (34.3± 0.08 para 0.25, 45.25±0.34 para 0.5, y 33.3±0.42 para 1.0 mmol/ml vs. testigo 26.6±0.317) siendo significativos para todas las dosis con una P < 0.05. En relación a la frecuencia de AS por célula se observó que en todos los casos los

incrementos observados en los tratados eran significativos al compararlos con el testigo ($P < 0.05$).

TABLA 8. FRECUENCIA DE ASOCIACION DE SATELITES (AS) EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS CON Li_2CO_3 .

TRATAMIENTO (mmol/ml)	TOTAL DE CEL. CON AS $\bar{X} \pm E.E.$	AS POR CEL. $\bar{X} \pm E.E.$	D (%)	G (%)	N
TESTIGO	26.6 \pm 0.31	1.04 \pm 0.002	64.05	35.85	300
0.25	34.3 \pm 0.06*	1.12 \pm 0.03*	64.85	35.05	300
0.50	45.2 \pm 0.34*	1.33 \pm 0.06*	59.6	40.35	360
1.00	33.3 \pm 0.42*	1.24 \pm 0.05*	50.5	49.5	208

* $P < 0.05$ VS TESTIGO CON PRUEBA DE T DE STUDENT

La frecuencia de participación de los cromosomas D y G en las AS se espera que sea un 60% y 40% respectivamente (Zang y Back, 1969) y se encontró que no hubo variaciones significativas en ninguno de los tratamientos.

En la tabla 8, se muestran los resultados del número de células con uno a tres AS tanto en los lotes testigos como en los tratados.

TABLA 9. FRECUENCIA DE ASOCIACION DE SATELITES (AS) EN LINFOCITOS HUMANOS *in vitro* TRATADOS CON Li_2CO_3 .

TRATAMIENTO (mmol/ml)	No. DE CELULAS CON AS		
	CON 1 AS $\pm E.E.$	CON 2 AS $\pm E.E.$	CON 3 AS $\pm E.E.$
TESTIGO	25.3 \pm 2.6	1.0 \pm 0.57	0.0 \pm 0.0
0.25	30.0 \pm 0.57	4.33 \pm 1.45	0.0 \pm 0.0
0.50	31.0 \pm 4.37	12.7 \pm 1.71*	0.5 \pm 0.75*
1.00	25.6 \pm 4.4	6.3 \pm 0.6*	1.33 \pm 1.33*

* $P < 0.05$ VS TESTIGO CON PRUEBA DE T DE STUDENT

Cuando se analizó el número de células con una AS, se observó que no hubo diferencias significativas al ser comparado el testigo con los tratados, sin embargo se encontró un aumento de células con dos AS al compararse el testigo (1.0 ± 0.57) con los tratados, siendo solo significativos para las dosis de 0.50 y 1.00 mmol/ml (12.7 ± 1.17 y 6.3 ± 0.6) ($P < 0.05$)

En la tabla 7, se muestran los resultados de la frecuencia del número AS con dos o más cromosomas. Los resultados del número de AS con dos cromosomas mostraron que en el grupo testigo la frecuencia fue de 24.6 ± 0.31 , mientras que en los tratados fue de 33.3 ± 0.08 para 0.25, 50.5 ± 0.35 para 0.5, y de 40.0 ± 0.68 para 1.0 mmol/ml, encontrándose diferencias significativas en todos estos últimos ($P < 0.05$). Para el número de AS con tres cromosomas se observó que se incrementa significativamente, ya que para el testigo fue de 2.6 ± 0.03 y para los tratados: 4.3 ± 0.12 para 0.25, 9.5 ± 0.15 para 0.50 y 7.3 ± 0.08 para 1.0 mmol/ml ($P < 0.05$).

TABLA 7. FRECUENCIA DE ASOCIACIONES CON 2 O MAS CROMOSOMAS EN LINFOCITOS HUMANOS *in vitro* TRATADOS CON Li_2CO_3

TRATAMIENTO (mmol/ml)	NÚMERO DE CROMOSOMAS POR ASOCIACION ($\bar{X} \pm E.E.$)		
	(C/2)	(C/3)	(C/4)
TESTIGO	24.6 ± 0.31	2.6 ± 0.03	0.3 ± 0.03
0.25	$33.3 \pm 0.08^*$	$4.3 \pm 0.12^*$	1.3 ± 0.06
0.50	$50.5 \pm 0.35^*$	$9.5 \pm 0.15^*$	$1.0 \pm 0.05^*$
1.00	$40.0 \pm 0.68^*$	$7.3 \pm 0.08^*$	$1.6 \pm 0.14^*$

* $P < 0.05$ VS TESTIGO CON PRUEBA DE T DE STUDENT

Con cuatro cromosomas se observó un aumento significativo al comparar los tratados con el testigo (0.3 ± 0.03), encontrándose este incremento solo en las dosis de 0.50 y 1.0 mmol/ml (1.0 ± 0.05 y 1.6 ± 0.14 respectivamente) con $P < 0.05$.

En la tabla 8 se muestran los tipos de asociaciones cromosómicas obtenidas, observándose un incremento en la asociación del tipo DG en los cultivos tratados con litio en las concentraciones de 0.25, 0.50 y 1.0 mmol/ml (22.0 ± 4.58 , 28.5 ± 2.25 y 16.6 ± 2.18 respectivamente), en comparación con los testigos (12.33 ± 0.33).

TABLA 8. FRECUENCIA DE LAS COMBINACIONES DE ASOCIACIONES DE CROMOSOMAS OBSERVADAS EN LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS CON Li_2CO_3 , *in vitro*.

TIPO DE ASOCIACION	TESTIGO \pm E.E.	0.25 (mmol/ml) \pm E.E.	0.5 (mmol/ml) \pm E.E.	1.0 (mmol/ml) \pm E.E.
DD	5.66 \pm 3.48	9.66 \pm 4.66	14.00 \pm 3.20	10.60 \pm 3.28
DG	12.33 \pm 0.33	22.00 \pm 4.56*	28.50 \pm 2.25*	16.60 \pm 2.18*
GG	4.33 \pm 2.02	1.60 \pm 1.60	8.00 \pm 2.20	10.30 \pm 3.28
DDD	0.33 \pm 2.02	1.33 \pm 1.33	4.25 \pm 2.00	1.00 \pm 0.67
DDG	1.66 \pm 0.33	0.00 \pm 0.00*	3.25 \pm 1.60	0.33 \pm 0.33
DGG	0.33 \pm 0.33	3.00 \pm 1.00*	1.00 \pm 0.50	4.33 \pm 1.20*
GGG	0.33 \pm 0.33	0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.50	1.66 \pm 1.66
DDDG	0.33 \pm 0.33	0.00 \pm 0.00	0.25 \pm 0.25	0.00 \pm 0.00
DDGG	0.0 \pm 0.0	0.00 \pm 0.00	0.75 \pm 0.47*	1.30 \pm 0.88*
DGGG	0.0 \pm 0.0	0.66 \pm 0.66*	0.00 \pm 0.00	0.33 \pm 0.33*

* $P < 0.05$ VS TESTIGO CON PRUEBA DE T DE STUDENT

Para el tipo DDG se observó una disminución significativa en la dosis de 0.25 mmol/ml (0.0 \pm 0.0) al compararlo con el testigo (1.66 \pm 0.33) ($P < 0.05$). Las AS que involucraban a los cromosomas DGG se encontró que tenía variaciones con respecto al testigo (0.33 \pm 0.33) y solo fue significativo para las dosis de 0.25 (3.0 \pm 1.0) y 1.0 mmol/ml (4.33 \pm 1.20) con una $P < 0.05$. Las asociaciones del tipo DDGG mostraron un incremento solo en las dosis de 0.50 (0.75 \pm 0.47) y 1.0 (1.3 \pm 0.88) con respecto al testigo (0.0 \pm 0.0), mientras que las del tipo DGGG solo se incrementaron en las dosis de 0.25 (0.66 \pm 0.66) y 1.0 mmol/ml (0.33 \pm 0.33).

En el caso de las asociaciones del tipo DD, GG, DDD, GGG, DDDG presentaron algunas variaciones pero las diferencias no fueron significativas.

FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (ICH's) , CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN CELULAR (CCC) Y TASA DE PROLIFERACIÓN LINFOCÍTICA (TPL).

La tabla 9 nos muestra los resultados de la frecuencia de ICH por célula, de la CCC y la TPL. Los resultados de ICH's por célula mostraron que el Li_2CO_3 incrementa la frecuencia de ICH's en todas las dosis utilizadas con respecto al testigo (7.68 ± 0.33 para 0.25, 6.87 ± 0.26 para 0.5 y 7.31 ± 0.43 para 1.0 mmol/ml vs 5.75 ± 0.26 del testigo con ($P < 0.05$).

TABLA 9.- EFECTO DEL CARBONATO DE LITIO (Li_2CO_3) SOBRE LA INDUCCIÓN DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (ICH), CINÉTICA DEL CICLO CELULAR (CCC) Y TASA DE PROLIFERACIÓN (TPL) EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS *in vitro*.

TRATAMIENTO (mmol/ml)	ICH/CEL \pm E.E	C. 1	C. 2	C. 3	TPL	N
TESTIGO	5.75 ± 0.26	23.5	35.6	41.0	21.9	200
0.25	$7.68 \pm 0.33^*$	21.0	41.0	38.0	22.0	200
0.50	$6.87 \pm 0.26^*$	27.0	40.0	33.0	22.1	181
1.00	$7.31 \pm 0.43^*$	26.0**	43.0**	31.0**	23.7	100

* $P < 0.05$ VS TESTIGO CON PRUEBA DE T DE STUDENT
 ** $P < 0.05$ VS TESTIGO CON PRUEBA DE JI CUADRADA

Con respecto a CCC, cuando se analizó el porcentaje de células que se encontraban en primera, segunda y tercera o subsecuente divisiones, los resultados mostraron que solo en la dosis más alta (1.0 mmol/ml) se modificó significativamente la distribución de este tipo de células.

En lo que respecta a la tasa de proliferación linfocítica de los cultivos tratados con 0.25, 0.50, 1.00 mmol/ml de Li_2CO_3 fue de 22.0, 22.1 y 23.7 horas respectivamente, mientras que en el testigo fue de 21.9 horas. El análisis estadístico mostró que solo en la dosis más alta había diferencias significativas.

En la tabla 10 se muestran los resultados de la distribución de ICH's por metafase, observándose en todos los casos diferencias en la distribución del número de intercambios por célula con respecto al testigo.

TABLA 10. DISTRIBUCION DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS CON Li_2CO_3 .

TRATAMIENTO (mmol/ml)	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	+16
TESTIGO	23.0	39.5	26.5	10.0	0.5	0.5
0.25	9.4*	9.4	43.9*	16.4*	6.0*	4.2*
0.50	9.1*	34.9	41.3*	10.7	3.2*	0.5
1.00	9.0*	33.0	42.0*	12.0	3.0*	1.0

*= P < 0.05 VS TESTIGO CON PRUEBA DE JI CUADRADA

DISCUSION

El catión litio ha sido usado en embriología experimental desde el siglo XIX, tanto para estudios de organismos superiores como para estudios de regeneración y movimiento de cilios y flagelos en organismos unicelulares (Weinstein y Goldfield, 1975), mientras que en la Medicina las sales de litio, debido a la alta solubilidad del urato de litio, se creía que tenían cierta influencia benéfica en enfermedades causadas por depósitos de sales de ácido úrico como la gota, artritis y reumatismo (Garron, 1859).

En 1897 Lange fue el primero que sugirió que los iones de litio eran útiles en el tratamiento de las depresiones mentales, sin embargo tuvo que pasar más de medio siglo para que el litio fuera introducido a la Psiquiatría en Austria por Cade (1949), y tomó alrededor de 20 años para que el Carbonato de Litio (Li_2CO_3) llegará a ser un remedio estándar para el tratamiento de enfermedades maniaco-depresivas y psicosis esquizofrénica (unipolar y bipolar). (Baastrup y Schou, 1967; Schou, 1970; Payson, 1971; Linakis *et al.*, 1989; Shou, 1986; Linakis *et al.*, 1992, Povisen *et al.*, 1992).

Aunque los mecanismos farmacológicos de la acción antisicótica de los iones del litio no están bien comprendidos, lo mas probable es que, en contraste con aquellos fármacos estimulantes que incrementan la actividad de la norepinefrina, el litio causa que la concentración de esta disminuya en las sinapsis (Julien, 1981; Jurand, 1988; Cedric y Alan, 1993). Se cree que los iones de litio incrementan la permeabilidad de las membranas celulares nerviosas seguido de un desplazamiento del Ca^{++} y Magnesio. Las propiedades farmacológicas del litio lo refieren como un estabilizante del humor, por lo que en general las sales de litio son incluidas dentro del grupo que, día con día se incrementa, de agentes psicoactivos (Jurad, 1988; Cedric y Alan, 1993).

El efecto profiláctico del Li_2CO_3 en enfermedades mentales unipolares y bipolares, es por ahora uno de los mejores documentos de la Farmacoterapia Psiquiátrica (Baastrup y Schou, 1967; Schou, 1986). Aunque clínicamente es totalmente efectivo, el Li_2CO_3 ha sido comparativamente bajo en el índice terapéutico, ya que en dosis excesivas de litio presenta resultados tóxicos. En dosis agudas provoca; coma, convulsiones, cardiovasculares, colapsos y la muerte, además de desarrollar sensación de sed y poliúria. En muchos pacientes que consumen Li_2CO_3 , estos han mostrado tener una complicación en la respuesta decreciente de los túbulos renales o de la hormona

antidiurética (Povisen *et al.*, 1992), y desafortunadamente, no existe un antídoto específico para contrarrestar la toxicidad del litio (Linakis *et al.*, 1992).

En los últimos años han aumentado en forma significativa, los estudios tendientes a investigar los efectos mutagénicos y carcinogénicos de medicamentos y compuestos químicos (Sasaki, 1982; Rojas *et al.*, 1992, 1993). Muchos son los sistemas biológicos de prueba que se utilizan en la valoración de estos compuestos y, que además de proporcionar datos confiables, permiten establecer el riesgo potencial de daño para el hombre. Estos sistemas van desde el uso de procariontes (bacterias) hasta eucariontes (plantas, animales y células en cultivo) (Mudry *et al.*, 1981; Moutschen, 1982; Prival, 1984; Brusick, 1987).

Los cambios que provoca un compuesto sobre el proceso de división celular, así como la inducción de anomalías cromosómicas son un criterio importante para la identificación de daño en los sistemas genéticos (Sharma y Talukder, 1987). Dentro de éstos, la toxicidad celular, producida por un medicamento o compuesto, es uno de los primeros índices de efecto que generalmente se evalúa. Los parámetros más utilizados para este fin son el índice mitótico (IM) y la cinética de proliferación celular (CPC). Rojas *et al.*, (1992, 1993) han considerado que tanto el IM como la CPC, analizadas en condiciones estándares, son excelentes indicadores de daño genotóxico y citotóxico, además de ser altamente reproducibles.

Aunque los datos reportados sobre la citotoxicidad inducida por el litio han mostrado ser contradictorios, (Friedrich y Nielse, 1969; Aoki y Ruedy, 1971; Nishioka, 1975 y Kanematsu *et al.* 1980), los resultados obtenidos en este trabajo al aplicar Li_2CO_3 a linfocitos humanos en cultivos tanto de 48 hrs como de 72 hrs muestran que este compuesto disminuye significativamente el IM en ambos tratamientos.

Se han realizado diversos estudios con metales para estudiar la citotoxicidad tanto en sistemas de prueba *in vitro* como *in vivo*. Las sales de sodio y potasio (grupo IA de los metales alcalinos), presentan actividad citotóxica, atribuida al anión propio del metal. Además se ha reportado un incremento en la frecuencia de ICH's y de AC tanto en células animales como en células humanas tratadas con estos metales (Sharma y Talukder 1987).

El cobre es el único metal que cuenta con información suficiente sobre su acción mutagénica. Dentro de los efectos más sobresalientes se sabe que produce infidelidad

en la síntesis de ADN, así como también la disminución del IM (Kazantzis y Lilly, 1986). Por su lado el aluminio y el talio también muestran actividad citotóxica y mutagénica, mientras que el lantano y el cesio son considerados solamente como citotóxicos (Kazantzis y Lilly, 1986). También se ha descrito que el cadmio induce alteraciones en la mitosis, además de inducir micronúcleos y reducir el IM. Debido a sus efectos en la división celular, se cree que esto es debido a la interacción de este metal con el grupo sulfhidrilo de las proteínas que forman el huso (Lakkand *et al.*, 1986).

Se sabe que la mayoría de los metales son capaces de afectar la división celular y producir alteraciones en las fibras del huso, lo que conduce a la formación de diplocromosomas, poliploidías y a una disminución del índice mitótico (Sharma y Talukder, 1987). Algunas de estas respuestas son atribuidas a la gran afinidad de los metales por los enlaces disulfuro, y por consecuencia, a las proteínas del huso (Alvarez, 1992). Los resultados muestran que el carbonato de litio al igual que la mayoría de los metales es capaz de alterar el índice mitótico, aunque el mecanismo aún se desconoce, ya que existen reportes que indican que este metal no se une a las proteínas (Bloom *et al.*, 1983; Cedric y Alan, 1993).

Aunque la citotoxicidad es usualmente estimada en cultivo de linfocitos y permite tener una idea de la tolerancia máxima de las dosis (Dean y Danford, 1984), en paralelo se deben realizar evaluaciones de eventos que permitan establecer daño al ADN, como son los intercambios de cromátidas hermanas (ICH's) y las alteraciones cromosómicas (AC), (Moutschen, 1982; Brusick 1987; Rojas *et al.*, 1992, 1993).

En este trabajo, se evaluaron los efectos del carbonato de litio sobre la inducción de anomalías cromosómicas, tanto estructurales como numéricas. Los resultados obtenidos del total de células con aberraciones cromosómicas, fragmentos sencillos (foto 2a), dobles (foto 2b) y poliploidías (foto 2c) mostraron que este compuesto es capaz de elevar significativamente la frecuencia de estos parámetros.

Estos resultados no están de acuerdo a lo reportado en la literatura, ya que, en la mayoría de los tratamientos *in vitro* los resultados son contradictorios, y tienden a ser negativos (Friederich y Nielse, 1969; Timpson y Price, 1971), mientras que, en ciertos pacientes bajo terapia con litio se reportan incrementos en las frecuencias de aberraciones cromosómicas (Friederich y Nielse, 1969; De La Torre and Krompotic, 1975), la mayoría de los reportes muestran una ausencia en la inducción de rupturas



FOTO 2.- a) FRAGMENTO SENCILLO; b) FRAGMENTO DOBLE; c) POLIPLOIDIA

cromosómicas en personas con tratamiento continuo con este compuesto (Sharma y Talukder, 1987; Jarvic et al., 1971; Timpson y Price 1971).

La mayoría de los trabajos realizados *in vitro* involucran al carbonato como compuesto evaluado, encontrando que en todos los casos se emplean bajas dosis, por lo que no se observan aberraciones cromosómicas, aunque además de lo anterior, lo pequeño del tamaño de la muestra hace que los resultados sean difíciles de interpretar (Sharma y Talukder, 1987). Los tratamientos realizados en este trabajo en los cultivos de linfocitos (dosis de 0.25, 0.5 y 1.0 mmol/ml) son más altas que las anteriormente utilizadas en las mismas condiciones (Tabla 11), razón por la cual posiblemente se pudieron observar aberraciones cromosómicas.

TABLA 11. Dosis comparativas de diferentes compuestos de litio usadas en prueba de mutagénesis

AUTOR	COMPUESTO	SISTEMA DE EVALUACION	DOSES (mmol)	A.C.	ICH	AS	S. ADN
FRIEDRICH Y NIELSE (1969)	Li ₂ CO ₃	LINFOCITOS HUMANOS <i>in vitro</i>	1.2, 1.8 y 2.4	-		-	
		LINFOCITOS HUMANOS <i>in vitro</i>	DOSES MAS ALTAS	+		+	
TIMPSON Y PRICE (1971)	Li ₂ CO ₃	LINFOCITOS HUMANOS <i>in vitro</i>	13.6, 13.3 Y 1.34	+	+	+	
DEY (1966)	Li ₂ CO ₃	MEDULA OSEA DE RATON <i>in vivo</i>	8.12	+			
SOTTI et al., (1969)	LiCl	MEDULA OSEA DE RATON <i>in vivo</i>	0.908, 0.960 Y 0.90	+	-		
	Li ₂ CO ₃	MEDULA OSEA DE RATON <i>in vivo</i>	0.018, 0.18 Y 1.82	+	-		
	Li ₂ SO ₄	MEDULA OSEA DE RATON <i>in vivo</i>	0.06, 0.80 Y 0.80	+	-		
WEINER et al., (1969)	LiOCl	CÉLULAS CHO <i>in vitro</i>	???	+			
BRAM (1969)	Li ₂ CO ₃	RATON <i>in vivo</i>	0.87				+
SUH (1982)	LiCl	RATON <i>in vivo</i>	1-2				+
SERRA (1986)	Li ₂ CO ₃	LINFOCITOS HUMANOS <i>in vitro</i>	250, 500 Y 1000	+	+	+	

A.C. = ABERRACIONES CROMOSÓMICAS; ICHS = INTERCAMBIO DE CRÓMATIDAS HERMANAS
 A.S. = ASOCIACION DE SATELITES; S. ADN = SINTESIS DE ADN

Friedrich y Nielse (1969) al tratar cultivos de linfocitos humanos normales con bajas dosis de litio, encontraron que este metal no incrementaba la frecuencia de gaps, fragmentos cromosómicos, poliploidías o aneuploidías, sin embargo, cuando aplicaban altas concentraciones reportaron un incremento en la frecuencia de células poliploides,

además de una reducción en el número de las mitosis. Cuando analizaron tres pacientes que se encontraban bajo terapia con carbonato de litio, encontraron un incremento tanto en la frecuencia de anomalías cromosómicas como en la incidencia de asociación de satélites, observando en este caso también una reducción en el índice mitótico.

Por su lado, Genest y Villeneuve (1971) y Jarvik *et al.*, (1971) reportaron la reducción del índice mitótico en algunos pacientes maniaco-depresivos tratados con carbonato de litio, sin embargo Timpson y Price (1971) en sus estudios, contradicen los resultados anteriores, ya que al añadir carbonato de litio a cultivos de 72 horas de linfocitos humanos de sangre periférica, (en cantidades equivalentes de 10.0, 1.0, y 0.1g ingeridas por un hombre de 70 kg, siendo las dosis equivalentes a 10 dosis terapéuticas), encontraron que el daño cromosómico no era significativo, además de que no hubo cambios en el índice mitótico, ni tampoco en la transformación linfocítica, lo cual sugirió que el litio no afectaba la síntesis de ADN o la inducción de mitosis en las células.

Aoki y Ruedy (1971), observaron aberraciones cromosómicas en bebés recién nacidos de madres tratadas con carbonato de litio, pero no en las madres. Aunque solamente existen reportes de trabajos realizados en pacientes maniaco-depresivos (bajo terapia con Li_2CO_3) en los que se incrementa la frecuencia de aberraciones cromosómicas (Torre y Krompotic, 1975; Friedrich y Nielse, 1969), en los estudios realizados *in vitro* los reportes han sido negativos de que induce daño al ADN, lo que ha causado polémica en los diferentes resultados.

Por otro lado son pocos los estudios que existen sobre el efecto del litio en animales de laboratorio. Dey (1985) tratando por vía intraperitoneal ratas albinas con una solución acuosa de carbonato de litio al 0.6% encontró que este compuesto era clastogénico, actuando principalmente sobre el periodo post-sintético. Estudios realizados por Sobti (1989) con tres sales de litio (Cloruro de litio, carbonato de litio y acetato de litio) *in vivo*, muestran que estos compuestos incrementan significativamente la frecuencia de aberraciones cromosómicas, pero no los ICH's. Estos resultados muestran que el litio en ciertos sistemas de prueba y en determinadas dosis puede inducir daño cromosómico, por lo que se requiere realizar más estudios a este respecto.

En el presente trabajo uno de los efectos evaluados fué la modificación de la frecuencia de asociaciones de satélites, evento que había sido previamente reportado por

Friedrich y Nielse (1969) al tratar cultivos de linfocitos humanos normales con bajas dosis de litio.

Desde 1961 se ha admitido que los brazos cortos de los 10 cromosomas acrocéntricos (grupo D y G) en el hombre poseen unas estructuras en la porción terminal, semejando satélites, término que se le da hasta la fecha. Cuando estos cromosomas se encuentran muy cercanos uno con otro por sus extremos satelizados y además se encuentran alineados, forman unas figuras que conocen como asociación de satélites (AS). (Ferguson-Smith y Handmaker, 1961; Verma, 1983) (fotos 3a, 3b y 3c).

La asociación de los cromosomas satelizados a menudo sugiere que estas regiones poseen una propiedad especial de adhesión, probablemente tal cualidad está directamente relacionada con la formación del material nucleolar, ya que las regiones del satélite se encuentran involucradas en la formación del nucleólo, razón por la cual se les conoce también como las regiones organizadoras del nucleólo (NOR) (Ferguson-Smith y Handmaker, 1961; Trent *et al.*, 1981)

La formación del nucleólo se lleva a cabo en anafase tardía con material del núcleo presente en la vecindad y sobre la superficie de los cromosomas, algunas veces forma la envoltura pericromosómica y este material es condensado en pequeños cuerpos prenucleolares en telofase e interfase temprana y provee las bases en la formación de los nucleolos maduros en interfase (Ochs *et al.*, 1985).

Cuando los cromosomas acrocéntricos satelizados se asocian se ha observado que esta asociación está relacionada con la presencia de conexiones de ADN_r con ARN_r y proteínas (Kirsch *et al.*, 1978), por lo cual este tipo de evento es considerado como un posible mecanismo para la producción de anomalías cromosómicas, como son la no disyunción autosómica tanto en meiosis como en las divisiones del cigoto (trisomías 13 y 21) y las translocaciones del tipo Robertsonianas, donde están involucrados los cromosomas acrocéntricos (Ferguson-Smith y Handmaker, 1961; Verma *et al.*, 1983; Migliore *et al.*, 1993; Zhong *et al.*, 1994).

En este trabajo, las evaluaciones realizadas muestran que el litio incrementa la proporción de células con asociaciones de satélites, el número total de asociaciones y el número de cromosomas acrocéntricos involucrados en las asociaciones (tablas 5, 6, 7 y 8).

FALLA DE ORIGEN



FOTO 3.- ASOCIACIONES DE SATELITES: a) DG; b) DDGG; c) DGG, DG, DG

Aunque algunos estudios sobre asociación de acrocéntricos han demostrado que existe una variabilidad en el número y tipo de las asociaciones, debido en parte a las técnicas de cultivos, a la preparación de laminillas, a la edad y el sexo de los individuos estudiados, muchos investigadores han tratado de demostrar que la variación en el número y tipo de las AS están relacionados con ciertos síndromes genéticos, con algunas enfermedades hormonales, o por la exposición a químicos como metales o drogas (Curtis, 1974; De Capoa *et al.*, 1970; Roldán y Altamirano, 1990; Zhong *et al.*, 1994; Migliore *et al.*, 1993) o agentes físicos (Krisch *et al.*, 1978).

Krisch *et al.*, (1978) realizaron estudios de las modificaciones de AS en poblaciones humanas expuestas a mutágenos ambientales (acetato de fenilmercurio, plomo inorgánico), y reportaron que a dosis bajas estos compuestos modifican los patrones de asociación de los cromosomas acrocéntricos. En el grupo expuesto a Pb encontraron que este metal incrementa la frecuencia del total de aneuploidias así como de las asociaciones de acrocéntricos, mientras que Roldán y Altamirano (1990) observaron que el pentóxido de vanadio incrementa la frecuencia de asociación de satélites en linfocitos humanos *in vitro*.

Por su lado, en estudios realizados por Torre y Krompotic, (1975) en pacientes bajo terapia de Li_2CO_3 estos investigadores, encontraron que este compuesto es capaz de elevar la frecuencia de asociaciones de satélites, de manera similar a lo encontrado en el presente estudio.

Estudios en poblaciones normales hechos por Froland y Mikkelsen (1984) y Zang y Back (1968) reportaron que la frecuencia de asociaciones por célula para hombres estaba dentro de un rango de 1.63 a 2.36, mientras que en mujeres era entre 1.61 a 2.42, por lo que concluyen que en esta población hay por lo menos 2 asociaciones por metafase, mientras que Ferec *et al* (1988), cita que en hombres de 20-45 años se presentaban metafases con un promedio de una asociación de satélites.

Los resultados encontrados en el presente estudio mostraron que a pesar de observarse un incremento en el total de células con asociaciones, el rango de asociaciones por célula tanto de los cultivos tratados como de los testigo fué similar, variando de 1.04 a 1.24, lo cual indicó que no hubo diferencias significativas en ambos grupos (tabla 5 y 6).

Tomando en consideración que en el caso de los cromosomas humanos, de los 23 pares 5 de ellos son cromosomas acrocéntricos, 6 de ellos pertenecen al grupo D y 4 al grupo G, en las asociaciones aleatorias, los porcentajes teóricos de participación de los cromosomas deben ser del 60% (6 cromosomas) para los cromosomas del grupo D y del 40% para los del grupo G (4 cromosomas) (Zang y Back, 1968). Los resultados mostraron que a pesar de existir variabilidad con respecto al testigo, al aplicar la prueba estadística esta reveló que no hubo diferencias significativas, entre los cultivos tratados y los testigos.

Cuando se describen las frecuencias de asociaciones de satélites, uno de los parámetros que se deben cuantificar es el número de cromosomas acrocéntricos involucrados por asociación (Sigmund *et al.*, 1979). Los resultados mostraron que el litio incrementa la frecuencia del número de cromosomas que participan en una asociación, es decir, aunque no se incrementa el número de asociaciones por célula, en cada AS participan más cromosomas.

Dento *et al.*, (1976), indicó que de las 32 posibles combinaciones entre cromosomas de los grupos D y G en el hombre solo 17 han sido observadas, dividiéndolas en cinco grupos de acuerdo al número de cromosomas asociados. En este trabajo se encontraron solo 10 combinaciones y fueron agrupadas de la misma manera que Dento. Los resultados de las frecuencias del tipo de cromosomas asociados fueron muy variados, solo cabe destacar que la frecuencia del tipo DG se incrementó significativamente en todas las concentraciones (tabla 8). Estos resultados son de gran importancia, ya que las aneuploidías que se presentan con mayor frecuencia en el hombre son aquellas que involucran los cromosomas acrocéntricos (Por ejemplo la trisomía 21 Síndrome de Down tiene una incidencia del 1/600 con una frecuencia de 97% Down regular y del 3% por traslocación 21/21 o 14/21).

Por otro lado el interés del estudio en la inducción de las aneuploidías es que esta alteración cromosómica es una de las causas de los abortos espontáneos, además de provocar malformaciones neonatales, lo cual representa un problema tanto económico como social (Dellarco *et al.*, 1985; Parry & Parry, 1987; Bond, 1987; Ford, 1990; Migliore *et al.*, 1993; Zhong *et al.*, 1994).

Existen numerosos ejemplos de químicos que son capaces de inducir aneuploidías en diferentes sistemas de prueba, aunque son relativamente pocos aquellos que han sido ampliamente comprobados (Waters *et al.*, 1985). Según los datos encontrados en éste

: trabajo, el carbonato de litio incrementa la frecuencia de asociaciones de satélites, fenómeno que incrementa la probabilidad de aberraciones cromosómicas como las translocaciones y las no disyunciones, por lo cual lo podemos considerar a este metal como un posible aneuploidógeno, hecho que fue demostrado por Bond (1987) quien empleo como sistema de prueba al hongo (4 cepas distintas) y encontró que el LiCl incrementaba la frecuencia de estas alteraciones cromosómicas.

Otro parámetro de daño evaluado en este trabajo fué el Intercambio de cromátidas hermanas (ICH's). En la actualidad varios grupos de investigación sugieren que la frecuencia de intercambios es un excelente indicador para detectar mutágenos y carcinógenos por ser un método fácil y sensible (Obe *et al.*, 1981; Takehisa, 1982; Lambert *et al.*, 1982; Brusick, 1987).

Los ICH's son conocidos como un cambio recíproco de una cromátida nuevamente replicada junto con la cromátida hermana, y de carácter aparentemente homólogo en un loci, posiblemente originada de la recombinación de la doble cadena del ADN cromosómico restringido por la polaridad de la hélice (Sasaki, 1982; Sorsa, 1984; Perry y Thomson, 1984; Morales *et al.*, 1990).

En estudios previos se ha reportado que la frecuencia basal de ICH's en linfocitos de sangre periférica varía entre individuos, y los posibles factores que afectan la frecuencia de ICH's son preferentemente la exposición a agentes terapéuticos o genotóxicos ambientales ó los defectos genéticos como en el caso del Síndrome de Bloom (Palitti *et al.*, 1983)

Los resultados obtenidos al evaluar la frecuencia de ICH's inducidos por carbonato de litio se muestra que este metal indujo un aumento estadísticamente significativo de este parámetro en todas las dosis.

Se ha estudiado 53 metales para determinar sus efectos genotóxicos tanto *in vitro* como *in vivo*, y se observó una gran variación de respuestas obtenidas con diferentes sistemas de prueba. Estas pruebas fueron agrupadas en 15 sistemas que permiten una comparación rápida del comportamiento de los metales. Entre estas pruebas se evaluó los ICH's y se reportó que es positivo para el As, Be, Cr, Pb, Ni, Pt y Se (Hansen, 1984).

Sin embargo, son pocos los resultados sobre la inducción de ICH's por litio. Torres y Kromp (1971), observaron un incremento de la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en pacientes bajo terapia con Li_2CO_3 . Estos datos fueron

posteriormente apoyados por Friedrich y Nielse (1969), quienes también encontraron un aumento en la frecuencia de ICH's en linfocitos de sangre periférica en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los mecanismos de mutagénesis de los metales aún no están completamente elucidados (Leonard, 1979; Flessel *et al.*, 1980; Bianchi y Levis, 1984). El comportamiento de los metales parece involucrar un paso inicial del enlace covalente de los cationes metálicos con los sitios nucleofílicos en el ADN, proteínas cromosómicas, ADN polimerasa, o substratos nucleotídicos precursores. Estas interacciones afectan mucho la fidelidad de los mecanismos de replicación del ADN e induce ADN aberrante o genes de expresión anormales (Bianchi y Levis, 1984; Sunderman, 1984).

La relación entre los procesos de reparación del ADN y la génesis de ICH's es hasta la actualidad tema de gran controversia. Recientemente, nuevas aproximaciones acerca de este problema fueron posibles por el descubrimiento de la benzamida y algunos de sus derivados al incrementar la frecuencia espontánea de ICH's.

La benzamida y sus análogos, como es la 3-aminobenzamida (3AMB) son inhibidores eficientes del ADPribosa transferasa nuclear (ADPRT), está tiene actividad enzimática que es requerida para una eficiente reparación por escisión, probablemente además de la regulación por la actividad de la ADN ligasa. Consecuentemente la capacidad de inducción de ICH's de tales inhibidores ha sido interpretada como una consecuencia del retraso de la replicación de las cadenas rotas del ADN que se considera ocurren espontáneamente en el ADN que contiene bromodesoxiuridina (BrUd) (Lindahl y Sydney, 1984; Kröger, 1990).

Painter (1980) propuso que los ICH's son reflejo de errores en la síntesis de ADN, sin que estos conduzcan a la muerte. Siendo intercambios de dos filamentos entre dos moléculas de ADN posiblemente por alguna de las tres vías siguientes: 1) Un intercambio entre cromátidas que han sido rotas independientemente en sitios homólogos; 2) un sistema de reparación que opera durante la replicación del ADN y 3) un error en la replicación del ADN.

Srám *et al.*, 1990 realizaron estudios de los efectos de drogas psicótropas en ratas de 6 meses de edad, administrando Li_2CO_3 (0.05%) por vía oral, ellos indicaron que usando la terapia durante un largo período decrece la síntesis de ADN que se lleva a

cabo durante el proceso de reparación. Estos resultados muestran que el litio puede estar alterando estos mecanismos, y por lo tanto incrementar la frecuencia de ICH's.

Cuando se analizó la distribución de intercambios de cromátidas hermanas por célula en el presente estudio, se encontró que el carbonato de litio también modificó este índice, observándose que disminuyó el número de células que contenían de 1 a 3 ICH's, mientras que la frecuencia de células con 7 a 9 y 13 a 15 ICH/cél aumentó ($P < 0.05$ con X^2) (tabla 10). Estos resultados indican que en las células tratadas con Li_2CO_3 existe una tendencia a aumentar en número de ICH's/cél. con respecto al testigo, datos que se reflejan en el promedio de ICH's por célula.

Cuando se exponen las células a la 5-bromodeoxiuridina durante al menos dos ciclos celulares, este método nos permite identificar mediante un patrón de tinción, las células que se han dividido una, dos y tres o más veces, lo cual nos da la posibilidad de estudiar la cinética del ciclo celular de los linfocitos (CCC) (Takehisa; 1982; Perry y Thomson, 1984; Waters, 1984; Kröger *et al.*, 1990).

En las células que se han dividido una vez se observó que las cromátidas tienen un mismo color oscuro (foto 1a), cuando se han dividido dos veces el patrón de tinción muestra que una cromátida es clara y la otra es oscura, mientras que cuando la célula se ha dividido tres veces o más se observan cromosomas con las dos cromátidas claras (foto 1b) y cromosomas con una cromátida oscura y una clara (foto 1c). De esta manera al saber cuantas veces se ha dividido una célula en un tiempo determinado, se puede calcular la tasa de proliferación linfocítica (TPL en horas), y establecer diferencias en tiempos de división celular (Ivette y Tice, 1982; Roldán y Altamirano, 1990).

Los resultados obtenidos de la CCC mostraron que en la dosis más alta (1.0 mmol/ml), la tasa de proliferación linfocítica fue de 23.7 Hrs. mientras que en los cultivos testigo fue de 21.9 Hrs. Estos datos indican que el litio modificó el tiempo de división celular, haciendo que los linfocitos tardaran más en duplicarse, sin embargo las diferencias observadas no son estadísticamente significativas. Los datos indican que Li_2CO_3 tienen un comportamiento mutagénico, como la gran mayoría de los metales.

Los daños inducidos en el ADN de los linfocitos por agentes mutagénicos, pueden estar sujetos en algunos casos a la reparación, a pesar de la baja actividad, (Perry y Thomson, 1984), lo que conduce a que las lesiones no reparadas o mal reparadas formen mutaciones puntuales y aberraciones cromosómicas importantes.

Los ICH's son resultado de una mala replicación del templado de ADN, dañado probablemente por recombinación o pérdida de la velocidad de replicación de la horquilla propuesto por Painter (1980). Similarmente, las aberraciones cromosómicas inducidas por agentes químicos parecen ser formadas por los mismos tipos de mecanismos. En general los mecanismos de formación de AC e ICH's después de ser tratados con agentes químicos pueden deberse a un proceso de recombinación iniciado durante la reparación del ADN dañado o la replicación de un templado dañado (Latt, 1981; Painter, 1980; Duncan y Evans, 1983; Lugo *et al.*, 1989; Preston, 1981).

Los diferentes estudios realizados muestran que al parecer los parámetros estudiados (AC, ICH's y AS) no están relacionados, ya que tienen diferentes mecanismos, que conducen a la formación de las alteraciones en el ADN a diferentes niveles, por lo que se puede concluir que el litio es un metal que tiene un amplio potencial de acción sobre las células.

Estudios recientes indican que los niveles terapéuticos de litio (0.6-1.2 meq/L) pueden reducir la sensibilidad de las neuronas y otras células a varios neurotransmisores mediante la disminución del contenido de fosfatidilinositolídeos de las membranas plasmáticas (Cedric y Alan, 1993). Sin embargo los mecanismos responsables de los efectos terapéuticos y tóxicos del litio siguen sin entenderse (Jurad, 1988, Cedric y Alan, 1993; Bertram, 1993).

El litio se emplea en forma primaria para prevenir el desarrollo de la fase maníaca de la depresión bipolar, no se utiliza para los episodios maníacos agudo, en cuyo caso son necesarios los fármacos antipsicóticos clásicos (benzodiazepinas) para controlar la manía externa y tratar los síntomas psicóticos. El litio se usa como tratamiento de mantenimiento y parece modular los ciclos así como prevenir la manía. (Bloom, 1983; Donaldson, *et al.*, 1983; Cedric y Alan, 1993; Bertram, 1993).

El litio tiene un índice terapéutico muy bajo y es necesario determinar y mantener los niveles sanguíneos para asegurar su eficacia y prevenir los efectos tóxicos. El litio provoca una serie de alteraciones adversas como son; debilidad, sed, ataca también el sistema nervioso central provocando confusión mental, temblores en las manos, convulsiones, alteraciones gastrointestinales, alteraciones renales (necrosis glomerular), cardiovasculares, coma y algunas veces la muerte. Incluye también crecimiento de la tiroidea, algunos pacientes desarrollan bocio, edema, en recién nacidos provoca letargo,

cianosis y posiblemente hepatomegalia, y frecuencia cardíaca, especialmente la de Ebstein. A parte de estos efectos existen informes de función sexual alterada en hombres tratados con litio. (DePaulo *et al.*, 1981; Goodwin, 1983; Cedric y Alan, 1993; Bertram, 1993).

En este trabajo se encontró que el carbonato de litio es capaz de incrementar la frecuencia de AC, AS, ICH's y reducir el IM. Aunado a la serie de alteraciones que provoca el litio, puede ser un candidato clastogénico, aneuploidogénico, mutagénico y citotóxico.

Debido a la citotoxicidad de litio y de todas sus repercusiones que tiene a nivel citogenético, es necesario buscar otras alternativas para el tratamiento de desórdenes mentales, ya que provoca muchas alteraciones adversa para el paciente.

CONCLUSIONES

A pesar de que aún no se ha elucidado el mecanismo de acción del litio, y que los resultados reportados son contradictorios acerca de su comportamiento citotóxico y genotóxico en sistemas de prueba *in vitro* como *in vivo*, al evaluar el IM se encontró que disminuye significativamente al incrementar las dosis de Li_2CO_3 , lo cual indica que el litio a pesar de que no se une a las proteínas como los demás metales, es un agente citotóxico

Aunque en la literatura se reporta que el Li_2CO_3 en bajas dosis no es capaz de inducir aberraciones, en el presente estudio, al utilizar dosis más altas, se observó un incremento en la frecuencia de AC tanto estructurales como numéricas.

Cuando se analizó el número y tipo de aberraciones estructurales el litio fué capaz de producir fragmentos sencillos y dobles, con un incremento significativo, por lo que se puede clasificar como un agente clastógeno.

En el análisis de AC numéricas se encontró que el Li_2CO_3 en determinadas dosis incrementó la frecuencia de poliploidías, por lo que puede ser un posible agente euploidógeno.

En la evaluación de la frecuencia de AS, el litio incrementó de manera significativa, en todas las dosis, este parámetro, fenómeno que está asociado a la probabilidad de AC, lo cuál permite considerar al Li_2CO_3 como un posible aneuploidógeno.

El litio incrementó la frecuencia de ICH's , elevó la frecuencia de AS, de aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales y disminuyó el índice mitótico. Los resultados muestran que este metal tiene un gran espectro de acción, por lo que se puede considerar como un agente Genotóxico y Mutagénico.

COMENTARIOS FINALES

Los estudios sobre los efectos genotóxicos de los metales sugieren que no son mecanismos comunes, ya que el daño depende de la bio-habilidad de estos, esto es, de su capacidad de entrar a la célula y de reaccionar con moléculas importantes.

Se han observado dos modelos de acción predominantes: La formación de cadenas con el O_2 y otros radicales y que llevan al ADN a oxidarse y dañarse; y a la interferencia con la reparación del ADN y los procesos de replicación ya que es muy sensible a la acción de compuestos metálicos (no esenciales) que tienen la habilidad de competir con los iones metálicos esenciales y formar complejos con biomoléculas (Hartwig, 1995).

Estudios realizados *in vitro* con metales sugieren que estos tienen actividad mutagénica en bacterias y en células de mamíferos, sin embargo, los metales, dependen de la reactividad de otros químicos que interaccionan con los enlaces de algunos componentes del medio, resultando un decrecimiento en la bio-habilidad de los metales en las células. Los resultados de estos estudios indican que la composición del medio extracelular puede ser un verdadero modulador genético y/o citotóxico, sin embargo cuando se realizan las comparaciones de resultados de distintos laboratorios y diferentes experimentos con metales carcinogénicos se observa que el medio extracelular también puede modificar de manera significativa la respuesta de estos elementos (Cantoni, *et al.*, 1986).

Por todo lo anterior se hace necesario la continuación de este trabajo, ya que se requiere comprobar si es el carbonato de litio el que tienen una acción directa sobre los cromosomas o este compuesto está reaccionando con los componentes del medio extracelular. Además se deben de realizar estudios en pacientes tratados durante un largo periodo con Li, y evaluar otros parámetros para estudiar el efecto. Dentro de estos estudios se encuentran: La electroforesis unicelular (Singh *et al.*, 1988; Tice *et al.*, 1990; Hartmann *et al.*, 1995), la evaluación de micronúcleos y aneuploidías mediante la técnica de hibridación *in situ* con sondas específicas de ADN (centroméricas y de cromosomas completos) (Asfari *et al.*, 1994; Michaelis *et al.*, 1994), y aspectos moleculares, como la activación y o inhibición de genes (Caron y Hamilton, 1995). Estas metodologías ayudarían a elucidar el mecanismo de acción del litio ya que hasta hoy en día sigue sin comprenderse.

REFERENCIAS

Albertini, R. D. , Sylvester, D. L., y Allen , E. F., (1982) The G Thio Guanina-Resistant Peripheral Blood Lymphocytes Assay for Direct Mutagenicity Testing in Human. En: Mutagenicity. New Horizons In Genetic Toxicology. Academic. Press. New York.

Alvarez, B. L., (1992). Efecto del Pentóxido de Vanadio sobre la Frecuencia de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH's) en la Médula Oséa de Ratón. Tesis licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM, México.

Ackl, F. Y., y Ruedy, J. K., (1971). Severe Lithium Intoxication : Management with Dialysis and Report of a Possible Teratogenic effect of Lithium. Can. Med. Assoc. J. 105: 847-852.

Ardito, G., Lambertini, L. E., y Bioger, A., (1978). Satellite Associations of Human Acrocentric Chromosomes Identified by Trypsin Treatment at Metaphase. Am. Hum. Genet. 41: 455-462.

Basstrup, P. C., y Schou, M., (1967). Lithium as Prophylactic Agent Against Recurrent Depression and Manic-Depressive Psychopsia. Arch. Gen. Psy. 16: 162-172.

Bento, F. S., (1983). Organizadores Nucleolares o Alteracoes Cromossômicas na Espécie Humana. Ciencia e Cultura. 34 (4): 474-479.

Bertram, M. G., (1993). Farmacología Médica. Ed. Interamericana. México.

Bianchi, V., y Levis A. G., (1984). Mechanisms of Chromium Genotoxicity. Toxicol. Environ. Chem. 9:1-25.

Bloom, F. E., Baetge, G. , Deyo, s., Ettenberg, A., Koda, L., Magisretti, P. J., Shoemaker, W. J., y Staunton, D. A., (1983). Chemical and Physiological Aspects of the Actions of Lithium and Antidepressant Drugs. Neurophar. 22: 359-365.

Bolaños, F. R., (1990). Impacto Biológico: Problema Ambiental Contemporánea, UNAM, México.

Bond, D. J., (1987). Mechanisms of Aneuploid Induction. Mutat. Res. 181: 257-265.

Brusick, D., (1987). Principles of Genetic Toxicology. 2da. ed. Ed. Plenum Press, New York.

Cade, J. F., (1949). Lithium Salts in the Treatment of Psychotic Excitement, 99: 353-370.

Carson, B. L., Ellis, H. V., y McCann, J. L., (1987). *Toxicology and Biological Monitoring of Metals in Humans, Including Feasibility and Need*. Lewis Publishers, Inc. Michigan.

Cedric R. A., y Alan A. L., (1993). *Farmacología*. Ed. Interamericana, México.

Clarkson, T. W., (1987). *Effects-General Principles Underlying the Action of Metals*. En: *Handbook on the Toxicology of Metals*. Vol. I. Cap. 6. L., Friberg, G. F., Nordberg, y Vouk. (eds.). Elsevier Science Pub. New York.

Clayton, G. D., (1987). *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*. Vol. Ila: *General Principles*. Clayton, G. D., y Clayton, F. E. eds. John Wiley and Sons, New York.

Cotton, R. M., (1987). *Química Inorgánica*. Ed. Omega, Barcelona, España.

Crossen, P. E., y Morgan, W. Y., (1977). *Proliferation of PHA Stimulation Lymphocyte Measured by combined autoradiography and Sister Chromatid Differential Staining*. *Exp. Cell. Res.* 118: 423-426.

Curtis, D. J., (1974). *Acrocentric Associations In Mongol Population*. *Hum. Gent.* 22: 17-22.

Dean, B., y Danford, N., (1984). *Cap. 7. Assays for the Detection of Chemically-Induce Chromosome Damage in Cultured Mammalian Cells*. En: *Mutagenicity Testing A practical Approach*. Venitt, S. y Parry, J. M. (eds.) IRL Press, Oxford England.

De Capoa, A., Ferraro, M., Archidiacono, N., Pellicia, F., Rocchi, M., y Rocchi, A., (1976). *Nucleolus Organizer and Satellite Association in Variant D-group Chromosome*. *Hum. Genet.* 34: 13-18.

Dellarco, V. Y., Voyter, P. E., y Hollaender, A., (1985) *Aneuploidy, Etiology and Mechanism*. Plenum Press, New York.

Dempsey, G. M., y Meltzer, H. L., (1977). *Lithium Toxicity*. En: *Neurotoxicology*. Loizin, H. Shiraki, y N., Grcevic. (eds). Ed. Raven Press, New York.

Dento, T. E., Howell, W. M. y Barrett, J. V., (1976). *Human Nucleolar Organizer Chromosome: Satellite Associations*. *Chromosome.* 55: 81-84.

DePaulo, J. R., Correa, E. Y., y Sapir, D. G., (1981). *Renal Toxicity of Lithium and its Implications*. *Johns Hopkins Med. J.* 149: 15-21.

Dey, S. K., (1985). *Effect of Lithium Carbonate on Bone Marrow Chromosomes of Rat*, *J. Environ. Biol.* 2:103-106.

Donaldson, S. R., Gelenberg, A. J., y Baldessarini, R. J. (1983). *The Pharmacologic Treatment os Schizophrenia; A Progress Report*. *Schizoph. Bull.* 9:504-527.

- Duffus, J. L., (1983) *Toxicologia Ambiental*. Ed. Omega, Barcelona, España.
- Duncan, A. M. ., y Evans, H. J., (1983) The Exchange Hypothesis for the Formation of Chromatid Aberrations An Experimental Test Using Bleomycin. *Mut. Res.* 107:397-341.
- ECETOC (European Chemical Industry Ecology and Toxicology Center), (1983) Identification and Assessment of the Effects of Chemicals on Reproduction and Development (Reproductive Toxicology), Monograph No. 5, Brussels, Belgium.
- Evans, H. F., (1984) Human Peripheral Blood Lymphocytes for the Analysis of Chromosomes Aberrations in Mutagen Test. En: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. B. J., Kilbey, M., Legator, W., Nichols, y C., Ramel. (eds). Cap. 18. Elsevier Publishers. New York.
- Evans, J. L., y O'Riordan, M. S., (1975). Human Peripheral Blood Lymphocytes for the Analysis of Chromosome Aberrations in Mutagen Test. *Mutat. Res.* 31:135-148.
- Ferec, A., Tomasz, L., Henryk, G., Huebner, S., Franciszk, M., y Byczkiewicz, K., (1988). An analysis of Satellites Association of Human Acrocentric Chromosomes: II An Analysis of Chromosome Patterns in Persons at the Age of 20-25 and 35-45 Years. *Genet. Pol.* 29 (2):199-214.
- Ferguson-Smith, M. A., y Hadmaker, S. D., (1961). Observations on the Satellited Human Chromosomes. *Lancet.* 1:638-40.
- Fleissel, C. P., Furst, A., y Radding, S., (1980). A Comparison of Carcinogenic Metals Sytems. En: *Metals Ion Biological. H.*, Sigel (eds). New York.
- Ford, H. J. (1990). Aneuploidy in Human. En: *Mechanisms of Environmental Mutagenesis-Carcinogenesis*. A. Kappas. (eds). Humana Press. Clifton, New Jersey.
- Forni, A., (1984). Chromosomal Aberrations in Monitoring Exposure to Mutagens-Carcinogens. En: *Monitoring Human Exposure to Carcinogenic and Mutagenic Agents*. A. Berlin, M. Draper, K. Hemminki and H. Vainio. (eds). Ed. International Agency for Resech of Cancer Lyon.
- Forni, A. S., y Bertazzi P. A., Alessio, L., (1987). Chromosomes and Biochemical Studies in Women Occupationally Exposed to Lead. *Arch. Environ. Health.* 35:139-146.
- Friedrich, U. M., y Nielse (1969). Lithium and Chromosome Abnormalies. *Lancet* 2:243.
- Froland, A. S., y Mikkelsen, M. H., (1964). Studies on Satellites Associations in Human Cells. *Hereditas (Lun)* 52:248-256.
- Gani, R., (1978). Nuclei of Cultures Human Lymphocytes . II Nucleolar Fusion and its Relation to Acrocentric Association *Hum. Genet.* 42:271-282.

García, R. M., (1992). Efecto de la Clorofilina sobre las Frecuencias Radiolucidas de Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH's) y de otros Eventos Citogénéticos en Células de la Médula Osea de Ratón *in vivo*. Tesis, FES-Zaragoza, UNAM.

Garron, A. B., (1859). *The Nature and Treatment of Gout and Rheumatic Gout*. Wolton Maberly., Londres.

Genest, P. T., y Villeneuve, A. Z., (1971). Lithium Chromosomes and Mitotic Index. *Lancet* 1:1132

Gonsebatt, M. E., Montero, R., Vega, L. H., Salazar, M. A., Herrera, L., Rojas, E., García, V. G., y Ostrosky, W. P., (1992). Hallazgos Genotóxico y de la Proliferación Celular en un Estudio Piloto en la Industria Expuestos Crónicamente a Hidroarsenismo. INVENTARIOS DE INVESTIGACION, UNAM. México.

Goodwin, F. K., (1983). The Impact of Tricyclic Antidepressants and Lithium on the Course of Recurrent Affective Disorders. *McLean Hosp. J.* 8:1-16.

Gulzar, V. L., (1988). *Genética Clínica. Manual Moderno*, México.

Hammond, P. B., y Beliles, R. P., (1980). Chapter 1. Metals. En: Casarett and Doull's toxicology, the basic science of poisons. J., Doll, C. D., Klaassen, M. O., Amdur, (eds). Macmillan, New York.

Hansen, K., (1984), *A survey of Metals-Induced Mutagenicity in vitro and in vivo*. Toxicological and Environmental. Chemistry. Vol. 9. Gordon and Bleach, Science Publishers. Inc and OPA Ltd, Great Britain.

Hartman, E. D., (1989). *Neuropsychological Toxicology Identification and Assessment of Human Neurotoxic Syndromes*. Ed. Pergamon Press. New York.

Houghton, A. L., (1979). Relationship Between Satellites Association and the Occurrence of Non- Disjunction in Man. *Mutat. Res.* 61: 130-144.

Ivett, J. L., y Tice, R. R., (1982). Average Generations Time: A new Method of Analysis and Quantitation of Cellular Proliferation Kinetics. *Environ. Mutagen.* 4: 358-365.

Jarvik, L. F., Bishum N. P., Bleiweiss, H., Kato, T. y Moralishevili, E., (1971). Abnormalities Chromosomes Lithium. *Arch. Gen. Psychiatry.* 24: 166-168.

Julien, R. M., (1981). *A primer of Drug Action* 3rd. Ed. W. H. Freeman and Co., San Francisco.

Jurand, A., (1988). Teratogenic Activity of Lithium Carbonate: An Experimental Update. *Teratology*, 38: 101-111.

Kaczmarek, L. T., Calabretta, B. S., Eifenbein, Y. B., y Mercer, E. Y., (1987). Cell Cycle Analysis of Human Peripheral Blood Lymphocytes in Long-Term Culture. *Exp. Cell. Res.* **173**: 70-79.

Kanematsu, N., Hara, M., y Kada, T., (1980). Lithium in Toxicology. *Mut. Res.* **77**: 109-116.

Kazantzis, G., y Lilly, J. L., (1986). Chapter 14. Mutagenic and Carcinogenic Effects of Metals. En: *Handbook on Toxicology of Metals.*, L., Friberg, Noeberg, G. F., y V. Vouk, (eds). Elsevier Science Publisher, N.Y.

Kirsch-Volders, M., Hens, L., Verschaeve, L., Alexander, A., Driesen, M., Poma, K., y Susanne, C., (1978). Modification of Human Acrocentric Associations After *in vivo* Exposure to Environmental Mutagens. *Act. Anthropogen.* **2**: 1-16.

Korenberg, J. R., y Freedlender, E. F., (1974). Giemsa Technique for the Detection of Sister Chromatid Exchange. *Chromosoma.* **48**: 355-360.

Kröger, Y., y Nowak, C., (1990). Induction of Sister Chromatid Exchange with Hypotonic Treatment. Wiley. Liss. Inc. Germany.

Lakkad, B. C., Nigam, S. K., Karnik, A. B., Thakore, K. N., y Chatterjee, B. B., (1986). Effect of Cadmium Chloride on Cell Division and Chromosome in Chinese Hamster Ovary Cell. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **36**: 342-349.

Lambert, B., Lindblad, A., Holmberg, K., and Francesconi, D., (1982). The use of SCE to Monitor Human Populations for Exposure to Toxicologically Harmful Agents. In *Sister Chromatid Exchange.* S. Wolff (ed). Wiley, New York.

Lange, C., (1897). Bidrag til Urinsyrediatesens Klinik. *Hospitalstidende*, **5**: 1-83.

Latt, S. A., (1973). Sister Chromatid Exchange, Indices of Human Chromosome damage and repair. Detection by Fluorescence and Induction by Mitomycin C. *Proc. Nat. Acad. Sci., E. U.*, Vol **71**: 3162-3166.

Latt, S. A., (1981). Sister Chromatid-exchange formation. *Ann. Genet.* **15**: 173-176.

Latt, A. M., Allen, J., Bloom, S. E., Carrano, A., Faalke, E., Kram, D., Schneider, E., Schereck, R., Tice, R., Whitfield, B., y Wolff, S., (1981). Sister-Chromatid Exchanges: A Report of the Genotox Program. *Mutat. Res.* **87**: 17-62.

Lenhinger, A. L., (1982). *Bioquímica.* Ed. Omega. 2a. ed. Barcelona, España.

Leonard, A., (1979). Carcinogenesis an Mutagenic effects of Metals (As, Cd, Cr, Hg, Ni) Present State of Knowledge and Needs for Further Studies. En: *Trace Metals Exposure and Health Effects.* V. Bianchi y A. G., Levis (eds). Pergamon Press. New York.

Levine, P. R., (1982). *Genética.* Ed. Continental, 2da. ed., México.

- Li, P. A., y Heflich, H. R., (1991). *Genetic Toxicology*. Ed. CRC Press Inc. Boston.
- Linakis, G. J., Lacouture, G. P., Eisenberg, S. M., Maher, J. T., Lewander, J. W., Driscoll, L. J., y Woolf, D. A., (1989). Administration of Activated Charcol or Sodium Polystyrene Sulfanate (Kayexalate) as Gastric Decontamination of Lithium Intoxication: An Animal Model. *Pharm. Toxicol.* 65: 387-389.
- Linakis, G. J., Eisenberg, S. M., Lacouture, G. P., Maher, J. T., Lawender, J. W., Driscoll, L. J., y Woolf, A., (1992). Multiple- Dose Sodium Polystyrene Sulfanate in Lithium Intoxication: An Animal Model. *Pharm. Toxicol.* 70: 38-40.
- Lindahl, K., and Sydney, S., (1984). Sister Chromatid Exchange. In: *DNA Repair and Sister Chromatid Exchange*. R., Tice and A., Hollaender (eds). Plenum. New York.
- Lugo, M. H., Ranchfoss, H. S., Zakour, H. R., Allen, J. W., y Hozier, J. C., (1989). Evidence the Chromosomal Replicons as Units of Sister Chromatid Exchange. *Chromosome.* 98: 69-76.
- Mattel, J. F., Aymes, S., Mattel, M. G., Gouvernert, J. y Girand, F., (1976). Quantitative and Qualitative Study of Acrocentric Associations in 109 Normal Subjects. *Hum. Genet.* 34: 185-194.
- McClintock, B., (1938). The Production of Homozigous Deficient Tissues with Mutant Characteristics by Means of the Aberrant Mitotic Behavior or Ring-Shaped Chromosome. *Genet.* 23: 315-376.
- Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C., y LoJacono, F., (1993). Cytogenetic Damage Induced in Human Lymphocytes by Vanadium compounds and Micronucleus Analysis by Fluorescence *in situ* Hybridization with a Centromeric Probe. *Mut. Res.* 319: 205-213.
- Morales, R., Rodriguez, R. R., y Vallarino, K. T., (1990). Fate of DNA Lesions that Elicit SCE. *Mutat. Res.* 233: 77-88.
- Moutschen, J., (1982). *Introduction of Genetic Toxicology*. Ed. Jhon Wiley y Sons. New York.
- Mudry, D. M., Labal, V., Larripa, M. Briux, S., y Colilla, S., (1981). Utilidad del Método de Intercambio de Cromátidas Hermanas en la Detección de Posibles agentes Mutagénicos. *Medicina.* 41: 173-76.
- Natajaran, A. N., y Obe, G. (1982) *Mutagenic Testing with Cultured Mammalian Cells Cytogenetic Assays*. En: *Mutagenicity A New Horizons in Genetic Toxicology*, Acad. Press. New York.
- Newman, C. M., y McClintosh, W. A., (1991). *Metal Ecotoxicology. Concepts & Applications*. Ed. Lewis Publishers, Inc., Chelsea. Michigan.

Nielse, F. H., Shuler, T. R., McLerod, T. G., y Zimmerman, T. L., (1986). Nickel Influences Iron Metabolism Through Physiologic Pharmacologic and Toxicology Mechanisms in the Rat. *J. Nutr.* 114: 1280-1288.

Nielse, F. H., (1988). Possible Future Implications of Ultratrace Elements in Human Health and Disease. *Current Topics in Nutrition and Disease* Prasad, A. A., Alan (ed). Liss, Inc. New York.

Nishioka, H., (1975). *Mutat. Res.* 31: 185-189.

Obe, G., Natajara, A. T., y Palitti, P., (1982). Role of DNA double Strand Breaks in the Formation the Radiation-Induced Chromosomal Aberrations. En: *DNA Repair Chromosome Alterations and Chromatin Structure*. A. T. Natajara *et al.*, (eds). Elsevier Biomedical Press. Amsterdam.

Ochs, R. L., Lischwe, M. A., Shen, E., Carrol, R. E., y Busch, H., (1985). Nucleogenesis: Composition and Fate of Prenucleolar Bodies. *Chromosoma*. 92: 330-336.

Ohno, S., Trujillo, J. M., Klapan, D. W., y Kinosita, R., (1961). Nucleolus-Organizers in the Causation of Chromosomes Anomalies in Man. *Lancet*. 2: 123-28.

Painter, R. B., (1980). A Replication Model of Sister Chromatid Exchange. *Mutat. Res.* 70: 337-341.

Palitti, F., Tenzarella, C. Degrassi, F., De Galvia, R., Fiure, M., y Natarajan, A. N., (1983). Formation of Chromatid-type Aberrations in G₂ Stage of The Cell Cycle. *Mutat. Res.* 110: 343-50.

Perry M. J., y Parry, M. E., (1987). Comparisons of Test for Aneuploidy. *Mutat. Res.* 181; 287-287.

Payson, H. E., (1971). Drug Therapy of Metal Illness, Treatment of Psychiatric depression. En: *Introduction to Psychopharmacology*. R. H., Rech y K. E., Moore (eds). Raven Press. New York. pp.321-340.

Perry, P. y Wolff, S., (1974). New Giemsa Method for the Differential Staining of Sister Chromatid. *Nature*. 251: 156-158.

Perry, E. P., y Thomson F. E., (1984). The Methodology of Sister Chromatid Exchanges. En: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. B. J., Kilbey, M., Legator, W., Nichols y C., Ramel (eds). 2de. New York.

Povlsen, U. T., Hetmar, O., Ladefoged, J., y Bolwig, G. T., (1992). Kindney Functioning During Lithium Treatment: A prospective Study of Patients Tread with Lithium for up to Ten Years. *Act. Psy. Scand.* 85: 56-60.

Preston, R. J., (1982). DNA Repair and Chromosome Aberrations: Interactive Effects of Radiation and Chemicals. En: *DNA Repair, Chromosome Alterations and*

Chromatin Structure. Natarajan, A. T., Obe, G., y Altmann, H., (eds), Amsterdam. De Elsevier Biomedical Press.

Prival, M. J., (1980). Genetic Toxicology: Regulatory aspect. *J. Environm. Pathol. Toxicol.* 3: 99-111.

Rojas, E., Montero, R., Herrera, A. L., Sordo, M., Gonsebatt, E. M., Rodríguez, R., y Ostrosky, W. P., (1992). Are Mitotic Index and Lymphocyte Proliferation Kinetics Reproducibles Endpoints in Genetic Toxicology Testing?. *Mutat. Res.* 282: 283-286.

Rojas, E., Montero, R., Herrera, A. L., Sordo, M., Gonsebatt, E. M., Montero, R Rodríguez, R., y Ostrosky, W. P., (1993). Mitotic Index and Cell Proliferation Kinetics for Identification of Antineoplastic Activity. *Anti-Cancer Drugs.* 4: 637-640.

Roldán R. E., (1992). Efecto Mutagénico y Teratogénico del Pentóxido de Vanadio. Tesis maestría. FES-Zaragoza, UNAM, México.

Roldán, R. E., y Altamirano, M., A., (1990). Chromosomal Aberrations Sister Chromatid Exchange, Cell-Cycle Kinetics and Satellite Associations in Human Lymphocytes Cultures Exposed to Vanadium Pentoxide. *Mutat. Res.* 245: 61-65.

Rostenberg, Y. K., (1980). Manual de Genética Médica. Ed. UNAM, México.

Sansone, M. E., y Zeigler, D. K., (1985). Lithium Toxicology. En: *Of Neurologic complication.* *Clin. Neurop.* 8: 242-248.

Sasaki, S., M.,(1982). Sister Chromatid Exchange: Sister Chromatid Exchange as a Reflection of Cellular Repair DNA. Sister Chromatid Exchange. Allan. R. Liss, Inc., 150, New York.

Shepard, T. A., (1980) Catalog of Teratogenic Agents, 3ra. Ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.

Scheres, J. M., Hustinx, T. H., Rutten, F. J., y Merks, G., (1977). Reserve Differential Staining of Sister Chromatid. *Exp. Cell. Res.* 109: 466-468.

Schou, M., (1970). Use of Lithium. En: *Principles of Psychopharmacology.* W. G., Clark y D. J. del Guidice, (eds). Academic Press, New York.

Schou, M., (1986). Lithium Treatment: A Refresher Course. *Br. J. Psy.*, 149: 541-547.

Schvartzman, J. B., Goyanes, V. J., y Tice, R. R., (1984). DNA Damage Persistence and Site Specificity in SCE Formation. Sister Chromatid Exchange. R. R., Tice, D. Hollaender, (eds). Plenum. Press. New York.

Scott, D., Danford, N., Dean, B. J., Kirkland, D. J., y Richardson, C. R., (1983). Report of The UNEMS Sub Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. B. J., Dean (eds). Publishes by United Kingdon Environmental Mutagen Society.

Sharma, A. R., y Talukder, G. S., (1987). Effects of Metals on Chromosomes of Higher Organisms. Environ. Mutag. 9: 191-226.

Sigmund, J., Schwarzacher, H. G., y Mikelsaar, A. V.,(1979). Satellite Associations Frequency and Number of Nucleoli Depend on Cell Cycle Duration and Nor-Activity Studies on First, Second, and Third Mitosis of Lymphocyte Cultures. Hum. Genet. 50: 81-91.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., y Scheneider, E. L., (1988). A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. Exp. Cell. Res. 175: 184-191.

Sisler, H. H., Dresdner, R. O., y Mooney, W. T., (1980). Chemistry: A Sistematic Approach. Oxford University Press, Oxford.

Smith, H. M., (1973). Metal Contamination of Urban Woody Plants, Environmental Science and Tecnology. 3: 631-636.

Snyder, W. S. Cook, M. J., Nassat, E. S., Karhausen, L. S., Howells, G. P., y Tipton, T. H., (1975). International Commission on Radiological Protection. Report of the Task Group of Reference Man. ICRP Publication 23. New York.

Sobtl, R. C., Sharma, M., y Gill, R. M., (1989). Frequency of Sister Chromatid Exchange and Chromosome Aberration (CAS) Caused Three Salts the Lithium. Cytologia. 54(2): 245-248.

Sorsa, M., (1984). Monitoring of Sister Chromatid Exchange and Micronuclei as Biological End points. Monitoring Human Exposure to Carcinogenic and Mutagenic agents. A. Berlin, M. Draper, K. Hemminki and H. Vainio (eds). Ed. International Agency for Resech of Cancer Lyon.

Srám, R. J., Binková, B., Topinka, J., y Fojtiková (1990). Inhibition of DNA Repair Sythesis in the Rat by *in vivo* exposure to Psychotropic Drugs and Reversal of the Efecte by Co-Administration with α -Tocopherol. Mut. Res. 244: 331-335.

Starker, H. S. , (1989). Chemistry: A Science for Today. MacMillan. Pub. Co. New York.

Sterman, A. B., y Schaumberg, H. H., (1980). Neurotoxicity of Selected Drugs. En: Experimental and Clinical Neurotoxicology. P. S. Spencer and H. H. Schaumberg (eds). Williams & Wilkins. Baltimore.

Storker, H. S., y Walker, E. B., (1988) Funtaments of Chemistry: General, Organic, and Bilogical. Allyn and Cacon.

Storkinger, H. E., (1981). Chapter 29. The Metals. En: Patty's Industrial Hygiene and Toxicology. 3rd ed. Vol. 2A. Toxicology. G. D., Clayton, F. E., Clayton (eds). A Wiley-Interscience Publication. John Wiley and Sons. New York

Suh, H., Naik, E., Nord, E. P., y Goligorsky, M. S., (1992). Mitogenic Effect of Lithium and Intracellular Potassium Deficiency. *Lithium* 3/4: 275-279.

Surdermann, F. W., (1984). Recent Advances In Metals Carcinogenesis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* (in Press).

Takayama, S., y Sakanishi, S., (1977). Differential Giemsa Staining of Sister Chromatids after Extraction with Acids. *Chromosoma*. 64: 109- 115.

Takeshisa, S., (1982). Induction of SCE by Chemical Agents. En: *Sister Chromatid Exchange*. S. Wolff (ed). Ed. Wiley , New York.

Taylor, J. H., (1958). Sister Chromatid Exchange in Tritium-labeled chromosomes. *Genet.* 43: 515-529.

Tice, R., Chalilet, J., y Schneider, E. L., (1975). Demonstration of Spontaneous Sister Chromatid Exchange *in vivo*. *Exp. Cell. Res.* 102: 426-429.

Tice, R. R., Schenelder, E. L., y Rary, J. M., (1976). The Utilizations of Bromodeoxyuridine Incorporation into DNA for the Analysis of Cellular Kinetics. *Exp. Cell. Res.* 102: 232-236.

Timpson, J. Y., y Price, D. J., (1971). Lithium and Mitosis. *Lancet* .2: 93.

Torre, De la R., y Krompotic, E., (1975). *In vivo and in vitro* Effects of de Lithium on Human Chromosomes and Cell Replication. *Teratology*. 13: 131.

Trent, J. M., Carlin, D. A., y Davis, J. R., (1981) Expression of Silver-Stained Nucleolar Organizing Regions (Ag-NORs) in Human Carcer. *Cytogenet. Cell. Genet.* 30: 31-38.

Verma , R. S., Jyot, V., Schaw, L., y Harvey, D., (1983). Frequency of Chromosomes and Chromatid Types Associations of Nucleolar Human Chromosomes Demonstrated by the N-Bandin G Techniques. *Cytobios*. 36: 25-29.

Villanueva, S. T., Botello, A. V., y Páez, O. F., (1988). Evaluación de algunas de los Metales Pesados en Organismos del Río Coatzacoalcos y de la Laguna del Ostión Veracruz, México. *Contam. Ambient.* 4: 19-31.

Vouk, V. T., (1986). General Chemistry of Metals. En: *Handbook on Toxicology of Metals*. L. Friberg, Noedberg y V., Vouk.(eds). Vol. I. Elsevier Science Publisher B. V.

Waters, M, D., Stark, F., Movononin, K, H., y Dellarco V, L., (1985) Special Committee Report, Parte II. Quantitative Evaluation of Chemicals that Induce Aneuploidy

Using the Genetic Activity Profile Method, En: Aneuploidy: Etiology and Mechanism. V. L., Dellarco, P. E., Voytek y A., Hollaender (eds), Plenum, New York.

Waters, R., (1984) DNA Repair Test in Cultured Mammalian Cell. En: Mutagenicity Testing a Practical Approach. S. Venitt & Parry, J. M. (eds), Ed. IRL Press Oxford.

Weiner, M. L., Batt, K. J., Putmun, D. L., Curren, R. D., y Yang, L. L., (1990). Genotoxicity of Lithium Hypoclorite. *Toxicol.* **65**: 1-20.

Weinergarther, H. R., y Linnolla, M. S., (1985) Cognitive Effects of Lithium Treatment in Normal Volunteers. *Psychopharmacology*, **86**: 472-474.

Weinstein, M. R., y Goldfield, M. D., (1975). Administration of Lithium during Pregnancy. In *Lithium Research and Therapy*. F. N. Johnson, Ed. Academic Press, London.

Zakharov, A. F., y Egolina, N. A., (1972). Differential: Spiralization Along Mammalian Mitotic Chromosomes I. BrdU-Reveled Differentiation in Chinese Hamster Chromosomes. *Chromosome*. **38**: 341-365.

Zaldivar, R., (1980). High Lithium Concentrations in Drinking Water and Plasma of Exposed Subjects. *Arch. Toxicol.* **46**: 318-320.

Zang, D. K., y Back, E., (1968). Quantitative Studies on the Arrangement of Human Metaphase Chromosomes. *Cytogenet.* **7**: 455-470.

Zhong, B. Z., Gu, Z. W., Wallece, R. S., Whong, W. Z., y Ong, T. (1994). Genotoxicity of Vanadium Pentoxide in Chinese Hamster V79 Cells. *Mutat. Res.* **321**: 35-45.

Zumdahl, S. S., (1989). Chemistry. D. C. Health and Company, Lexington.