

42
201

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTOS DEL ZINC Y ALUMINIO SOBRE
MARCADORES BIOLÓGICOS DEL DAÑO TEMPRANO.
EVALUACION DEL EFECTO SOBRE MARCADORES
DE CITO Y GENOTOXICIDAD.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A
VICTORIA EUGENIA ESPINOSA RIVERA

DIRECTOR DE TESIS: DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

MEXICO, D. F.



1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION DE...



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
EFECTOS DEL ZINC Y ALUMINIO SOBRE MARCADORES BIOLÓGICOS DE DAÑO TEMPRANO.
EVALUACION DEL EFECTO SOBRE MARCADORES DE CITO Y GENOTOXICIDAD.

realizado por ESPINOSA RIVERA VICTORIA EUGENIA

con número de cuenta 8627038-4 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

Propietario

DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

Propietario

DRA. MARIA DOLORES LASTRA A.

Suplente

DR. MARIO AGUSTIN ALTAMIRANO LOZANO

Suplente

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

[Handwritten signatures and initials]

Esta Tesis se realizó en el Laboratorio de Genética y Toxicología Molecular del Departamento de Genética y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.

**Esta Tesis fue financiada con Beca de la DGPA
No. IN-202593
y parcialmente financiada con Beca de la Fundación
U.N.A.M.**

Gracias por siempre ...

Al Doctor Emilio Rojas del Castillo, mi especial y enorme agradecimiento por permitirme aprender de sus conocimientos y amplia experiencia en Genética Toxicológica.

Gracias por la excelente dirección de esta tesis, por tu comprensión, consejos y sugerencias para cristalizar la misma, pero sobre por haber creído en mí.

A la Doctora Patricia Ostrosky-Wegman, por haberme aceptado en su estupendo y distinguido grupo de trabajo, perteneciente al Departamento de Genética y Toxicología Ambiental del IIB-UNAM, y tener la única y gratísima experiencia de colaborar con ella.

A mis distinguidos sinodales:

Doctora María Eugenia Gonseball Bonaparte
Doctora María Dolores Lastra Azpilicueta
Doctor Mario Agustín Allamirano Lozano
Doctora Patricia Ramos Morales

Gracias por la excelente y minuciosa revisión de la tesis, por sus consejos y sugerencias para mejorar y enriquecer con su experiencia la misma.

A mis compañeros del laboratorio, con quienes he aprendido mucho:

Maricha, Regi, Guillermo, Isidro, Luis, Monse, Anita, Paty Ramírez, Cecy, Maricarmen, Adriana, Angélica, Laura, Vero, Miriam, Tzutzuy, Mahara, Pavel, Alejandro, Esperanza, Vanessa, Iván, Libia, Rocío, Salomón, Gaby, Silvia, Andrea y Daniel.

Pero sobre todo, mi muy especialísimo gracias a Marlita Del Valle, Marlita Luna, Juliana y Paty Guzmán, por brindarme su invaluable amistad.

Gracias siempre a la señora Aurora Castillo, por su ayuda valiosa en todo momento.

Mil gracias, a "mi pandilla" del Instituto Nacional de Ecología (mis incondicionales amigos), por su apoyo de siempre y sus "porras":

Rosalinda, Silvia Eugenia, Lucy, Esteban, Penélope y Guillermo...

Al Hidrobiólogo Guillermo Muñoz Mejía, por haber estado conmigo en los momentos más difíciles del desarrollo de la tesis; por haberme permitido los innumerables "permisos" para asistir al laboratorio en las mañanas, por ser siempre un ejemplo para mí, y por su apoyo incondicional, ayuda y gran amistad de siempre.

Al Ingeniero Noé López Bartolo, por su apoyo, tan necesario e importante para mí.

A la Bióloga Berenice del Carmen Reyes Guevara, mi siempre fiel amiga de la carrera, con quien compartí los momentos más significativos y agradables, y que siempre estuvo a mi lado.

Finalmente, al Contador Público Rogelio Martínez Rodríguez, por su cariño de tantos años.

... y a todas aquellas personas que contribuyeron a mi formación...

Muchísimas gracias.

Gracias Infinitas...

A mis queridos papás:

Víctor Espinosa O. y Mónica Bertha Rivera de Espinosa.

Quienes son mi amor y apoyo, y a quienes adoro y admiro mucho.
Gracias por dejar elegir mi camino y por estar conmigo en todos mis momentos difíciles...

A ustedes les dedico mis mejores esfuerzos.

A mi "pequeña" hermana Malena, por ser un ejemplo de tenacidad y entereza, y por todos los ánimos que me dio durante el desarrollo de la tesis.

Gracias Malé.

A la memoria de mi abuelo...
Por su amor y cariño de siempre.

A la memoria de mi tía Dary...
Por su dedicación y cariño para conmigo.

A mi queridísima tía, Licenciada Luz María Rivera...
Por ser siempre un gran ejemplo profesional para mí.

"Tu tienes el pincel y las pinturas... pinta el paraíso y entra en él".

Kazantzakis.

"Los máximos logros al principio y por un tiempo son un sueño. El roble duerme en la simiente; el ave aguarda en el huevo; y en la visión más elevada del alma, un ángel empieza a despertar. Los sueños son las semillas de las realidades".

James Allen.

"Todo lo que puedas hacer, o sueños poder hacer... empieza a hacerlo. En la temeridad hay genio, poder y magia".

Goethe.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
Efectos mutagénicos y carcinogénicos de los metales	3
Zinc	
1. Usos	5
2. En el ambiente	5
3. En la salud humana	6
4. En otros mamíferos	11
5. Como posible agente mutagénico y carcinogénico	11
Aluminio	
1. Usos	16
2. En el ambiente	16
3. En la salud humana	17
4. Como posible agente mutagénico y carcinogénico	19
Marcadores biológicos como herramientas para evaluar citotoxicidad y genotoxicidad	21
II. OBJETIVOS	23
Diseño experimental	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS	25
Parámetros evaluados	29
IV. RESULTADOS	31
V. DISCUSIÓN	33
VI. CONCLUSIONES	39
VII. REFERENCIAS	40
Tablas	
Gráficas	

RESUMEN

La contaminación ambiental originada por numerosas sustancias, entre ellas las metálicas, ha provocado que se presente exposición aguda y crónica no sólo en humanos, sino en la biota de los ecosistemas terrestres y acuáticos. Los seres humanos están expuestos a una amplia variedad de compuestos metálicos industriales, un gran número de éstos, son capaces de producir efectos adversos a la salud humana, que van desde cambios biológicos casi imperceptibles hasta la muerte en casos extremos. Un factor de riesgo para la salud humana es el hecho de estar expuesto a emisiones de las industrias y de vehículos automotores, los que constituyen la principal fuente de contaminación por metales, ya que muchos de ellos pueden interactuar directa o indirectamente con el ADN.

En el presente estudio se analizaron los efectos provocados por las concentraciones 0.1, 1, 10 y 100 μM de cloruro de zinc (ZnCl_2) y de cloruro de aluminio (AlCl_3), sobre marcadores de citotoxicidad (índice mitótico IM y cinética de proliferación celular CPC) y de genotoxicidad (intercambios de cromátidas hermanas ICH), todos ellos evaluados en cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica de donadores sanos.

Los resultados mostraron que hay disminución en el número de metafases encontradas en las diferentes dosis de los compuestos comparadas con el testigo, así como un retraso en la CPC conforme aumenta la dosis de ambos metales, sin embargo, la frecuencia de ICH's no se vio alterada.

Estos resultados permiten establecer que tanto el ZnCl_2 como el AlCl_3 a ciertas dosis, son capaces de alterar la fisiología de los linfocitos circulantes, afectando directamente la capacidad de respuesta proliferativa (IM) y la velocidad de división (CPC).

INTRODUCCIÓN

La exposición a agentes químicos ambientales es causa de preocupación, principalmente porque existen evidencias de que enfermedades como el cáncer, la arterioesclerosis, la diabetes, y algunas enfermedades degenerativas pueden ser producidas por la exposición a sustancias tóxicas (Brusick, 1987).

Entre los elementos considerados como peligrosos por la Organización Mundial de la Salud, el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA), los metales ocupan un lugar importante ya que ha sido ampliamente demostrada su toxicidad y efectos adversos sobre los organismos (Deknudt y Deminatti, 1978; Deknudt y Gerber, 1979; Duffus, 1983; Friberg y cols, 1986; Carlson y cols, 1987).

La principal fuente de contaminación del ambiente por metales se debe a los desechos de las industrias, sobre todo las que se dedican a la refinación, galvanizado, pigmentos, biocidas y fertilizantes, desechos que son vertidos al medio por vía aérea o acuática (Urone, 1986; Beijer y Jernelov, 1986). Las actividades domésticas, agrícolas y forestales son también causa de contaminación, ya que los individuos pueden estar expuestos a metales por el uso de insecticidas o fertilizantes o bien, por ingerir agua contaminada con concentraciones elevadas de metales como en el caso del arsénico (Beijer y Jernelov, 1986; Manning y Feder, 1980).

Entre las fuentes naturales más importantes de aporte de metales a la atmósfera están: aguas superficiales, suelos y vegetación, actividad volcánica e incendios forestales. Procesos naturales, como la actividad química y geoquímica, también liberan metales a la corteza terrestre y aumentan la exposición humana (Nordberger y Andersen, 1985). En los sistemas acuáticos, la liberación química de las rocas ígneas y metamórficas, son la fuente más importante de aporte de metales traza en la totalidad de las aguas superficiales (Leckie y James, 1974).

Por otra parte, ciertos metales son necesarios para el funcionamiento de los organismos, en los que tienen funciones diversas, ya que pueden ser elementos estructurales, estabilizadores de estructuras biológicas, componentes de mecanismos de control (nervios y músculos), de sistemas redox, y sobre todo, constituyentes de enzimas, tal como el zinc (Friberg y cols, 1986).

Algunos metales y metaloides provocan efectos tóxicos bien definidos en el hombre, como son arsénico, cadmio, plomo, manganeso y mercurio (Friberg y cols, 1986). La exposición a los metales puede llevarse al cabo por vía de inhalación, de ingestión o de penetración a la piel. La inhalación es la ruta de exposición ocupacional más importante (Friberg y cols, 1986).

Los metales producen múltiples efectos en humanos, que resultan de interacciones a nivel molecular, celular, de tejidos y órganos. Dependiendo del metal involucrado, la acción se puede manifestar como un efecto local en la piel, membranas pulmonares o tracto gastrointestinal (Clayton y Clayton, 1978; Friberg y cols, 1986), o bien, como un efecto sistémico que potencialmente puede involucrar algún tejido u órgano (Friberg y cols, 1986; Carlson y cols, 1987).

Los metales a menudo interactúan en sitios importantes de los sistemas enzimáticos como los grupos SH; también pueden competir con otros metales esenciales como cofactores de enzimas (Task Group on Metal Toxicity, 1976).

La toxicidad de los metales se explica con base en la interferencia de éstos con los sistemas celulares bioquímicos y depende cuantitativa y cualitativamente de su estado de oxidación (Friberg y cols, 1986).

La mayoría de los compuestos orgánicos pueden eliminarse por degradación metabólica, sin embargo, los metales tienen potencial para acumularse en el cuerpo,

ocasionando efectos crónicos. Cuando se presentan en exceso, los metales esenciales pueden llegar a ser tóxicos.

Una de las vías por la cual los metales se eliminan del cuerpo es la excreción. La tasa y el medio de excreción varían de un metal a otro. El tiempo de vida media para el mismo metal varía en diferentes tejidos (Clarkson y cols, 1988). Una vez absorbido, el metal permanece en el cuerpo hasta que es excretado (Friberg y cols, 1986).

1. Efectos mutagénicos y carcinogénicos de los metales.

Las investigaciones en el campo de los metales han permitido establecer algunas relaciones entre ellos y ciertos daños genotóxicos. Muchos metales pueden producir respuestas alérgicas y efectos mutagénicos o carcinogénicos (Carlson y cols, 1987; Gensebatt y cols, 1992). En estudios con animales y en sistemas de prueba a corto plazo, se ha reportado que ciertos metales como el cromo, níquel y el óxido de cadmio son carcinogénicos y mutagénicos (IARC, 1976, 1980, 1986; Fishbein, 1981; Friberg y cols, 1986; Sunderman, 1986). Cabe resaltar que en pacientes tratados durante largos períodos con drogas que contenían arsénico se detectaron defectos en la división celular que a su vez incrementaron la frecuencia de anomalías cromosómicas (Petres y cols, 1977).

Muchos metales y metaloides han demostrado inducir efectos genotóxicos *in vitro* e *in vivo*, como mutaciones puntuales, por ejemplo, en *Salmonella*, *E. coli* y *Drosophila*. Es muy difícil interpretar el significado de esta información en humanos (Friberg y cols, 1986).

Se sabe que hay correlación entre el potencial de que una sustancia química produzca aberraciones cromosómicas en células del tallo de ciertas plantas y en células animales (Friberg y cols, 1986). Hace 24 años, se iniciaron los estudios

sobre el efecto de los metales potencialmente mutagénicos ó carcinogénicos en bacterias, como prueba preliminar del potencial genotóxico en el hombre (Ames y cols, 1973). Bridges y cols (1984), han sugerido que las pruebas de inducción de mutaciones en bacterias es la metodología más sensible para detectar daño al ADN, sin embargo, las diferencias en la concentración y distribución de las sustancias químicas, así como las diferencias en la fisiología y metabolismo de las bacterias dificulta el extrapolar los resultados al hombre (Brusick, 1987).

Un mecanismo de acción que comparten una amplia gama de carcinógenos es el de la reacción electrofílica, en la cual el metal reacciona con varios centros nucleofílicos de la célula, tales como los ácidos nucleicos y proteínas (Frieberg y cols, 1986). Mientras unos metales parecen activarse como carcinógenos, otros pueden actuar como promotores del cáncer, y posiblemente alterar la susceptibilidad celular a otros carcinógenos. Sin embargo, el mecanismo molecular de la carcinogénesis por metales todavía no está dilucidado (Hartmann y Speit, 1994). Gran parte del conocimiento sobre los mecanismos y los efectos de la interacción entre los metales y el ADN de los mamíferos provienen generalmente de estudios *in vitro* (cultivos de linfocitos humanos y de líneas celulares) e *in vivo* (ratones) (Evans y O'Riordan, 1975; Moutchen, 1985; Brusick, 1987).

1. Usos

El zinc ocupa el lugar No. 24 en orden de abundancia y representa cerca del 0.02 % de la corteza terrestre. Se utiliza en recubrimientos para proteger fierro y acero, en aleaciones, manufactura de bronco, en hojas y bandas para baterías secas, en techados y herrajes exteriores para construcción, y en algunos procesos de impresión (Brown, 1988). Los compuestos orgánicos de zinc se utilizan como fungicidas (Léonard y cols, 1986).

Las sales de zinc tienen aplicaciones en clínica; el sulfato de zinc es un antiséptico oftálmico; el óxido de zinc se utiliza en dermatología, el fosfato de zinc ($Zn_3(PO_4)_2$) se utiliza como cemento dental, y los cristales de insulina de zinc, para el tratamiento de la diabetes (Toxicological Profile for Zinc, 1994).

2. En el ambiente

Este proviene de fuentes naturales y antropogénicas. La toxicidad del zinc en los ecosistemas terrestres es baja, por ejemplo, retardando o interfiriendo el crecimiento de ciertas plantas acuáticas (Moore y Ramamoorthy, 1984). Debido a su baja toxicidad, las emisiones producidas por el hombre probablemente no representen un peligro serio para el ambiente *per se*.

No se dispone de información suficiente sobre la especiación química para poder elaborar un modelo para el transporte y la transformación de este metal en ambientes acuáticos. Es un elemento esencial en el ecosistema acuático y se bioacumula rápidamente (Canadian Water Quality Guidelines, 1993).

3. En la salud humana

Integra la lista de los denominados oligoelementos o elementos traza y es esencial para el funcionamiento normal de muchos organismos. Es importante en los sistemas biológicos, ya que interviene en la síntesis de ácidos nucleicos, es constituyente de numerosas metaloenzimas como la anhidrasa carbónica, la fosfatasa alcalina, la alcohol deshidrogenasa, la carboxipeptidasa, la fosfolipasa C, la transcriptasa reversa, la ARN polimerasa, la superóxido dismutasa y muchas más como la timidina cinasa y la nucleósido fosforilasa, que dependen del zinc para funcionar en forma adecuada; además es esencial para la movilización hepática de la vitamina A (Smith y cols, 1973). Trabajos recientes sugieren que el zinc se encuentra involucrado en la acción de las enzimas nucleotidil transferasas (Diario de la A al Zinc, 1995). Este ion parece cumplir importantes funciones biológicas vinculadas con el crecimiento, proliferación y diferenciación celular, la maduración sexual y la reproducción, el sentido del gusto, la coagulación sanguínea, la reparación tisular de las heridas y las defensas inmunitarias. Se sabe que el zinc es un estimulador del crecimiento tumoral; aparte de ser antagonista del selenio (Schrauzer y cols, 1978; Jensen, 1975); es el clásico inhibidor de la toxicidad del cadmio (Webb, 1971).

La absorción de zinc en el hombre se da principalmente por medio del agua potable, en ambientes industriales, así como también por inhalación (Toxicological Profile for Zinc, 1994).

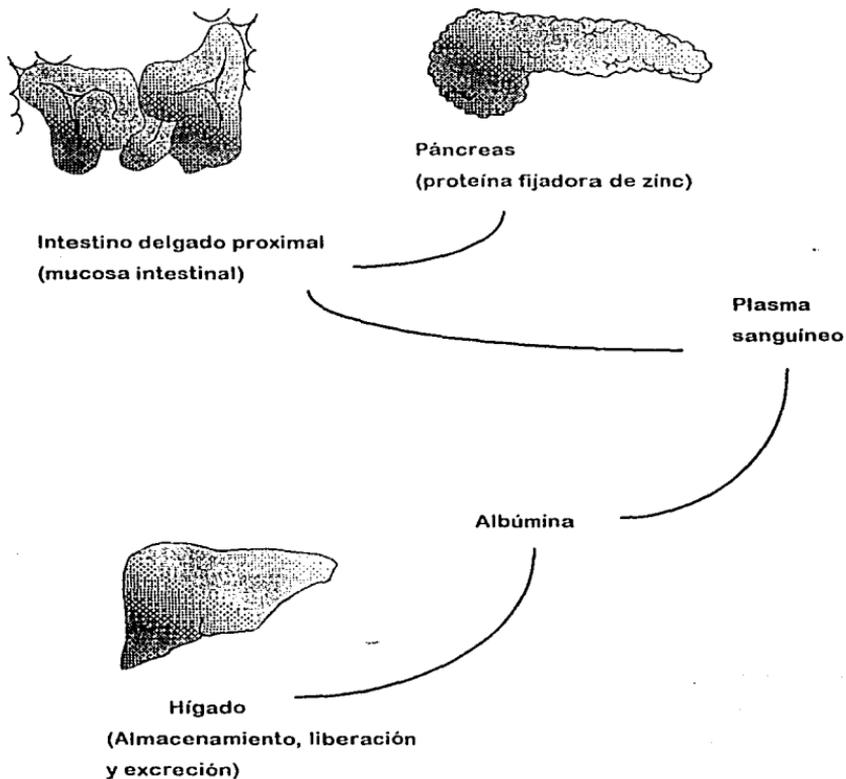
La deficiencia en la alimentación de elementos traza puede ocasionar debilitamiento de la función inmunológica (Beach y cols, 1982). Esta deficiencia puede ser perjudicial para el desarrollo del organismo, y es ocasionada por baja absorción del metal a partir de la dieta. Dependiendo de la severidad y duración, la deficiencia de zinc ocasiona también hipoplasia del timo y de los órganos linfoides periféricos (Chandra, 1983).

El zinc se deposita fundamentalmente en músculo y hueso; pero también hay cantidades apreciables en cabello, uñas, testículos, próstata y los tejidos pigmentados del ojo (Diario de la A al Zinc, 1995); es rápidamente absorbido a través del intestino por medio de un proceso activo que trabaja contra el gradiente de concentración; y en roedores, este se encuentra principalmente en el duodeno, y en la parte distal del yeyuno (Prasad y cols, 1963). Entre 10 y 20 % del zinc ingerido es absorbido en el intestino delgado proximal: la mucosa enteral parece regular la capacidad de absorción del mineral: existe una proteína fijadora específica que favorece su incorporación al enterocito y es segregada por el páncreas. De la mucosa intestinal, el zinc pasa al plasma, donde es transportado por la albúmina (compitiendo, aparentemente con el cobre por los mismos sitios de unión). Es captado por el hígado, órgano que participa en el almacenamiento, liberación y excreción de los metales (Figura 1). El metabolismo hepático del zinc se parece al del cobre, y estos dos micronutrientes se hayan muy relacionados (Diario de la A al Zinc, 1995).

Se ha dedicado poca atención al estudio de las propiedades tóxicas del zinc, fuera de considerarlo un riesgo laboral por la inhalación de emanaciones tóxicas (WHO, 1987). Aunque existe evidencia creciente de que el consumo de este elemento en exceso, como suplemento terapéutico, aún en concentraciones mínimas, puede tener resultados adversos (Fosmire, 1990). La toxicidad del zinc es baja; como tal no se ha reportado que éste provoque irritación en la piel; únicamente puede ocasionar resequedad (Schrauzer y cols, 1978; Jensen, 1975).

En cultivos de linfocitos existe antagonismo entre zinc y fierro, zinc y cobre; zinc y calcio y zinc y plomo (Carpentieri, 1986; Clayton y Clayton, 1978).

Figura 1. Cinética del Zinc en Humanos.



Tomado de: *Diario de la A al Zinc*, 1995.

EFFECTOS DEL ZINC Y ALUMINIO SOBRE MARCADORES BIOLÓGICOS DE DAÑO TEMPRANO. EVALUACION DEL EFECTO SOBRE MARCADORES DE CITO Y GENOTOXICIDAD.

El zinc es esencial en la inmunocompetencia, tanto en humanos como en animales. El papel del zinc en el desarrollo y función de las diferentes poblaciones de células linfoides indican que este elemento tiene un efecto predominante sobre los linfocitos T (Prasad, 1985).

El zinc está considerado como el micronutriente mejor caracterizado respecto a su capacidad de modular las funciones inmunológicas. En humanos, el efecto de la deficiencia de zinc se ha estudiado en enfermedades congénitas, como la acrodermatitis enterohéptica, anemia falciforme (Prasad, 1985) y el Síndrome de Down (Mocchegiani y cols, 1991). En estas enfermedades se ha demostrado alergia a ciertos antígenos comunes, que se hace reversible por suplementación con zinc (Prasad, 1988).

Existe un interés renovado en la identificación de enzimas y/o reacciones involucradas en la generación de radicales oxígeno u otros metabolitos tóxicos del oxígeno que pudieran ser dependientes del zinc (Frieden, 1984).

Es posible que los efectos conocidos del zinc en el estímulo de la inmunidad sean debidos en gran parte a su participación como cofactor en la timulina; asimismo, es necesario considerar el papel del zinc en la actividad de más de cien enzimas en el metabolismo, las que necesariamente van a estar involucradas en procesos que afectan el sistema inmunológico, que difieren de aquellos en los que interviene la timulina (Frieden, 1984); asimismo, las alteraciones en la inmunidad mediada por células, tales como la disminución en número del total de linfocitos T, merman la función normal de los linfocitos T ayudadores y linfocitos T citotóxicos (Mocchegiani y cols, 1995; Ehrlich, 1980; Murray y cols, 1983). El zinc puede modular la tasa de proliferación de células linfoides, a través de la producción de citocinas, tales como la interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e interferón (IFN) (Fabris, 1994).

El mecanismo por el cual el zinc puede afectar el sistema inmune es multifacético. El papel del zinc en la división celular se basa primeramente en los requerimientos para la síntesis de ADN, y en particular para la ADN polimerasa y la timidina cinasa, ya que ambas enzimas son dependientes de zinc (Fabris, 1994).

Se ha demostrado que el zinc también se encuentra involucrado en la muerte celular, la cual puede ser un evento fisiológico (apoptosis). Una característica particular de la apoptosis es la activación temprana de una endonucleasa endógena, la cual produce efectos de ruptura internucleosómica en el ADN. Estas endonucleasas se activan con calcio y magnesio, y se inhiben fuertemente con zinc. De acuerdo a los hallazgos recientes de Mocchegiani y cols (1996), el zinc no sólo reduce, sino que también puede potenciar la apoptosis, dependiendo de la concentración del metal, lo cual está de acuerdo con lo encontrado por Provinciali y cols (1995).

El zinc también se requiere para conferir actividad biológica a uno de los péptidos tímicos mejor conocidos, llamado timulina, que unida al zinc es responsable de la inmunidad mediada por células (Fabris, 1994). El zinc cuando no está unido al péptido, puede unirse a otros sitios diana, en los cuales permanece inactivo, con lo cual carece de actividad biológica (Mocchegiani y cols, 1991).

En un estudio realizado por la Facultad de Química de la UNAM, en donde se sometieron once voluntarios a dosis de 300 mg/d de zinc, por un período de 6 semanas, se encontró una marcada depresión de algunos indicadores de la respuesta inmune en linfocitos, como el índice de proliferación (Lastra y Espinosa, 1993).

Aún más, en ausencia de síntomas y con las cantidades consumidas habitualmente por el humano, y el uso de suplementos con zinc, puede interferir con la utilización de otros nutrimentos, particularmente cobre, y afectar la respuesta inmunitaria (Fosmire, 1990). A pesar de los datos existentes, los mecanismos de la acción

inmunodepresora producida por el exceso de zinc, aún no han sido completamente investigados (Lastra y Espinosa, 1993).

4. En otros mamíferos

En ratones, también se ha estudiado el zinc, particularmente en ratones viejos, en los que existe una condición de deficiencia de zinc (Mocchegiani y cols, 1995). Es de interés general, seguir explorando las interacciones entre el zinc, otros oligonutrientes y el sistema inmunitario, para conocer el tipo de relaciones en que participan y las posibilidades de la aplicación de este conocimiento a mejorar la salud (Lastra y Espinosa, 1993).

5. Como posible agente mutagénico y carcinogénico

No se ha dilucidado que el zinc sea mutagénico, y sus propiedades clastogénicas -si las tiene- son muy reducidas. Es todavía incierto que pueda causar transformación maligna, pero es necesario para la proliferación celular de tumores existentes, y el crecimiento tumoral se ve retrasado por deficiencia de zinc. Tampoco se sabe que sea teratogénico (CCINFO, 1994).

No existe información respecto que el zinc pueda ocasionar daño cromosómico, rompimientos de una sola hebra del ADN o que altere la fidelidad de la síntesis del ADN (Landolph, 1989); sin embargo, estudios realizados en nuestro laboratorio sugieren que el zinc puede inducir rompimientos de una sola hebra al ADN (Rojas y cols, 1996).

Deknudt y Deminatti (1978), demostraron que el zinc produce anomalías cromosómicas en linfocitos humanos *in vitro*. También estudiaron los efectos que producen los metales pesados administrados a ratones con y sin deficiencias de calcio en su dieta; con lo cual concluyen que la deficiencia de calcio es un co-factor

importante en la mutagénesis del zinc y del plomo, pero no del cadmio; sugieren además, que éstos metales pueden ser los responsables de las aberraciones cromosómicas encontradas en los trabajadores de las industrias de zinc; sin embargo, en seres humanos, los efectos *in vivo* del zinc solo, no se han establecido aún.

Carpenter y Ray (1969) no encontraron efecto significativo del cloruro de zinc ($ZnCl_2$) sobre la producción de letales dominantes y mutaciones recesivas ligadas al sexo en *Drosophila*. Sin embargo, sí se encontró utilizando cloruro de zinc radiactivo ($^{65}ZnCl_2$), debido quizá más a la radiactividad *per se* que por la sal.

El ziram es un complejo de zinc asociado con un ditiocarbamato; éste compuesto es capaz de ocasionar grandes lesiones inactivando al ADN, las cuales puede resultar en rompimientos cromosómicos (Epstein y Legator, 1971).

Pilinskaya (1973), reportó alta incidencia de aberraciones tipo cromosómicas y cromatídicas en linfocitos de 9 trabajadores industriales que trabajaron de 3 a 5 años en plantas de ziram. De manera similar, los linfocitos de personas no expuestas que fueron tratados *in vitro* con ziram, también presentaron aberraciones cromosómicas (Pilinskaya, 1973).

Los estudios relativos a la mutagenicidad del zinc sugieren que éste no representa un riesgo mutagénico, como se puede apreciar en el Cuadro 1. El cloruro de zinc no afecta la fidelidad de la síntesis *in vitro* del ADN (Sirover y Loeb, 1976; Miyaki y cols, 1977). Sin embargo, se ha observado que en linfocitos humanos tratados *in vitro* con cloruro de zinc hay bajo incremento de aberraciones cromosómicas (Deknudt y Deminatti, 1978).

Cuadro 1. Efectos tóxicos del zinc en organismos de ambientes acuáticos y terrestres

METAL	LETAL	MUTAGÉNICO	TERATOGÉNICO	CARCINOGÉNICO	BIOACUMULABLE	PERSISTENTE
Zinc	+	-	-	-	+	+

Clave: + Tiene la característica
 - No tiene la característica

Tomado de: USEPA, 1994.

La primera acción carcinogénica descubierta para un metal fue la formación de teratoma testicular en aves de corral seguida de repetidas inyecciones intratesticulares de cloruro de zinc (Michalowsy, 1926; Kazantzis y Lilly, 1986); esta observación fue confirmada por Sunderman (1986), y también en pájaros y roedores expuestos a la misma sal y al sulfato y nitrato de zinc (Willis, 1934; Bagg, 1936; Falin, 1940, 1941; Carleton y cols, 1953); sin embargo, el zinc no fue considerado como carcinogénico en la evaluación realizada por la IARC (IARC, 1987).

El daño local ocasionado por la inyección testicular del cloruro de zinc indica su disociación a ácido clorhídrico y zinc bioquímicamente activo (Magos, 1991). Debido a que el zinc inhibe y estimula muchas reacciones enzimáticas, y además se encuentra presente en la ARN polimerasa (Jacobson y Turner, 1980), así como en los dominios "finger-loops" en el ADN, uniendo proteínas que regulan la expresión del gene (Sunderman, 1981), es posible que el ácido clorhídrico sea la primera causa del trauma local, así como de la proliferación celular, y el zinc a su vez, carezca de la inducción del cáncer (Magos, 1991). Esta es una hipótesis atractiva, dado que la última forma carcinogénica de los metales es iónica, en particular por su estado de oxidación; por ejemplo, Ni^{2+} , Cr^{3+} , o Cd^{2+} , cuya forma puede ser liberada en células blanco. El problema de esta hipótesis iónica puede ser la identificación de las reacciones químicas que sean las responsables de la carcinogénesis y la

participación del ión en la reacción crucial. Actualmente cada una de las identificaciones no son posibles, debido principalmente a la carencia de información respecto a los mecanismos celulares y moleculares de la carcinogénesis (Magos, 1991).

No hay observaciones clínicas que sugieran que el zinc pueda ser un riesgo para desarrollar cáncer en humanos (Magos, 1991), por el contrario, existe evidencia epidemiológica indirecta de que la deficiencia de zinc puede incrementar la susceptibilidad al cáncer de esófago (Woo y cols, 1988). El acetato de zinc no indujo adenoma de pulmón en ratón (Stoner y cols, 1976). Los efectos del cromato de zinc o de otros complejos con derivados ditiocarbamatos (por ejemplo, con zineb), son independientes del presentado por el zinc (Magos, 1991).

Un problema más general es la toxicidad de los metales para ser carcinogénicos a determinados niveles; de este modo, la consecuencia inmediata del cloruro de zinc inyectado a los testículos ocasionó necrosis seguida de una inflamación crónica (Cuadro 2). Con estas circunstancias, surge la posibilidad que altas dosis fueron las responsables de iniciar el cáncer. La proliferación celular proporciona un resultado confiable para muchos estados de carcinogénesis (Butherworth, 1990).

Cuadro 2. Evidencia epidemiológica y experimental de genotoxicidad y carcinogenicidad del zinc

METAL	EPIDEMIOLOGÍA	BIOENSAYO	MUTACIÓN DEL GENE	ENSAYO rec	DAÑO CROMOSÓMICO (ICH's)	TRANSFORM. CELULAR	FIDELIDAD AL ADN
Zn	Ninguna	Teratoma testicular por inyección intratesticular	-(b), ±(m)	?	?	p	-

CLAVE: (b) = bacterias; (m) = células de mamífero; p = potenciada

TOMADO DE: Magos, 1991.

EFFECTOS DEL ZINC Y ALUMINIO SOBRE MARCADORES BIOLÓGICOS DE DAÑO TEMPRANO. EVALUACION DEL EFECTO SOBRE MARCADORES DE CITO Y GENOTOXICIDAD.

No hay información acerca de la carcinogenicidad del zinc en vías de exposición ocupacional (Magos, 1991). Tampoco hay información con respecto a que el zinc sea teratógeno y embriotóxico (CCINFO, 1994). No hay información relevante acerca de los efectos tóxicos del zinc en los animales (Gunn y cols, 1963, 1964).

1. Usos

El aluminio ocupa el lugar No. 3 en orden de abundancia en la corteza terrestre, pero no se le encuentra sólo, sino formando parte de múltiples compuestos como elemento en la naturaleza (USEPA, 1973). El aluminio se utiliza en aleaciones, fundiciones, partes de aeroplanos, materiales de construcción, incluyendo tablas de forro exteriores, equipos deportivos, conductores eléctricos, utensilios de cocina, levadura, latas de conserva, cerveza y analgésicos, así como en el agua potable (Windholtz y cols, 1983); en envolturas, recipientes para perecederos, maquinaria, envases en general y en productos farmacéuticos (Friberg y cols, 1986).

El aluminio pulverizado, es la base de ciertos desodorantes que se rocían sobre la piel, el que se inyecta en preparaciones para vacunas, y el consumido en antiácidos que contienen el hidróxido $Al(OH)_3$ (Kendricky y cols, 1991).

2. En el ambiente

Las fuentes antropogénicas de aluminio en ambientes acuáticos incluyen efluentes provenientes de industrias que utilizan aluminio, así como el uso del sulfato de aluminio como floculante (McNeely y cols, 1979).

Durante el proceso de manufactura de la bauxita mineral de que se extrae el aluminio, se genera gran cantidad de polvo de aluminio el cual es vertido a la atmósfera. Sin embargo, aunque la bauxita y el aluminio son materiales inertes, su dispersión en el aire ocasiona molestias, como irritación en las vías respiratorias; lo mismo sucede con los gases provenientes del proceso de calcinación del aluminio (Office of Environmental Affairs World Bank, 1993).

Los desechos sólidos incluyen los residuos de bauxita, residuos de la combustión procedentes de hornos de fundición del aluminio, los cuales son las principales fuentes de depositación de aluminio en suelo (Office of Environmental Affairs World Bank, 1993).

3. En la salud humana

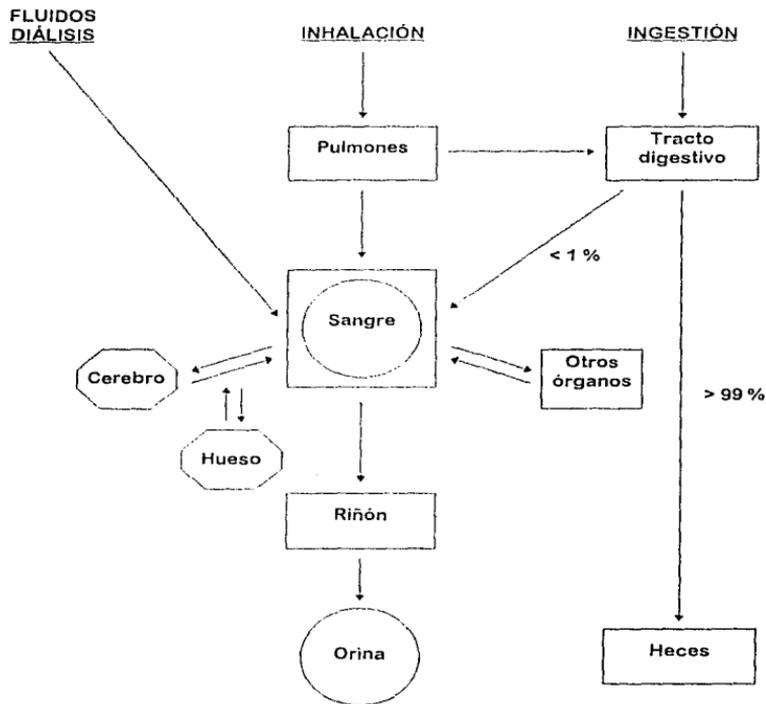
El aluminio posee valencia 3+, y aquellos compuestos de aluminio liberan el ion Al^{3+} en solución acuosa. Los estudios en animales revelan que el tracto gastrointestinal representa una barrera importante para la entrada del aluminio, sin embargo, altas dosis de $Al(OH)_3$ administrados oralmente a ratas y humanos (como antiácidos) han incrementado los niveles de aluminio en tejidos y orina, ya que la barrera no es totalmente impermeable (Altmann, 1987).

A principios de 1970, no se había considerado la posible toxicidad del aluminio. Sin embargo, con el desarrollo de la terapia de hemodiálisis a largo plazo conteniendo aluminio para pacientes con disfunciones del riñón; se descubrió que muchos pacientes desarrollan una serie de síndromes neurológicos, llamados *encefalopatía de diálisis*.

Existe evidencia que sugiere que el aluminio está involucrado con la enfermedad de Alzheimer (Markesbery y Ehmann, 1994), quizá por favorecer la agregación y la depositación extracelular de la proteína β -amiloide (Exley y cols, 1993; Chong y Suh, 1995), así como la formación de microtúbulos fosforilados anormales y asociados a la proteína tau (Shin y cols, 1994; Savory y Willis, 1995).

Además, el aluminio se encuentra implicado en la patogénesis de otras tres condiciones neurodegenerativas, tales como la encefalopatía, la cual es ocasionada por inhalación masiva de polvo de aluminio en ambientes industriales; la demencia de diálisis, y posiblemente también la demencia de esclerosis/parkinsoniana amiotrófica lateral en Guam (Markesbery y Ehmann, 1994; Edwardson y cols, 1989).

Figura 2. Cinética del Aluminio en Humanos.



- Utilizado para monitoreo biológico
- ◡ Órgano crítico

Tomado de: *Clarkson y cols, 1988.*

La neurotoxicidad del aluminio establecida a partir de estudios realizados en pacientes con encefalopatía diálisis, donde se observa una acumulación excesiva de aluminio, puede no ocasionar la enfermedad de Alzheimer, pero sí empeorar aún más el daño neurológico. Sin embargo, la estabilidad constante del aluminio (cercana a 10^{25}) es mucho menor en orden de magnitud que la que presenta el hierro (cercana a 10^{31}), y por tanto, un tratamiento prolongado con desferrioxamina puede provocar anemia y otros efectos colaterales (McLachlan, 1986).

¿Cuál es el mecanismo de la neurotoxicidad del aluminio? Se ha propuesto una serie de mecanismos, los cuales incluyen la interferencia con el ion calcio, abarcando los mecanismos y la inhibición de la enzima dihidropteridina reductasa, la cual cataliza la reducción dependiente de NADPH de la dihidrobiopterina a tetrahidrobiopterina, que es un cofactor que se requiere para la biosíntesis de tirosina (y potencia también la actividad de la dopamina, adrenalina y noradrenalina) a partir de la fenilalanina (Sunderman, 1986).

En trabajadores que se expusieron nuevamente al aluminio, la vida media biológica del metal en la orina es de 8 h (Sjögren y cols 1985), mientras que los trabajadores que han estado expuestos durante muchos años, aparece cierta acumulación del metal en el organismo y se ven también influenciadas las concentraciones de éste en el suero y en la orina (Van del Meulen y cols, 1984; Sjögren y cols, 1985). Respecto a los efectos potenciales sobre la salud, no hay una respuesta detectable a corto tiempo por inhalación, sin embargo, el aluminio en polvo en altas concentraciones puede irritar la nariz y causar depósitos del polvo en las vías respiratorias (Sjögren y cols, 1985).

4. Como posible agente mutagénico y carcinogénico

En un estudio realizado no se observaron efectos en la incidencia de intercambios de cromátidas hermanas en linfocitos de sangre periférica de trabajadores de la industria del aluminio (Becher y cols, 1984). Tampoco se observó incremento en la incidencia de aberraciones cromosómicas estructurales en linfocitos de sangre

pariférica de 50 trabajadores expuestos en una planta de reducción de aluminio; los análisis de semen no mostraron efecto sobre la morfología del espermatozoide y la cuenta espermática cuando se compararon con controles de la misma área, aunque las muestras de orina evaluadas por la Prueba de Ames/*Salmonella* si fueron mutagénicas (Heussner y cols 1985).

Cuadro 3. Efectos tóxicos del aluminio en organismos de ambientes acuáticos y terrestres.

METAL	LETAL	MUTAGÉNICO	TERATOGÉNICO	CARCINOGÉNICO	BIOACUMULABLE	PERSISTENTE
Al	+	-	-	-		

Clave: + Tiene la característica

- No tiene la característica

En blanco: No hay información

Tomado de: USEPA, 1994.

No se han reportado casos de que el aluminio sea carcinogénico, debido unicamente a la exposición (Krueger, 1984); en cuanto a teratogenicidad, embriotoxicidad y toxicidad reproductiva, no existe información suficiente que asegure que provoca estos daños (USEPA, 1994; CCINFO, 1994).

MARCADORES BIOLÓGICOS COMO HERRAMIENTAS PARA EVALUAR CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD

Se llaman marcadores biológicos a aquéllos parámetros intrínsecamente relacionados con la actividad de los organismos, que permiten determinar eventos relacionados con su fisiología de manera cuali o cuantitativa. En la actualidad se han propuesto a los biomarcadores de efecto como indicadores de daño a los organismos en sus fases iniciales, pudiendo ser reversible en muchos casos, lo que permite prevenir enfermedades que una vez diagnosticadas son difíciles de tratar o que provocan efectos irremediables. Por tal motivo, los marcadores de efecto se consideran indicadores tempranos de enfermedad (NCR, 1989). Existen compuestos como los metales, que son capaces de inhibir la proliferación linfocitaria, con lo que es posible evaluar la tasa proliferativa de los linfocitos, como marcador biológico para determinar los efectos citotóxicos de los metales.

Los marcadores de citotoxicidad se utilizan como indicadores para evaluar y comparar la tasa de proliferación celular; entre ellos la medición de la incorporación de timidina tritiada al ADN es usada clásicamente; la incorporación de colorantes vitales, colorantes que se unen a las proteínas, y otros (Babich y Borenfreund, 1987; Johnson, 1990), el índice mitótico (IM), el cual es un parámetro que indica el porcentaje de células que están en división; este índice se ha utilizado generalmente como un marcador para evaluar y comparar la tasa de proliferación celular (Piscicotta y cols, 1967; Scott y cols, 1991), y recientemente se ha propuesto también a la cinética de proliferación celular (CPC) que es un parámetro que indica citostaticidad, es decir, proporciona datos para discernir qué tanto las células se han dividido y con qué frecuencia (Ostrosky-Wegman y cols, 1991; Rojas y cols, 1992).

Asimismo, el desarrollo de la Técnica de Tinción Diferencial (FPG), ha permitido la

identificación de células en metafase, que se han duplicado una, dos o más veces (CPC), haciendo posible el examen de la cinética de poblaciones celulares en división; ésta técnica se basa en la incorporación del análogo de la base timina llamado 5-bromodesoxiuridina (BrdU) (Perry y Wolff, 1974); la técnica presenta la ventaja adicional de no trabajar con radioactividad y es muy útil para determinar la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH's), los cuales se evalúan en células que se han dividido dos veces en el cultivo.

Los marcadores de genotoxicidad, como las aberraciones cromosómicas, los intercambios de cromátidas hermanas (ICH), los micronúcleos (MN), la síntesis no programada de ADN, las mutaciones génicas y la electroforesis unicelular (Método del Cometa), se utilizan para evaluar el daño producido por el rompimiento de cadena en el ADN.

En el presente estudio se evaluó el efecto del zinc y del aluminio sobre la cinética de proliferación celular, el índice mitótico y el intercambio de cromátidas hermanas en el cultivo de linfocitos humanos.

OBJETIVOS

- Evaluar el efecto del cloruro de zinc ($ZnCl_2$) sobre marcadores de citotoxicidad, utilizando como parámetros el índice mitótico (IM) y la cinética de proliferación celular (CPC).
- Evaluar el efecto del cloruro de zinc ($ZnCl_2$) sobre marcadores de genotoxicidad, utilizando como parámetro la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH's).
- Evaluar el efecto del cloruro de aluminio ($AlCl_3$) sobre marcadores de citotoxicidad, utilizando como parámetros el índice mitótico (IM) y la cinética de proliferación celular (CPC).
- Evaluar el efecto del cloruro de aluminio ($AlCl_3$) sobre marcadores de genotoxicidad, utilizando como parámetro la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH's).

Se efectuaron determinaciones de los parámetros IM, CPC e ICH's en muestras de cuatro donadores sanos para evaluar el efecto producido con cloruro de zinc ($ZnCl_2$) y con cloruro de aluminio ($AlCl_3$), utilizando un espectro de concentración.

Como control positivo, se utilizó mitomicina C, un agente alquilante bifuncional que es un fuerte inductor del ICH's, para comprobar la sensibilidad del sistema, así como para determinar si tanto el cloruro de zinc ($ZnCl_2$) como el cloruro de aluminio ($AlCl_3$) alteraban la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH's), ya que se encuentra bien documentado que la mitomicina C.

Finalmente, se calcularon la media de los índices mitóticos, índices de replicación, cinética de proliferación celular, así como la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas de cada una de las sales evaluadas, representándose estos parámetros gráficamente. Posteriormente, se efectuó Análisis de Varianza (ANOVA) unifactorial (para zinc y aluminio) para comparar las diferentes concentraciones utilizadas y determinar si habían diferencias significativas entre ellas con respecto al control. Asimismo, se realizó el Análisis de Duncan para comprobar en qué concentraciones había diferencias significativas ($P < 0.05$ y $P < 0.01$).

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS PARA LA MEDICIÓN DEL IM, LA CPC Y LA FRECUENCIA DE ICH's.

Se obtuvo sangre periférica por venopunción de ocho donadores sanos (4 donadores por metal), cuya media de edades fue 28.4 (21 - 44 años) (cuatro hombres y cuatro mujeres), con jeringas desechables previamente heparinizadas bajo condiciones de esterilidad, la sangre se procesó siguiendo la técnica descrita por Ostrosky-Wegman y cols (1988), la cual consiste en los siguientes pasos:

- 1.- Cultivo de muestras
- 2.- Tratamiento de muestras
- 3.- Cosecha de linfocitos
- 4.- Preparación de laminillas
- 5.- Tinción

1.- CULTIVO DE MUESTRAS

Alícuotas de 0.5 ml de sangre, se agregaron a 6.0 ml de medio RPMI 1640 (Gibco BRL) suplementado con 1 ml de aminoácidos no esenciales (Gibco BRL) y 1 ml de glutamina (Sigma, USA) por cada 100 ml de medio; a cada cultivo se agregaron 200 μ l de lectina fitohemaglutinina (PHA) (Microlab), y 300 μ l de 5-bromodesoxiuridina (BrdU) (Sigma, USA) (concentración final 32 μ M), los cultivos se mantuvieron en incubación a 37 °C, durante 72 horas.

2.- TRATAMIENTO DE MUESTRAS

Los tratamientos se aplicaron a los cultivos por duplicado, utilizando cloruro de zinc ($ZnCl_2$) y cloruro de aluminio ($AlCl_3$), obteniéndose dos réplicas. El tratamiento de los linfocitos para ambas sales se realizó cuando éstos se encontraban proliferando activamente, es decir, a las 48 horas de iniciado el cultivo.

Las concentraciones utilizadas para estas sales, se determinaron con base en experimentos preliminares y un espectro de concentraciones, dependiendo de su toxicidad. Las concentraciones utilizadas para ambos metales fueron: 0.1, 1, 10 y 100 μ M.

Las cuatro concentraciones para cada metal se adicionaron en un volumen final de 50 μ l a las 48 horas del cultivo, continuando incubando en una estufa 20 horas adicionales a 37 °C, después de las cuales se les agregaron 200 μ l de colcemid (0.028 μ g/ml) (Gibco BRL) a cada tubo y se cultivaron cuatro horas más antes de cosechar los linfocitos.

3.- COSECHA DE LINFOCITOS

Este procedimiento se efectuó centrifugando los tubos de cultivo a 1200 rpm durante 10 minutos, para posteriormente, retirar la mayor parte del sobrenadante y resuspender las células antes de dar un choque hipotónico a éstas durante 30 minutos con una solución de cloruro de potasio (KCl) 0.075 M a una temperatura de 37 °C.

Posteriormente se centrifugaron los tubos nuevamente, retirando el exceso de sobrenadante y resuspendiendo las células para fijarlas con una solución de metanol-ácido acético 3:1 fría; inmediatamente después, se centrifugaron y se lavaron varias veces con fijador las células de todos los tubos. Este procedimiento se realizó las veces que fuese necesario hasta que el sobrenadante quedara transparente. Se conservaron los tubos en refrigeración con fijador (aproximadamente 5 ml), durante 24 horas como mínimo.

4.- PREPARACION DE LAMINILLAS

Después de transcurridas 24 horas de la fijación de las células, se realizaron

preparaciones cromosómicas sobre portaobjetos esmerilados lavados y mantenidos previamente en refrigeración inmersos en alcohol de caña. Se resuspendió el botón con núcleos con una pipeta Pasteur con aproximadamente 0.5 ml de fijador fresco, y se tomaron algunas gotas de solución que se dejaron caer sobre el portaobjetos desde una altura de aproximadamente 1.50 metros y se secaron a la flama de un mechero. Los portaobjetos se codificaron previamente para evitar confusiones, y efectuar lecturas a doble ciego.

5.- TINCION

Para teñir las laminillas se siguió la técnica Giemsa mas Fluorescencia (FPG) propuesta por Perry y Wolff (1974). Se utilizó una solución de 600 µl del colorante fluorocromo Hoechst 33258 en 50 ml de agua destilada en la que se sumergieron las laminillas durante 45 minutos en completa oscuridad; una vez transcurrido este lapso, se procedió a enjuagar éstas con agua de la llave y se secaron al aire para inmediatamente exponerlas a luz negra, cubiertas con una solución de buffer de fosfatos con un pH de 6.8 (fosfato de sodio al 0.95 % y fosfato de potasio al 0.91 % en proporción 1:1) y un cubreobjetos para evitar la evaporación, durante aproximadamente 90 minutos. Cabe hacer notar que la cámara de luz negra se encendió 20 minutos antes de colocar las laminillas, con la finalidad de alcanzar una temperatura adecuada dentro de ésta, y obtener el mayor índice de fotólisis; este fenómeno de tinción diferencial ocurre cuando la laminilla se expone a la luz negra después de la tinción con Hoechst 33258, lo cual provoca que el ADN que ha incorporado BrdU, se sensibilice, aumentando por tanto el nivel de fotólisis.

Después de este período, las laminillas se enjuagaron de nuevo con agua de la llave y se secaron al aire para inmediatamente teñirse con una solución de 3 ml de Giemsa en 75 ml de agua destilada durante aproximadamente 3 minutos, para enseguida enjuagarse por última vez con agua de la llave y secarse al aire, y de esta manera estar listas para poder analizarse al microscopio fotónico.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS TRATADAS CON MITOMICINA C (CONTROL POSITIVO) PARA LA EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA DE ICH's.

Se obtuvo sangre periférica por venopunción de los ocho donadores sanos (4 donadores por metal) (cuatro hombres y cuatro mujeres), con jeringas desechables previamente heparinizadas bajo condiciones de esterilidad, la sangre se procesó siguiendo la misma técnica anteriormente descrita. Para el tratamiento de las muestras, se utilizó mitomicina C (Sigma USA) en concentración de 3×10^{-6} M. Los tratamientos se aplicaron a los cultivos por duplicado, obteniéndose dos réplicas. El tratamiento de los linfocitos se realizó cuando éstos se encontraban proliferando activamente, es decir, a las 48 horas de iniciado el cultivo.

La mitomicina C se adicionó en un volumen final de 50 μ l, continuando incubando en una estufa 20 horas adicionales a 37 °C; después de las cuales se les agregaron 200 μ l de colcemid (Gibco BRL) a cada tubo y se cultivaron cuatro horas más antes de cosechar los linfocitos.

La cosecha, preparación de laminillas y la tinción se efectuaron de la misma forma anteriormente descrita.

PARÁMETROS EVALUADOS

a) *ÍNDICE MITÓTICO (IM)*

Las laminillas se leyeron al microscopio fotónico con el objetivo de 20 aumentos, empezando de la parte extrema derecha y recorriéndolas en zig-zag, contando dos mil núcleos totales, determinando entre ellos cuántos estaban en división (metafase). Se registraron como núcleos de linfocitos estimulados aquéllos que presentaban una forma esférica, con tinción clara (color rosa) y de tamaño relativamente grande. Como metafase se contabilizaron los grupos de cromosomas bien definidos con un número de cromosomas mayor de 30.

El valor del índice mitótico se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$I. M. = \frac{\text{Número total de metafases}}{\text{Número total de células (2000)}}$$

b) *CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN CELULAR (CPC)*

Se leyeron 100 metafases con el objetivo de 100 aumentos y aceite de inmersión, determinándose cada una, como primera (M1), segunda (M2), tercera división o subsecuentes (M3), dependiendo del patrón de tinción claro y oscuro que presentaron los cromosomas.

Si la metafase presentaba un 100 % de tinción oscura, se procedió a clasificarla como M1, si se observaba un 50 % de tinción clara y un 50 % de tinción oscura sobre cada cromosoma, se clasificó como M2, y por último, si la metafase presentaba un 25 % de tinción oscura y un 75 % de tinción clara, la metafase se clasificaba como M3.

Con esto se calculó el valor del índice de replicación utilizando la siguiente fórmula:

$$I. R. = \frac{1(\text{No. M1}) + 2(\text{No. M2}) + 3(\text{No. M3})}{100 \text{ metafases registradas}}$$

c) INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS (ICH)

Se contabilizaron los intercambios de cromátidas hermanas en 25 metafases en segunda división (M2) con el objetivo 100X y aceite de inmersión es decir, se contaron las sustituciones de las cromátidas de cada cromosoma. Como metafase se contabilizó a los grupos de cromosomas bien definidos con un número de cromosomas mayor de 40, anotando el número de cromosomas por cada metafase y su número de intercambios de cromátidas hermanas; posteriormente, se ajustó el número de intercambios considerando los 46 cromosomas.

No. de Intercambios de cromátidas presentes en 25 metafases en M2

EFFECTO DEL CLORURO DE ZINC SOBRE MARCADORES DE CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD

Los datos obtenidos a partir de este estudio efectuado con cuatro donadores sanos (Tabla 1) muestran una inhibición del índice mitótico (IM) (Gráfica 1), la cual está determinada en función de la concentración. Asimismo, la cinética de proliferación celular (CPC) cambia al aumentar la concentración del cloruro de zinc ($ZnCl_2$), y esto también se ve reflejado en el decremento del índice de replicación (IR) (Gráficas 2 y 3).

En cuanto a la evaluación de la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH's), los datos obtenidos muestran que el cloruro de zinc ($ZnCl_2$) no induce aumento en la frecuencia basal existente entre los donadores (Gráfica 4).

EFFECTO DEL CLORURO DE ALUMINIO SOBRE MARCADORES DE CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD

Los datos generados a partir de este estudio efectuado con cuatro donadores sanos (Tablas 2 y 3) muestran una inhibición del índice mitótico (IM) (Gráfica 5), la cual está determinada en función de la concentración, asimismo, la cinética de proliferación celular (CPC), se ve alterada al aumentar la concentración del cloruro de aluminio ($AlCl_3$), y el índice de replicación (IR) decrece a la concentración $0.1 \mu M$, y posteriormente se mantiene constante (Gráficas 6 y 7).

Con respecto a la evaluación de la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH's), los datos obtenidos muestran que el cloruro de aluminio ($AlCl_3$) no induce aumento en la frecuencia basal existente entre los donadores (Tabla 3 y Gráfica 4).

La Tabla 3 resume los resultados promedio obtenidos con cloruro de zinc ($ZnCl_2$) y cloruro de aluminio ($AlCl_3$), para cada uno de los tres parámetros evaluados: índice mitótico (IM), cinética de proliferación celular (CPC) y la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH's).

Las Gráficas 8 y 9 representan la relación índice de replicación (IR) versus inhibición del índice mitótico (IIM) ocasionada por el cloruro de zinc ($ZnCl_2$) y el cloruro de aluminio ($AlCl_3$) respectivamente. La Gráfica 8 muestra claramente una tendencia de pendiente negativa, no así la Gráfica 9, donde prácticamente la pendiente tiende a cero; esta última representa el comportamiento del cloruro de aluminio ($AlCl_3$).

Al tratar los linfocitos con las cuatro concentraciones (0.1, 1, 10 y 100 μM) de cloruro de zinc (ZnCl_2), los resultados mostraron que hay disminución en el número de metafases (IM) conforme aumenta la concentración, observándose un efecto dosis-respuesta, lo cual indica que este metal tiene un comportamiento citotóxico (Gráfica 1). Los resultados obtenidos con la mayor concentración utilizada (100 μM), de cloruro de zinc (ZnCl_2), concuerdan con lo reportado por Berger y Skinner (1974), quienes indican que a concentraciones de 100 μM , el zinc inhibe la síntesis de ADN en el cultivo de linfocitos estimulados con fitohemaglutinina (PHA), así como en linfoblastos de la línea L1210.

Se conocen numerosos agentes que estimulan la división de los linfocitos iniciando la síntesis de ADN, los más conocidos son las lectinas de plantas, tales como la fitohemaglutinina (PHA) y la concanavalina A (ConA), así como extractos bacterianos (Ling, 1968). Existen reportes de que los iones de zinc pueden estimular también la síntesis de ADN en el cultivo de linfocitos (Rühl y cols, 1971). En este sentido, es importante destacar que al efectuar los cultivos de linfocitos, se adicionó fitohemaglutinina (PHA), la cual estimula la división de los linfocitos que se encuentran en fase G_0 . Cuando la PHA o la ConA se unen a la membrana de los linfocitos, ocurre una serie de eventos de síntesis macromolecular, los cuales dirigen la síntesis de ADN, la cual alcanza su máxima estimulación después de 72 horas de haberse iniciado el cultivo (Ling, 1968). Es relevante mencionar lo anterior, debido a las propiedades linfoproliferativas que se le asocian al zinc, por lo que se ha sugerido que este comportamiento es similar a la estimulación ejercida por la PHA en el cultivo (Berger y Skinner, 1974).

Los estudios efectuados por Berger y Skinner (1974) demostraron que los iones zinc estimulan la síntesis linfocitaria de ADN y de ARN, así como la transformación blastoide. Estos hallazgos se confirman también con lo reportado por Rühl y cols

(1971), quienes indican que linfocitos de donadores sanos responden a la estimulación por zinc, sin adición de PHA, incrementando la tasa de síntesis del ADN. Schöpf y cols (1967) también demostraron que los iones mercurio (Hg^{++}) estimulan los cambios morfológicos de la transformación blastoide y mitosis en cultivos de linfocitos humanos.

Berger y Skinner (1974) demostraron también que los iones de zinc deben estar presentes durante todo el período de cultivo para producir una estimulación óptima de la síntesis de ADN de los linfocitos, sin presencia de PHA. El incremento gradual de la tasa de síntesis del ADN puede ocurrir por mecanismos diversos. El zinc puede estimular un clon o un grupo de células, lo cual ocasiona que éstas inicien la síntesis de ADN, pasen por mitosis, y continúen proliferando hasta que el número de células sea suficiente para evaluar la tasa de síntesis del cultivo. Marshall y cols (1969) encontraron como respuesta que en cultivos estimulados con antígenos, cada una de las células comienzan a dividirse 48 horas después de la adición del mismo, continuando con la proliferación a un tiempo de generación promedio de 8-13 horas. Por otra parte, la estimulación con iones de zinc permite que otras células entren en la Fase S del ciclo celular (Berger y Skinner, 1974). Asimismo, también reportaron que la estimulación de los linfocitos con determinado antígeno requiere previamente que la sangre del donador esté sensibilizada para responder adecuadamente, mientras que la estimulación con zinc no requiere sensibilización previa.

Por medio del método de incorporación de timidina tritiada (utilizado tradicionalmente para evaluar citotoxicidad), Berger y Skinner (1974) determinaron que la concentración óptima de zinc necesaria para estimular la síntesis del ADN linfocitario es de $100 \mu M$, lo cual coincide con los estudios realizados por Lastra y cols (1996), quienes reportan que a concentraciones de $100 \mu M$ de acetato de zinc ($COOH-Zn$) se presenta un notable incremento en la proliferación de los linfocitos de ratones suplementados con este elemento durante diferentes etapas perinatales, evaluado por el mismo método.

Los resultados reportados por Berger y Skinner (1974), muestran que, efectivamente los linfocitos humanos tratados con la concentración de 100 μM incrementan su síntesis de ADN; sin embargo, en los linfocitos previamente estimulados con PHA y tratados con zinc, inhiben su proliferación. El zinc inhibe la estimulación de la PHA en los cultivos de linfocitos humanos, el zinc *per se* estimula la linfoproliferación, actuando de manera similar al mitógeno; sin embargo, cuando se adicionan tanto el mitógeno (PHA) como los iones de zinc, la síntesis de ADN decrece, por lo que la estimulación con PHA y zinc no es aditiva, lo que posiblemente indica que en el cultivo de linfocitos humanos, la presencia de PHA y de algún otro elemento necesario para llevar a cabo la síntesis de ADN, probablemente inhibe la respuesta mitogénica de la PHA.

La toxicidad de otros iones metálicos (Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Cd^{2+}) puede ser resultado de la competencia con un metal esencial. De hecho, cada uno de los metales puede coordinar una variedad de ligandos en las células y el medio, alterando la estructura macromolecular y la función; esta forma de toxicidad puede asociarse posiblemente también al zinc, así como a otros iones (Berger y Skinner, 1974). Con base en lo anterior, es posible sugerir que iones divalentes (como en el caso del zinc) presenten comportamientos similares.

La valencia del metal quizá sea un factor importante que determine el comportamiento, toxicidad, absorción y hasta competencia de los iones que presenten igual valencia por los mismos sitios de unión en la célula, tal como ocurre con el cobre y el zinc. Según Carpentieri (1986), existe antagonismo en cultivos de linfocitos entre zinc y hierro; zinc y cobre; y zinc y calcio, lo que obviamente corrobora la hipótesis que confiere comportamientos similares a los iones que presentan la misma valencia. Asimismo, el zinc es antagonista de algunos efectos tóxicos del plomo (Clayton y Clayton, 1981).

En cuanto al índice mitótico (IM), al efectuar el Análisis de Varianza (ANOVA) para los datos obtenidos con el cloruro de zinc (ZnCl_2), se muestra que hay diferencia

EFECTOS DEL ZINC Y ALUMINIO SOBRE MARCADORES BIOLÓGICOS DE DAÑOS TEMPRANO. EVALUACIÓN DEL EFECTO SOBRE MARCADORES DE CITO Y GENOTOXICIDAD.

significativa entre el testigo y cada una de las concentraciones evaluadas ($P < 0.05$; $P < 0.01$). Posteriormente, al realizar el Análisis de Duncan, se corroboró que existen diferencias significativas entre las cuatro concentraciones y el control ($P < 0.05$; $P < 0.01$), por lo que se puede considerar que el zinc posee características citotóxicas a estas dosis.

Por lo que respecta a la cinética de proliferación celular (CPC), en la Tabla 1, se muestra que no existen diferencias basales significativas entre los cuatro donadores, evidenciándose también que responden en forma dosis-respuesta, por lo que se sugiere que, aparte de la respuesta citotóxica que tiene el zinc, también existe una respuesta citostática, ya que claramente se muestra un incremento de metafases en M1. El ANOVA, se realizó con los datos del índice de replicación (IR), y se encontró que la respuesta entre el testigo y todas las concentraciones evaluadas fue muy diferente ($P < 0.05$). Lo anterior confirma que el zinc a estas dosis altera la cinética de proliferación celular, inhibiendo el IR (Gráficas 2 y 3).

Se determinó también si el zinc alteraba la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH's) en el cultivo (Gráfica 4). Como control positivo se utilizó a la mitomicina C (MMC), a una concentración que incrementa notablemente la frecuencia de ICH's (1.3×10^{-6} M).

La mitomicina C (MMC) es un poderoso agente alquilante, que inhibe la síntesis del ADN, por lo cual se observó menor frecuencia de células que completaron 3 o más ciclos celulares, habiendo de manera significativa ($P < 0.05$), en contraparte un incremento en el número de células que sólo llegaron a completar un ciclo celular.

El índice mitótico (IM) se abatió casi por completo con la dosis aplicada (1.3×10^{-6} M), y la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH's) en las células tratadas con este agente aumentó considerablemente, lo cual indica que una gran parte de las pocas células que se dividieron en presencia de mitomicina C pasaron por la Fase S del ciclo celular, traduciendo el daño provocado al ADN en ICH's.

EFFECTOS DEL ZINC Y ALUMINIO SOBRE MARCADORES BIOLÓGICOS DE DAÑOS TEMPRANO. EVALUACIÓN DEL EFECTO SOBRE MARCADORES DE CITO Y GENOTOXICIDAD.

Por otra parte, al tratar los linfocitos con el cloruro de aluminio (AlCl_3), los resultados obtenidos al evaluar el índice mitótico (IM) mostraron que presenta un comportamiento similar con el cloruro de zinc (ZnCl_2); ya que hay disminución en el número de metafases (IM) conforme aumenta la concentración; sin embargo, esta disminución es menos marcada, como se observa en la Gráfica 5. Al efectuar también el Análisis de Varianza (ANOVA) para los datos del índice mitótico (IM) obtenidos con el cloruro de aluminio (AlCl_3), se evidencia que existe diferencia significativa ($P < 0.05$; $P < 0.01$) entre el testigo y las cuatro concentraciones evaluadas. Posteriormente, al efectuar el Análisis de Duncan, se corroboró lo anterior; por tanto, se puede sugerir que el aluminio, a las concentraciones evaluadas, presenta efecto citotóxico también.

Por lo que respecta a la cinética de proliferación celular (CPC), y a semejanza de lo encontrado al evaluar el cloruro de zinc (ZnCl_2), en la Tabla 2 se muestra un aparente comportamiento dosis-respuesta. Con los datos del índice de replicación (IR), se efectuó también el ANOVA, obteniéndose diferencias significativas ($P < 0.05$; $P < 0.01$) entre el testigo y cada una de las cuatro concentraciones evaluadas, lo que confirma que a estas dosis el aluminio ocasiona que el índice de replicación (IR) disminuya con la concentración $0.1 \mu\text{M}$, y posteriormente se mantenga constante a las concentraciones $1.0 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ y $100 \mu\text{M}$ (Tabla 3 y Gráficas 6 y 7).

Al comparar el índice mitótico (IM) y cinética de proliferación celular (CPC), obtenidos con el cloruro de zinc (ZnCl_2) y el cloruro de aluminio (AlCl_3), con los resultados obtenidos con sustancias con alto potencial antineoplásico (mitomicina C, metotrexate, melfalan), que se tiene bien documentado que son fuertemente citotóxicos y citostáticos (Rojas, 1994), se puede sugerir que ambos metales son citotóxicos y citostáticos débiles, lo cual posiblemente indique que tanto el cloruro de zinc (ZnCl_2) como el cloruro de aluminio (AlCl_3) alteran o interfieren en algunos procesos vitales de la célula; esta hipótesis es viable para el zinc, ya que éste es constituyente de enzimas necesarias para la replicación celular y la síntesis de

ácidos nucleicos (Toxicological Profile for Zinc, 1994), por lo que tampoco se descarta la posibilidad de que el zinc interactúe directamente sobre el ADN.

En las Gráficas 8 y 9, se observa la relación entre el índice de replicación (IR) y la inhibición del índice mitótico (IIM), para zinc y aluminio, respectivamente, donde el cloruro de zinc ($ZnCl_2$) presenta pendiente con tendencia negativa, asimismo, a medida que la inhibición del índice mitótico aumenta, el índice de replicación disminuye, lo que confirmaría la citotoxicidad y citostaticidad del zinc; sin embargo, en el caso del cloruro de aluminio ($AlCl_3$), la pendiente tiende a cero, por lo que este comportamiento indicaría que a medida que el índice mitótico se inhibe al aumentar la dosis de cloruro de aluminio ($AlCl_3$), el índice de replicación no se ve alterado en las concentraciones 1.0 μM , 10 μM y 100 μM ; estos resultados sugieren que el aluminio probablemente no interactúa directamente con el ADN (Rojas, 1994).

En cuanto al comportamiento del aluminio, como inductor de intercambios de cromátidas hermanas (ICH's) en el cultivo de linfocitos, se encontró que no incrementó la frecuencia de ICH's, lo cual está de acuerdo con lo establecido por los estudios efectuados con linfocitos de sangre periférica de trabajadores de la industria del aluminio, ya que tampoco se han observado efectos sobre la incidencia de intercambios de cromátidas hermanas (Becher y cols, 1984).

De acuerdo con Solomon y Bobrow (1975), la evaluación de los intercambios de cromátidas hermanas (ICH's) constituyen un parámetro sensible para determinar daño a cromosomas humanos, y que tanto el zinc como el aluminio no producen daño al ADN, evaluado por medio de la inducción de ICH's.

Estos resultados permiten establecer que a estas concentraciones el cloruro de zinc ($ZnCl_2$) y el cloruro de aluminio ($AlCl_3$), son capaces de alterar la fisiología, afectando la capacidad de respuesta proliferativa (IM) y la velocidad de división (CPC) de los linfocitos circulantes *in vitro*, sin embargo, no producen lesiones en el ADN asociadas con la inducción de ICH's.

- El cloruro de zinc ($ZnCl_2$) inhibe el índice mitótico (IM), por lo cual, se considera un citotóxico débil, comparado con sustancias fuertemente citotóxicas, como la mitomicina C.
- El cloruro de zinc ($ZnCl_2$) inhibe el índice de replicación (IR), por lo cual, se considera un citostático débil, comparado con sustancias fuertemente citostáticas, como la mitomicina C.
- El cloruro de aluminio ($AlCl_3$) inhibe el índice mitótico (IM), por lo cual, se considera un citotóxico débil, comparado con sustancias fuertemente citotóxicas, como la mitomicina C.
- El cloruro de aluminio ($AlCl_3$) inhibe el índice de replicación (IR), por lo cual, se considera un citostático débil, comparado con sustancias fuertemente citostáticas, como la mitomicina C.
- El cloruro de aluminio ($AlCl_3$) presenta débil toxicidad asociada a la división y replicación celular.
- El cloruro de zinc ($ZnCl_2$) y el cloruro de aluminio ($AlCl_3$) no provocan efectos asociados con la inducción de intercambios de cromátidas hermanas (ICH's).

REFERENCIAS

- ♦ Altmann, P. (1987). Serum aluminum levels and erythrocyte dihydropteridine reductase activity in patients on hemodialysis. *New. Engl. J. Med.* 317:80.
- ♦ Ames, B. N., T. D. Lee y W. E. Durston. (1973). An Improved bacterial Test System for the detection and clasification of mutagens and carcinogens. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 70: 782-786.
- ♦ Babich, H. y E. Borenfreund. (1987). Structure-Activity relationship (SAR) models established *in vitro* with the neutral red cytotoxicity assay. *Toxicology in vitro* 1:3-10.
- ♦ Bagg, H. J. (1936). Experimental production of teratoma testis in fowl. *Am. J. Cancer* 26:69-84.
- ♦ Beach, R. S., M. E. Gershwyn y L. S. Hurley. (1982). Zinc, copper, and manganese in immune function and experimental oncogenesis. *Nutr. Cancer* 3:172-191.
- ♦ Becher, G., A. Haugen y A. Bjorseth. (1984). Multimethod determination of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in an aluminium plant. *Carcinogenesis* 5:641-651.
- ♦ Beijer, K. y A. Jernelov. (1986). Handbook on the Toxicology of Metals, Cap 4 Elsevier Sci. Pub. N.Y.
- ♦ Berger, N. A. y A. M. Skinner. (1974). Characterization of lymphocyte transformation induced by zinc ions. *J. Cell. Biol.* 61:45-55.
- ♦ Bridges, C. H., J. E. Womack y E. D. Harris. (1984). Considerations of copper metabolism in osteochondrosis of suckling foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 185:173-178.
- ♦ Brown, J. J. (1988). Zinc fume fever. *Br. J. Radiol.* 61:327-329.
- ♦ Brusick, D. (1987). Principles of Genetic Toxicology, Plenum Press, N.Y. 284 p.
- ♦ Butheworth, B. E. (1990). Consideration of both genotoxic and nongenotoxic mechanisms in predicting carcinogenic potential. *Mut. Res.* 239:117-132.
- ♦ Canadian Water Quality Guidelines. (1993). Canadian Council of Resource and Environment Ministers.
- ♦ Carlson, B. L., H. V. Ellis y J. L. McCann. (1987). Toxicology and Biological Monitoring of Metals in Humans. Lewis Pub., Inc. Michigan.
- ♦ Carleton, R. L., N. B. Freedman y E. J. Bomze. (1953). Experimental teratomas of the testis. *Cancer* 6:464-473.

- ♦ Carpenter, J. M. y J. H. Ray. (1969). The effect of ⁶⁵zinc chloride on the production of mutations in *Drosophila melanogaster*. *Am. Zool.* 9:1121.
- ♦ Carpentieri, V., J. Myers, L. Thorpe, C. W. Daeschner y M. E. Haggard. (1986). Copper, zinc and iron in normal and leukemic lymphocytes for children. *Mut. Res.* 46:981-984.
- ♦ CCINFO, Disc. (1994). Cheminfo. Canadian Centre for Occupational Health and Safety (zinc and aluminum).
- ♦ Clarkson, T. W., L. Friberg, G. F. Nordberg y R. P. Sager. (1988). Biological monitoring of Toxic Metals. Plenum Press. N. Y. and London.
- ♦ Clayton, G. D. y F. E. Clayton. (1978). Patty's Industrial Hygiene and Toxicology. J. Wiley and Sons, Inc.
- ♦ Clayton, G. D. (1981). Patty's Industrial Hygiene and Toxicology. 3rd revised ed. Vol. 2A: toxicology. J. Wiley and Sons, Inc.
- ♦ Chandra, R. K. (1983). Trace elements and immune response. *Immunol. Today.* 4:322-325.
- ♦ Chong, Y. H. y Y. H. Suh. (1995). Aggregation of amyloid precursor protein by aluminum *in vitro*. *Brain Res.* 670:137-141.
- ♦ Deknudt, G. H. y M. Deminatti. (1978). Chromosome studies in human lymphocytes after *in vitro* exposure to metals salts. *Toxicology* 10:67-75.
- ♦ Deknudt, G. H. y G. B. Gerber. (1979). Chromosomal aberrations in bone-marrow cells of mice given a normal or a calcium-deficient diet supplemented with various heavy metals. *Mut. Res.* 68:163-168.
- ♦ Diario de la A al Zinc. (1995). Laboratorios Laderle. México.
- ♦ Duffus, J. H. (1983). Toxicología ambiental. Omega, Barcelona, España.
- ♦ Edwardson, J. A., A. E. Oakley, R. G. L. Pullen, F. K. McArthur, M. C. Morris, G. A. Taylor y J. M. Candy. (1989). Aluminum and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *In: Massey R. C. and Taylor D. Eds. Aluminum in food and the environment.* Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry. 20-36 p.
- ♦ Ehrlich, R. (1980). Interaction between environmental pollutants and respiratory infections. *Environ. Health. Persp.* 35:89-100.
- ♦ Epstein, S. S. y M. S. Legator. (1971). The mutagenicity of pesticides. M. I. T. Press, London.

- ♦ Evans, H. J. y M. L. O'Riordan. (1975). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Mut. Res.* 31:135-148.
- ♦ Exley, C., N. C. Price, S. M. Kelly y J. D. Birchall. (1993). An interaction of β -amyloid with aluminum *in vitro*. *FEBS Letters.* 324:293-295.
- ♦ Fabris, N. (1994). Neuroendocrine-immune aging: an integrative view on the role of zinc. *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA.* 719:353-368.
- ♦ Falin, L. I. (1940). Experimental teratoma testis in fowl. *Am. J. Cancer* 38:199-211.
- ♦ Falin, L. I. (1941). Morphologie und Differenzierung der Nervelemente in den experimentellen Teratomen, *Z. Mikroskop. Anat. Forsch.* 48:193-224.
- ♦ Fishbein, L. (1981). Sources, transport and alterations of metal compounds: An overview. I. Arsenic, beryllium, cadmium, chromium and nickel. *Environ. Health Persp.* 40:43-64.
- ♦ Fosmire, G. J. (1990). *Am. J. Clin. Nutr.* 51:225.
- ♦ Friberg, L., G. F. Nordberg y V. Vouk. (1986). *Handbook on the Toxicology of Metals.* Vols. I y II. Elsevier Sci. Pub. N. Y. 458 p y 704 p.
- ♦ Frieden, E. (1984). *Biochemistry of the Essential Trace Elements.* Plenum Press, Ed.
- ♦ Gonsebatt, M., L. Vega, L. A. Herrera, R. Montero, M. Cebrian y P. Ostrosky-Wegman. (1992). Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation. *Mut. Res.* 283:91-95.
- ♦ Gunn, S. A., T. C. Gould y W. A. D. Anderson. (1963). Cadmium-induced interstitial cell tumors in rats and mice and their prevention by zinc. *J. Natl. Cancer Inst.* 31:745-760.
- ♦ Gunn, S. A., T. C. Gould y W. A. D. Anderson. (1964). Effect of zinc on carcinogenesis by cadmium. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 115:653-657.
- ♦ Hartmann A. y G. Speit. (1994). Comparative investigations of the genotoxic effect of metals in the single cell gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. *Environ. and Mol. Mutagen.* 23:299-305.
- ♦ Heussner, J. C., J. B. Ward, Jr. y M. S. Legator. (1985). Genetic monitoring of aluminium workers exposed to coal tar pitch volatiles. *Mut. Res.* 155:143-155.

- ♦ IARC (1976). IARC Monograph on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Vol. 11. Cadmium, Nickel, Some Epoxides, Miscellaneous Industrial Chemicals and General Considerations on Volatile Anesthetics. International Agency for Research on Cancer, Lyon France.
- ♦ IARC (1980). IARC Monograph on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Vol. 23. Some metals and metallic compounds. International Agency for Research on Cancer, Lyon France.
- ♦ IARC (1986). Environmental Carcinogens - Selected Methods of Analysis. Vol. 8. Some Metals: Arsenic, Beryllium, Cadmium, Chromium, Nickel, Lead, Selenium and Zinc. I.K. O'Neill, P. Schuller and L. Fishbein, eds. International Agency for Research on Cancer, Lyon France.
- ♦ IARC (1987). Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Supplement 6. International Agency for Research on Cancer, Lyon France.
- ♦ Jacobson, K. B. y J. E. Turner. (1980). The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids. *Toxicology* 16:1-37.
- ♦ Jensen, L. S. (1975). Modifications of selenium toxicity in chicks by dietary and silver and copper. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 149:113-117.
- ♦ Johnson, R. K. (1990). Screening Methods in Antineoplastic drug discovery. *J. Natl. Can. Inst.* 82:1082-1083.
- ♦ Kazantzis, G. y L. J. Lilly. (1986). Mutagenic and carcinogenic effects of metals-In: Handbook on the Toxicology of Metals, 2nd. Ed., Vol. 2. Elsevier, Amsterdam. 319-390 p.
- ♦ Kendrick, M. J., M. T. May y K. D. Robinson. (1991). Metals in biological systems. Ellis-Horwood Eds. 183 p.
- ♦ Krueger, G. L. (1984). The health effects of aluminum compounds in mammals. *Crit. Rev in Toxicol.* 13:1.
- ♦ Landolph, J. R. (1989). Molecular and cellular mechanisms of transformation of C3H/10T1/2 Cl 8 and diploid human fibroblasts by unique carcinogenic, non-mutagenic metal compounds. A review. *Biol. Trace Elem. Res.* 21:421-429.
- ♦ Lastra, M. D. y E. Espinosa. (1993). Efectos del zinc como inmunomodulador. *Bioquimia*, 3, Vol. 18, No. 71:17-21.
- ♦ Lastra, M. D., R. Pastelin, A. Camacho, L. Saldivar y A. E. Aguilar. (1996). Mitogenic effect of zinc on splenic lymphocyte proliferation in certain

developmental stages of mice. *In: Metal ions in Biology and Medicine*; vol. 4. Eds. Ph. Coltery, J. Corbella, J. L. Domingo, J. C. Etienne, J. M. Llobet. John Libbey Eurotext. Paris.

- ♦ Leckie, J. O. y R. O. James. (1974). Control mechanisms for Trace Metals in Natural Waters. *In: A. J. Rubin (Ed.), Aqueous-Environmental Chemistry of Metals. Ann. Arbor Science, Ann Arbor, Michigan.*
- ♦ Léonard, A., G. B. Gerber y F. Léonard. (1986). Mutagenicity, Carcinogenicity and Teratogenicity of zinc. *Mut. Res.* 168:343-353.
- ♦ Ling, N. R. (1968). Lymphocyte stimulation. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- ♦ Magos, L. (1991). Epidemiological and Experimental Aspects of Metal Carcinogenesis: Physico chemical Properties, Kinetics, and the Active Species. *Environ. Health. Persp.* 95:157-189.
- ♦ Manning, W. J. y W.A. Feder. (1980). Biomonitoring Air Pollutants With Plants. Applied Sci. Pub. LTD., London.
- ♦ Markesbery, W. R. y W. D. Ehmann. (1994). Brain trace element in Alzheimer disease. *In: Terry R. D., Katzman R. Bick K. L. Eds. Alzheimer disease. New York: Raven Press. 353-367 p.*
- ♦ Marshall, W. H., F. T. Valentine y H. S. Lawrence. (1969). Clonal proliferation of antigen-stimulated lymphocytes. *J. Exp. Med.* 130:327.
- ♦ McLachlan, D. R. C. (1986). Aluminum and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging.* 7: 525.
- ♦ McNeely, R. N., V. P. Neimanis y L. Dwyer. (1979). Aluminum. *In Water Quality Sourcebook. A Guide to Water Quality Parameters. Water Quality Branch, Inland Waters Directorate, Environment Canada, Ottawa. p. 3.*
- ♦ Michalowsky, I. (1926). Die experimentelle Erzeugung einer teratoiden Missbildung der Hoden beim Hahn, Mitteil. *Zentr. Allgem. Pathol. Anat.* 38:385-387.
- ♦ Miyaki, M., M. Murata, Osabe y T. Ohno. (1977). Effect of metal cations on misincorporation by *E. coli* DNA polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77:854-860.
- ♦ Mocchegiani, E., F. Licastro, F. Franceschi y N. Fabris. (1991). Immunological function in Down's syndrome before and after zinc supplementation. *J. Chemotherapy.* 3:71-75.
- ♦ Mocchegiani, E., L. Santarelli, M. Muzzioli y N. Fabris. (1995). Reversibility of the thymic involution and of age-related peripheral immune dysfunctions by zinc supplementation in old mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 17:703-718.

- ♦ Mocchegiani, E., L. Santarelli y N. Fabris. (1996). Zinc, human diseases and aging. *In: Metal Ions in Biology and Medicine*; vol. 4. Eds. Ph. Collery, J. Corbella, J. L. Domingo, J. C. Etienne, J. M. Llobet. John Libbey Eurotext. Paris. 566-568 p.
- ♦ Moore, J. W. y S. Ramamoorthy. (1984). *Heavy Metals in Natural Waters. Applied Monitoring and Impact Assessment*. Springer-Verlag. N. Y. 268 p.
- ♦ Moutchen, J. (1985). *Introduction to genetic toxicology*. J. Wiley and Sons, N. Y.
- ♦ Murray, M. J., F. D. Wilson., G. L. Fisher y K. L. Erikson. (1983). Modulation of murine lymphocyte and macrophage proliferation by parenteral zinc. *Clin. Exp. Immunol.* 53:744-749.
- ♦ Nordberg, G. F. y O. Andersen. (1985). Metal interactions in carcinogenesis: Enhancement, inhibition. *Environ. Health. Persp.* 40:65-81.
- ♦ NRC (1989). *Biomarkers in Reproduction*.
- ♦ Office of Environmental Affairs World Bank. (1993). *Environmental Guidelines*. USA. 423 p.
- ♦ Ostrosky-Wegman, P., R. Montero, R. Hernández, L. Ruiz, L. Gasque, L. A. Herrera, M. Ruiz, C. Cortinas de Nava y R. Rodríguez. (1988). Lymphocyte proliferation kinetics as a cytostatic screening system. *Environ. Mol. Mutagen.* 11:80.
- ♦ Ostrosky-Wegman, P., M. E. Gonsebatt, R. Montero, L. Vega, H. Barba, J. Espinosa, A. Palao, C. Cortinas de Nava, G. Garcia-Vargas, L. M. del Razo y M. Cebrian. (1991). Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mut. Res.* 250:477-482.
- ♦ Perry P. y S. Wolff. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatid. *Nature* (London) 251:156-158.
- ♦ Petres, J., D. Baron y M. Hagedorn. (1977). Effects of arsenic cell metabolism and cell proliferation: Cytogenic and biochemical studies. *Environ. Health. Persp.* 19:223-227.
- ♦ Pilinskaya, M. A. (1973). Chromosomal aberrations in persons handling ziram under industrial conditions. *Genetica* 54:977-981.
- ♦ Pisciotto, A. V., D. W. Westring, C. DePrey y B. Walsh. (1967). Mitogenic effect of PHA at different ages. *Nature* 215:193.
- ♦ Prasad, A. S., A. Miale, y Z. Farid. (1963). Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism and

hypogonadism. *J. Lab. Clin. Med.* 61:537-549.

- ◆ Prasad, A. S. (1985). Endocrinological and biochemical effects of zinc-deficiency. *Clin. Endocrinol. Metab.* 14:567-589.
- ◆ Prasad, A. S. (1988). Clinical spectrum and diagnostic aspects of human zinc deficiency *In: Prasad, A.S. Essential and Toxic Trace elements in human health and disease.* New York, NY. Alan R. Liss, Inc., 3-53.
- ◆ Provinciali, M., G. Di Stefano y N. Fabris. (1995). Dose-dependent opposite effect of zinc on apoptosis in mouse thymocytes. *Int. J. Immunopharmacol.* 17:735-744.
- ◆ Rojas, E., R. Montero, L. Herrera, M. Sordo, M. E. Gonsebatt, R. Rodríguez y P. Ostrosky-Wegman. (1992). Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology testing? *Mut. Res.* 282:283-286.
- ◆ Rojas, E., L. A. Herrera, M. Sordo, M. E. Gonsebatt, R. Montero, R. Rodríguez y P. Ostrosky-Wegman. (1994). Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Anti-Cancer Drugs* 4:637-640.
- ◆ Rojas, E., M. Valverde, M. Sordo, M. A. Altamirano y P. Ostrosky-Wegman. (1996). Single cell gel electrophoresis assay in the evaluation of metal carcinogenicity. *In: Metal ions in Biology and Medicine; vol. 4.* Eds. Ph. Coltery, J. Corbella, J. L. Domingo, J. C. Etienne, J. M. Llobet. John Libbey Eurotext. Paris.
- ◆ Rühl, H., H. Kirchner y G. Bochart. (1971). Kinetics of the Zn⁺⁺ stimulation of human peripheral lymphocytes *in vitro.* *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137:1089.
- ◆ Savory, J. y M. R. Willis. (1995 u 83). Aluminum Poisoning: Dialysis Encephalopathy, Osteomalacia and Anemia. *Lancet*, Vol II. p. 29-33.
- ◆ Schrauzer, G. N., L. White y C. J. Schneider. (1978). Selenium in human nutrition: dietary intake and effects of supplementation. *Bioinorg. Chem.* 8:303-318.
- ◆ Schöpf, E., K. H. Schulz y H. Gramm. (1967). Transformationen und mitosen von lymphocyten *in vitro* durch quecksilber (II) Clorid. *Naturwissenschaften.* 54:568.
- ◆ Scott, D., S. Galloway, R. Marshall, M. Ishidate, D. Brusick, J. Ashby y B. M. Myhr. (1991). ICPEMIC Genotoxic under extreme culture conditions. *Mut. Res.* 257:147-204.
- ◆ Shin, R. W., V. M. Y. Lee y J. Q. Trojanowski. (1994). Aluminum modifies the properties of Alzheimer's Disease PHF τ proteins *in vivo* and *in vitro.* *J. Neurosci.* 14:7221-7233.

- ♦ Sirover, M. A., y L. A. Loeb. (1976). Infidelity of DNA synthesis *in vitro*: Screening for potential metal mutagens or carcinogens. *Science* 194:1434-1436.
- ♦ Sjögren, B., V. Lidums, M. Hakansson y L. Hedstrom. (1985). Exposure and urinary excretion of aluminum during welding. *Scand. J. Work Environ. Health* 11:39-43.
- ♦ Smith, J.C., E.G. McDaniel y F.F. Fan. (1973). Zinc: A Trace Element Essential in Vitamin A Metabolism. *Science* 181: 954-955.
- ♦ Solomon, E. y M. Bobrow. (1975). Sister chromatid exchanges -a sensitive assay of agents damagin human chromosomes. *Mut. Res.* 30:273-278.
- ♦ Stoner, G. S., M. B. Shimkin, M. C. Troxell, T. L. Thompson y L. S. Terry. (1976). Test for carcinogenicity of metallic compounds by the pulmonary tumor response in strain A mice. *Cancer Res.* 36:1744-1747.
- ♦ Sunderman, F. W. Jr. (1981). Recent Research on Nickel Carcinogenesis. *Environ. Health. Persp.* 40:131-141.
- ♦ Sunderman, F. W. Jr. (1986). Carcinogenicity and Mutagenicity of Some Metals and Their Compounds. *In: Environmental Carcinogens - Selected Methods of Analysis.* Vol. 8. Some Metals: Arsenic, Beryllium, Cadmium, Chromium, Nickel, Lead, Selenium and Zinc. I. K. O'Neill, P. Schuller and L. Fishbein, eds. International Agency for Research on Cancer, Lyon France. pp. 17-43.
- ♦ Task Group on Metal Toxicity. (1976). *In: Effects and Dose-Response Relationships of Toxic Metals.* Nordberg, G.F. (Ed.). Elsevier, Amsterdam 7-111pp.
- ♦ Toxicological Profile for Zinc (update). (1994). U.S. Department of Health & Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. TP-93/15
- ♦ Urone, P. (1986) Air Pollution, Vol. VI. Academic Press, N. Y.
- ♦ USEPA. (1973). Water Quality Criteria 1972. Committee on Water Quality Criteria, U. S. Environmental Protection Agency, Washington D. C. EPA-R3-73-033.
- ♦ USEPA. (1994). Pretratamiento de aguas residuales para funcionarios mexicanos.- Manual de referencia. U. S. Environmental Protection Agency. Office of Wastewater Enforcement and Compliance. Washington, D. C. USA. 8 Módulos.
- ♦ Van der Meulen, J., P. D. Bezemer y F. Lips. (1984). Individual differences in gastrointestinal absorption of aluminum. *N. Eng. J. Med.* 311:1322.

- ◆ Webb, M. (1971). Protection by zinc ions against the toxicity of cadmium ions. *Biochem. J.* 124:17-18.
- ◆ WHO. (1987). Environmental Health Criteria 58 World Health Organization. Geneva.
- ◆ Willis, R. A. (1934). Experimental study of possible influence of injury in genesis of tumors of gonads. *Br. J. Exp. Pathol.* 15:234-236.
- ◆ Windholtz, M., S. Budavari, R. F. Blumett y E. S. Otterbein (eds.). (1983). The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 10th edition. Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey.
- ◆ Woo, Y. T., D. J. Lai, J. C. Arcos y M. F. Argus. (1988). Chemical Induction of Cancer, Structural Bases and Biological Mechanisms. Academic. Press, San Diego, Ca.

TABLAS

Tabla 1.- Efecto del cloruro de zinc (ZnCl₂) sobre el índice mitótico (IM) y la cinética de proliferación celular (CPC) (4 donadores)

DONADOR 1

Concentración (μM)	IM	Cinética de Proliferación Celular			IR
		M1	M2	M3	
TESTIGO	0.0153 +/- 0.0016	18.25 +/- 1.25	22.25 +/- 1.50	59.5 +/- 2.08	2.41 +/- 0.030
0.1	0.0117 +/- 0.0006	25.25 +/- 1.70	22.5 +/- 1.91	52.25 +/- 1.50	2.27 +/- 0.020
1	0.0112 +/- 0.0006	25.5 +/- 1.29	24.25 +/- 0.95	50.25 +/- 1.70	2.25 +/- 0.035
10	0.0083 +/- 0.0005	26.3 +/- 0.57	24.6 +/- 0.57	49 +/- 1.0	2.22 +/- 0.015
100	0.0051 +/- 0.0007	30.5 +/- 2.64	24.75 +/- 1.70	44.75 +/- 1.70	2.08 +/- 0.015
MITOMICINA C 1.3 x 10 ⁻⁸ M	0.0045 +/- 0.0005	37 +/- 2.85	20 +/- 2.50	43 +/- 4.62	2.06 +/- 0.020

DONADOR 2

Concentración (μM)	IM	Cinética de Proliferación Celular			IR
		M1	M2	M3	
TESTIGO	0.0159 +/- 0.0020	16.5 +/- 1.29	24.75 +/- 1.70	58.75 +/- 2.21	2.42 +/- 0.032
0.1	0.0125 +/- 0.0004	24.25 +/- 1.25	24 +/- 1.82	51.75 +/- 1.25	2.27 +/- 0.017
1	0.0111 +/- 0.0004	25.5 +/- 1.29	23.5 +/- 1.29	51 +/- 0.81	2.25 +/- 0.017
10	0.0092 +/- 0.0006	27 +/- 0.81	23.5 +/- 0.57	49.5 +/- 0.57	2.22 +/- 0.012
100	0.0041 +/- 0.0007	31.25 +/- 1.70	23.75 +/- 0.95	45 +/- 2.16	2.13 +/- 0.037
MITOMICINA C 1.3 x 10 ⁻⁸ M	0.0025 +/- 0.0005	30 +/- 2.50	24 +/- 2.45	46 +/- 0.81	2.16 +/- 0.020

DONADOR 3

Concentración (μM)	IM	Cinética de Proliferación Celular			IR
		M1	M2	M3	
TESTIGO	0.0146 +/- 0.0004	18.5 +/- 1.29	23.5 +/- 1	58 +/- 1.82	2.39 +/- 0.030
0.1	0.0116 +/- 0.0002	23.5 +/- 1.29	23.25 +/- 0.95	53.25 +/- 2.06	2.39 +/- 0.033
1	0.0097 +/- 0.0006	26 +/- 0.81	23.25 +/- 1.70	50.75 +/- 2.21	2.24 +/- 0.028
10	0.0082 +/- 0.0006	28 +/- 0.81	23 +/- 1.41	49 +/- 1.41	2.21 +/- 0.018
100	0.0042 +/- 0.0002	32.25 +/- 1.70	23.5 +/- 2.38	44.25 +/- 3.77	2.12 +/- 0.053
MITOMICINA C 1.3 x 10 ⁻⁸ M	0.0030 +/- 0.0003	36 +/- 3	26 +/- 2.78	38 +/- 2.12	2.02 +/- 0.010

DONADOR 4

Concentración (μM)	IM	Cinética de Proliferación Celular			IR
		M1	M2	M3	
TESTIGO	0.0171 +/- 0.0033	19.25 +/- 2.75	23.75 +/- 2.98	57 +/- 5.59	2.37 +/- 0.092
0.1	0.0114 +/- 0.0004	24.25 +/- 1.25	24 +/- 1.82	51.75 +/- 2.21	2.27 +/- 0.031
1	0.0108 +/- 0.0006	25.5 +/- 1.29	23 +/- 2.94	51.5 +/- 4.12	2.26 +/- 0.053
10	0.0091 +/- 0.0008	27.75 +/- 1.25	23 +/- 1.82	49.25 +/- 2.62	2.21 +/- 0.036
100	0.0040 +/- 0.0010	32.5 +/- 2.38	27.75 +/- 5.82	39.75 +/- 6.99	2.01 +/- 0.153
MITOMICINA C 1.3 x 10 ⁻⁸ M	0.0050 +/- 0.0007	34 +/- 1.26	27 +/- 3.26	39 +/- 2	2.05 +/- 0.040

M1 = Metafase en primera división
M2 = Metafase en segunda división
M3 = Metafase en tercera división
IR = Índice de replicación

Tabla 2.- Efecto del cloruro de aluminio (AlCl₃) sobre el índice mitótico (IM) y la cinética de proliferación celular (CPC) (4 donadores)

DONADOR 1

Concentración (μM)	IM	Cinética de Proliferación Celular			
		M1	M2	M3	IR
TESTIGO	0.0164±0.00014	19.5 ± 2.38	23.5 ± 1.73	57 ± 2.16	2.37 ± 0.042
0.1	0.0126±0.0008	23 ± 1.82	24.5 ± 2.38	52.5 ± 1	2.29 ± 0.017
1	0.0107±0.0012	22.5 ± 2.08	26.75 ± 2.62	50.75 ± 2.5	2.28 ± 0.037
10	0.0108±0.00059	26.75 ± 2.36	22 ± 1.63	51.25 ± 2.36	2.24 ± 0.044
100	0.0092±0.0011	26.5 ± 2.64	25.25 ± 1.25	48.25 ± 3.30	2.21 ± 0.058
MITOMICINA C 1.3 × 10 ⁻⁶ M	0.0045 ± 0.0005	37 ± 2.85	20 ± 2.50	43 ± 4.62	2.06 ± 0.020

DONADOR 2

Concentración (μM)	IM	Cinética de Proliferación Celular			
		M1	M2	M3	IR
TESTIGO	0.0291±0.0029	16.5 ± 2.51	21.75 ± 2.98	61.75 ± 2.98	2.45 ± 0.046
0.1	0.0255±0.0010	24.25 ± 2.06	23.75 ± 1.70	49.5 ± 3.10	2.20 ± 0.116
1	0.0209±0.0029	24.75 ± 2.75	23.75 ± 2.06	51.5 ± 3.87	2.28 ± 0.063
10	0.0157±0.0010	26.5 ± 2.08	24.5 ± 1.29	48.75 ± 0.95	2.21 ± 0.029
100	0.0125 ± 0.0015	28.66 ± 2.08	24.33 ± 1.52	35.25 ± 2.64	2.18 ± 0.045
MITOMICINA C 1.3 × 10 ⁻⁶ M	0.0025 ± 0.0005	30 ± 2.50	24 ± 2.45	46 ± 0.81	2.16 ± 0.020

DONADOR 3

Concentración (μM)	IM	Cinética de Proliferación Celular			
		M1	M2	M3	IR
TESTIGO	0.0153 ± 0.0006	16 ± 2.51	22.5 ± 2.98	61 ± 2.98	2.46 ± 0.046
0.1	0.0131 ± 0.0010	20 ± 2.06	22.5 ± 1.70	57.5 ± 3.10	2.37 ± 0.116
1	0.0130 ± 0.0030	23 ± 2.75	23.25 ± 2.06	55 ± 3.87	2.3 ± 0.063
10	0.0123 ± 0.0010	23.25 ± 2.44	21 ± 1.41	55.75 ± 0.95	2.32 ± 0.033
100	0.0103 ± 0.0015	25.5 ± 2.08	21.5 ± 1.52	50.5 ± 2.64	2.2 ± 0.045
MITOMICINA C 1.3 × 10 ⁻⁶ M	0.0030 ± 0.0003	36 ± 3	26 ± 2.78	38 ± 2.12	2.02 ± 0.010

DONADOR 4

Concentración (μM)	IM	Cinética de Proliferación Celular			
		M1	M2	M3	IR
TESTIGO	0.0187 ± 0.0011	18 ± 3	23 ± 0.57	59 ± 3.16	2.41 ± 0.087
0.1	0.0138 ± 0.0070	23 ± 1.63	21.75 ± 1.91	55.25 ± 1.91	2.32 ± 0.030
1	0.0129 ± 0.0012	24.25 ± 1.82	21.5 ± 1.50	54.25 ± 1.70	2.3 ± 0.032
10	0.0111 ± 0.0060	27 ± 1.25	20.12 ± 2.44	52.88 ± 2.21	2.25 ± 0.026
100	0.0111 ± 0.0012	26.5 ± 1.91	19.75 ± 2.08	53.75 ± 2.16	2.27 ± 0.035
MITOMICINA C 1.3 × 10 ⁻⁶ M	0.0050 ± 0.0007	34 ± 1.26	27 ± 3.26	39 ± 2	2.05 ± 0.040

M1 = Metafase en primera división
M2 = Metafase en segunda división
M3 = Metafase en tercera división
IR = índice de replicación

Tabla 3.- Efecto del cloruro de zinc (ZnCl₂) y cloruro de aluminio (AlCl₃) sobre el índice mitótico (IM), cinética de proliferación celular (CPC) y la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (promedio de 4 donadores para cada metal)

CLORURO DE ZINC (ZnCl₂)

<i>Cinética de Proliferación Celular</i>						
<i>Concentración (μM)</i>	<i>IM</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>IR</i>	<i>ICH's</i>
TESTIGO	0.0157 +/- 0.0018	18.12 +/- 1.89	23.56 +/- 1.96	58.31 +/- 3.11	2.39 +/- 0.05	5.95
0.1	0.0118 +/- 0.0005 *	24.31 +/- 1.40	23.43 +/- 1.63	52.25 +/- 1.73	2.27 +/- 0.02 *	6.0
1	0.0107 +/- 0.0008 *	25.62 +/- 1.08	23.50 +/- 1.75	50.87 +/- 2.30	2.25 +/- 0.03 *	6.10
10	0.0087 +/- 0.0007 *	27.33 +/- 1.04	23.46 +/- 1.30	49.20 +/- 1.47	2.21 +/- 0.02 *	6.11
100	0.0043 +/- 0.0008 *	31.62 +/- 2.09	24.93 +/- 3.43	43.43 +/- 4.36	2.08 +/- 0.11 *	6.17
MITOMICINA C 1.3 x 10⁻⁶ M	0.0037 +/- 0.0011 *	34.25 +/- 3.09 *	24.25 +/- 3.09 *	41.5 +/- 3.69 *	2.05 +/- 0.060 *	13.5 +/- 1.21 *

CLORURO DE ALUMINIO (AlCl₃)

<i>Cinética de Proliferación Celular</i>						
<i>Concentración (μM)</i>	<i>IM</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>IR</i>	<i>ICH's</i>
TESTIGO	0.0225 +/- 0.0070	17.25 +/- 2.69	22.37 +/- 2.18	60.37 +/- 3.26	2.43 +/- 0.06	6.07
0.1	0.0191 +/- 0.0065 *	22.87 +/- 2.47	23.62 +/- 1.89	52.25 +/- 4.02	2.26 +/- 0.10 *	6.23
1	0.0163 +/- 0.0051 *	23.75 +/- 2.38	24.37 +/- 2.36	51.87 +/- 3.03	2.28 +/- 0.05 *	6.28
10	0.0136 +/- 0.0023 *	25.87 +/- 2.44	22.87 +/- 2.15	51.12 +/- 3.34	2.25 +/- 0.05 *	6.35
100	0.0118 +/- 0.0027 *	27.14 +/- 2.41	23.78 +/- 2.11	49.07 +/- 3.56	2.21 +/- 0.05 *	6.34
MITOMICINA C 1.3 x 10⁻⁶ M	0.0037 +/- 0.0011 *	34.25 +/- 3.09 *	24.25 +/- 3.09 *	41.5 +/- 3.69 *	2.05 +/- 0.060 *	13.5 +/- 1.21 *

M1 = Metafase en primera división

M2 = Metafase en segunda división

M3 = Metafase en tercera división

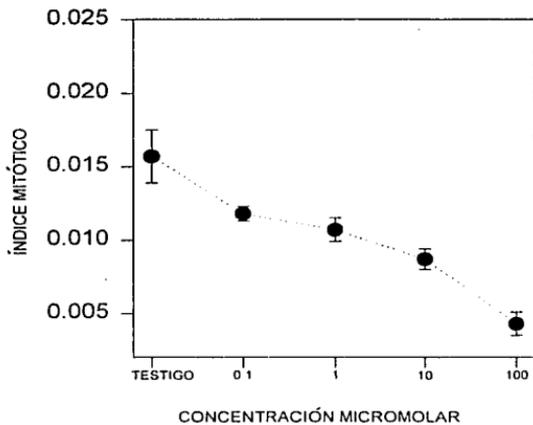
IR = Índice de replicación

ICH's = Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas

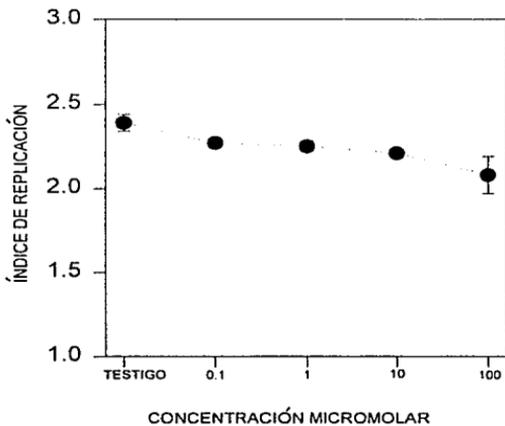
*** P < 0.05**

GRÁFICAS

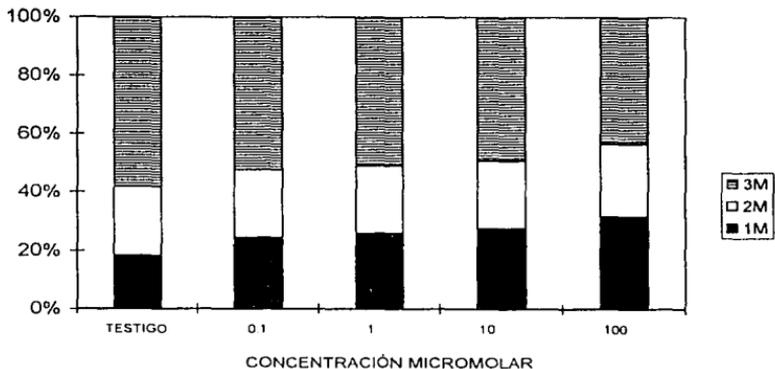
GRÁFICA 1.- EFECTO DEL CLORURO DE ZINC SOBRE EL ÍNDICE MITÓTICO



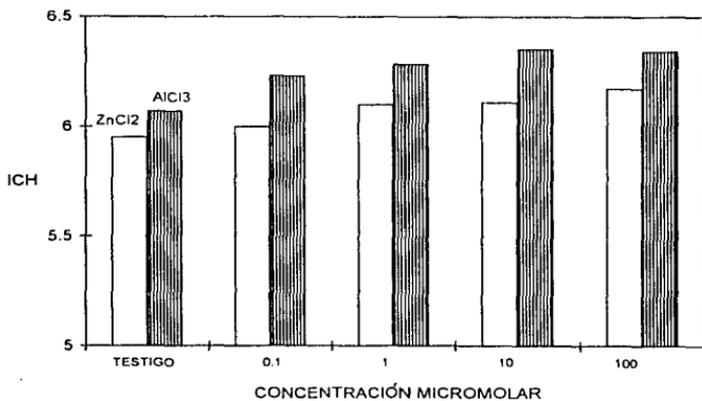
GRÁFICA 2.- EFECTO DEL CLORURO DE ZINC SOBRE EL ÍNDICE DE REPLICACIÓN



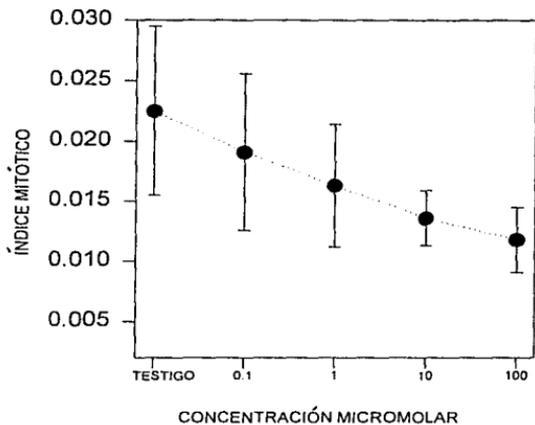
GRÁFICA 3. EFECTO DEL CLORURO DE ZINC SOBRE LA CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN CELULAR



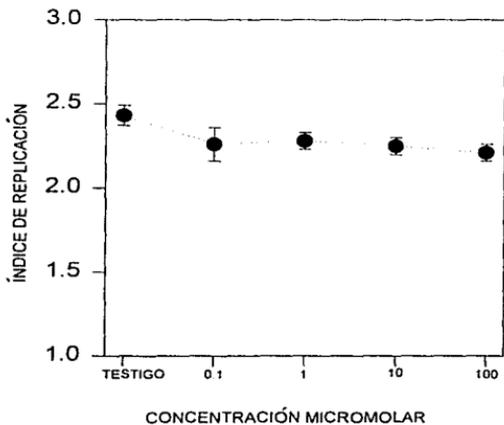
GRÁFICA 4. EFECTO DEL CLORURO DE ZINC Y CLORURO DE ALUMINIO SOBRE LA FRECUENCIA DE INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS



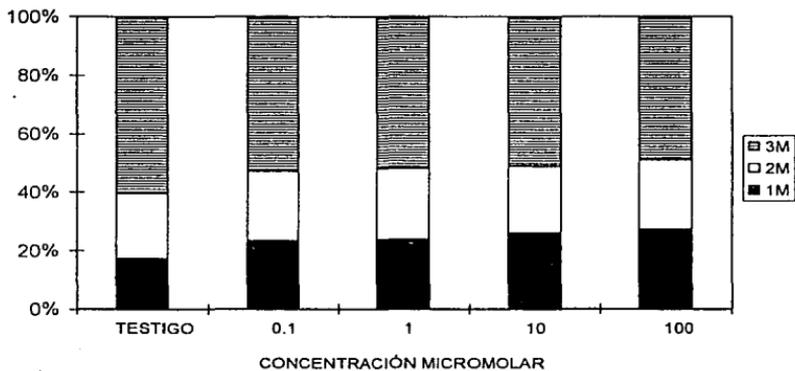
GRÁFICA 5.- EFECTO DEL CLORURO DE ALUMINIO SOBRE EL ÍNDICE MITÓTICO



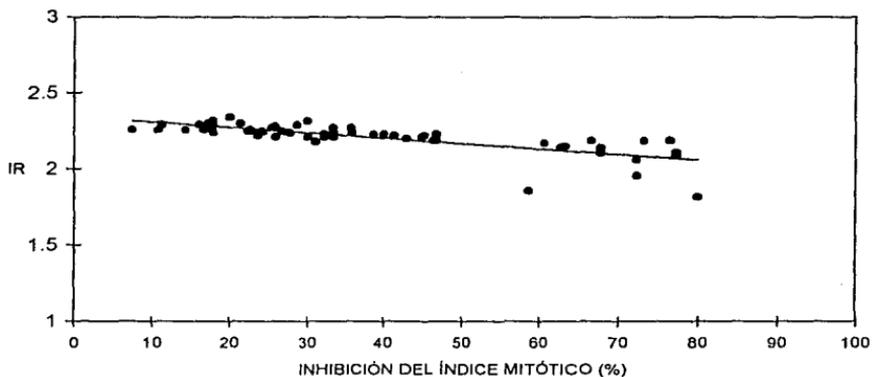
GRÁFICA 6.- EFECTO DEL CLORURO DE ALUMINIO SOBRE EL ÍNDICE DE REPLICACIÓN



GRÁFICA 7. EFECTO DEL CLORURO DE ALUMINIO SOBRE LA CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN CELULAR



GRÁFICA 8. RELACIÓN ÍNDICE DE REPLICACIÓN VS. INHIBICIÓN DEL ÍNDICE MITÓTICO PROVOCADA POR ZnCl₂



GRÁFICA 9. RELACIÓN ÍNDICE DE REPLICACIÓN VS. INHIBICIÓN DEL ÍNDICE MITÓTICO PROVOCADA POR AlCl₃

