



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS
INDUCIDOS POR COBALTO Y ZINC EN

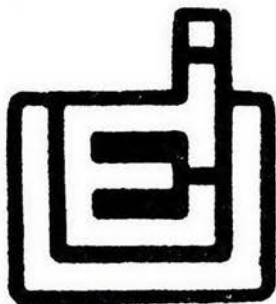
Vicia faba

BO 1337/97

g.3

T E S I S
Que para obtener el título de
B I O L O G A
p r e s e n t a

ROSA MARIA BEDOLLA CANSINO



Realizada Bajo la Dirección de la
Dra. Sandra Gómez Arroyo
en el Laboratorio de Citogenética
Ambiental del Centro de
Ciencias de la Atmósfera



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mi madre, por su infinita paciencia...

A mi compañero Fili, por su infinita impaciencia...

A mi hija Carolina...

A mis hermanos Francisco y Jaime, por lo que pudimos
compartir.... tan efímeramente.

A toda mi familia.

A G R A D E C I M I E N T O S

Deseo expresar mi agradecimiento a la Dra. Sandra Gómez Arroyo por el tiempo, esfuerzo y entusiasmo, brindados durante la dirección de este trabajo de tesis.

Gracias también a la M. en C. Josefina Cortés Eslava por su colaboración técnica en el desarrollo experimental de esta investigación.

Por último, agradezco a la M. en C. María Elena Calderón Segura por su asesoría técnica y valiosos comentarios durante el desarrollo de esta tesis.

*Nótese que cuando alguna parte de este documento parezca
insulsa, hay un propósito en ello.*

Sir Richard Steele (1672-1729)

INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS
POR COBALTO Y ZINC EN *Vicia faba*

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MATERIAL Y MÉTODOS	30
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	35
<i>CLORURO Y NITRATO DE COBALTO</i>	37
<i>CLORURO Y NITRATO DE ZINC</i>	43
REFERENCIAS	47
FIGURAS	66
FIGURA 1 CARIOTIPO NORMAL DE CÉLULAS DE RAÍZ DE <i>Vicia faba</i>	67
FIGURA 2 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS PATRONES DE MARCAJE DEL ADN Y TINCIÓN DIFERENCIAL DE CROMÁTIDAS HERMANAS	68
FIGURA 3 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS PATRONES DE MARCAJE DEL ADN, TINCIÓN DIFERENCIAL DE CROMÁTIDAS HERMANAS E ICHs	69
TABLAS	70
TABLA 1 INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR CLORURO Y NITRATO DE COBALTO EN <i>Vicia faba</i>	71
TABLA 2 INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR CLORURO Y NITRATO DE ZINC EN <i>Vicia faba</i>	72

TABLA 3 PROMEDIOS DE INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR CLORURO Y NITRATO DE COBALTO EN <i>Vicia faba</i>	73
TABLA 4 PROMEDIOS DE INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR CLORURO Y NITRATO DE ZINC EN <i>Vicia faba</i>	74
TABLA 5 EFECTOS GENÉTICOS DE CoCl_2 EN BACTERIAS	75
TABLA 6 MODULACIÓN DE MUTAGENICIDAD POR CoCl_2 EN BACTERIAS	76
TABLA 7 EFECTOS GENÉTICOS DE CoCl_2 EN MAMÍFEROS	77
TABLA 8 EFECTOS MUTAGÉNICOS DE CoCl_2 EN MAMÍFEROS	78
TABLA 9 MODULACIÓN DE MUTAGENICIDAD POR CoCl_2 EN CÉLULAS DE MAMÍFERO	79
TABLA 10 EFECTOS GENÉTICOS DE COMPUESTOS DE COBALTO EN LEVADURAS Y VEGETALES	80
TABLA 11 EFECTOS GENÉTICOS DE COMPUESTOS DE ZINC EN BACTERIAS	81
TABLA 12 EFECTOS GENÉTICOS DE COMPUESTOS DE ZINC EN MAMÍFEROS	82
TABLA 13 EFECTOS GENÉTICOS DE COMPUESTOS DE ZINC EN OTROS ORGANISMOS	83
TABLA 14 EFECTOS GENÉTICOS DE COMPUESTOS DE ZINC EN LEVADURAS Y VEGETALES	84

RESUMEN

El cobalto y el zinc están ampliamente distribuidos en depósitos naturales, de los que son liberados al ambiente a través de procesos industriales, usos en agricultura y fenómenos naturales como intemperismo y vulcanismo. Sus sales y compuestos han mostrado ser mutagénicos y/o carcinogénicos.

En este estudio se realizaron tratamientos con cloruro y nitrato de cobalto y cloruro y nitrato de zinc, en los meristemos de la raíz de *Vicia faba*, a fin de evaluar su actividad citogenética, mediante la prueba de intercambios de cromátidas hermanas (ICH).

Los resultados obtenidos indican que las sales de cobalto empleadas son fuertes inductoras de ICH; pero no así las de zinc. También se observó un efecto tóxico, manifestado por inhibición de la división celular, con todos los compuestos usados. Sin embargo, el cobalto ejerce su acción mitodepresiva a una concentración menor que el zinc.

INTRODUCCIÓN

El hombre de la sociedad industrial moderna vive en un ambiente cargado con una multitud de agentes potencialmente tóxicos, entre los que se incluyen los metales pesados (Léonard *et al.*, 1984). Este hecho ha conducido a un renovado interés por éstos, en cuanto a sus posibles propiedades mutagénicas, carcinogénicas y teratogénicas (Sharma y Talukder, 1987).

El cobalto constituye aproximadamente 0.001-0.002% de la corteza terrestre y se encuentra en gran cantidad de minerales metalíferos tales como catierita (CoS_2), cobaltita (CoAsS), esmaltita (CoAs_2) y otros (Léonard y Lauwerys, 1990). La producción comercial del metal es superior a las 25000 ton métricas anuales de la cual, alrededor del 55%, es usada para la producción de aleaciones como *alnico* (Co, Ni, Al y Cu), utilizado en la fabricación de magnetos permanentes; *acerita* (Co, W, Cr y Mo), caracterizada por su extrema dureza y resistencia a la corrosión, por lo que se emplea en herramientas de alta velocidad (puntas de sierra, cortadores, barrenas, etc.) e instrumentos quirúrgicos y *vitallium* (Co-Cr), destinado a la fabricación de prótesis artificiales, implantes metálicos y a varios tipos de prácticas dentales. Mientras que el 45% restante es ocupado en la fabricación de herramientas de diamante y en la producción de varias sales que tienen una amplia variedad de aplicaciones: en galvanoplastia, como pigmentos en la industria del

vidrio y la alfarería, agentes secantes en pinturas, barnices y tinta de imprenta, catalizadores (síntesis de combustible, hidrogenación y reacciones de polimerización), estabilizadores de espuma en bebidas de malta, aditivos de alimentos animales, elaboración de agroquímicos y en la manufactura de la vitamina B₁₂ (Léonard y Lauwerys, 1990; Hamilton, 1994).

La emisión de cobalto en el ambiente ha sido estimada en 50000 ton anuales, de las cuales 40000 son de fuentes naturales (erosión de rocas y suelos y extracción por vegetales) y 10000 de origen antropogénico. De estas últimas, alrededor de 5000 resultan de la quema de combustibles fósiles y materiales que contienen cobalto (Merian, 1985, cit. por Léonard y Lauwerys, 1990).

Las concentraciones atmosféricas de cobalto en el ambiente general varían desde menos de 0.01 a 4 ng/m³ en áreas industriales; pero han sido descritos, ocasionalmente, niveles superiores a 40 ng/m³ (Koivistainen, 1980, cit. por Léonard y Lauwerys, 1990). Las concentraciones máximas permisibles para vapores y polvo de cobalto en los sitios de trabajo, durante una jornada de 8 horas, son de 0.05 mg/m³ en USA y Suecia y de 0.5 mg/m³ en la antigua URSS (NIOSH, 1981, cit. por Léonard y Lauwerys, 1990).

En la mayoría de las áreas, excepto aquéllas que están asociadas con emisiones localizadas de cobalto proveniente de la industria, este metal está asociado con la resuspensión de partículas del suelo por acción del viento, y con el lanzamiento de las mismas a la tropósfera y estratósfera, a través de erupciones volcánicas (Hamilton, 1994). Sin embargo, Fergusson y Kim (1991) reportaron una concentración de 6 ppm de cobalto, en polvo de calles urbanas y de 9 ppm en el colectado dentro de las casas y concluyeron, a partir de una consideración de factores de enriquecimiento relativo, para el cobalto en polvo de casas y suelo, que probablemente fue generado internamente. Además, Hamilton (1974, cit. por Hamilton, 1994) examinó los compuestos del escape de automóviles, extraídos en los 2 cm finales (1000 cc) y encontró 391 ppm de cobalto presente en los residuos, indicando que los productos del escape pueden contribuir a los niveles del metal en áreas de alta densidad de autos.

Por otro lado, el cobalto tiene un alto interés biológico, ya que es un nutriente esencial para el hombre como componente de la vitamina B₁₂. Se desconoce si es o no esencial para plantas y bacterias, a pesar de la condición de que pequeñas cantidades producen efectos positivos en el crecimiento de ambas; aunque en el caso de las bacterias, su importancia es mayor en aquéllas fijadoras de nitrógeno, en los nódulos de las leguminosas (Hamilton, 1994).

El cobalto también juega un papel tóxico importante, ya que puede unirse a grupos tiol e interferir con la actividad de gran cantidad de enzimas *in vivo*. En forma de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, reduce la oxidación de la glucosa en ratones (Isom y Way, 1974); el suministro de grandes dosis inhibe algunas enzimas, como la citocromo oxidasa, deshidrogenasa succínica y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Beskid, 1967, cit. por Léonard y Lauwerys, 1990); y puede bloquear el canal de calcio en axones de calamar, al unirse a sus proteínas transportadoras (Baker *et al.*, 1973). Además, la aplicación de altas dosis de cobalto puede agotar las concentraciones del citocromo P450 en el hígado, a través de la depresión de la actividad del ácido α -aminolevulínico sintetasa y la activación del hemo oxidasa, en ratas (Sinclair *et al.*, 1982).

En trabajadores crónicamente expuestos a cobalto metálico y a sus sales, los principales órganos blanco son la piel y el tracto respiratorio (Lauwerys y Lison, 1994). El cobalto es un alérgeno capaz de producir dermatitis por contacto (Léonard y Lauwerys, 1990), rinitis, asma e irritación de membranas mucosas (Alexandersson, 1979, cit. por Nordberg, 1994). Ha sido descrito un padecimiento crónico del parénquima pulmonar, llamado enfermedad del metal pesado (pneumoconiosis), principalmente entre trabajadores expuestos a polvo, en la industria del cortado y pulido de diamantes (Demedts *et al.*, 1984, cit. por Hamilton, 1994; van den Eeckhout *et al.*, 1989, cit. por Nordberg, 1994). Asimismo, fueron reportadas epidemias de

cardiomiopatías en Canadá, USA y Bélgica, después del uso de CoCl_2 (aproximadamente 1 mg/l) como aditivo para cerveza, entre personas que consumieron varios litros al día (Alexander, 1972); algunas de estas víctimas desarrollaron además, bocio y/o hipotiroidismo (Taylor y Marks, 1978; Roy *et al.*, 1968). También se encontraron cardiomiopatías, después de la exposición a altas concentraciones de cobalto ($100 \mu\text{g}/\text{m}^3$), en personas ocupacionalmente expuestas (Kennedy *et al.*, 1981). El cobalto en forma de vitamina B_{12} , es un tratamiento para anemia perniciosa debido a su efecto hematopoyético; sin embargo, pueden ocurrir otros efectos, como una disminución en la función de la tiroides (Alexander, 1972).

En 1991 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), publicó una monografía sobre la evaluación de los riesgos carcinogénicos del cobalto para el hombre, en la cual se revisaron estudios epidemiológicos sobre su carcinogenicidad, experimentos en animales de laboratorio, pruebas de genotoxicidad y reportes de tumores en el sitio de implantes de metales pesados, usados en cirugía de hueso. Los resultados de la evaluación de la IARC evidenciaron la carcinogenicidad del óxido de cobalto II y del cobalto metálico en polvo, en animales de laboratorio y la incapacidad de establecer, por insuficiencia de datos, la carcinogenicidad del cobalto y sus compuestos en el hombre, quedando éstos clasificados como posibles carcinógenos (Christensen y Poulsen, 1994).

En lo que se refiere a la mutagenicidad del cobalto, se ha observado que el Co(II) interactúa con proteínas y ácidos nucleicos (Jacobson y Turner, 1980) y funciona como cofactor de la ADN polimerasa durante la replicación del ADN. De acuerdo a Eichhorn y Shin (1968), aunque el Co(II) puede unirse al ADN, le causa poco o ningún daño *in vitro*; sin embargo, Moorhouse *et al.* (1985) sugieren que el ion cataliza la formación de radicales hidroxilo y probablemente también la de 'cripto-hidroxilo', bajo condiciones fisiológicas. El Co(II) tiene además la capacidad de substituir al Mg(II) como activador de la ADN polimerasa (Sirover y Loeb, 1976a), disminuyendo así la fidelidad de la síntesis de ADN *in vitro* (Sirover y Loeb, 1976b, 1977).

Los efectos del cloruro de cobalto en bacterias son controvertidos ya que resultados contradictorios son reportados, aún cuando fue usado el mismo sistema de ensayo. En la prueba de mutaciones reversas en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, Kanematsu *et al.* (1980) y Arlauskas *et al.* (1985) observaron resultados negativos, asimismo Ogawa *et al.* (1986), en *S. typhimurium*; mientras que Wong (1988) y Pagano y Zeiger (1992) los encontraron positivos, también en *S. typhimurium* (Tabla 5).

Sin embargo, la respuesta negativa de las bacterias a la inducción de mutaciones por sales de cobalto, ha sido atribuida a falta de biodisponibilidad de éstas en el interior de la célula, más que a

insensibilidad de ella (Pagano y Zeiger, 1992). Un factor que puede contribuir a lo anterior es la precipitación de fosfatos de cobalto (insolubles) en el medio bacteriano (Rossman, 1981). No obstante, este factor no es la razón para la carencia de actividad del cloruro de cobalto en ensayos bacterianos, como lo demostraron Arlauskas *et al.* (1985) y Ogawa *et al.* (1986) al obtener resultados negativos, a pesar de evitar la formación de fosfatos insolubles, mediante la utilización de un medio de cultivo modificado, en el cual se sustituyeron los iones ortofosfato (PO_4^{3-}) por iones trimetofosfato ($\text{P}_3\text{O}_9^{3-}$) (Arlauskas *et al.*, 1985) y de un medio Tris-HCl, bajo en contenido de fosfato (Ogawa *et al.*, 1986).

Otros factores que puede contribuir a la carencia de disponibilidad del metal por parte de las células, son la quelación a componentes del medio circundante, ausencia de sistemas de transporte activo bacteriano y/o tiempo de tratamiento insuficiente. Lo anterior quedó apoyado por la investigación de Pagano y Zeiger (1992), quienes en un intento por aumentar dicha biodisponibilidad, removieron los componentes quelantes potenciales de la mezcla de exposición, esto es, amortiguador normal de sodio fosfato y medio Vogel-Bonner (comunmente usados en la prueba de incorporación de placa), además de introducir un periodo de preincubación a 37 °C, encontrando así manifestación de actividad mutagénica. Y consecuentemente, también observaron que cada uno de los componentes del medio Vogel-Bonner (fosfato de potasio, fosfato de amonio, sulfato de magnesio y citrato), así como el amortiguador de

sodio fosfato, inhiben en distinto grado la mutagénesis inducida por cloruro de cobalto.

Adicionalmente, Ogawa *et al.* (1986, 1988) reportaron que el cloruro de cobalto puede inducir mutaciones en *S. typhimurium* cuando se administra en combinación con varios compuestos heteroaromáticos (la mayoría de ellos no mutagénicos), esto fue atribuido a una elevada toma de los iones Co(II), debido a la formación de complejos organometálicos débiles, los cuales pueden facilitar la penetración del ion al citoplasma y liberarlo en él; el hecho de que la máxima mutagenicidad se observe en mezclas equimolares apoya lo anterior.

Por otro lado, el cloruro de cobalto no fue mutagénico en el ensayo rec en *Bacillus subtilis* rec^{+/-} (Nishioka, 1975); sin embargo, Kanematsu *et al.* (1980) obtuvieron datos positivos al introducir un procedimiento de preincubación en frío, lo cual resalta la importancia de las condiciones de ensayo, que permiten un tiempo suficiente para la toma del ion metálico (Tabla 5).

El análisis de las investigaciones realizadas en bacterias, hasta ahora descrito, sugiere que el cloruro de cobalto posee actividad mutagénica y, por lo tanto, es posible que actúe como inductor de respuestas SOS; es decir, que promueva lisogenia y reactivación de fagos, aparte de mutagénesis. En este aspecto, Rossman *et al.* (1984) no

tuvieron éxito al intentar inducir fagos lambda en cultivos de *E. coli* WP2s(λ) adicionados con cloruro de cobalto; no obstante, Leitao *et al.* (1993) si lo lograron, pero esto sucedió cuando las células fueron expuestas a la sal por un periodo corto (en ausencia de Mg) y, observaron además, que si ésta está presente en el medio durante todo el experimento (como sucedió en el ensayo realizado por Rossman *et al.* en 1984), no se induce lisogenia (Tabla 5).

Considerando otro aspecto, se ha demostrado que el cloruro de cobalto modula la mutagenicidad de otros agentes genotóxicos. Esta sal en combinación con el compuesto heteroaromático 9-aminoacridina (9AA), fue mucho más mutagénico que 9AA sólo, en *S. typhimurium*; lo cual fue atribuido a una elevada toma de los iones metálicos (Ogawa *et al.*, 1986). En contraste, dicha sal redujo la frecuencia de mutación espontánea en una estirpe mutante de *Bacillus subtilis* con una ADN polimerasa III alterada (Inoue *et al.*, 1981), así como las mutaciones causadas por Trp-P-1 (Mochizuki y Kada, 1982), en *S. typhimurium*; cafeína (Clarke y Shankel, 1988) y luz ultravioleta, (Leitao *et al.*, 1993), en *E. coli*. Sin embargo, Rossman y Molina (1986) reportaron que la sal no interfirió con la mutagénesis inducida por luz ultravioleta en *E. coli*; estos resultados contradictorios probablemente se deben a las bajas concentraciones (5 μ M la más alta) empleadas por Rossman y Molina (1986), en comparación con las más altas (50-200 μ M) usadas por Leitao *et al.* (1993). Estos investigadores observaron además, que el compuesto

disminuyó la inducción lisogénica, pero aumentó la reactivación de fagos producidos por luz uv (Tabla 6).

Adicionalmente, Leitao *et al.* (1993) demostraron que el cloruro de cobalto fue capaz de bloquear la síntesis de proteínas en células de *E. coli*, lo que los llevó a proponer que este efecto puede ser el responsable de las respuestas antimutagénicas y antilísogénicas observadas, ya que la síntesis proteica *de novo* es requerida para todas las funciones SOS. Resulta importante señalar que estas respuestas fueron obtenidas sólo cuando el metal estuvo presente durante todo el experimento, después del tratamiento genotóxico. Por el contrario, si éste es removido, se puede lograr inducción lisogénica y aumento en la reactivación de fagos provocados por irradiación ultravioleta, ya que en estas condiciones no se bloquea la síntesis de proteínas. Por tanto, dependiendo de las condiciones experimentales, el cloruro de cobalto puede actuar como inhibidor o inductor de funciones SOS.

Con respecto a los efectos genéticos provocados por sales de cobalto en levaduras y vegetales, se ha encontrado que el cloruro induce mutantes respiratorio-deficientes (Lindegren *et al.*, 1958; Prazmo *et al.*, 1975), conversión génica (Fukunaga *et al.*, 1982; Kharab y Singh, 1985) y mutaciones reversas (Kharab y Singh, 1985) en *Saccharomyces cerevisiae*. Mientras que en *Vicia faba* se observan aberraciones

cromosómicas e inhibición del huso causadas por cloruro, nitrato y sulfato (Komczynski *et al.*, 1963), así como cromosomas pegajosos y disminución en la intensidad de la división celular ocasionados por nitrato (Herich, 1965). En tanto que en *Allium cepa*, el sulfato produce aberraciones cromosómicas y aneuploidías (Gori y Succoni, 1957, cit. por Beyersmann y Hartwig, 1992) (Tabla 10).

Las investigaciones sobre los efectos genéticos del cloruro de cobalto, en ensayos *in vitro* en células de mamífero, describen predominantemente resultados positivos; ellas incluyen: rompimiento de filamentos de ADN (Hartwig *et al.*, 1990), enlaces cruzados ADN-proteína (Wedrychowski *et al.*, 1986), micronúcleos (Capomazza y Botta, 1991) y aumento en la frecuencia de ICH (Hartwig *et al.*, 1991; Andersen, 1983, cit. por Beyersmann y Hartwig, 1992). Por el contrario, el nitrato de cobalto no indujo aberraciones cromosómicas en leucocitos y fibroblastos diploides humanos (Paton y Allison, 1972) (Tabla 7).

En cuanto al efecto mutagénico del cloruro de cobalto en células de mamífero *in vitro*, se han encontrado resultados débilmente positivos en células de criceto chino (Miyaki *et al.*, 1979; Hartwig *et al.*, 1990, 1991) y de carcinoma mamario de ratón (Morita *et al.*, 1991); pero negativos en células de linfoma de ratón (Amacher y Paillet, 1980) y de criceto chino (Yokoizuma *et al.*, 1990). Estos resultados contradictorios pueden deberse a diferencias en las condiciones experimentales, principalmente concentración y/o tiempo de exposición del tratamiento.

Este último abarcó de 20-48 horas en los ensayos en los cuales los resultados son positivos y las concentraciones empleadas fueron del orden de 100-250 μM (Miyaki *et al.*, 1979; Hartwig *et al.*, 1990, 1991; Morita *et al.*, 1991); mientras que en aquéllos que describen datos negativos, se usaron concentraciones de 24-240 μM y tiempo de exposición de 3 horas (Amacher y Paillet, 1980), el cual es muy corto comparado con el primero y considerando que las sales de cobalto II son tomadas por las células de mamífero en cultivo, sólo de manera lenta (Hartwig *et al.*, 1990); en tanto que Yokoiyama *et al.* (1990) sometieron las células durante 6 días a concentraciones de 1-10 μM , las cuales son muy bajas comparadas con las primeras y tomando en cuenta que los compuestos de cobalto incrementan la frecuencia de mutación en un rango muy estrecho de concentraciones, que va de 100-250 μM , observándose incluso una disminución moderada a partir de 250 μM (Morita *et al.*, 1991) (Tabla 8). De lo anterior se aprecia que, tanto la concentración como el tiempo de exposición del tratamiento, son factores muy importantes en los estudios de mutagénesis.

Aún cuando el cloruro de cobalto provoca sólo una débil mutagénesis en células de mamífero *in vitro*, ha mostrado que modula marcadamente la mutagenicidad de otros agentes genotóxicos. En células de criceto chino, aumentó la frecuencia de mutaciones y de ICH inducidas por luz ultravioleta (Yokoiyama *et al.*, 1990; Hartwig *et al.*,

1991); pero redujo marcadamente las mutaciones provocadas por rayos gamma (Yokoizama *et al.*, 1990) (Tabla 9).

En ensayos *in vivo* con células de mamífero, el cloruro de cobalto da resultados positivos, ellos incluyen, aneuploidías en médula ósea y testículos de criceto sirio (Farah, 1983, cit. por Beyersmann y Hartwig, 1992), micronúcleos (Suzuki *et al.*, 1993) y aberraciones cromosómicas (Palit *et al.*, 1991) en células de médula ósea de ratón (Tabla 7). Asimismo, es capaz de modular la genotoxicidad de otros compuestos, ya que aumentó la frecuencia de ICH provocados por 1,1-dimetilhidrazina (DMH), benzo(a)pireno (BAP) y 2-naftilamina (2NA), en células de médula ósea de ratón (Suzuki *et al.*, 1993) (Tabla 9).

Relativamente han sido realizados pocos estudios para evaluar los efectos de las sales de cobalto en los organismos en desarrollo. Kury y Crosby (1968) inyectaron la yema de pollo con 0.4-0.5 mg de CoCl_2 y observaron anemia, hiperplasia epitelial tiroidea, así como anomalías en ojos y extremidades bajas, entre los supervivientes. Las consecuencias de la exposición prenatal al cobalto parecen ser menos marcadas en mamíferos, ya que a una dosis de 5 mg/kg, el acetato de cobalto falló en la inducción de efectos teratogénicos en cricetos dorados y tampoco protegió contra la acción teratogénica del cadmio (Ferm y Carpenter, 1968). Además, Kasirsky *et al.* (1967, 1969)

mostraron que una sola inyección intraperitoneal de cloruro de cobalto (25 mg/kg) provocó labio y paladar hendido en ratones de la estirpe CF-1, pero protegió contra la formación de paladar hendido, a causa de cortisona.

Por lo que se refiere al zinc, éste representa casi el 0.02% de la corteza terrestre, sus minerales más difundidos en la naturaleza son la esfalerita (ZnS), la zincita (ZnO) y la smithsonita ($ZnCO_3$). En 1984 la producción minera mundial ascendió a 6.2 millones de toneladas métricas aproximadamente, de la cual alrededor del 40%, es usada para protección contra corrosión. Las aleaciones de zinc, principalmente con magnesio y aluminio, son ampliamente utilizadas en la industria del automóvil (parrillas de radiador, carburadores, etc.); la aleación de zinc con cobre, el latón, es conocido desde la antigüedad; el zinc también es empleado para baterías secas y en la construcción. El polvo de este metal sirve como agente reductor en la industria química. Varios compuestos de zinc son ocupados en procesos industriales, tales como la manufactura de textiles, porcelana y alfarería; en fotografía; como pigmento en pinturas; en galvanoplastia y para preservar la madera. Los carbamatos zineb y ziram son aprovechados como potentes fungicidas en la agricultura, el fosfuro de zinc (Zn_3P_2) es un veneno contra ratas y ratones de campo. Las sales de zinc tienen aplicaciones médicas, el sulfato como antiséptico oftálmico, el óxido en dermatología, el peróxido como antiséptico de la piel, el fosfato como cemento dental y los cristales de

zinc-insulina en el tratamiento de la diabetes. Otras sales tales como óxido, cloruro, carbonato, peryodato, permanganato, acetato, p-fenolsulfonato y salicilatos, son usadas en medicina veterinaria como astringentes y antisépticos (Léonard *et al.*, 1986).

El zinc en el ambiente, se origina mediante procesos naturales y antropogénicos. Las emisiones mundiales de zinc provocadas por el hombre, fueron estimadas en más de 300000 ton/año (Nriagu, 1979); las que resultaron, principalmente, de la producción primaria de zinc metálico, combustión de madera, incineración de desechos y elaboración de hierro y acero. Mientras que la dispersión de procedencia natural, se calcula que es del orden de 44000 ton/año (Léonard *et al.*, 1986).

Las cantidades de zinc en aire urbano varían desde 0.01 a 0.84 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Schiller y Boyle, 1985), mientras que superan los 1530 $\mu\text{g}/\text{g}$, en polvo colectado en calles cercanas a fundiciones. En áreas de estacionamiento de automóviles van de 1000-3700 $\mu\text{g}/\text{g}$ y de sólo 160-710 $\mu\text{g}/\text{g}$ en caminos rurales (Harrison, 1979, cit. por Léonard *et al.*, 1986). Las concentraciones máximas permisibles en los sitios de trabajo, durante una jornada de 8 horas, son de 1 mg/m^3 para vapores de cloruro de zinc, 0.05 mg/m^3 para cromato de zinc y 5 mg/m^3 para vapores de óxido de zinc (ACGIH, 1983, cit. por Léonard *et al.*, 1986).

El zinc, al igual que el cobalto, tiene funciones biológicas importantes; se sabe que es un nutriente esencial para plantas y animales, desde que Raulin (1869, cit. por Pike *et al.*, 1975) demostró su necesidad para el crecimiento de *Aspergillus niger*. Es parte integral de muchas moléculas biológicas, funciona como cofactor para más de 70 enzimas, entre las que se incluyen: anhidrasa carbónica, fosfatasa alcalina, peptidasas y alcohol deshidrogenasa (Sanstead y Evans, 1984, cit. por Thompson *et al.*, 1989). También interviene en otros aspectos fisiológicos, tales como el metabolismo de las hormonas, la respuesta inmune (Blazsek y Mathé, 1984, cit. por Léonard *et al.*, 1986) y la estabilidad del ADN (al unirse a las porciones fosfato) (Eichhorn y Shin, 1968). Cabe mencionar que el zinc, a bajas concentraciones, se une preferentemente a fosfatos y a altas, interactúa con las bases de los nucleótidos (Jacobson y Turner, 1980).

Léonard *et al.* (1986) describen que la toxicidad del zinc en los ecosistemas terrestres, es pequeña; sin embargo, se ha observado que un contenido excesivo en el suelo y en la atmósfera provoca acumulación de este elemento en varios tejidos y órganos vegetales (Karweta, 1976, cit. por Kocik *et al.*, 1982) lo cual conduce a inhibición del crecimiento de las plantas, clorosis de las hojas y aún a la muerte (Antonovics *et al.*, 1971).

La deficiencia de zinc juega un papel más importante en la salud humana que la intoxicación, ya que esta última es rara en el hombre (Elinder y Piscator, 1979, cit. por Léonard *et al.*, 1986). La carencia de zinc conduce a una reducida tasa de crecimiento, provocada por la disminución en la actividad de muchas enzimas que lo requieren; tal es el caso de la timidina cinasa, la cual fosforila la timidina antes de su incorporación en el ADN, durante la replicación (Prasad y Oberleas, 1979). Por tanto, la escasez de este metal puede reducir la velocidad de replicación del ADN y la proliferación celular (Sanstead y Rinaldi, 1969).

El zinc es capaz de interactuar de manera competitiva con varios metales, lo cual puede ser benéfico, como en el caso del cadmio, plomo, estaño o mercurio; o perjudicial, si elementos tales como hierro, cobre, magnesio o calcio están incluidos. En muchos casos tal interacción sucede a nivel molecular, por desplazamiento de componentes metálicos de proteínas, por acción sobre la estructura del ADN o sobre membranas. Estos aspectos son ilustrados por los siguientes ejemplos: la inyección de sales de zinc protege contra la atrofia testicular causada por cadmio (Parizek, 1957) y la anemia inducida por la ingestión de cantidades excesivas de zinc, es revertida por el hierro (Magee y Matrone, 1960).

A pesar de que el zinc produce tumores, bajo condiciones particulares de exposición, en animales de laboratorio (Guthrie, 1964,

1966, 1967, 1971), no hay evidencia de que represente un riesgo carcinogénico para el hombre (Léonard *et al.*, 1986).

En cuanto se refiere a mutagenicidad del zinc, se ha observado que el cloruro no afecta la fidelidad de la síntesis *in vitro* del ADN (Sirover y Loeb, 1976b), ni induce falsas reparaciones *in vitro* entre las bases de los ácidos nucleicos (Murray y Flessel, 1979, cit. por Léonard *et al.*, 1986). Sin embargo, los resultados en bacterias son controvertidos, ya que los datos reportados por diferentes investigadores son contradictorios, aún cuando fue usado el mismo sistema de ensayo. Tal es el caso de los datos logrados por Wong (1988) y Pagano y Zeiger (1992), quienes trabajando con cloruro de zinc, mediante el ensayo de mutaciones reversas en *Salmonella typhimurium*, observaron resultados negativos y positivos respectivamente (Tabla 11). Sin embargo, existen diferencias importantes en los protocolos usados en ambas investigaciones: Wong (1988) siguió el propuesto por Maron y Ames (1983), en el que se utiliza, entre otras sustancias, medio Vogel-Bonner (V-B) y amortiguador de sodio-fosfato; mientras que Pagano y Zeiger (1992), además de utilizar un procedimiento de preincubación, sustituyeron el amortiguador de sodio-fosfato por amortiguador Hepes (sodio-cloruro de potasio) o por agua destilada desionizada, y no emplearon ninguno de los componentes del medio V-B; ya que demostraron en la misma investigación, que éstos y el amortiguador reemplazado inhiben completamente la inducción de mutaciones por cloruro de zinc;

probablemente debido a una acción quelante sobre el metal y/o a procesos de transporte activo y pasivo. Esta propuesta fue apoyada al evidenciar inhibición de la mutagénesis por zinc, cuando fue usado un complejo Zn/transportador orgánico-quelante (Zn/DEDTC), para evitar el proceso de transporte metálico selectivo.

Así, posiblemente el origen de los resultados conflictivos involucra la forma de zinc usada y las probables interacciones entre éste y los compuestos del medio. Cuando el $ZnCl_2$, $Zn(NO_3)_2$ ó $ZnSO_4$ es añadido al medio de cultivo, se disocia completamente, y varios de los constituyentes de éste (especialmente las proteínas del suero) son capaces de unirse al zinc libre (Parisi y Vallee, 1970) y de este modo, no estar disponible para el transporte al interior de la célula. Por otro lado, cuando el zinc es aplicado como un complejo orgánico, también existe competencia con los componentes del medio. Si éstos se unen al zinc con una afinidad menor que el compuesto orgánico, entonces puede ser transportado como complejo orgánico y el metabolismo subsecuente dentro de la célula podría liberarlo. Por lo que la presencia o ausencia de una respuesta mutagénica en un ensayo corto dependería del medio, tipo de célula y la fuerza de uniones coordinadas entre el zinc y los compuestos orgánicos.

La respuesta negativa producida por zinc inorgánico en el ensayo de mutaciones reversas, en *E. coli* (Venitt y Levy, 1974) así como en *S.*

typhimurium (Gocke *et al.*, 1981; Marzin y Vo Phi, 1985; Wong, 1988) (Tabla 11), es consistente con la posibilidad de que el metal no esté disponible para el transporte al interior de la célula, por haberse unido con los constituyentes del medio.

Mientras que el resultado negativo observado con acetato de zinc, en la prueba de mutaciones reversas en *S. typhimurium* (Thompson *et al.*, 1989), sugiere que la unión del zinc con el acetato no es suficientemente fuerte para competir con el medio o que este compuesto no atraviesa la pared celular bacteriana. Por el contrario, el complejo Zn/2,4-pentanodionato produce datos positivos en el mismo sistema de ensayo (Thompson *et al.*, 1989), lo cual indica que es bastante estable para retener al zinc en el agar del medio y por tanto, es transportado a través de la pared celular de la bacteria.

En células de mamífero, los resultados contradictorios descritos por Amacher y Paillet (1980) y Thompson *et al.* (1989), en el ensayo de mutaciones génicas con células de linfoma de ratón, son también consistentes con las formas de zinc usadas (Tabla 12). El cloruro de zinc, probado por Amacher y Paillet (1980), se disocia y probablemente se une a proteínas del suero, siendo por tanto inactivo; mientras que una porción significativa del acetato de zinc, usado por Thompson *et al.* (1989), puede estar disponible para el transporte y ocasionar las mutaciones observadas. En la prueba de aberraciones cromosómicas, las

evidencias halladas también han sido conflictivas, ya que Deknudt y Deminatti (1978) reportaron que el cloruro de zinc es un clastógeno débil en linfocitos humanos cultivados, mientras que Thompson *et al.* (1989) encontraron que el acetato de zinc es un potente clastógeno en células CHO; sin embargo fue notada una respuesta negativa, en linfocitos humanos cultivados, por Gasiorek y Bauchinger (1981) con acetato de zinc y por Littlefield *et al.* (1984), con el quelato Zn-DTPA (ácido dietilendiaminopentacético) (Tabla 12). Las disparidades en las respuestas mencionadas por Deknudt y Deminatti (1978), Thompson *et al.* (1989) y Littlefield *et al.* (1984) pueden deberse a diferencias en el transporte de las formas de zinc probadas y en el caso del Zn-DTPA, además, a la estabilidad del quelato. En tanto que las divergencias en los datos logrados por Deknudt y Deminatti (1978) y Thompson *et al.* (1989) comparados con los de Gasiorek y Bauchinger (1981), probablemente se deben más a la etapa del ciclo celular durante el experimento, ya que estos últimos expusieron linfocitos frescos por 3 horas y después indujeron replicación, de modo que las células estuvieron en G₀ durante el tratamiento. Debido a que los eventos citogenéticos ocurren más fácilmente en células en división, no es sorprendente que se haya obtenido una respuesta negativa. También es probable que 3 horas de exposición hayan inducido metalotioneína, la cual puede unirse al zinc antes que la replicación ocurra (Enger *et al.*, 1983).

Los estudios de genotoxicidad *in vivo* con zinc, en mamíferos y en *Drosophila melanogaster*, son también opuestos. En células de médula ósea de ratón, Giri *et al.* (1988) reportan ICH y aberraciones cromosómicas cuando los ratones reciben cloruro (330 mg/kg de peso corporal) vía oral; mientras que Voroshilin *et al.* (1978) no encuentran aberraciones, si el suministro del compuesto es intraperitoneal (15 mg/kg de peso corporal); asimismo, Gocke *et al.* (1981) obtienen resultados negativos en la prueba de micronúcleos, en células de médula ósea de rata y ratón tratados intraperitonealmente con sulfato (86.3 mg/kg de peso corporal) (Tabla 12). En *D. melanogaster*, Gocke *et al.* (1981) no notan mutaciones letales recesivas ligadas al sexo, usando sulfato (5mM); en tanto que Ogawa *et al.* (1994) logran datos positivos, en la prueba de la mancha del ala, inducidos por cloruro (6-30 mM) (Tabla 13). Las discrepancias observadas posiblemente se deben a la dosis empleada, vía de administración y/o al hecho de que el zinc se une casi totalmente a las proteínas del suero o metaloproteínas, en las células (Parisi y Vallee, 1970).

En *Saccharomyces cerevisiae*, el cloruro de zinc no indujo mutaciones, pero si una leve conversión génica (Fukunaga *et al.*, 1982). Mientras que en plantas superiores provocó aberraciones cromosómicas y redujo el índice mitótico en *Allium sativa* (Mitra, 1984, cit. por Sharma y Talukder, 1987); y tuvo también un efecto mitodepresor y una acción inhibidora del crecimiento de la raíz en *Allium cepa* (Kocik *et al.*, 1982).

Por su parte, el sulfato de zinc incrementó débilmente la frecuencia de aberraciones cromosómicas en *Vicia faba*, aunque en combinación con etil metanosulfonato lo hizo de manera marcada (Moutschen-Dahmen y Moutschen-Dahmen, 1963). Asimismo, se han observado fragmentos de cromosomas y huecos, inducidos por nitrato de zinc en *Vicia faba* (Gläss, 1956).

En trabajadores de la industria del zinc se encontró un número mayor de aberraciones cromosómicas, en linfocitos de sangre periférica, comparado con el de personas no expuestas (Deknudt *et al.*, 1973; Deknudt y Léonard, 1975; Bauchinger *et al.*, 1976), pero este hecho no puede ser considerado como prueba de actividad clastogénica del zinc, ya que la exposición a otros agentes genotóxicos, tales como plomo y cadmio, ha ocurrido de manera simultánea en dichos empleados.

El zinc aparentemente no tiene efecto teratogénico, excepto quizás a dosis altas; pero puede modificar el potencial teratogénico de otros compuestos. Pocos estudios se han realizado acerca de la capacidad nociva del zinc en los organismos en desarrollo. Dosis de 20 mg/kg, inyectados intraperitonealmente en ratones hembras preñadas, causaron un retraso en el desarrollo y malformaciones en la osificación fetal (Chang *et al.*, 1977); sin embargo, Ferm y Carpenter (1967) no pudieron confirmar esto en cricetos, a una dosis de 2 mg/kg. Las discrepancias

pueden deberse a diferencias en las especies y/o a la aplicación de dosis insuficientes.

Por el contrario, la acción deletérea de la deficiencia de zinc en el organismo en desarrollo, está bien documentada. Roedores con una dieta insuficiente en éste mostraron un aumento en la mortalidad perinatal, paladar hendido, espina bífida, patas y piernas zambas, sindactilia, huesos de las costillas fusionados, hidrocefalia, microftalmia, peso fetal reducido, malformaciones pulmonares, hernia diafragmática, malformaciones del sistema nervioso y cambios conductuales (Apgar, 1968; Mills *et al.*, 1969; Warkany y Peterling, 1972; McKenzie *et al.*, 1975). La carencia severa del metal, provocada por la administración de grandes cantidades de ácido etilendiaminotetracético (EDTA), en ratas preñadas, también indujo malformaciones congénitas (Swenerton y Hurley, 1971). Además, se ha sugerido (Sever y Emanuel, 1973; Hambridge *et al.*, 1975) que su escasez, en mujeres embarazadas, puede ser responsable de defectos en recién nacidos. Probablemente, algunos daños embriotóxicos del agotamiento del zinc están relacionados con una disminución en enzimas dependientes de éste (Prasad y Oberleas, 1971). El zinc puede, asimismo, prevenir los efectos teratogénicos producidos por otros metales, como el cadmio (Ferm y Carpenter, 1967) y disminuir la acción de otros teratógenos, al interactuar con ellos, tal es el caso de la talidomida (Jackson y Schumacher, 1979) y de la vitamina A (Smith *et al.*, 1973).

Con el fin de detectar los efectos genotóxicos provocados por la gran variedad de mutágenos, tanto físicos como químicos, presentes en el ambiente y de evaluar el riesgo que representan para la salud del hombre, se han desarrollado diversos sistemas de prueba que incluyen bacterias, hongos, plantas y animales (EMS, 1975). El haba, *Vicia faba*, es considerada una de las especies de plantas superiores más eficientes para valorar daño cromosómico. En una revisión de la literatura, Shelby (1976) mostró que en más de un tercio de los estudios en plantas, para el análisis de aberraciones cromosómicas, se usó *Vicia faba*; asimismo, ha sido ampliamente utilizada en pruebas de intercambios de cromátidas hermanas (Kihlman, 1975; Kihlman y Kronborg, 1975; Gómez-Arroyo y Castillo Ruiz, 1985; Gómez-Arroyo *et al.*, 1988a, b, 1989; Xing y Zhang, 1990; Zhang *et al.*, 1991) e incluso fue propuesta como sistema de prueba citogenética para mutágenos ambientales, en el Gene-Tox Program (Ma, 1982).

Las características de *Vicia faba* como biomonitor citogenético de contaminantes ambientales, están basadas en su sensibilidad a ensayos de tratamiento corto (Grant, 1982; Grant *et al.*, 1992) y puesto que la metodología ya está estandarizada, los resultados entre laboratorios son comparables en todo el mundo (Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1995). Como sistema de ensayo es barato, fácilmente manipulable y no requiere de equipo sofisticado.

Para la detección de daño cromosómico, *Vicia* es un material experimental muy adecuado ya que sus cromosomas son pocos ($2n=12$), grandes y fácilmente observables. La figura 1 muestra el cariotipo normal, en células meristemáticas de raíz, el cual consiste en un par de cromosomas metacéntricos, con largos satélites separados del resto del cromosoma por constricciones secundarias y 5 pares de cromosomas subacrocentricos, similares en tamaño. El ciclo celular es corto: 19.3 horas a 19 °C en el cual el período presintético (G_1) abarca 4.9 horas, la síntesis de ADN (S) 7.5 horas, el período postsintético (G_2) 4.9 horas y la mitosis (M) 2 horas (Evans y Scott, 1964).

Como prueba de análisis, el intercambio de cromátidas hermanas (ICH) ofrece la posibilidad de un ensayo rápido y altamente sensible, para la detección de mutágenos ambientales; puesto que el fenómeno se induce a concentraciones hasta diez veces menores que las requeridas para producir alteraciones cromosómicas (Perry y Evans, 1975; Carrano *et al.*, 1978).

Desde el punto de vista molecular, el ICH es un fenómeno que implica transposiciones simétricas de ADN de doble cadena, equivalentes entre las dos cromátidas de un mismo cromosoma. Algunos estudios han evidenciado que el proceso de ICH requiere que la célula pase por la etapa de síntesis (S) del ADN (Wolff, 1974) y se ha sugerido

que es durante o inmediatamente después de que se ha formado la horquilla de replicación, cuando se lleva a cabo el intercambio de doble banda entre las cadena de ADN (Kato, 1980). En cuanto a las causas, parece ser que el ICH puede ser inducido por circunstancias múltiples, como daño al ADN (Perry y Evans, 1975; Nakanishi y Schneider, 1979), inhibición del proceso de síntesis del ADN (Ishii y Bender, 1980; Rainaldi y Mariani, 1982), supresión de las enzimas involucradas en dicho proceso (Ishii y Bender, 1980) o inhibición de enzimas involucradas en la respiración (Oikawa *et al.*, 1980; Morgan y Cleaver, 1982).

El fenómeno de ICH fue observado por primera vez por Taylor *et al.* (1957) en *Vicia faba*, usando timidina tritiada para marcar el ADN y haciendo autorradiografía para detectar las cromátidas marcadas; sin embargo, el escaso poder de resolución logrado con la técnica autorradiográfica, hacía difícil estimar con exactitud la frecuencia de ICH. El desarrollo de nuevas técnicas aumentó de manera significativa la resolución y, por tanto, la diferenciación de cromátidas hermanas. Todas éstas implican que las células estudiadas hayan crecido previamente en presencia del nucleósido halogenado 5-bromodesoxiuridina (BrdU), análogo de la timina. Si las células permanecieron dos ciclos celulares en presencia de éste, tendrán una cromátida bifilarmente substituida (BB) con el análogo y su hermana unifilarmente substituida (TB); pero si sólo estuvieron un ciclo en solución de BrdU y el otro en solución

conteniendo timidina (Thd), entonces tendrán una cromátida unifilarmente substituida (TB) y otra no substituida (TT) (Fig. 2) (Kihlman y Kronborg, 1975; Kihlman y Andersson, 1982). En cualquier caso, la diferenciación de cromátidas hermanas es obtenida en la segunda división, después del marcaje del ADN. Sin embargo, los ICH pueden ocurrir durante los dos ciclos celulares, de manera que los visualizados en los cromosomas en segunda división, son la suma de los intercambios que han ocurrido durante las 2 generaciones celulares consecutivas (Figs. 1 y 3) (Schvartzman, 1987).

Tempelaar *et al.* (1982) desarrollaron el procedimiento de tinción de Feulgen para cromosomas vegetales, que involucra varias modificaciones a la técnica Fluorescente más Giemsa (FPG) lograda por Perry y Wolff (1974). En contraste con este método, Tempelaar *et al.* (1982) encontraron que no es necesario el uso del fluorocromo Hoechst 33258 y, además, substituyeron el colorante Giemsa por el reactivo de Feulgen, el cual es específico para el ADN y, por tanto, también se hizo innecesario utilizar enzimas para remover el ARN del citoplasma. Es importante señalar que con la tinción de Feulgen se obtiene la "diferenciación de cromátidas hermanas reversa", llamada así porque las cromátidas más substituidas con BrdU (BB), tiñen más intensamente que las menos substituidas (TB) (Fig. 1) (Tempelaar *et al.*, 1982); contrariamente a lo que sucede cuando se usa la técnica FPG (Fig. 3).

El método de Feulgen para tinción diferencial de cromosomas vegetales es más corto y menos complicado que el FPG, la diferenciación de las cromátidas hermanas es buena (Fig. 1) y los resultados son muy reproducibles (Gómez-Arroyo *et al.*, 1988a, b; Gerster y Grant, 1989).

Vicia faba ha probado ser un sistema sensible y confiable para la detección de ICH inducidos por agentes químicos (Xing y Zhang, 1990; Zhang *et al.*, 1991); sin embargo, Kihlman y Andersson (1982) describen que el uso de ICH en sistemas vegetales para identificar mutágenos y carcinógenos en mamíferos, puede ser inexacto, ya que no se considera el metabolismo de éstos; pero recientemente se ha demostrado que las plantas poseen sistemas enzimáticos tan eficientes como los del hígado de mamífero para metabolizar y transformar sustancias no mutagénicas a mutagénicas (Plewa y Gentile, 1982; Takehisa *et al.*, 1988; Gómez-Arroyo *et al.*, 1995).

MATERIAL Y MÉTODOS

Las semillas de haba (*Vicia faba* var. minor) que se usaron en los experimentos fueron lavadas en agua corriente por 2 horas y dejadas en remojo otras 24, con el fin de acelerar la germinación; posteriormente se pusieron a germinar entre dos capas de algodón humedecido con agua de la llave, a 21 °C y en la obscuridad. Cuando las raíces primarias alcanzaron 1-2 cm de longitud (entre el 5° y 6° día) se removió la testa y

fueron introducidas en tubos de ensaye conteniendo una solución 100 μM de 5-bromo-2'desoxiuridina (BrdU), 0.1 μM de 5-fluorodesoxiuridina (FdU) y 5 μM de uridina (U), durante 20 horas en la obscuridad a 21°C.

Las sustancias que se probaron fueron: cloruro de cobalto (Baker), nitrato de cobalto (Sigma), cloruro de zinc (Baker) y nitrato de zinc (Baker) y sus concentraciones, establecidas con base en experiencias previas considerando la toxicidad de cada una de ellas, fueron las siguientes: cloruro y nitrato de cobalto: 0.1, 1.0, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0 y 50.0 ppm; cloruro y nitrato de zinc: 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 y 50.0 ppm, con exposición de 2 horas.

Los tratamientos se efectuaron en la obscuridad, colocando las diversas sustancias en cristalizadores, sobre los cuales se aplicaron tapas de papel aluminio con perforaciones, por donde se introdujeron las raíces; de tal manera que sólo éstas quedaron en contacto con la solución. Las raíces de los testigos se sumergieron en agua destilada.

Al terminar el tratamiento, las raíces fueron colocadas de nuevo en tubos de ensaye conteniendo la solución de análogos ya mencionada (100 μM BrdU, 0.1 μM FdU y 5.0 μM U), para otro ciclo de replicación de 20 horas, con el objeto de tener cromátidas bifilarmente substituidas.

A continuación se hicieron cortes de aproximadamente 2 mm de las puntas de las raíces y se trataron con colchicina al 0.05% durante 3 horas, después fueron fijados y teñidos usando la técnica diferencial de Feulgen descrita por Tempelaar *et al.* (1982), con las siguientes modificaciones hechas por Gómez-Arroyo *et al.* (1989): los cortes fueron fijados en ácido acético glacial por 1 hora y dejados en etanol:ácido acético (3:1) durante 2 días a -20 °C. Del fijador, fueron transferidos a etanol al 70% y mantenidos ahí por 15 minutos, para luego ser hidrolizados en HCl 5N por 80 minutos a 28 °C, después fueron lavados con agua destilada y teñidos con el reactivo de Schiff por 10 minutos, en la oscuridad. Posteriormente, fueron tratados con pectinasa al 2% (disuelta en amortiguador de citrato 0.01M pH 4.7), por 15 minutos a 28°C, seguido por ácido acético al 45% por 10 minutos y finalmente transferidos a etanol frío al 70% por otros 30 minutos.

En seguida se elaboraron preparaciones de las raíces, mediante aplastamiento en monocapa con ácido acético al 45% y se hicieron permanentes mediante la técnica de Conger y Fairchild (1953), colocándolas sobre hielo seco durante algunos minutos y separando los cubreobjetos con un bisturí. Por último, se deshidrataron con dos cambios rápidos de butanol absoluto y se montaron en bálsamo de Canadá.

Se realizó el conteo de ICH en 50 cromosomas M y 250 cromosomas S, lo cual corresponde a 25 células en metafase, por cada concentración y su testigo, más la repetición de cada una de ellas.

Las laminillas fueron codificadas antes de su análisis al microscopio, con el fin de evitar prejuicios en el observador.

Las frecuencias de ICH de cada experimento fueron comparadas mediante la prueba "t" de Student, en vista de que no hubo diferencias significativas entre ellos, se promediaron y se aplicó un análisis de varianza; cuando $F < 0.001$, se realizó la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls.

RESULTADOS

En todos los tratamientos se realizaron dos experimentos. Las frecuencias de ICH obtenidas en ambos (tanto para las raíces tratadas, como para sus testigos), se muestran en las tablas 1 y 2 respectivamente, para cloruro y nitrato de cobalto y cloruro y nitrato de zinc. Los valores de cada par de experimentos no mostraron diferencias significativas (Tablas 1 y 2), al compararse mediante la prueba "t" de Student y, por esta razón, se promediaron. Es necesario señalar que el valor promedio de los testigos, se obtuvo a partir de dos datos elegidos al azar, uno del experimento 1 y otro del experimento 2, para cada sal probada.

Los promedios de ICH/metafase, inducidos por cloruro y nitrato de cobalto, se presentan en la tabla 3, en la que puede observarse que ambas sales incrementan la frecuencia de ICH conforme aumenta la concentración; siendo significativas las diferencias respecto a los testigos. Sin embargo, el cloruro (Fig. 1) es más eficaz que el nitrato, tanto en su efecto inductor de ICH como en el de toxicidad; ya que las sales de cloruro causan duplicación de la frecuencia basal de ICH a 0.1 ppm y un máximo a 7.5 ppm, el cual es 3.4 veces más alto comparado con el testigo, y un efecto tóxico (manifestado por inhibición de la división celular) a partir de 10 ppm; mientras que las sales de nitrato provocan duplicación de ICH a 1.0 ppm y la mayor frecuencia en 10 ppm, siendo ésta 3.1 veces más alta que el testigo y un efecto tóxico a partir de 15 ppm.

Por lo que se refiere a cloruro y nitrato de zinc, los promedios de ICH/metafase se muestran en la tabla 4, en la que puede observarse que ambos compuestos no inducen ICH en *Vicia faba* y los pequeños incrementos observados con algunas dosis no son significativos con respecto a los testigos. En relación al grado de toxicidad, estas sales lo son menos que las de cobalto, ya que la dos inhiben la división celular a partir de 50 ppm.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las poblaciones humanas están expuestas a una multitud de agentes potencialmente tóxicos, entre los que se incluyen los metales pesados. Tanto el cobalto como el zinc, tienen una amplia variedad de aplicaciones. El primero es usado en la fabricación de herramientas de alta velocidad e instrumentos quirúrgicos, como pigmento en la industria del vidrio y la alfarería, como aditivo de alimentos, en la elaboración de agroquímicos y en la manufactura de la vitamina B₁₂, entre otros. Mientras que el zinc es utilizado en galvanoplastia, en varios procesos industriales, como manufactura de textiles, porcelana y alfarería, en la elaboración de fungicidas, venenos contra ratas y ratones de campo y antisépticos y astringentes, usados en medicina humana y veterinaria.

Numerosos estudios han mostrado que el cobalto provoca diversos efectos adversos a la salud, principalmente entre trabajadores de la industria del metal pesado y que constituye un riesgo carcinogénico para el hombre (Christensen y Poulsen, 1994). En cuanto al zinc, a pesar de que no es tóxico para el hombre (Elinder y Piscator, 1979, cit. por Léonard *et al.*, 1986) y de que no hay evidencias de que represente un riesgo carcinogénico para el mismo, ha probado ser mutagénico en varios sistemas de ensayo.

Tomando en cuenta el riesgo que representa la exposición a metales pesados, para la salud humana, en este trabajo se investigó la capacidad genotóxica del cloruro y nitrato de cobalto y zinc, mediante el análisis de ICH en las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*.

En todos los tratamientos se realizaron dos experimentos, los valores de ICH obtenidos se muestran en las tablas 1 y 2, donde se nota que las diferencias son insignificantes, al contrastarlos mediante la prueba "t" de Student y por esta razón se promedian (Tablas 3 y 4). Por otro lado, la obtención de frecuencias tan similares, de un experimento a otro, implica que la prueba de ICH es confiable y objetiva.

Como se aprecia en las tablas 3 y 4, el promedio de ICH/metafase en las raíces testigo, cuyas células tienen cromosomas de constitución TB-BB (por permanecer dos ciclos replicativos en presencia de BrdU), varió entre 29.3 y 29.7, lo que concuerda con el valor de 29 ICH/metafase obtenido por Kihlman y Andersson (1984). Estos valores pueden considerarse altos si se comparan con las frecuencias de ICH en células de mamífero; sin embargo, en *Vicia* son relativamente bajos, juzgando por el contenido de ADN (Kihlman y Andersson, 1984).

Cloruro y nitrato de cobalto

Se han descrito efectos contradictorios del cobalto, en diferentes pruebas con bacterias, tales como: mutaciones reversas en *E. coli* y *S. typhimurium* (Kanematsu *et al.*, 1980; Arlauskas *et al.*, 1985; Ogawa *et al.*, 1986; Wong, 1988; Pagano y Zeiger, 1992), ensayo rec en *Bacillus subtilis* (Nishioka, 1975; Kanematsu *et al.*, 1980) e inducción de profagos en *E. coli* WP2s(λ) (Rossman *et al.*, 1984; Leitao *et al.*, 1993); sin embargo, un análisis de las condiciones experimentales bajo las cuales se realizaron estos ensayos, indica que una respuesta negativa se debe, más que a insensibilidad bacteriana, a la no disponibilidad del cobalto en el interior de la célula, ocasionado por quelación del metal a componentes del medio circundante, ausencia de sistemas de transporte activo bacteriano y/o tiempo de exposición insuficiente.

Por el contrario, las investigaciones sobre los efectos genéticos del cloruro de cobalto en células de mamífero, tanto *in vitro* como *in vivo*, son predominantemente positivos, ellos incluyen: rompimiento de filamentos de ADN en células HeLa (Hartwig *et al.*, 1990), enlaces cruzados ADN-proteína en células de hepatoma Novikoff (Wedrychowski *et al.*, 1986), mutaciones en células de criceto chino (Miyaki *et al.*, 1979; Hartwig *et al.*, 1990,1991) y de carcinoma mamario de ratón (Morita *et al.*, 1991), aneuploidías en células de médula ósea y testículo de criceto sirio (Farah, 1983, cit. por Beyersmann y Hartwig,

1992), aberraciones cromosómicas en células de médula ósea de ratón (Palit *et al.*, 1991), micronúcleos en linfocitos humanos (Capomazza y Botta, 1991) y en células de médula ósea de ratón (Suzuki *et al.*, 1993) e ICH en células de macrófago de ratón (Andersen, 1983, cit. por Beyersmann y Hartwig, 1992) y de criceto chino (Hartwig *et al.*, 1991).

Asimismo, en levaduras y vegetales se han observado resultados positivos ocasionados por sales de cobalto. En *S. cerevisiae*, el cloruro indujo mutantes respiratorio deficientes (Lindegren *et al.*, 1958; Prazmo *et al.*, 1975), conversión génica (Fukunaga *et al.*, 1982) y mutaciones reversas (Kharab y Singh, 1985). Mientras que en *Vicia faba* y *Allium cepa*, algunas sales de cobalto causaron cambios patológicos en el núcleo, disminución en la intensidad de la división celular, cromosomas pegajosos, aberraciones cromosómicas y aneuploidías (Gori y Succoni, 1957, cit. por Beyersmann y Hartwig, 1992; Komczynski *et al.*, 1963; Herich, 1965).

Por consiguiente, la genotoxicidad del cobalto está bien establecida en levaduras, plantas superiores y mamíferos, lo cual concuerda con el hallazgo de esta investigación, donde se observa que, tanto cloruro como nitrato, son fuertes inductores de ICH (Tabla 3). Y en relación a bacterias, a pesar de la contradicción en los resultados obtenidos, el análisis de los protocolos empleados sugiere que las respuestas negativas se deben, más que a insensibilidad de la célula, a la

falta de disponibilidad del cobalto en su interior; atribuida a una acción quelante sobre el metal (ejercida por los componentes del medio) y/o a carencia de sistemas de transporte activo.

Por otro lado, aunque ha sido considerado que para plantas el pH de la solución (6 a 8) y el tipo de anión usado (cloruro, nitrato, sulfato, bromuro, yoduro y acetato) no influyen en los resultados (von Rosen, 1954; Degraeve, 1971); en esta investigación el tipo de anión fue importante, ya que el cloruro indujo frecuencias de ICH más altas que el nitrato, a concentraciones similares (Tabla 3). Asimismo, Komczynski *et al.* (1963) encontraron diferencias en la frecuencia de aberraciones e inhibición del huso, con las sales usadas; siendo el nitrato el mayor inductor de ellas, seguido por cloruro y sulfato.

Ahora bien, el ingreso de nitrato al interior de las células, ocurre generalmente por un mecanismo de transporte activo, ajustado a la ATPasa; pero en el caso del cloruro, la transferencia no ha sido encontrada, con excepción de plantas que viven en ambientes fuertemente salinos (Clarkson, 1984, cit. por Gómez-Arroyo *et al.*, 1989). No obstante, el hallazgo de frecuencias de ICH más altas inducidas por cloruro, que por nitrato, en células de *Vicia*, sugiere la existencia de algún mecanismo de transporte pasivo para el cloruro; lo cual es apoyado por el estudio de Cambraia y Hodges (1980), quienes reportan la existencia de 2 ATPasas distintas, en membranas plasmáticas

de raíz de *Avena sativa*, una con pH óptimo de 6.5 (estimulada por cationes monovalentes) y otra con pH de 8.5 (sensible a aniones), que pueden estar involucradas en el transporte de cationes y aniones a través de la membrana plasmática, mediante la generación secuencial de gradientes de pH dirigidos opuestamente; los cuales suministrarían las fuerzas que guían el flujo pasivo de cationes y aniones a través de la membrana y mantendrían el pH citoplasmático.

En relación al mecanismo molecular involucrado en la inducción de daño genético, se sabe que el cobalto causa rompimiento de filamentos de ADN (Robison *et al.*, 1982; Hartwig *et al.*, 1990), debido quizás a las formación de radicales de oxígeno libres; ya que en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el Co(II) catalizó la degradación de desoxirribosa (Moorhouse *et al.*, 1985) y provocó el desdoblamiento del ADN, en ADN marcado en el extremo 5' con ^{32}P (ADN ^{32}P -5') (Yamamoto *et al.*, 1989).

Para esclarecer los tipos de radicales implicados en el fenómeno, se han hecho experimentos con radicales buscadores y con trampas de espín, empleando la técnica de resonancia de espín electrónica (ESR). Moorhouse *et al.* (1985) observaron que la degradación de desoxirribosa ocasionada por Co(II) más H_2O_2 , fue inhibida por manitol, un radical hidroxilo buscador y aplicando la técnica ESR, Kadiiska *et al.* (1989) encontraron que el Co(II) más H_2O_2

condujo a la formación de radicales tanto hidroxilo como superóxido, lo cual fue confirmado con la aplicación de radicales buscadores.

La importancia de los aniones superóxido fue también enfatizada por Yamamoto *et al.* (1989), ya que los buscadores de radicales hidroxilo, como dimetil sulfóxido y formato de sodio, inhibieron parcialmente el desdoblamiento de ADN ³²P-5' inducido por Co(II) más H₂O₂, mientras que una inhibición completa fue lograda en presencia de superóxido dismutasa.

En suma, la formación de radicales hidroxilo y superóxido por la acción combinada de Co(II) y H₂O₂, así como su actividad en el desdoblamiento del ADN *in vitro*, está bien establecida; pero no así el papel de estas especies de radicales, en la generación de rompimientos de ADN en células intactas.

Con respecto a los efectos mutagénicos y antimutagénicos del cobalto en bacterias, solo o en combinación con otros agentes genotóxicos, Leitao *et al.* (1993) han sugerido que el cloruro de cobalto promueve la actividad proteolítica de la proteína RecA y, consecuentemente, la inducción de respuestas SOS. No obstante, esto se logra sólo si las células son tratadas con la sal por un periodo corto, ya que si ésta permanece durante todo el experimento, bloquea la síntesis de

proteínas, y las funciones SOS causadas por los agentes genotóxicos, posiblemente no se observen.

En células HeLa el Co(II) inhibió la reparación de dímeros de pirimidina inducidos por ultravioleta (Hartwig *et al.*, 1991), los cuales son reparados por el sistema de reparación-escisión (Sancar y Sancar, 1988). La inhibición de éste puede resultar en aumento de muerte celular y/o elevadas frecuencias de mutación; por tanto, el incremento de mutaciones e ICH inducidos por uv, en presencia de cobalto (Yokoiyama *et al.*, 1990; Hartwig *et al.*, 1991), así como el ICH provocado por el metal (Andersen, 1983, cit. por Beyersmann y Hartwig, 1992; Hartwig *et al.*, 1991), pueden ser explicados por inhibición de la reparación.

Adicionalmente, Hartwig *et al.* (1991) observaron acumulación de filamentos rotos de ADN, después de la irradiación uv en presencia de Co(II), en el ensayo de sedimentación nucleoide; lo cual señala una interferencia con el paso de polimerización durante la reparación, posiblemente causada por la competencia con iones esenciales como Mg(II), como lo muestran los sistemas *in vitro* con ADN aislado (Sirover y Loeb 1976a). Otra posibilidad es la unión al ADN (Jacobson y Turner, 1980), ocasionando con esto cambios en su estructura e interfiriendo con la ADN polimerasa.

Cloruro y nitrato de zinc.

A pesar de que en bacterias se han reportado efectos predominantemente negativos provocados por algunas sales de zinc, como cloruro, nitrato y acetato, en pruebas como la de mutaciones reversas en *S. typhimurium* (Venit y Levy, 1974; Gocke *et al.*, 1981; Marzin y Vo Phi, 1985; Wong, 1988; Thompson *et al.*, 1989), ensayo rec en *B. subtilis* (Nishioka, 1975; Kanematsu y Kada, 1978; Kanematsu *et al.*, 1980) y SOS en *E. coli* (Olivier y Marzin, 1987); los resultados positivos obtenidos por Thompson *et al.* (1989) y Pagano y Zeiger (1992), en la prueba de mutaciones reversas en *S. typhimurium* y por Rossman *et al.* (1984) en la inducción lisogénica en *E. coli* WP2s(λ), sugieren que el origen de estos datos conflictivos involucra la forma de zinc usada y las probables interacciones de ésta y los componentes del medio; entre las que se pueden incluir, una acción quelante de éstos sobre el metal, de manera que no esté disponible para el transporte al interior de la célula (Thompson *et al.*, 1980; Pagano y Zeiger, 1992).

En células de mamífero cultivadas, tratadas con diferentes compuestos de zinc, como cloruro, acetato ó Zn-DTPA, se han observado, asimismo, resultados contradictorios en pruebas como la de mutación génica (Amacher y Paillet, 1980; Thompson *et al.*, 1989) y aberraciones cromosómicas (Deknudt y Deminatti, 1978; Gasiorek y Bauchinger, 1981; Littlefield *et al.*, 1984; Thompson *et al.*, 1989). Sin

embargo, Thompson *et al.* (1989) opinan que una respuesta negativa se debe, más que a inactividad del metal, a diferencias en el transporte de las formas de zinc probadas, las cuales se atribuyen a las interacciones del compuesto con las proteínas del suero. De tal manera que si la molécula se disocia, como en el caso del cloruro, el zinc se une casi totalmente a las proteínas del suero (Parisi y Vallee, 1970), siendo por tanto inactivo o poco activo, como en el caso de Amacher y Paillet (1980) y Deknudt y Deminatti (1978), respectivamente. Mientras que si no hay disociación, como sucede con el acetato de zinc, puede estar disponible para el transporte y provocar las mutaciones y aberraciones observadas por Thompson *et al.* (1989).

En relación a los estudios de genotoxicidad *in vivo*, en células de médula osea de ratón, se ha observado que el cloruro de zinc, administrado oralmente, induce ICH y aberraciones cromosómicas (Giri *et al.*, 1988); en tanto que cloruro y sulfato, aplicados intraperitonealmente, no ocasionan aberraciones (Voroshilin *et al.*, 1978) ni micronúcleos (Gocke *et al.*, 1981). Estas discordancias, posiblemente se deben a la vía de administración y/o a la dosis empleada.

Por otro lado, las investigaciones con zinc en plantas superiores han dado datos positivos. En *Vicia faba* se encontraron perturbaciones en la diferenciación de la matriz cromosómica y en la espiralización de los cromosomas (Herich, 1969, cit. por Léonard *et al.*, 1986) y aberraciones

cromosómicas (Moutschen-Dahmen y Moutschen-Dahmen, 1963), inducidas por sulfato; así como fragmentos de cromosomas y lesiones acromáticas, debidas a nitrato (Gläss, 1956). En *Allium sativa*, Mitra (1984, cit. por Sharma y Talukder, 1987) reportó aberraciones cromosómicas y reducción de la frecuencia mitótica, provocadas por cloruro; mientras que en *Allium cepa* Kocik *et al.* (1982) observaron inhibición de la división celular con cloruro y acetato.

En suma, la actividad genotóxica del zinc está bien establecida en plantas superiores, contrariamente a lo que sucede en bacterias y mamíferos, debido a las discrepancias en los resultados obtenidos; sin embargo, el análisis de las condiciones experimentales bajo las cuales se lograron éstos, señala al zinc como un agente genotóxico potencial.

No obstante, en el presente trabajo se encontró que, tanto cloruro como nitrato de zinc, no inducen ICH pero si inhiben la división celular en células meristemáticas de raíz de *Vicia faba*.

Ahora bien, la prueba de ICH en *Vicia faba* requiere que las células a ser estudiadas crezcan previamente en presencia de un análogo de la timina, el nucleósido halogenado 5-bromodesoxiuridina (BrdU), por dos ciclos de replicación del ADN, para tener una cromátida bifilarmente substituida (BB) con el análogo y otra unifilarmente substituida (TB) y así lograr la diferenciación de las cromátidas

hermanas. Sin embargo, las plantas poseen una escasa capacidad para incorporar BrdU, la cual es incrementada por la adición de 5-fluorodesoxiuridina (FdU) a la solución, ya que disminuye la incorporación al ADN de timina, por inhibir la síntesis *de novo* de ésta, a través de la interacción con la enzima timidilato sintetasa. Para evitar cualquier efecto adverso del FdU (análogo de la uridina) sobre la síntesis de ARN, la uridina (U) es también añadida a esta solución (Kihlman y Kronborg, 1975; Kihlman y Andersson, 1982).

El uso de solución de análogos, conteniendo BrdU, FdU y U, en el ensayo de ICH, pero no en el de aberraciones cromosómicas (Gläss, 1956; Moutschen-Dahmen y Moutschen-Dahmen, 1963; Mitra, 1984, cit. por Sharma y Talukder, 1987) constituye una diferencia fundamental entre ambos; por consiguiente, es posible que la presencia de esta solución sea el factor que influye en la aparición de resultados negativos en la prueba de ICH, tal vez porque algún (o algunos) componente de la solución actúe como agente quelante del zinc, haciéndolo por tanto incapaz de inducir ICH.

REFERENCIAS

ALEXANDER, C.S. (1972). Cobalt-beer cardiomiopathy. A clinical and pathological study of twenty-eight cases. *Am. J. Med.* **53**, 395-417.

AMACHER, D.E. y Paillet, S.C. (1980). Induction of trifluoro-thimidine-resistant mutants by metal ions in L5178YTK^{+/-} cells. *Mutat. Res.* **78**, 279-288.

ANTONOVICS, J., Bradshaw, A.D. y Turner, R.G. (1971). Heavy metal tolerance in plants. *Adv. Ecol. Res.* **7**, 1-80.

APGAR, J. (1968). Comparison of the effects of copper, manganese and zinc deficiencies on parturation on the rat. *Am. J. Physiol.* **125**, 1478-1481.

ARLAUSKAS, A., Baker, R.S.U., Bonin, A.M., Tandon, R.K., Crisp, P.T. y Ellis, J. (1985). Mutagenicity of metal ions in bacteria. *Environ. Res.* **36**, 379-388.

BAKER, P.F., Meeves, H. y Ridgway, E.B. (1973). Effects of manganese and other agents on the calcium uptake that follows depolarization of squid axons. *J. Physiol.* **231**, 511-526.

BAUCHINGER, M., Schmid, E., Einbrodt, H.J. y Dresp, J. (1976). Chromosome aberrations in lymphocytes after occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat. Res.* **40**, 57-62.

BEYERSMANN, D. y Hartwig, A. (1992). The genetic toxicology of cobalt. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **115**, 137-145.

CAMBRAIA, J. y Hodges, T.K. (1980). ATPase of plasma membranes of oat roots. En: Plant Membrane Transport: Current Conceptual Issues. Vol. 4, Spanswick, R.M., Lucas, W.J. y Dainty, J. (Eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 211-222.

CAPOMAZZA, C. y Botta, A. (1991). Cobalt chloride induces micronuclei in human lymphocytes. *Med. Sci. Res.* **19**, 219-220.

CARRANO, A.V., Thompson, L.H., Lindl, P.A. y Minkler J.L. (1978). Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature (London)* **271**, 551-553.

CHANG, C.H., Mann, D.E. y Gautieri, R.F. (1977). Teratogenicity of zinc chloride, 1,10-phenanthroline, and a zinc-1,10-phenanthroline complex in mice. *J. Pharm. Sci.* **66**, 1755-1758.

CHRISTENSEN, J.M. y Poulsen, O.M. (1994). A 1982-1992 surveillance programme on Danish pottery painters. Biological levels and health effects following exposure to soluble or insoluble cobalt compounds in cobalt blue dyes. *Sci. Total Environ.* **150**, 95-104.

CLARKE, C.H. y Shankel, D.M. (1988). Antimutagens against spontaneous and induced reversion of a lacZ frameshift mutation in *E. coli* K-12 strain ND-160. *Mutat. Res.* **202**, 19-23.

CONGER, A.D. y Fairchild, L.M. (1953). A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain Technol.* **28**, 281-283.

DEGRAEVE, N. (1971). Modification des effets du méthane sulfonate d'ethyl au niveau chromosomique. I. Les ions métalliques. *Rev. Cytol. Biol. Veget.* **34**, 233-244.

DEKNUDT, Gh., Léonard, A. e Ivanov, B. (1973). Chromosome aberrations observed in male workers occupationally exposed to lead. *Environ. Physiol. Biochem.* **3**, 132-138.

DEKNUDT, Gh. y Léonard, A. (1975). Cytogenetic investigations on leucocytes in workers from a cadmium plant. *Environ. Physiol. Biochem.* **5**, 319-327.

DEKNUDT, Gh. y Deminatti, M. (1978). Chromosome studies in human lymphocytes after *in vitro* exposure to metal salts. *Toxicology* **10**, 67-75.

EICHHORN, G.L. y Shin, Y.A. (1968). Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 7323-7328.

EMS (Environmental Mutagen Society). (1975) Environmental mutagenic hazards. *Science* **187**, 503-514.

ENGER, M.D., Hildebrand, C.E. y Stewart, C.C. (1983). Cd²⁺ responses of cultures human blood cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **69**, 214-224.

EVANS, H.J. y Scott, D. (1964). Influences of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by x-rays and maleic hydrazide in *Vicia faba*. *Genetics* **49**, 17-33.

FERGUSON, J.E. y Kim, N.D. (1991). Trace elements in street and house dusts: sources and speciation. *Sci. Total Environ.* **100**, 125-150.

FERM, V.H. y Carpenter, S.J. (1967). Teratogenic effects of cadmium and its inhibition by zinc. *Nature (London)* **216**, 1123.

FERM, V.H. y Carpenter, S.J. (1968). The relationship of cadmium and zinc in experimental mammalian teratogenesis. *Lab. Invest.* **18**, 429-432.

FUKUNAGA, M., Kurachi, Y. y Mizuguchi, Y. (1982). Action of some metal ions on yeast chromosomes. *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 3017-3019.

GASIOREK, K. y Bauchinger, M. (1981). Chromosome changes in human lymphocytes after separate and combined treatment with divalent salts of lead, cadmium, and zinc. *Environ. Mutagen.* **3**, 513-518.

GERSTER, J.L. y Grant, W.F. (1989). A cytogenetic study of factors affecting sister chromatid differentiation in *Vicia faba* and *Hordeum vulgare*. *Cytologia* **54**, 523-537.

GIRI, A.K., Bandyopadhyay, T.S., Murkherjee, A., Talukder, G. y Sharma, A. (1988). Effects of vitamin C and vitamin A on post chromosomal aberration *in vivo* induced by metanil yellow and zinc chloride. *Cytologia* **53**, 793-799.

GLÄSS, E. (1956). Die Verteilung von Fragmentation und achromatischen Stellen auf den Chromosomen von *Vicia faba* nach Behandlung mit Schwermetallsalzen. *Chromosoma* **8**, 260-284.

GOCKE, M., King, M.T., Eckhardt, K. y Wild, D. (1981). Mutagenicity of cosmetics ingredients licensed by the European Communities. *Mutat. Res.* **90**, 91-109.

GÓMEZ-ARROYO, S. y Castillo-Ruiz, P. (1985). Sister chromatid exchanges induced by thinner in *Vicia faba*. *Contam. Ambient.* **1**, 17-23.

GÓMEZ-ARROYO, S., Castillo-Ruiz, P., Cortés-Eslava, J. y Villalobos-Pietrini, R. (1988a). *Vicia faba*-sister chromatid exchanges of the organophosphorus insecticides methyl parathion, dimethoate, oxydemeton methyl, azinphos methyl and phoxim. *Cytologia* **53**, 627-634.

GÓMEZ ARROYO, S., Hernández-García, A. y Villalobos-Pietrini, R. (1988b). Induction of sister-chromatid exchanges in *Vicia faba* by arsenic contaminated drinking water. *Mutat. Res.* **208**, 219-224.

GÓMEZ-ARROYO, S., Abarca-Hernández, J.C., Cortés-Eslava, J. y Villalobos-Pietrini, R. (1989). Sister chromatid exchanges induced by cadmium in *Vicia faba*. *Rev. Int Contam. Ambient.* **5**, 71-82.

GÓMEZ-ARROYO, S., Calderón-Segura, M. E. y Villalobos-Pietrini, R. (1995). Sister chromatid exchange in human lymphocytes induced by propoxur following plant activation by *Vicia faba*. *Environ. Mol. Mutagen.* **26**, 324-330.

GÓMEZ-ARROYO, S. y Villalobos-Pietrini, R. (1995). Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in *Vicia faba* as genetic monitors of environmental pollutants. En: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Vol. **8**, Butterworth, F.M., Corkum, L.D. y Guzmán-Rincón, J. (Eds.). Plenum, Nueva York, pp. 95-113.

GRANT, W.F. (1982). Plant mutagen assays based upon chromosome mutations. En: Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Plant Biology. Vol. I, Klekowsky , E.J. (Ed.), Praeger, Nueva York, pp. 1-24.

GRANT, W.F., Lee, H.G., Logan, D.M. y Salamone, M.F. (1992). The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the in situ detection of mutagens in an aquatic environment. *Mutat. Res.* **270**, 53-64.

GUTHRIE, J. (1964). Observations on the zinc-induced testicular teratomas of fowl. *Br. J. Cancer* **18**, 130-142.

GUTHRIE, J. (1966). Effects of a synthetic anti-gonadotrophin (2-amino 5-nitrothiazole) on growth of experimental testicular teratomas. *Br. J. Cancer* **20**, 582-587.

GUTHRIE, J. (1967). Specificity of the metallic ion in the experimental induction of testicular teratomas in the fowl. *Br. J. Cancer* **21**, 619-622.

GUTHRIE, J. (1971). Zinc induction of testicular teratomas in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) after photoperiodic stimulation of testis. *Br. J. Cancer* **25**, 311-314.

HAMBRIDGE, K.M., Neldner, K.H. y Walravens, P.A. (1975). Zinc, acrodermatitis enterophatica, and congenital malformations. *Lancet* **1**, 577-578.

HAMILTON, E.I. (1994). The geobiochemistry of cobalt. *Sci. Total Environ.* **150**, 7-39.

HARTWIG, A., Kasten, U., Boakye-Dankwa, K., Schlepegrell, R. y Beyersmann, D. (1990). Uptake and genotoxicity of micromolar concentrations of cobalt chloride in mammalian cells. *Toxicol. Environ. Chem.* **28**, 205-215.

HARTWIG, A., Snyder, R.D., Schlepegrell, R. y Beyersmann, D. (1991). Modulation by Co(II) of UV-induced DNA repair, mutagenesis and sister-chromatid exchanges in mammalian cells. *Mutat. Res.* **248**, 177-185.

HERICH, R. (1965). The effect of cobalt on the structure of chromosomes and on the mitosis. *Chromosoma* **17**, 194-198.

INOUE, T., Ohta, Y., Sadaie, Y. y Kada, T. (1981). Effect of cobaltous chloride on spontaneous mutation induction in a *Bacillus subtilis* mutator strain. *Mutat. Res.* **91**, 41-45.

ISHII, Y. y Bender, M.A. (1980). Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light induced sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* **79**, 19-32.

ISOM, G.E. y Way, J.L. (1974). Alteration of *in vivo* glucose metabolism by cobaltous chloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **27**, 131-139.

JACKSON, A.J. y Schumacher, H.J. (1979). The teratogenic activity of a thalidomide analogous EM12 in rats on a low zinc diet. *Teratology* **19**, 341-344.

JACOBSON, K.B. y Turner, J.E. (1980). The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids. *Toxicology* **16**, 1-37.

KADIISKA, M.B., Maples, K.R. y Mason, R.P. (1989). A comparison of cobalt(II) and iron(II) hydroxyl and superoxide free radical formation. *Arch. Biochem. Biophys.* **275**, 98-111.

KANEMATSU, N., y Kada, T. (1978). Mutagenicity of metal compounds. *Mutat. Res.* **54**, 215-216.

KANEMATSU, N., Hara, M. y Kada, T. (1980). Rec assay and mutagenicity studies on metal compounds. *Mutat. Res.* **77**, 109-116.

KASIRSKY, G., Gautieri, G.F. y Mann, D.E. (1967). Inhibition of cortisone-induced cleft palate in mice by cobaltous chloride. *J. Pharm. Sci.* **56**, 1330-1332.

KASIRSKY, G., Sherman, W.T., Gautieri, R.F. y Mann, D.E. Jr. (1969). Cobalt-cortisone interrelationships in the induction and inhibition of cleft palate in mice. *J. Pharm. Sci.* **58**, 766-767.

KATO, H. (1980). Evidence that the replication point is the site of sister chromatid exchange. *Cancer Genet. Cytogenet.* **2**, 69-77.

KENNEDY, A., Dornan, J.D. y King, R. (1981). Fatal myocardial disease associated with industrial exposure to cobalto. *Lancet* **i**, 412-414.

KHARAB, P. y Singh, I. (1985). Genotoxic effects of potassium dichromate, sodium arsenite, cobalt chloride and lead nitrate in diploid yeast. *Mutat. Res.* **155**, 117-120.

KIHLMAN, B.A. (1975). Sister chromatid exchanges in *Vicia faba*. II. Effects of thiotepa, caffeine and 8-ethoxy caffeine on the frequency of SCEs. *Chromosoma* **51**, 11-18.

KIHLMAN, B.A. y Kronborg, D. (1975). Sister chromatid exchanges in *Vicia faba*. I. Demonstration by a modified fluorescent plus Giemsa (FPG) technique. *Chromosoma* **51**, 1-10.

KIHLMAN, B.A. y Andersson, H.C. (1982). Sister chromatid exchanges in plants. En: *Sister Chromatid Exchanges*. Wolff, S. (Ed.), Wiley, Nueva York, pp. 243-265.

KIHLMAN, B.A. y Andersson, H.C. (1984). Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. En: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. y Ramel, C. (Eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 531-554.

KOČIK, H., Wojciechowska, B. y Liguzińska, A. (1982). Investigations on the cytotoxic influence of zinc on *Allium cepa* L. roots. *Acta Soc. Bot. Pol.* **51**, 3-9.

KOMCZYNSKI, L., Nowak, H. y Rejniak, L. (1963). Effect of cobalt, nickel and iron on mitosis in the roots of broad bean (*Vicia faba*). *Nature (London)* **198**, 1016-1017.

KURY, G. y Crosby, R.J. (1968). Studies on the development of chicken embryos exposed to cobaltous chloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **13**, 199-206.

LAUWERYS, R. y Lison, D. (1994). Health risks associated with cobalt exposure - an overview. *Sci. Total Environ.* **150**, 1-6.

LEITAO, A.C., Soares, R.A., Cardoso, J.S., Guillobel, H.C. y Caldas, L.R. (1993). Inhibition and induction of SOS responses in *Escherichia coli* by cobaltous chloride. *Mutat. Res.* **286**, 173-180.

LÉONARD, A., Gerber, G.B., Jacquet, P. y Lauwerys, R.R. (1984). Carcinogenicity, mutagenicity, and teratogenicity of industrially used metals. En: *Mutagenicity, Carcinogenicity, and Teratogenicity of Industrial Pollutants*. Kirsch-Volders, M.(Ed.), Plenum, Bruselas, pp. 59-126.

LÉONARD, A., Gerber, G.B. y Léonard, F. (1986). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of zinc. *Mutat. Res.* **168**, 343-353.

LÉONARD, A. y Lauwerys, R. (1990). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of cobalt metal and cobalt compounds. *Mutat. Res.* **239**, 17-27.

LINDEGREN, C.C., Nagai, S. y Nagai, H. (1958). Induction of respiratory deficiency in yeast by manganese, copper, cobalt and nickel. *Nature (London)* **182**, 446-448.

LITTLEFIELD, G.L., Joiner, E.E., Colyer, S.P., DuFrain, R.J. y Washburn, L.C. (1984). Evaluations of cellular proliferation and chromosome breakages after *in vitro* exposure of human lymphocytes to calcium or zinc DTPA. *Radiat. Res.* **99**, 129-139.

MA, T.H. (1982). *Vicia* cytogenetic test for environmental mutagens. A. report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* **99**, 257-271.

MAGEE, A.C. y Matrone, G. (1960). Studies on growth, cooper metabolism and iron metabolism of rats fed high levels of zinc. *J. Nutr.* **72**, 233-242.

MARON, D.M. y Ames B.N. (1983). Revised methods for *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173-215.

MARZIN, D.R. y Vo Phi, H. (1985). Study of the mutagenicity of metal derivatives with *Salmonella typhimurium* TA 102. *Mutat. Res.* **155**, 49-51.

MCKENZIE, J.M., Fosmire, G.J. y Sandstead, H.H. (1975). Zinc deficiency during the latter third of pregnancy: effects on fetal rat brain, liver and placenta. *J. Nutr.* **105**, 1466-1475.

MILLS, C.F., Quartermann, J., Chesters, J.K., Williams, R.B. y Dalgarno, A.C. (1969). Matabolic role of zinc. *Am. J. Nutr.* **22**, 1240-1249.

MIYAKI, M., Akamatsu, N., Ono, T. y Koyama, H. (1979). Mutagenicity of metal cations in cultured cells from Chinese hamster. *Mutat.Res.* **68**, 259-263.

MOCHIZUKI, H. y Kada, T. (1982). Antimutagenic action of cobaltous chloride on Trp-induced mutations in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA1538. *Mutat. Res.* **95**, 145-157.

MOORHOUSE, C.P., Halliwell, B., Grootveld, M. y Gutteridge, J.M.C. (1985). Cobalt(II) ion as a promoter of hydroxyl radical and possible 'cripto-hydroxyl' radical formation under physiological conditions. Differential effects of hydroxyl radicals scavengers. *Biochim. Biophys. Acta* **843**, 261-268.

MORGAN, W.F. y Cleaver, J.E. (1982). 3-amine benzamide synergistically increases sister chromatid exchanges in cells exposed to methane sulfonate but no to ultraviolet lighth. *Mutat. Res.* **104**, 361-366.

MORITA, H., Umeda, M. y Ogawa, H.I. (1991). Mutagenicity of various chemicals including nickel and cobalt compounds in cultures mouse FM3A cells. *Mutat. Res.* **261**, 131-137.

MOUTSCHEN-DAHMEN, J. y Moutschen-Dahmen, M. (1963). Influence of Cu^{++} and Zn^{++} ions on the effects of ethyl methanesulfonate (EMS) on chromosomes. *Experientia* **19**, 144-145.

NAKANISHI, Y. y Schneider, E.L. (1979). *In vivo* sister chromatid exchanges: a sensitive measure of DNA damage. *Mutat. Res.* **60**, 329-337.

NISHIOKA, H. (1975). Mutagenic activities of metal compounds in bacteria. *Mutat. Res.* **31**, 185-189.

NORDBERG, G. (1994). Assessment of risks in occupational cobalt exposures. *Sci. Total Environ.* **150**, 201-207.

NRIAGU, J.O. (1979). Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere. *Nature (London)* **279**, 409-411.

OGAWA, H.I., Sakata, K., Inouye, T., Jyosui, S., Niyitani, Y., Kakimoto, K., Morishita, M., Tsuruta, S. y Kato, Y. (1986). Combined mutagenicity of cobalt (II) salt and heteroaromatic compounds in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* **172**, 97-104.

OGAWA, H.I., Liu, S.Y., Sakata, K., Niyitani, Y., Tsuruta, S. y Kato, Y. (1988). Inverse correlation between combined mutagenicity in *Salmonella typhimurium* and strength of coordinate bond in mixtures of cobalt(II) chloride and 4-substituted pyridines. *Mutat. Res.* **204**, 117-121.

OGAWA, H.I., Shibahara, T., Iwata, H., Okada, T., Tsuruta, S., Kakimoto, K., Sakata, K., Kato, Y., Ryo, H., Itoh, T. y Fujikawa, K. (1994). Genotoxic activities *in vivo* of cobaltous chloride and other metal chlorides as assayed in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* **320**, 133-140.

OIKAWA, A., Thoda, H., Kanai, M., Miwa, M. y Sugimura, T. (1980). Inhibitors of poli (adenosine diphosphate ribose), polymerase induce sister chromatid exchanges. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **97**, 1311-1316.

OLIVIER, Ph. y Marzin, D. (1987). Study of the genotoxic potential of 48 inorganic derivatives with the SOS chromotest. *Mutat. Res.* **189**, 263-269.

PAGANO, D.A. y Zeiger, E. (1992). Conditions for detecting the mutagenicity of divalent metals in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mol. Mutagen.* **19**, 139-146.

PALIT, S., Ghosh, A.K., Sharma, A. y Talukder, G. (1991). Modification of the clastogenic effects of cobalt by calcium in bone marrow cells of mice *in vivo*. *Cytologia* **56**, 373-377.

PARISI, A.F. y Vallee, B.L. (1970). Isolation of a zinc 2-macroglobulin from human serum. *Biochemistry* **9**, 2421-2426.

PARIZEK, J. (1957). The destructive effect of cadmium ion on testicular tissue and its prevention by zinc. *J. Endocrinol.* **15**, 56-63.

PATON, G.R. y Allison, A.C. (1972). Chromosome damage in human cell cultures induced by metal salts. *Mutat. Res.* **16**, 332-336.

PERRY, P. y Wolff, S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature (London)* **251**, 156-158.

PERRY, P., y Evans, H.J. (1975). Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature (London)* **258**, 121-125.

PIKE, E.R., Graham, L.C. y Fogden, M.W. (1975). An appraisal of toxic metal residue in the soils of a disused sewage farm. Reprinted from *Journal of the Association of Public Analysts* **13**, 19-33.

PLEWA, M.J. y Gentile, J.M. (1982). The activation of chemicals into mutagens by green plants. En: *Chemicals Mutagens: Principles and Methods for Their Detection*, Vol. 7, De Serres, F.J. y Hollaender, A. (Eds.). Plenum, Nueva York, pp. 401-420.

PRASAD, A.S. y Oberleas, D. (1971). Changes in activity of zinc-dependent enzymes in zinc deficient tissues of rats. *J. Appl. Physiol.* **31**, 842-846.

PRASAD, A.S. y Oberleas, D. (1979). Thymidine kinase activity and incorporation of thymidine into DNA of zinc-deficient mice. *J. Lab. Clin. Med.* **23**, 634-639.

PRAZMO, W., Ballin, E., Baranowska, H., Ejchart, A. y Putrament, A. (1975). Manganese mutagenesis in yeast. II. Conditions of induction and characteristics of mitochondrial respiratory deficient *Saccharomyces cerevisiae* mutants induced with manganese and cobalt. *Genet. Res.* **26**, 21-29.

RAINALDI, R. y Mariani, T. (1982). The distribution of induced sister-chromatid exchanges: a tool for identifying agents directly interacting with DNA. *Mutat. Res.* **103**, 333-337.

ROBISON, S.H., Cantoni, O. y Costa, M. (1982). Strand breakage and decreased molecular weight of DNA induced by specific metal compounds. *Carcinogenesis* **3**, 657-662.

ROSSMAN, T.G. (1981). Effect of metals on mutagenesis and DNA repair. *Environ. Health Perspect.* **40**, 189-195.

ROSSMAN, T.G., Molina, M. y Meyer, L.W. (1984). The genetic toxicology of metal compounds: I. Induction of (λ) prophage in *E. coli* WP2s(λ). *Environ. Mutagen.* **6**, 59-69.

ROSSMAN, T.G. y Molina, M. (1986). The genetic toxicology of metal compounds: II. Enhancement of ultraviolet light-induced mutagenesis in *Escherichia coli* WP2. *Environ. Mutagen.* **8**, 263-271.

ROY, P.E., Bonenfant, J.L. y Turcot, L. (1968). Thyroid changes in cases of Quebec beer drinkers' myocardosis. *Am. J. Clin. Pathol.* **50**, 234-239.

SANCAR, A. y Sancar, G.B. (1988). DNA repair enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 29-67.

SANSTEAD, H.H. y Rinaldi, R.A. (1969). Impairment of deoxyribonucleic acid synthesis by dietary zinc deficiency in the rat. *J. Cell. Physiol.* **73**, 81-83.

SCHILLER, A.M. y Boyle, E. (1985). Dissolved zinc in rivers. *Nature (London)* **317**, 48-52.

SCHVARTZMAN, J.B. (1987). Sister-chromatid exchanges in higher plant cells: past and perspectives. *Mutat. Res.* **181**, 127-145.

SEVER, L.E. y Emanuel, I. (1973). Is there a connection between maternal zinc deficiency and congenital malformations of the central nervous system in man? *Teratology* **7**, 117-118.

SHARMA, A. y Talukder, G. (1987). Effects of metals on chromosome of higher organisms. *Environ. Mutagen.* **9**, 191-226.

SHELBY, M.D. (1976). Chemical mutagenesis in plants and mutagenicity of plant related compounds. The Environmental Mutagen Information Center Staff. ONRL/EMIC-7, Oak Ridge, Tenn., Oak Ridge National Laboratory.

SINCLAIR, P.R., Sinclair, J.F., Bonhonsky, H.L., Gibbs, A.H. y De Matteis, F. (1982). Formation of cobalt protoporphyrin by chicken hepatocytes in culture. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 993-999.

SIROVER, M.A. y Loeb, L.A. (1976a). Metal activation of DNA synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **70**, 812-817.

SIROVER, M.A. y Loeb, L.A. (1976b). Infidelity of DNA synthesis *in vitro*: screening for potential metal mutagens or carcinogens. *Science* **194**, 1434-1436.

SIROVER, M.A. y Loeb, L.A. (1977). On the fidelity of DNA replication. *J. Biol. Chem.* **252**, 3605-3610.

SMITH Jr., J.C., McDaniel, E.G., Fan, F.F. y Halsted, J.A. (1973). Zinc: a trace element essential in vitamin A metabolism. *Science* **181**, 954-955.

SUZUKI, Y., Shimizu, H., Nagae, Y., Fukumoto, M., Okonogi, H. y Kadokura, M. (1993). Micronucleus test and erythropoiesis: effect of cobalt on the induction of micronuclei by mutagens. *Environ. Mol. Mutagen.* **22**, 101-106.

SWENERTON, H. y Hurley, L.S. (1971). Teratogenic effects of a chelating agent and their prevention by zinc. *Science* **173**, 62-64.

TAKEHISA, S., Kanaya, N. y Rieger, R. (1988). Promutagen activation by *Vicia faba*: an assay based on the induction of sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* **197**, 195-205.

TAYLOR, J.H., Woods, P.S. y Hughes, W.L. (1957). The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labelled thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **43**, 122-128.

TAYLOR, A. y Marks, V. (1978). Cobalt: a review. *J. Hum. Nutr.* **32**, 165-177

TEMPELAAR, M.J., de Both, M.T.J. y Versteegh, J.E.G. (1982). Measurement of SCE frequencies in plants: a simple Feulgen-staining procedure for *Vicia faba*. *Mutat. Res.* **103**, 321-326.

THOMPSON, E.D., McDermott, J.A., Zerkle, T.B., Skare, J.A., Evans, B.L.B. y Cody, D.B. (1989). Genotoxicity of zinc in 4 short-term mutagenicity assays. *Mutat. Res.* **223**, 267-272.

VENITT, S. y Levy, L.S. (1974). Mutagenicity of chromates in bacteria and its relevance to chromate carcinogenesis. *Nature (London)* **250**, 493-495.

VON ROSEN, G. (1954). Breaking of chromosomes by the action of elements of the periodical system and some other principles. *Hereditas* **40**, 258-263.

VOROSHILIN, S.I., Plotko, E.G., Fink, T.V., Nikiforova V.Y. (1978). Cytogenetic effect of inorganic and acetate compounds of tungsten, zinc, cadmium and cobalt on animal and human somatic cells. *Tsitol. Genet.* **12**, 241-243.

WARKANY, J. y Peterling, H.G. (1972). Congenital malformations of the central nervous system in rats produced by maternal zinc deficiency. *Teratology* **5**, 319-334.

WEDRYCHOWSKI, A., Schmidt, W.N. y Hnilica, L.S. (1986). DNA-protein crosslinking by heavy metals in Novikoff hepatoma. *Arch. Biochem. Biophys.* **251**, 397-402.

WOLFF, S. (1974). Sister chromatid exchanges: the most sensitive mammalian system for determining the effects of mutagenic, carcinogenic. *Expert. Conference Oslo, Noruega* pp. 11-13.

WONG, P.K. (1988). Mutagenicity of heavy metals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **40**, 597-603.

XING, W. y Zhang, Z. (1990). A comparison of SCE test in human lymphocytes and *Vicia faba*: a hopeful technique using plants to detect mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.* **241**, 109-113.

YAMAMOTO, K., Inoue, S., Yamazaki, A., Yoshinaga, T. y Kawanishi, S. (1989). Site-specific DNA damage induced by cobalt(II) ion and hydrogen peroxide: Role of singlet oxygen. *Chem. Res. Toxicol.* **2**, 234-239.

YOKOIYAMA, A., Kada, T. y Kuroda, Y. (1990). Antimutagenic action of cobaltous chloride on radiation-induced mutations in cultures Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* **245**, 99-105.

ZHANG, Z., Yang, J., Zhang, Q. y Cao, X. (1991). Studies on the utilization of a plant SCE test in detecting potential mutagenic agents. *Mutat. Res.* **261**, 69-73.

FIGURAS

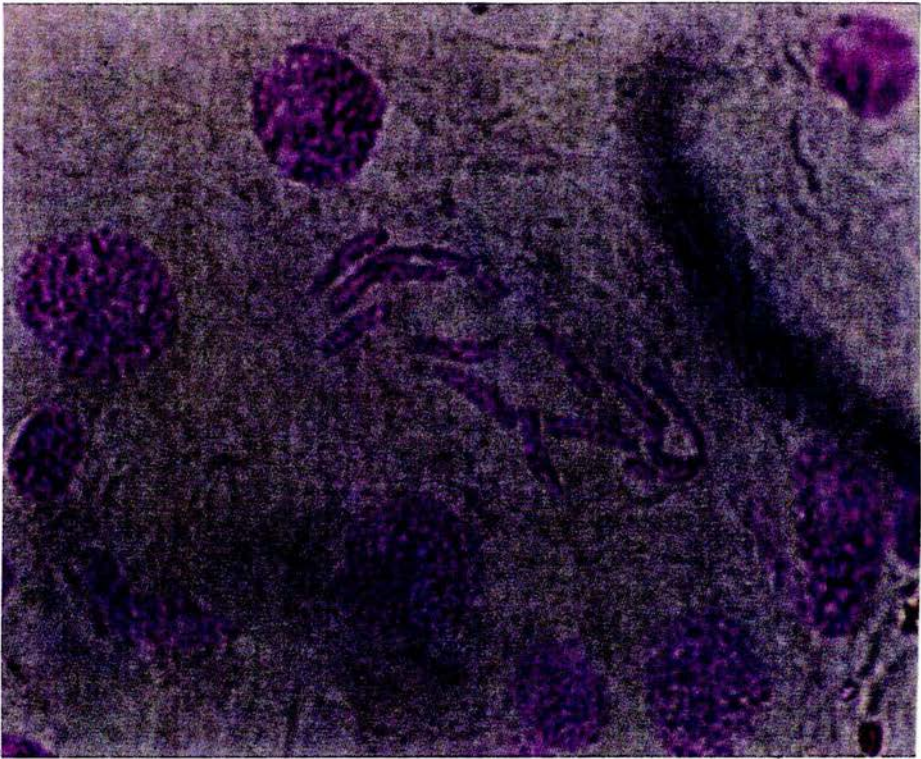


Fig. 1. Cariotipo normal ($2n=12$) de células de raíz de *Vicia faba*, tratadas con cloruro de cobalto. los cromosomas, teñidos con la técnica de Feulgen después de dos ciclos de incorporación de BrdU, muestran contraste diferencial entre cromatina con ADN unifilarmente substituido (claro) y ADN bifilarmente substituido (oscuro); también pueden observarse los ICHs inducidos por el compuesto.

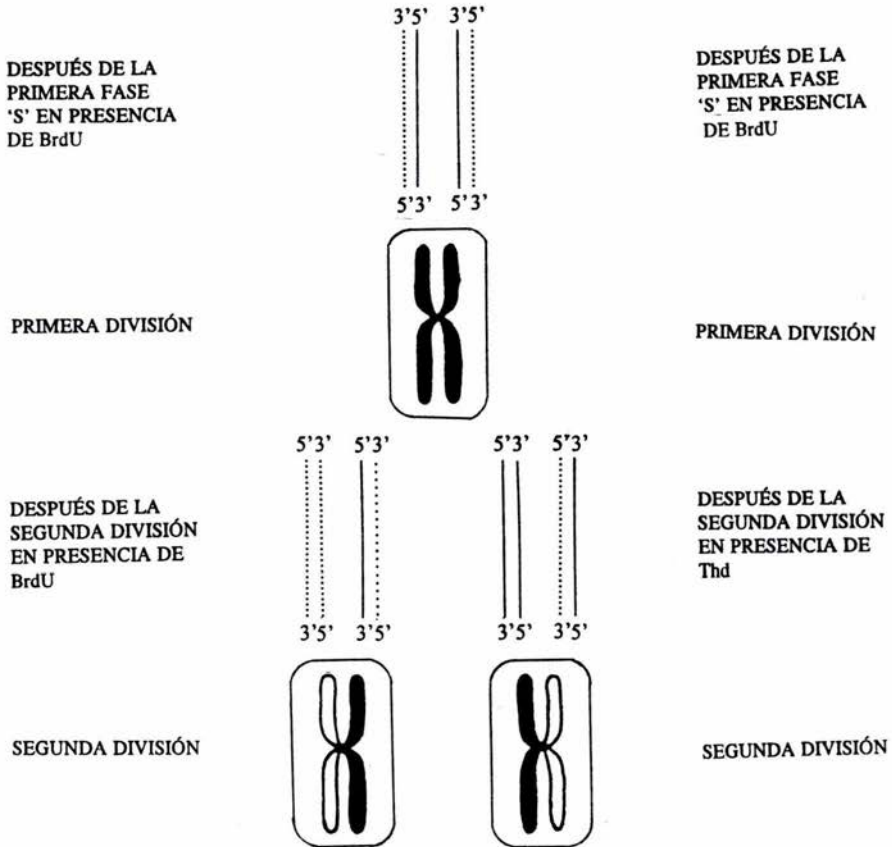


Fig. 2. Representación esquemática de los patrones de marcaje del ADN y tinción diferencial de cromátidas hermanas, a través de 2 generaciones celulares consecutivas. A la izquierda, cuando ambos ciclos celulares ocurren en presencia de BrdU. A la derecha, cuando el primer ciclo ocurre en presencia de BrdU y el segundo en presencia de Thd. Las barras representan filamentos de polinucleótidos (continuas, no substituidos; discontinuas, substituidos con BrdU). En cualquier caso, la diferenciación de cromátidas hermanas es lograda en la segunda división, después del inicio del marcaje del ADN (Schvartzman, 1987).

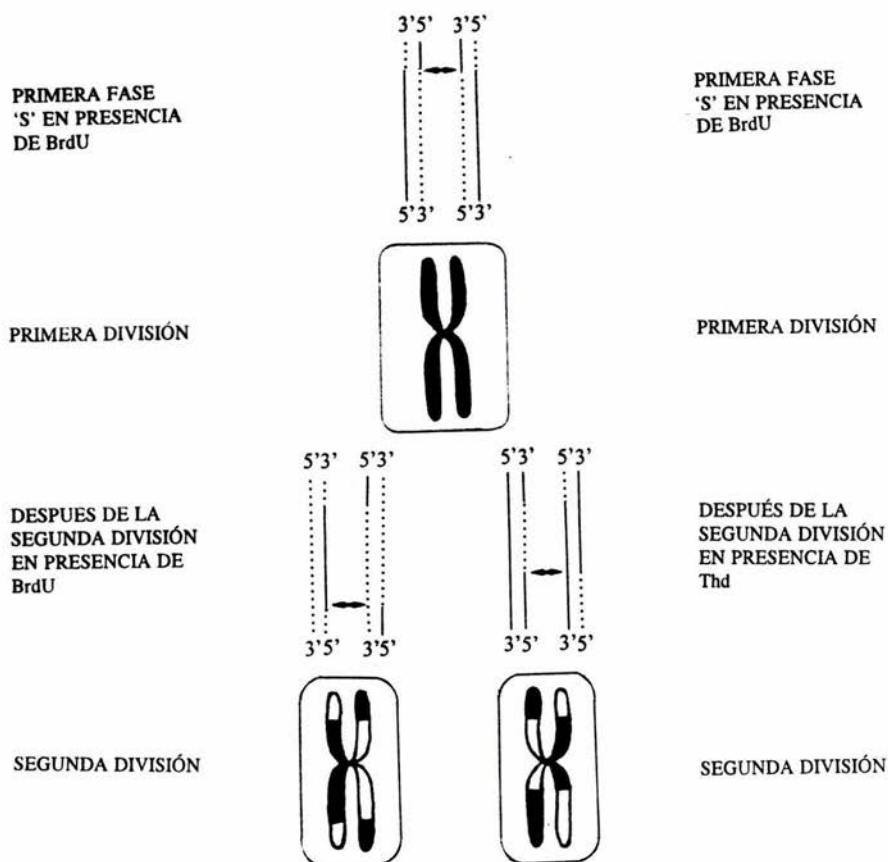


Fig. 3. Representación esquemática de los patrones de marcate, tinción diferencial de cromátidas hermanas e ICHs, a través de 2 generaciones celulares consecutivas. Las flechas dobles indican la ocurrencia de ICHs. Los ICHs visualizados en la segunda división son la suma de los intercambios que han ocurrido durante las últimas dos generaciones celulares consecutivas (Schvartaman, 1987).

TABLAS

TABLA 1. INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR CLORURO Y NITRATO DE COBALTO EN *Vicia faba*^a

Tratamiento (ppm)	Testigo					
	Experimento 1	Experimento 2	Valor "t"	Experimento 1	Experimento 2	Valor "t"
	ICH/metafase ($\bar{X} \pm E.E.$)	ICH/metafase ($\bar{X} \pm E.E.$)		ICH/metafase ($\bar{X} \pm E.E.$)	ICH/metafase ($\bar{X} \pm E.E.$)	
Cloruro de cobalto						
0.1	61.20 \pm 1.41	60.04 \pm 1.54	0.39 N.S.	29.64 \pm 0.35	29.52 \pm 1.04	0.09 N.S.
1.0	72.84 \pm 3.23	70.56 \pm 1.56	0.48 N.S.	29.64 \pm 0.35	29.52 \pm 1.04	0.09 N.S.
5.0	92.16 \pm 1.68	95.44 \pm 1.07	1.20 N.S.	29.64 \pm 0.35	29.60 \pm 0.84	0.03 N.S.
7.5	101.44 \pm 0.96	102.16 \pm 1.06	0.36 N.S.	28.92 \pm 0.60	29.60 \pm 0.84	0.47 N.S.
10.0	*	*		28.92 \pm 0.60	29.88 \pm 0.91	0.64 N.S.
15.0	*	*		30.71 \pm 1.05	29.88 \pm 0.91	0.42 N.S.
50.0	*	*		28.92 \pm 0.60	29.88 \pm 0.91	0.64 N.S.
Nitrato de cobalto						
0.1	47.84 \pm 1.96	48.56 \pm 1.43	0.21 N.S.	29.64 \pm 0.35	29.88 \pm 0.91	0.19 N.S.
1.0	58.08 \pm 2.09	60.64 \pm 1.55	0.70 N.S.	29.64 \pm 0.35	29.88 \pm 0.91	0.19 N.S.
5.0	80.88 \pm 2.39	81.04 \pm 0.78	0.05 N.S.	29.64 \pm 0.35	29.60 \pm 0.84	0.03 N.S.
7.5	86.20 \pm 1.08	86.88 \pm 0.95	0.34 N.S.	29.60 \pm 0.84	28.92 \pm 0.60	0.47 N.S.
10.9	90.36 \pm 1.14	89.24 \pm 0.65	0.63 N.S.	30.64 \pm 0.79	28.92 \pm 0.60	1.24 N.S.
15.0	*	*		30.71 \pm 1.05	27.56 \pm 1.03	1.51 N.S.
20.0	*	*		30.64 \pm 0.79	27.56 \pm 1.03	1.69 N.S.
50.0	*	*		30.64 \pm 0.79	27.56 \pm 1.03	1.69 N.S.

^a n = 25 metafases

N.S. No significativo

* Inhibición de la división celular

TABLA 2. INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR CLORURO Y NITRATO DE ZINC EN *Vicia faba*^a

Tratamiento (ppm)	Testigo					
	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 2	
	ICH/metafase ($\bar{X} \pm E.E.$)	ICH/metafase ($\bar{X} \pm E.E.$)	Valor "t"	ICH/metafase ($\bar{X} \pm E.E.$)	ICH/metafase ($\bar{X} \pm E.E.$)	Valor "t"
Cloruro de zinc						
0.1	30.44 \pm 1.49	33.00 \pm 1.30	0.92 N.S.	29.12 \pm 0.88	30.52 \pm 1.97	0.49 N.S.
1.0	29.76 \pm 1.16	30.00 \pm 1.49	0.09 N.S.	29.12 \pm 0.88	30.52 \pm 1.97	0.49 N.S.
5.0	29.08 \pm 1.35	30.24 \pm 0.90	0.52 N.S.	29.12 \pm 0.88	30.04 \pm 0.66	0.60 N.S.
10.0	31.88 \pm 1.04	30.92 \pm 0.61	0.58 N.S.	29.28 \pm 0.95	30.04 \pm 0.66	0.47 N.S.
20.0	30.08 \pm 0.68	31.20 \pm 0.77	0.77 N.S.	30.04 \pm 0.66	29.48 \pm 0.39	0.53 N.S.
30.0	32.32 \pm 0.80	29.68 \pm 0.51	2.02 N.S.	28.60 \pm 0.59	29.48 \pm 0.39	0.90 N.S.
40.0	31.36 \pm 0.94	33.20 \pm 0.87	1.02 N.S.	28.60 \pm 0.59	29.48 \pm 0.39	0.90 N.S.
50.0	*	*		28.60 \pm 0.59	29.48 \pm 0.39	0.90 N.S.
Nitrato de zinc						
0.1	35.00 \pm 1.02	30.84 \pm 1.31	1.79 N.S.	29.12 \pm 0.88	30.52 \pm 1.97	0.49 N.S.
1.0	34.64 \pm 1.25	31.24 \pm 1.31	1.33 N.S.	29.12 \pm 0.88	30.52 \pm 1.97	0.49 N.S.
5.0	29.28 \pm 0.75	32.28 \pm 0.92	1.80 N.S.	29.12 \pm 0.88	30.04 \pm 0.66	0.60 N.S.
10.0	28.16 \pm 0.97	32.20 \pm 0.99	2.06 N.S.	29.12 \pm 0.88	29.28 \pm 0.95	0.09 N.S.
20.0	29.24 \pm 0.67	30.12 \pm 0.47	0.77 N.S.	30.04 \pm 0.66	29.48 \pm 0.39	0.53 N.S.
30.0	29.04 \pm 0.87	30.04 \pm 0.49	0.74 N.S.	30.04 \pm 0.66	29.48 \pm 0.39	0.53 N.S.
40.0	29.32 \pm 1.01	30.24 \pm 0.44	0.63 N.S.	30.04 \pm 0.66	29.48 \pm 0.39	0.53 N.S.
50.0	*	*		30.04 \pm 0.66	29.48 \pm 0.39	0.53 N.S.

^a n = 25 metafases

N.S. No significativo

* Inhibición de la división celular

TABLA 3. PROMEDIOS DE INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR CLORURO Y NITRATO DE COBALTO EN *Vicia faba*^a

Tratamiento (ppm)	ICH/metafase ($\bar{X} \pm E.E.$)
Cloruro de cobalto	
0.0	29.58 \pm 0.54
0.1	60.62 \pm 1.04 *
1.0	71.70 \pm 1.78 *
5.0	95.80 \pm 0.98 *
7.5	101.80 \pm 0.71 *
10.0	**
15.0	**
50.0	**
Nitrato de cobalto	
0.0	29.76 \pm 0.48
0.1	48.20 \pm 1.20 *
1.0	59.36 \pm 1.30 *
5.0	80.96 \pm 1.24 *
7.5	86.54 \pm 0.71 *
10.0	89.80 \pm 0.65 *
15.0	**
50.0	**

^a n = 50 metafases en dos repeticiones

* Se obtuvieron diferencias significativas entre el testigo y los grupos de tratamiento, por análisis de varianza, donde F = 725.74 y 595.35 respectivamente, con P<0.0001; entonces se aplicó la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls a P<0.001.

** Inhibición de la división celular

TABLA 4. PROMEDIOS DE INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR CLORURO Y NITRATO DE ZINC EN *Vicia faba*^a

Tratamiento (ppm)	ICH/metafase ($\bar{X} \pm E.E.$)
Cloruro de zinc	
0.0	29.30 \pm 0.48
0.1	32.26 \pm 0.81
1.0	29.88 \pm 0.94
5.0	29.66 \pm 0.81
10.0	31.40 \pm 0.60
20.0	30.64 \pm 0.52
30.0	31.00 \pm 0.50
40.0	32.28 \pm 0.65
50.0	*
Nitrateo de zinc	
0.0	29.58 \pm 0.55
0.1	32.94 \pm 0.93
1.0	30.58 \pm 0.66
5.0	30.18 \pm 0.74
10.0	29.68 \pm 0.41
20.0	29.54 \pm 0.50
30.0	29.58 \pm 0.54
40.0	32.92 \pm 0.87
50.0	*

^a n = 50 metafases en dos repeticiones

* Inhibición de la división celular.

No se obtuvieron diferencias significativas entre el testigo y los grupos de tratamiento, mediante análisis de varianza.

TABLA 5. EFECTOS GENÉTICOS DE CoCl_2 EN BACTERIAS

Organismo indicador	Ensayo	Dosis (μM) ^a	Resultados ^b	Referencia
<i>E. coli</i> / <i>S.typh.</i>	Mutaciones reversas	5×10^4		Kanematsu <i>et al.</i> (1980)
		(CoCl_2)	-	
		CoSO_4	-	
		2.5×10^5		
		$[\text{Co}(\text{OH})_3]$	-	
	No tóxicas ^c	-	Arlauskas <i>et al.</i> (1985)	
<i>S. typhimurium</i>		13-84	-	Mochizuki y Kada (1982)
		0.1-1000	-	Ogawa <i>et al.</i> (1986)
<i>E. coli</i>		63	-	Clarke y Shankel (1988)
<i>S. typhimurium</i>		168 y 504	+	Wong (1988)
		25-800	+	Pagano y Zeiger (1992)
<i>E. coli</i> WP2s(λ)	Inducción lisogénica	32	-	Rossmann <i>et al.</i> (1984)
		105-841	d	Leitao <i>et al.</i> (1993)
<i>E. coli</i> AB1157	Reactivación de fagos	263-1051	-	
<i>E. coli</i>	SOS	0.03-300 $[\text{Co}(\text{NO}_3)_2]$	-	Olivier y Marzin
<i>B. subtilis</i>	Ensayo rec	5×10^4	-	Nishioka (1975)
		5×10^4		Kanematsu <i>et al.</i> (1980)
		(CoCl_2 ,	+	
		CoSO_4 ,	\pm	
		$2\text{CoCO}_3 \cdot 3\text{Co}(\text{OH})_2$	\pm	
		2.5×10^5 $[\text{Co}(\text{OH})_3]$	\pm	

^a CoCl_2 fue usado si no se establece otra cosa.

^b -, Negativo; +, Positivo; \pm , Respuesta débil.

^c No se especifica.

^d Positivo o negativo, dependiendo de las condiciones experimentales.

TABLA 6. MODULACIÓN DE MUTAGENICIDAD POR CoCl_2 EN BACTERIAS

Organismo indicador	CoCl_2 en combinación con	CoCl_2 dosis (μM)	Efecto ^a	Referencia
<i>S. typhimurium</i> TA1537, TA2637	Compuestos heteroaromáticos (40-120 μM)	40-100	Aumento	Ogawa <i>et al.</i> (1986)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> estirpe mutante	21-126	Reducción	Inoue <i>et al.</i> (1981)
<i>S. typhimurium</i> TA98, T 1538	Trp-P-1 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	13-84	Reducción	Mochizuki y Kada (1982)
<i>E. coli</i> ND-160	Cafeína (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	63	Reducción	Clarke y Skankel (1988)
<i>E. coli</i> WP2, WP2s	Luz UV 7.2, 13.2 J/m^2	5	Ninguno	Rossmann y Molina (1986)
<i>E. coli</i> WP2s	<i>E. coli</i> WP2s	210-841	Reducción	Leitao <i>et al.</i> (1993)
	Luz UV 1.5 J/m^2	210-841	Reducción	
<i>E. coli</i> WP2s(λ)	Luz UV 1.5 J/m^2	210-841	Reducción (ind. lisog.)	
<i>E. coli</i> AB1157	Luz UV 5 J/m^2	263-1051	Aumento (reactivación de fagos lambda)	

^a Efecto sobre la mutagénesis, a menos que se establezca otra cosa.

TABLA 7. EFECTOS GENÉTICOS DE CoCl_2 EN MAMÍFEROS^a

Organismo indicador	Ensayo	Dosis (μM) ^b	Resultados ^c	Referencia
Células HeLa	Rompimiento de filamentos de ADN	40-250	+	Hartwig <i>et al.</i> (1990)
Células de hepatoma Novikoff	Enlace cruzado ADN-proteína	1000	±	Wedrychowski <i>et al.</i> (1986)
Células de macrófago de ratón P338D	Intercambios de cromátidas hermanas	100	+	Andersen (1983) ^d
Linfocitos humanos		10	+	
Células de criceto chino V79		10-100	+	Hartwig <i>et al.</i> (1991)
Linfocitos humanos	Inducción de micronúcleos	0.6	+	Capomazza y Botta (1991)
Células de médula ósea de ratón		4-210	-	Suzuki <i>et al.</i> (1993)
Fibroblastos humanos	Aberraciones cromosómicas	50 y 90 mg/kg pc administrado ip en una sola dosis 0.08 [$\text{Co}(\text{NO}_3)_2$]	+	
Leucocitos humanos		0.8 [$\text{Co}(\text{NO}_3)_2$]	-	Paton y Allison (1972)
Células de médula ósea de ratón		20 y 40 mg/kg pc administrado oralmente en una sola dosis	+	Palit <i>et al.</i> (1991)
Médula ósea y testículos de criceto sirio	Aneuploidias	0.04 g/100 g p/c administrado ip durante 9 días. Dosis total 400 mg/kg	+	Farah (1983) ^d

^a Los efectos mutagénicos se muestran en la tabla 6.

^b CoCl_2 fue usado, si no se establece otra cosa.

^c -, Negativo; +, Positivo; ±, Respuesta débil.

^d Cit. por Beyersmann y Hartwig (1992).

pc Peso corporal.

ip Intraperitoneal

TABLA 8. EFECTOS MUTAGÉNICOS DE CoCl_2 EN MAMÍFEROS

Organismo indicador	Duración tratamiento	Dosis (μM)	Resultados ^a	Referencia
Células de criceto chino V79 locus HPRT	20 h	200	±	Miyaki <i>et al.</i> (1979)
	24 h	100-250	±	Hartwig <i>et al.</i> (1990)
	20 h	100-250	±	Hartwig <i>et al.</i> (1991)
Células de carcinoma mamario de ratón FM3A locus HPRT	48 h	100-250	±	Morita <i>et al.</i> (1991)
Células de linfoma de ratón L5178Y locus TK	3 h	24-240	-	Amacher y Paillet (1980)
Células de criceto chino V79 locus HPRT	6 días	1-10	-	Yokoizama <i>et al.</i> (1990)

^a -, Negativo; ±, Respuesta débil.

TABLA 9. MODULACIÓN DE MUTAGENICIDAD POR CoCl₂ EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

Organismo indicador	Ensayo	CoCl ₂ en combinación con	CoCl ₂ dosis (μM) ^a	Efecto	Referencia
Células de criceto chino V79	Mutaciones en el locus HPRT	Luz UV 10 J/m ²	3-9	Aumento (débil)	Yokoiyama <i>et al.</i> (1990)
		Rayos γ 4 Gy	1-10	Reducción	
		Luz UV 5 J/m ²	50-250	Aumento	Hartwig <i>et al.</i> (1991)
	ICH	Luz UV 5 J/m ²	10-100	Aumento	
Células HeLa	Remoción de dímeros timina-timina	Luz UV 24 J/m ²	75-200 (acetato de cobalto)	Inhibición	
	Rompimiento de filamentos de ADN	Luz UV 3.6-7.2 J/m ²	100-200 (acetato de cobalto)	Acumulación durante reparación	
Células de médula ósea de ratón	ICH	DMH ^b 20 mg/kg pc administrado ip en una sola dosis	50, 90 mg/kg pc administrado ip en una sola dosis	Aumento	Suzuki <i>et al.</i> (1993)
		BAP ^c 50-100 mg/kg pc	50 mg/kg pc	Aumento	
		2Na ^d 50-100 mg/kg pc	50 mg/kg pc	Aumento	

^a CoCl₂ fue usado si no se establece otra cosa.

^b 1, 1-dimetilhidrazina

^c Benzo(a)pireno

^d 2-naftilamina

pc Peso corporal

ip Intraperitoneal

TABLA 10. EFECTOS GENÉTICOS DE COMPUESTOS DE COBALTO EN LEVADURAS Y VEGETALES

Organismo indicador	Ensayo	Dosis (μM) ^a	Resultados ^b	Referencia
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mutación petite	1×10^3 - 4×10^3	+	Lindegren <i>et al.</i> (1958)
		2×10^4	+	Prazmo <i>et al.</i> (1975)
	Conversión génica	3×10^3 - 3×10^4	+	Fukunaga <i>et al.</i> (1982)
	Mutación génica		-	
	Conversión génica	6×10^3 - 5×10^4	+	Kharab y Singh (1985)
	Mutación génica		±	
<i>Vicia faba</i>	Aberraciones cromosómicas	8×10^{-1} - 8×10^3 (CoCl_2)	+	Komczynski <i>et al.</i> (1963)
		6×10^{-1} - 6×10^3 [$\text{Co}(\text{NO}_3)_2$]	+	
		7×10^{-1} - 7×10^3 (CoSO_4)	+	
<i>Allium cepa</i>		2-100 ($\text{Co}(\text{SO}_4)$)	+	Gori y Zuconi (1957) ^c
	Aneuploidías		+	

^a CoCl_2 fue usado si no se establece otra cosa.

^b -, Negativo; +, Positivo; ± Respuesta débil.

^c Cit. por Beyersmann y Hartwig (1992)

TABLA 11. EFECTOS GENÉTICOS DE COMPUESTOS DE ZINC EN BACTERIAS

Organismo indicador	Ensayo	Dosis (μM) ^a	Resultados ^b	Referencia
<i>E. coli</i> WP2	Mutación reversa	c	-	Venit y Levy (1974)
<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538		3600 $\mu\text{g/placa}$ (ZnSO_4)	-	Gocke <i>et al.</i> (1981)
<i>S. typhimurium</i> TA102		0.01-1 $\mu\text{M/placa}$ (ZnSO_4)	-	Marzin y Vo Phi (1985)
<i>S. typhimurium</i> TA98, TA102, TA1535, TA1537		701-934	-	Wong (1988)
<i>S. typhimurium</i> TA100, TA1535, TA1537, TA1538		50-7200 $\mu\text{g/placa}$ (Acetato zinc)	-	Thompson <i>et al.</i> (1989)
<i>S. typhimurium</i> TA98, TA1538		100-400 $\mu\text{g/placa}$ ($\text{Zn}/2-4$ pentanodiona)	+	
<i>S. typhimurium</i> TA97		16-1000	+	Pagano y Zeiger (1992)
<i>E. coli</i> WP2	Modulación de mutagenicidad	1000 (UV 7.2-13.2 J/m ²)	*	Rossmann y Molina (1986)
<i>E. coli</i> WP2s(λ)	Inducción lisogénica	3000	\pm	Rossmann <i>et al.</i> (1984)
<i>E. coli</i> PQ35, PQ37	SOS	1-1000 (acetato de zinc)	-	Olivier y Marzin (1987)
<i>B. subtilis</i> M45, H17	Ensayo rec	5×10^4	-	Nishioka (1975)
		c	-	Kanematsu y Kada (1978)
		10^3-10^7	-	Kanematsu <i>et al.</i> (1980)

^a ZnCl_2 fue usado si no se establece otra cosa.

^b -, Negativo; +, Positivo; \pm Respuesta débil; *, Sin efecto.

^c No se especifica tipo de sal ni dosis.

TABLA 12. EFECTOS GENÉTICOS DE COMPUESTOS DE ZINC EN MAMÍFEROS

Organismo indicador	Ensayo	Dosis (μM) ^a	Resultados ^b	Referencia
Células de linfoma de ratón L5178Y/TK ^{+/-}	Mutación génica	4-41	-	Amacher y Paillet (1980)
		6-59 ^c ó 19-91 ^d (acetato de zinc)	+	Thompson <i>et al.</i> (1989)
Células de médula ósea de ratón	ICH	330-mg/kg pc (una dosis) ó 16.5 mg/kg pc (21 días)	+	Giri <i>et al.</i> (1988)
Células de médula ósea de rata y ratón	Inducción de micronúcleos	86.3 mg/kg pc (ZnSO ₄) administrado ip (dos dosis)	-	Gocke <i>et al.</i> (1981)
Linfocitos humanos	Aberraciones cromosómicas	30	±	Deknudt y Deminatti (1978)
		0.1-1000 (acetato de zinc)	-	Gasiorek y Bauchinger (1981)
		10-80 $\mu\text{g/ml}$ (Zn/DTPA)	-	Littlefield <i>et al.</i> (1984)
Células de médula ósea de ratón		15 mg/kg pc administrados ip	-	Voroshilin <i>et al.</i> (1978)
		330-mg/kg pc (una dosis) ó 16.5 mg/kg pc (21 días)	+	Giri <i>et al.</i> (1988)
Células CHO		114-205 ^c ó 205-369 ^d (acetato de zinc)	+	Thompson <i>et al.</i> (1989)

^a ZnCl₂ fue usado si no se establece otra cosa.

^b -, Negativo; +, Positivo; ±, Respuesta débil.

^c Con activación metabólica (s9)

^d Sin activación metabólica (s9)

TABLA 13. EFECTOS GENÉTICOS DE COMPUESTOS DE ZINC EN OTROS ORGANISMOS

Organismo indicador	Ensayo	Dosis (μM) ^a	Resultados ^b	Referencia
<i>Drosophila melanogaster</i>	Mutaciones letales recesivas ligadas al sexo	5×10^3 (ZnSO ₄)	-	Gocke <i>et al.</i> (1981)
	Prueba de la mancha del ala	6×10^3 - 3×10^4	+	Ogawa <i>et al.</i> (1994)

^a ZnCl₂ fue usado, si no se establece otra cosa

^b -, Negativo; +, Positivo

TABLA 14. EFECTOS GENÉTICOS DE COMPUESTOS DE ZINC EN LEVADURAS Y VEGETALES

Organismo Indicador	Ensayo	Dosis (μM) ^a	Resultados ^b	Referencia
<i>S. cerevisiae</i>	Conversión génica	3×10^3 - 3×10^4	±	Fukunaga <i>et al.</i> (1982)
	Mutación génica	3×10^3 - 3×10^4	-	
<i>Vicia faba</i>	Aberraciones cromosómicas	$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$	+	Gläss (1956)
		1.0 (ZnSO_4)	±	Moutschen-Dahmen y Moutschen-Dahmen (1963)
		1.0 (ZnSO_4) más 0.5-2 mg/100ml de EMS	+	
<i>Allium sativa</i>		ZnCl_2	+	Mitra (1984) ^c
	Inhibición de la división celular		+	
<i>Allium cepa</i>		12.5×10^3 - 10^5 (ZnCl_2 , acetato de zinc)	+	Kocik <i>et al.</i> (1982)

^a ZnCl_2 fue usado, si no se establece otra cosa

^b -, Negativo; +, Positivo; ±, Respuesta débil

^c Cit. por Sharma y Talukder (1987)