

00381



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**División de Estudios de Postgrado**

**MARCADORES BIOLÓGICOS DE EXPOSICION  
A ARSENICO INORGANICO**

**T E S I S**  
Que para obtener el Grado Académico de  
**DOCTORA EN CIENCIAS ( BIOLOGIA )**  
**p r e s e n t a**

**MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**Directora de Tesis: Dra. Patricia Ostrosky-Wegman**



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.

**Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética Toxicológica y Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**"...I get by with a little help from my friends..."  
(Lennon y McCartney)**

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

**A los miembros de mi Comité Tutorial:**

**Dra Rosario Rodríguez Arnaiz**

**Dr Luis Angel Terán Ortiz**

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

**A los miembros del Jurado Examinador:**

**Dra Sandra Luz Gómez Arroyo, Dra Patricia Ramos Morales, Dra Regina Montero y Dr Mariano E. Cebrián por sus aportes y comentarios en la revisión de este trabajo.**

**A Regina por prestarme su hombro,**

**A La Dra María Luisa Fanjul de Moles por su amistad y apoyo**

**A mis compañeros:**

**Emilio, Luis, Libia, Ana María, Guillermo, Silvia, Patricia R., Patricia G., Aurora, Angélica, Mahara, Miriam, Juliana, Vicky y Roble por hacer del laboratorio un sitio en donde se comparten el trabajo y la amistad.**

**A mis compañeros del CINVESTAV:**

**Dr Albores, Gonzalo García-Vargas y Luz Ma. Del Razo por su colaboración.**

**Ca nauh, ca notlaqual. (Este es mi alimento, esta es mi bebida)**

**Metáfora nahuatl, Códice Florentino Folios 83r-215v.**

**"Nadie sabe si la noche se asoma a la ventana  
o si la ventana invade a la oscuridad"**

**del poema Tiempo Unánime , M.A. Montes de Oca.**

## RESUMEN

La exposición a sustancias y agentes tóxicos se halla a menudo relacionada con efectos adversos en el desarrollo, la reproducción y/o la supervivencia de los organismos. La Organización Mundial de la Salud considera relevante el estudio y la valoración de los efectos que sobre la salud humana, produce la exposición a agentes ambientales. La identificación de los cambios asociados a la exposición o marcadores biológicos, permite conocer la dosis recibida y/o los eventos tempranos o iniciales asociados a esta exposición. La actividad carcinogénica del arsénico (As) en poblaciones humanas se encuentra ampliamente documentada, aunque el mecanismo por el cual ejerce su(s) efecto(s) se desconoce. Este trabajo investiga los cambios en marcadores biológicos de citotoxicidad como los índices de marcaje, mitótico y de replicación y las aberraciones cromosómicas como indicadores de genotoxicidad, todos ellos evaluados en cultivos de linfocitos de individuos expuestos crónicamente a As en el agua de bebida. Estudios previos demostraron en estos individuos, que viven en la Comarca Lagunera (entré los estados de Durango y Coahuila), una elevada prevalencia de lesiones de piel típicas de hidroarsenicismo y una proliferación de linfocitos retrasada en comparación con la observada en individuos no expuestos. Los resultados obtenidos en este estudio, confirman que la respuesta proliferante de los linfocitos, inducida por el mitógeno PHA, se encuentra abatida, especialmente en aquellos individuos que presentan lesiones de piel características de la intoxicación por As. Los análisis de correlación entre los parámetros de proliferación sugieren diferencias en la progresión de la fase S a la fase M del ciclo celular entre los individuos testigos y expuestos, asimismo la exposición se asocia a un incremento en las frecuencias de rompimientos de tipo cromatídico e isocromatídico. Se encontraron también diferencias, cuando el análisis de los parámetros tomó en consideración el sexo y la exposición ponderada de los individuos. La exposición a elevadas concentraciones de As en el agua de bebida se halla asociada a tasas de mortalidad elevadas por cáncer de piel, vejiga, hígado y riñón, por lo que el tejido linfocitario resulta, desde el punto de vista epidemiológico, un tejido sustituto para la identificación de biomarcadores. La exposición crónica a este metaloide altera la proliferación y la integridad del material genético de estas células, lo que los convierte en marcadores sensibles. Finalmente, si la función esencial de los linfocitos es la defensa inmunológica, los hallazgos de este estudio sugieren que este tejido resulta afectado por la exposición al As.

## INDICE

	Página nº
<b>Prólogo</b>	1
<b>CAPITULO I</b>	
<b>Introducción</b>	3
<b>Indicadores o Marcadores biológicos</b>	5
Marcadores de exposición	5
Marcadores biológicos de efecto	7
Marcadores biológicos de susceptibilidad	10
Principios para la selección de marcadores	10
Consideraciones biológicas	11
Limitaciones prácticas	11
<b>CAPITULO II</b>	
<b>El tejido linfocitario como sustituto en la evaluación de marcadores biológicos de efecto en poblaciones humanas</b>	13
La cinética de proliferación y el índice mitótico como marcadores biológicos de citotoxicidad	14
Alteraciones en la proliferación por agentes agregados "in vitro"	
15	
Estudios de cinética de proliferación celular en síndromes y enfermedades	17
Estudios de la CPC en casos de exposición ambiental	
19	
Factores que pueden influir en la interpretación de resultados	
20	
Las aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos como indicador biológico de genotoxicidad	22
<b>CAPITULO III</b>	
<b>El arsénico como xenobiótica</b>	26
Distribución ambiental y transporte	27
Exposición	28
Metabolismo	30
Arsénico Inorgánico	30
<b>Indicadores biológicos de exposición a As</b>	32
Efectos biológicos del As	33
Arsénico orgánico	33
Arsénico inorgánico	33

**CAPITULO IV**

	<b>Planteamiento del problema</b>	
	36	
	<b>Hipótesis general de trabajo</b>	
	37	
	<b>Objetivo general de trabajo</b>	38
	Objetivos específicos	38
	<b>Material y métodos</b>	39
	Marcadores de citotoxicidad	39
	Marcadores de genotoxicidad	39
	Estudio poblacional	39
	Individuos a estudiar	39
	Criterios de inclusión y exclusión	40
	Toma de muestras	40
	Estudio de cito y genotoxicidad	
40		
	Indice de Marcaje	40
	Indice de Mitótico	41
	Cinética de Proliferación	41
	Aberraciones cromosómicas	41
	Determinación de arsénico en muestras de plasma, orina y agua	
41		
	Estudios <i>In Vitro</i>	42
	Análisis exploratorio de los datos	42

**CAPITULO V**

	<b>Resultados</b>	43
	Marcadores de exposición:	
	Arsénico en muestras de agua y orina	
43		
	Marcadores de citotoxicidad	43
	Resultados de los experimentos <i>in vitro</i>	46
	Marcadores de genotoxicidad	46
	<b>Discusión</b>	47
	<b>Conclusión</b>	51
	<b>Perspectivas</b>	52
	<b>Referencias</b>	53

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

### Figuras

- Fig.1. Diagrama de relaciones entre la investigación epidemiológica y la experimental.  
 Fig.2. Esquema de la diferenciación de cromátidas hermanas.  
 Fig.3. Cinética del As inorgánico.  
 Fig.4. Biotransformación del As inorgánico.  
 Fig.5. Efectos en la salud por inhalación de As inorgánico.  
 Fig.6. " " " " " ingestión " " "  
 Fig.7. Vías de exposición a As inorgánico y marcadores biológicos  
 Fig.8. Correlaciones entre IMC e IM de M1.  
 Fig.9. Análisis del tiempo de proliferación.  
 Fig.10. Correlaciones entre los IM e IR.  
 Fig.11. Efectos *in vitro* del As inorgánico.  
 Fig.12. Correlación entre el porcentaje de M1 y el porcentaje de aberraciones.

### Tablas

- Tabla 1. Fórmula de los compuestos arsenicales más comunes.  
 Tabla 2. Formas más frecuentes de exposición a As  
 Tabla 3a. Exposición ponderada en testigos  
 Tabla 3b. " " " " expuestos  
 Tabla 3c. Edad, años de residencia y marcadores de exposición  
 Tabla 4a. Número de linfocitos y leucocitos en testigos  
 Tabla 4b. " " " " expuestos  
 Tabla 4c. Promedios del número de leucocitos y linfocitos  
 Tabla 5a. IMC y IM de M1 en testigos  
 Tabla 5b. " " " " "  
 Tabla 5c. Promedios de los IMC  
 Tabla 6a. IM en testigos  
 Tabla 6b. IM en expuestos  
 Tabla 6c. Promedios de los IM  
 Tabla 7a. IR en testigos  
 Tabla 7b. " " expuestos  
 Tabla 7c. Promedios de IR  
 Tabla 8. Biomarcadores de citotoxicidad y genotoxicidad  
 Tabla 9. Efecto en las proporciones de M1, M2 y M3 del tratamiento *in vitro* con As  
 Tabla 10. Efecto sobre el IR del tratamiento con As  
 Tabla 11. Frecuencia de aberraciones cromosómicas en testigos  
 Tabla 12. " " " " " expuestos

**"Mas vale prevenir que lamentar"**

## **PROLOGO**

La prevención es, desde el punto de vista social y económico mucho menos onerosa que la reparación o la restitución del daño producido, debido a que no siempre es posible volver a la condición inicial.

El propósito último de la Toxicología Genética, va en el sentido del refrán popular en la medida que al identificar agentes tóxicos en nuestro medio ambiente, puede evitarse la exposición a los mismos.

Los estudios epidemiológicos han demostrado que una gran cantidad de enfermedades o padecimientos en el ser humano y muchas de las alteraciones que sufren los ecosistemas naturales son producto de la presencia en el ambiente de sustancias, productos o conductas nuevas, generados por los cambios tecnológicos y sociales. No nos resulta extraño el hecho de que los pueblos y ecosistemas americanos fueran expuestos a nuevas especies biológicas y a cambios sociales radicales a raíz del "encuentro de los dos mundos", ocasionando enfermedades nunca antes conocidas entre los americanos y exponiéndose a su vez los europeos a elementos para ellos también desconocidos (Moreno Toscano, 1976).

Se considera que el incremento en el tiempo promedio de vida de los habitantes de los países occidentales, de 40 años en 1850 a 70 años en 1950 se debe fundamentalmente, a la medicina preventiva (Ackernecht, 1982). Ello hace que el monitoreo y la valoración de los efectos que, sobre la salud humana, produce la exposición a agentes ambientales, sean considerados aspectos centrales para el Programa de Salud Ambiental de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1985).

Tomatis (1990) menciona que el 90% de los diferentes tipos de cáncer conocidos se originan por exposición ambiental u ocupacional; es posible afirmar también, que otro tipo de padecimientos como las malformaciones congénitas, la diabetes, algunas enfermedades autoinmunes y la enfermedad de Alzheimer entre otras, que disminuyen la calidad de

vida de los individuos afectados, podrían originarse por exposiciones crónicas a agentes extraños presentes en el medio(NRC, 1989; 1992).

El conocimiento de la presencia e identidad de agentes peligrosos en el ambiente y el alcance o nivel de la exposición a estos, es extremadamente importante en la interpretación de los resultados obtenidos al estudiar poblaciones humanas expuestas y tratar de identificar los efectos que produce sobre la salud (WHO, 1985).

Desafortunadamente, la identificación del o de los agentes causales no es fácil, ya que los organismos no estamos expuestos a un solo agente a lo largo de nuestras vidas, además del hecho de que cada uno de nosotros tiene un particular arreglo genético distinto al de los demás. Ello hace que la descripción de la interacción de nuestros genotipos con el ambiente no sea una tarea fácil desde el punto de vista toxicológico y constituya el desafío que nos ocupa.

## CAPITULO I

### INTRODUCCION

Mucho antes de conocer la naturaleza química del material genético, Muller en 1927 demostraba que los rayos X inducían mutaciones a nivel de las células germinales de *Drosophila melanogaster*, el autor comentaba que las "mutaciones génicas" provocadas de esta manera eran similares a las obtenidas espontáneamente, pero que con los tratamientos de radiación, se presentaban con mucho más frecuencia. Cuando se comprendió la manera en que la cadena de ADN codificaba la información genética, se hizo evidente que son potencialmente mutagénicas aquellas sustancias capaces de alterar la estructura y la secuencia de bases del ADN.

Los procesos de duplicación y reparación del ADN, las condiciones endógenas de las células, y los factores ambientales como la radiación ultravioleta, ionizante o sustancias genotóxicas presentes en el ambiente, afectan la integridad de la macromolécula, produciendo una cierta cantidad de daño al que podríamos llamar espontáneo, con el que las especies vivientes han lidiado en el transcurso de su evolución (Lindahl, 1993).

Estudios epidemiológicos y modelos experimentales han demostrado que existen sustancias y agentes capaces de incrementar el nivel de daño espontáneo, con efectos generalmente deletéreos para los organismos (Brusick, 1987; Ehling, 1991).

La investigación en los campos de la toxicología ambiental, genética y molecular, ha permitido demostrar la vinculación que existe entre la exposición a xenobióticos o a la radiación ionizante y las mutaciones a nivel de células germinales y somáticas y la aparición de malformaciones congénitas, esterilidad, o de enfermedades degenerativas y cáncer (NRC, 1989, 1992; Tomatis, 1990; Yamasaky y cols., 1992).

De acuerdo a la publicación "Chemical Abstracts", 10 millones de productos químicos fueron registrados hasta el año de 1984. Aproximadamente 65,725 compuestos distintos están reguladas e inventariadas por las agencias estadounidenses "Food and Drug Administration" y "Environmental Protection Agency". "La mayoría de estas sustancias no han sido estudiadas en cuanto a su toxicidad y una fracción desconocida de estos compuestos es mutagénica e indispensable" (Ehling, 1991).

Ello ha impulsado al desarrollo de una serie de sistemas de prueba y de modelos experimentales, que han sido la fuente primaria de información acerca de los efectos en la salud y que se toman en cuenta para las evaluaciones de sustancias tóxicas. Sin esta información muchos xenobióticos potencialmente peligrosos se hubiesen identificado solo a través del uso humano o de los desastres ecológicos (Brusick, 1987; Purchase y Kimber, 1990).

La identificación de los mecanismos de acción de un xenobiótico requiere de una observación lógica a nivel de los organismos afectados, de que la exposición modifique la probabilidad de la ocurrencia de un evento o suceso, los cuales incrementen a su vez el riesgo de un padecimiento (IARC, 1992).

Las alteraciones en las tasas de natalidad, de malformaciones congénitas o de mortalidad asociada a diferentes tipos de enfermedades que se verifican en poblaciones humanas expuestas, nos permiten correlacionar la presencia del (de los) xenobiótico(s) con estos efectos. Sin embargo por razones éticas, los estudios mecanísticos se realizan en modelos experimentales (Brusick, 1987); lo cual impone otra limitante a la posibilidad, no solamente de conocer la manera en que los agentes deletéreos ejercen su acción sobre los organismos, sino al análisis del riesgo asociado a la exposición. Esta limitación es el grado de incertidumbre que supone la extrapolación de los datos experimentales obtenidos en animales al hombre (Purchase y Kimber, 1990).

Si la exposición a sustancias tóxicas produce cambios o alteraciones tempranas o iniciales en los individuos, antes del desarrollo del impedimento o la enfermedad, estos cambios podrían convertirse en señales o "marcadores", los que pueden ser evaluados mediante estrategias adecuadas, y correlacionarse con los efectos observados a largo plazo en modelos experimentales o en grupos humanos expuestos (NRC, 1989).

## INDICADORES O MARCADORES BIOLÓGICOS

La magnitud de la alteración que produce la exposición a sustancias tóxicas dependerá de la naturaleza del compuesto, de la dosis de exposición y de la función que desempeñe en el organismo el (los) tejido (s) afectado (s) (NRC, 1989; 1992; Klaasen y Eaton, 1991).

Se llaman indicadores o marcadores biológicos a aquellos elementos relacionados con la actividad de los seres vivos, que permiten determinar eventos relacionados con su fisiología de manera cuali o cuantitativa.

La detección de un xenobiótico en fluidos o tejidos es una señal de que el organismo tuvo contacto con éste, es decir, ha estado expuesto a él, por lo que constituirá un marcador de exposición. Cuando ésta ha causado cambios en los organismos, es posible caracterizarlos cuali o cuantitativamente a través de diferentes estrategias. Los marcadores o indicadores biológicos de efecto son las alteraciones bioquímicas, fisiológicas, genéticas o de otro tipo que, dependiendo de su magnitud, pueden ser reconocidas como un daño potencial o efectivo sobre la salud. Finalmente, un marcador biológico de susceptibilidad es aquel indicador de una limitación heredada o adquirida de la capacidad de un organismo para responder al reto de la exposición a un agente xenobiótico específico (NRC, 1989).

### MARCADORES DE EXPOSICION

La exposición externa es la cantidad o concentración de material xenobiótico en el ambiente de un organismo, mientras que la dosis interna se refiere a la cantidad de xenobiótico que es transferida al o absorbida por el organismo. La dosis biológicamente efectiva, en términos generales es la dosis interna que está cuantitativamente relacionada con un efecto biológico; sin embargo es mucho más preciso considerarla como la cantidad de material xenobiótico que ha interactuado con un receptor celular crítico o con un blanco celular o tisular en donde el efecto biológico se inicia. Dado que estos sitios de recepción son a menudo desconocidos, o no son accesibles al muestreo, es necesario frecuentemente usar un sitio o compartimento sustituto, para el cual la concentración ha sido correlacionada con la dosis biológicamente efectiva o con el efecto biológicamente identificable en el tejido blanco (Elinder y cols., 1987; NRC, 1989)

Existe una continua necesidad de desarrollar, a través de la investigación, los marcadores adecuados de dosis interna que reflejen la dosis biológicamente efectiva, puesto que la cantidad de xenobiótico que es realmente absorbida por el organismo es generalmente desconocida, y a veces puede estar dentro de los límites de detección (Wild, 1990; Gensebatt y cols., 1994). La dosis biológicamente efectiva puede depender de las características individuales, las cuales son responsables a su vez, de una gran parte de las diferencias que se observan al momento de cuantificar los efectos. Los marcadores de exposición se pueden basar en mediciones farmacocinéticas, como las concentraciones circulantes, la dosis acumulada o la vida media del compuesto en el plasma. Las variaciones individuales en características fisiológicas como el sexo, la edad, el flujo sanguíneo, la permeabilidad de membranas y la tasa respiratoria, afectan significativamente la absorción y distribución de una sustancia química y sus metabolitos (Doull, 1980). Las alteraciones fisiológicas en el flujo sanguíneo durante el embarazo alteran la distribución de las drogas en el tejido blanco (NRC, 1989). También la edad y el estado de salud, por ejemplo en casos de enfermedad, pueden afectar la tasa respiratoria y por lo tanto la dosis pulmonar de un agente tóxico.

Las diferencias metabólicas entre especies y entre individuos de una misma especie, pueden alterar drásticamente también, las dosis internas de los metabolitos reactivos. La dosis interna de un xenobiótico puede variar con la ruta de exposición, la especie química y la forma física. Para hacer estimaciones cuali o cuantitativas de la exposición mediante marcadores biológicos, la concentración, la duración y el patrón de exposición y la naturaleza fisicoquímica de una sustancia tóxica deben ser consideradas en la selección de un marcador apropiado de exposición (Gibaldi y Perrier, 1982). Otros factores ambientales como la temperatura, pueden afectar la exposición cambiando la cantidad de consumo de agua y por lo tanto de la ingesta de los contaminantes contenidos en la misma. La dieta altera la motilidad intestinal y el tiempo de vaciado estomacal, así como el transporte de sustancias específicas, por ejemplo, dietas bajas en hierro parecen facilitar la absorción intestinal de plomo (Silbergeld y cols., 1988).

La presencia de mecanismos activos de transporte en un órgano y tejido y la densidad de los sitios receptores pueden, todos ellos, influenciar las dosis interna y la biológicamente efectiva. La dependencia de la activación metabólica es crítica, en que la distribución en el tejido de las enzimas metabolizadoras es importante para determinar la dosis biológicamente efectiva. La interpretación de los datos dosimétricos también involucra la comprensión del papel del receptor en los distintos niveles de organización

(célula-órgano-organismo) en que se expresa la función, de exposiciones coexistentes o preexistentes en el organismo y de la presencia y posibilidad de compensación durante y después de la exposición (Doull, 1980). La determinación del significado de una dosis biológicamente efectiva depende de la comprensión de cómo un efecto predecible es inducido. Por ejemplo, hombres y mujeres prepúberes parecen ser menos sensibles que las personas maduras al efecto de los agentes alquilantes en la función gonadal. En la mujer parece ser debido al gran número de ovocitos en el ovario antes de la ovulación y en el hombre a la baja proliferación celular y flujo sanguíneo y menor permeabilidad capilar características de los testículos inmaduros (NRC, 1989).

Otro importante marcador biológico de exposición es la carga corporal. Ella se refiere al total de la dosis interna acumulada en el organismo a lo largo del tiempo. Dependiendo de la toxicocinética el agente en cuestión, la carga corporal puede ser un marcador de las exposiciones recientes o en el pasado distante. La carga corporal incluye la dosis en los sitios blanco del receptor, pero también puede incluir la cantidad de material xenobiótico acumulado en otros compartimentos no blanco. A pesar que la carga corporal en lugares remotos puede o no ser relativamente inerte biológicamente hablando, tiene el potencial de ser liberado en condiciones de estrés metabólico. Esta liberación puede ser una dosis efectiva altamente dañina aun mucho después de la exposición externa original.

## MARCADORES BIOLÓGICOS DE EFECTO

Para la investigación en salud ambiental, los marcadores biológicos de efecto a un agente tóxico son considerados en el contexto de su relación con la salud del individuo (NRC, 1989; 1992), por lo que un efecto se define como:

- Una alteración en un tejido u órgano
- Un evento temprano en un proceso biológico predictivo del desarrollo de un padecimiento.
- Un padecimiento o una enfermedad clínicamente identificable
- Una respuesta periférica o paralela al desarrollo de una enfermedad, pero correlacionado con él y por lo tanto útil para predecir la evolución de un padecimiento.

Por ello, un marcador biológico de un efecto puede ser cualquier cambio cuali o cuantitativo predictivo de un daño a la salud y que resulta de la exposición a un agente exógeno. El mismo marcador biológico puede también utilizarse como un indicador de la fisiología normal, por ej. la concentración de glucosa o de colinesterasa en sangre.

Los marcadores de efectos biológicos tempranos incluyen alteraciones en las funciones de los tejidos blanco después de la exposición. Como señales de alarma, estos marcadores pueden ser dosímetros para guiar la intervención para reducir o prevenir la exposición. Estas señales tempranas pueden también observarse en órganos o tejidos diferentes de los sitios que son críticos para la acción de la sustancia tóxica (NRC, 1989).

Un tejido afectado por una sustancia tóxica puede exhibir una función alterada aún si la persona afectada no presenta manifestaciones de ello. Estas funciones alteradas pueden en algunos casos determinarse en pruebas, particularmente con métodos bioquímicos o biológicos. Los marcadores biológicos de estas funciones alteradas son muy útiles si ellas están relacionadas a órganos específicos o funciones, por ej. la beta microglobulina para la función renal y la hormona luteinizante para la ovárica, la respuesta proliferante de linfocitos T para la función inmune celular (NRC, 1989; Ostrosky y cols., 1991; Gonshebb y cols., 1992; Burns y Munson, 1993).

Si la exposición a una sustancia tóxica y la dosis interna es lo suficientemente alta, se desarrollará una enfermedad porque la dosis biológicamente efectiva será suficiente para afectar alguna función irreversiblemente o por un período sustancial (IARC, 1992). La enfermedad que ocurre después de la exposición puede ligarse directamente a la sustancia tóxica. El padecimiento que se manifiesta mucho tiempo después de la exposición, será difícilmente relacionable con la exposición (por ej. disfunción testicular u ovárica y cáncer; cáncer de vejiga e ingestión de solución de Fowler), a menos que los hallazgos sean patognómicos, es decir que sean relativamente específicos de un tipo particular de exposición (como un mesotelioma o un cáncer de piel) o sean raros en personas no expuestas (como angiosarcoma o adenocarcinoma vaginal) (ATSDR, 1989; NRC, 1989).

La transición a la manifestación de la enfermedad puede depender de las propiedades de la sustancia tóxica, la naturaleza de la exposición, el proceso de la enfermedad en sí mismo, o de susceptibilidades individuales (Elinder y cols., 1987; NRC, 1989). Las personas responden de manera diferente a los agentes tóxicos, y no resulta

sorprendente que solo algunos miembros de una población similarmente expuesta a un determinado agente ambiental, desarrollen un padecimiento dado (Harden, 1990).

A pesar de que los científicos tienden a dividir a los marcadores biológicos en grupos, se hace evidente que hay un proceso continuo entre la salud y la enfermedad, y las evidencias indican que también existe un proceso continuo entre la exposición y el efecto (IARC, 1992). De acuerdo con esto, lo que una vez pareció ser un grupo más o menos discreto de marcadores biológicos, son ahora más difíciles de discriminar. Los marcadores biológicos se dividen mejor operacionalmente, dependiendo de cómo son identificados y cómo serán utilizados, pero las divisiones no deberían ser interpretadas en el sentido de distinciones a nivel de los mecanismos (NRC, 1989).

Si una dosis biológicamente efectiva se correlaciona con un efecto o concentración en un sitio periférico, esto puede funcionar útilmente en reemplazo de la dosis o efecto que estén ocurriendo en el tejido blanco. Esta sustitución puede ser utilizada como un marcador de exposición y efecto en el sitio de acción. Ellos incluyen indicadores de la dosis de sustancias tóxicas de acción directa como un metabolismo hepático alterado de hormonas sexuales, que pueden afectar la fertilidad (NRC, 1989) y señales de los compartimientos sustitutos, como la medición de la enzima deshidrogenasa del ácido delta amino levulinico (ALAD), que es un marcador biológico de efecto del plomo. (Singhal y Thomas, 1980; NRC, 1989). Ejemplos de marcadores que están relacionados muy de cerca con las dosis externa, la biológicamente efectiva y el estado clínico, es el uso de cromosomas dicéntricos para estimar la dosis de radiación recibida (Brandán y cols., 1990) y de los aductos de ADN en linfocitos o en proteínas plasmáticas como marcadores de la cantidad absorbida, la dosis en el sitio de acción y la posibilidad de cáncer (Perera y Weinstein, 1982; Wild y cols., 1993). La concentración de carboxihemoglobina (COHb), después de la exposición a monóxido de carbono ha sido también utilizada para indicar dosis interna y predecir efectos. El objetivo principal de la investigación en marcadores biológicos es el desarrollo de sustitutos que relacionen la exposición con el efecto (NRC, 1989).

Puede resultar arduo establecer la asociación entre marcadores biológicos de la exposición y del efecto. Por ejemplo, la concentración de plomo en sangre parece ser más un indicador directo de dosis interna que el incremento de protoporfirina eritrocítica libre inducido por plomo, el cual es claramente un efecto. En algunas situaciones clínicas, sin embargo, la protoporfirina libre es un marcador más válido de la carga corporal total de

plomo que el contenido de plomo en sangre, y puede también dar mejor información con respecto a la dosis biológicamente efectiva de plomo en los órganos blanco, como el cerebro (Lauwerys, 1983). A pesar de que la presencia de aductos de compuestos mutagénicos xenobióticos alquilantes en hemoglobina, en proteínas plasmáticas y en el ADN de linfocitos, refleja un efecto bioquímico, ellos también pueden ser considerados marcadores de dosis biológicamente efectiva de carcinógenos, que están uniformemente distribuidos (Perera y Weinstein, 1982; Shamsuddin y cols., 1985; Wogan y Gorelick, 1985; Wild y cols., 1993). A menos que el linfocito en sí mismo sea el precursor de un tumor, los aductos en el ADN de los glóbulos blancos (y su sustituto los aductos en hemoglobina) son considerados como marcadores indirectos de dosis biológicamente efectiva en el tejido blanco (NIEHS, 1985; Wild y cols., 1990)

## **MARCADORES BIOLÓGICOS DE SUSCEPTIBILIDAD**

Algunos marcadores biológicos indican acerca de la existencia de factores individuales o poblacionales que pueden afectar la respuesta a agentes ambientales. Estos factores son independientes de la ocurrencia de la exposición, a pesar de que la exposición a veces incrementa la susceptibilidad al efecto de posteriores exposiciones (por ejemplo, la sensibilización al formaldehído). Una característica intrínseca o una enfermedad preexistente que aumente la dosis interna o la dosis biológicamente efectiva, o que amplifique el efecto en el tejido blanco, puede ser un marcador biológico de susceptibilidad incrementada (NIEHS, 1985; Omenn, 1986; Harden, 1990). Estos marcadores pueden incluir diferencias congénitas en el metabolismo, variaciones en las concentraciones de inmunoglobulinas producidas y en su afinidad por el antígeno, baja capacidad de reserva orgánica, u otros factores ambiental o genéticamente inducidos que modifiquen la absorción, el metabolismo, la desintoxicación y el efecto de agentes ambientales (Harden, 1990).

## **PRINCIPIOS PARA LA SELECCION DE MARCADORES**

La selección de marcadores biológicos de exposición o de efecto se basa en un amplio conjunto de datos históricos de estudios *in vitro*, *in vivo*, epidemiológicos, y en mediciones de exposición y de propiedades fisicoquímicas del agente tóxico en cuestión. Los marcadores biológicos de exposición pueden obtenerse midiendo la concentración de una sustancia tóxica o sus metabolitos solos o unidos a ADN, ARN, proteínas o receptores en tejidos o fluidos corporales y en productos de excreción. El uso de marcadores puede

acompañarse del empleo de cuestionarios con la intención de estimar la duración y magnitud de la exposición, como ocurre en encuestas acerca de la historia laboral o la historia clínica (NRC, 1989).

### **Consideraciones biológicas**

Un enfoque mecanicista en los eventos básicos responsables de un efecto adverso sobre la salud, debe tomarse en la selección de un marcador biológico. Este debe de escoger o generar marcadores biológicos que puedan identificar los estados iniciales de la enfermedad; y que se conviertan en herramientas valiosas para desarrollar estrategias que prevengan la progresión de la enfermedad, y que permitan realizar un análisis de riesgo (WHO, 1985; NRC, 1989).

### **Limitaciones prácticas**

Idealmente, el uso de marcadores biológicos para monitorear poblaciones humanas involucra técnicas mínimamente invasivas. El análisis patológico de órganos, la irradiación con dosis elevadas de rayos X, la autorradiografía, o los ensayos de uniones covalentes, pueden ser utilizados para identificar sitios de actividad tóxica en animales de laboratorio, pero no pueden aplicarse directamente a poblaciones humanas. Métodos menos invasivos como el análisis de imágenes a través de resonancia magnética nuclear, pueden eventualmente hacer posible la estimación de las concentraciones de sustancias químicas específicas y de tipos especiales de efectos (por ej. los cambios en la energía celular y la fosforilación (Cohen y cols., 1983) en tejidos de difícil acceso. Pero por ahora, estos métodos resultan inapropiados para el monitoreo de poblaciones expuestas por razones de costo y de operabilidad; por lo que la detección debe ser hecha en compartimentos sustitutos (WHO, 1985; NRC, 1989).

Otro requisito en la elección de marcadores biológicos es que también debe involucrar pruebas que sean rápidamente aceptables para los individuos. A menos que un ensayo sea rápido, poco complicado y aceptable para el público en general, la participación será pobre (WHO, 1985).

Para otorgarle un valor predictivo a los marcadores biológicos, es necesario tener en cuenta la heterogeneidad de las poblaciones humanas, las cuales están compuestas de personas que difieren en edad, constitución genética, estado nutricional y de salud. También es indispensable identificar personas con la posibilidad de exhibir los efectos más tempranos y más severos de la exposición a agentes tóxicos ambientales. Los modelos

animales pueden ser a veces utilizados para estudiar los mecanismos biológicos de hipersusceptibilidad y examinar en detalle los efectos de los agentes tóxicos ambientales en grupos hipersusceptibles (NRC, 1989, 1992).

La relación entre las diferentes áreas de la Toxicología Ambiental y el papel que juegan los marcadores o indicadores biológicos se han esquematizado en la figura 1.

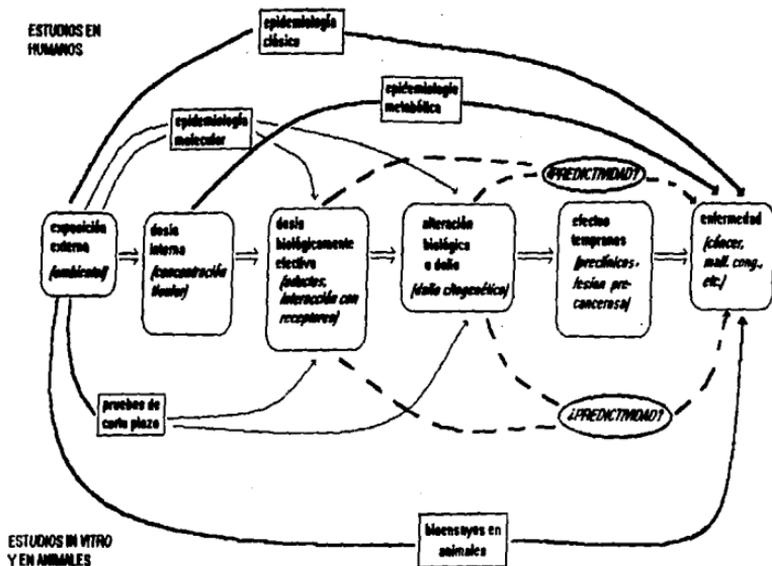


Figura 1. Diagrama que esquematiza las principales relaciones entre las diferentes categorías de investigación epidemiológica y experimental. Las líneas más delgadas indican las áreas de investigación de reciente desarrollo, mientras que las líneas interrumpidas representan relaciones que requieren de ser estudiadas [Schlichet, 1998]

## CAPITULO II

### **EL TEJIDO LINFOCITARIO COMO SUSTITUTO EN LA EVALUACION DE MARCADORES BIOLOGICOS DE EFECTO EN POBLACIONES HUMANAS.**

El sistema inmune consiste de aproximadamente  $2 \times 10^{12}$  linfocitos, los cuales circulan libremente en la sangre o se hallan en los espacios estructuralmente específicos de ciertos órganos como los nódulos linfáticos, el timo, el bazo y la médula ósea. En un sentido más amplio también incluye a los macrófagos, los cuales tienen una importante función como la de presentar antígenos y son además células efectoras; y a los granulocitos los cuales son mediadores y también células efectoras. En términos de masa celular, los linfocitos son equivalentes al hígado o al sistema nervioso central, y por lo tanto ocupan tanto lugar como estos sistemas de órganos.

Una gran proporción de los linfocitos se hallan en circulación constante de los órganos linfáticos a los linfáticos eferentes, de allí al ducto torácico y a la circulación sanguínea. Se logra, de esta manera una mezcla y una interacción ubicua de todas las células del sistema inmune.

Estas características generales, aunadas al hecho de que estas células se pueden obtener con técnicas poco invasivas para el ser humano, han hecho que sea considerado como un tejido sustituto más o menos ideal para investigar los efectos de la exposición a xenobióticos. Idealmente la determinación del xenobiótico se puede hacer en el plasma o en la sangre de los individuos, lo que permite tener una estimación de la dosis interna mientras que en los linfocitos se realizan evaluaciones de cito y genotoxicidad o efecto. Cuando las funciones del sistema inmune son perturbadas, se pueden originar las enfermedades autoinmunes y deficiencias inmunes congénitas que incrementan la susceptibilidad del organismo a una amplia variedad de infecciones por microorganismos. Medidas iatrogénicas como el uso de radiación ionizante o la quimioterapia con agentes alquilantes o antimetabolitos pueden también impedir las funciones del sistema inmune, temporal o permanentemente (Roitt, 1989). Existen factores y agentes capaces de inhibir la respuesta inmune celular a estímulos mitogénicos (Moller, y cols, 1989; Orson, y cols., 1989; McCarthy, y cols., 1990; Rodl y cols., 1990), de tal manera que la respuesta proliferante de los linfocitos resulta un indicador de esta función inmune, lo que permite evaluar los efectos citotóxicos e inmunotóxicos de la exposición.

## LA CINETICA DE PROLIFERACION Y EL INDICE MITOTICO COMO MARCADORES BIOLÓGICOS DE CITOTOXICIDAD

Numerosos son los trabajos que, utilizando la tinción de FPG (fluorescencia plus Giemsa; ver figura 2) descrita por Perry y Wolff (1974) o midiendo la incorporación de timidina tritiada al ADN, han investigado los cambios en la proliferación celular inducida por diversos agentes y factores tanto in vivo como in vitro (Hildebrand y cols., 1991). Aunque algunos de los autores han mencionado la importancia de relacionar los cambios en la proliferación celular con la exposición, pocos son los trabajos en donde se postula al índice mitótico y a la cinética de proliferación celular (CPC) como indicadores biológico de citotoxicidad y citostaticidad respectivamente (Rojas y cols., 1993), o como indicadores de inmunotoxicidad (NRC, 1992).

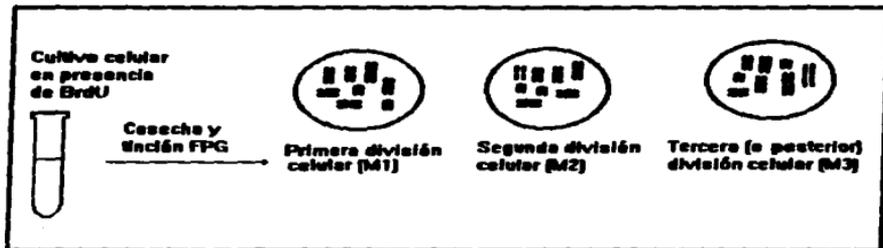


Figura 2. Esquema representativo de la diferenciación de cromátidas hermanas que se obtiene con la tinción diferencial FPG de Perry y Wolff (1974).

## ALTERACIONES EN LA PROLIFERACION POR AGENTES AGREGADOS "IN VITRO"

En muchos casos la capacidad para interferir con la proliferación celular se ha estudiado de manera paralela a la búsqueda de actividad genotóxica. Las drogas antineoplásicas que afectan la estructura del ADN, también son capaces de retrasar la CPC. Madle (1981) reporta inhibiciones que aumentan con la dosis en cultivos de linfocitos tratados con ciclofosfamida en mezcla S9. El mismo autor ha investigado los efectos de variaciones en las concentraciones de la mezcla S9 y los cofactores (NADP y glucosa-6-fosfato), y encuentra un retraso en el ciclo celular que relacionado con el incremento de las concentraciones de S9, debido probablemente a las altas cantidades de los metabolitos de la ciclofosfamida. De la misma manera la CPC se inhibe al aumentar las concentraciones de los cofactores.

Un poderoso agente alquilante como la mitomicina C (MMC), que inhibe la síntesis de ADN ha sido estudiado por Rojas y cols., (1992) con respecto a su capacidad para retrasar la CPC en cultivos de linfocitos de 5 donadores sanos. Los resultados indican una disminución de la frecuencia de M3 y del índice mitótico dependiente de la dosis, sin diferencias importantes entre las respuestas de los donadores. Un retraso similar se observa en cultivos de 72 horas tratados con cis-platino y melfalán, pero no en aquellos expuestos a 5-fluorouracilo, metrotrexate o 6-mercaptopurina. Las correlaciones entre el porcentaje de inhibición del índice mitótico y el índice de replicación son negativas para el melfalán, bleomicina y cis-platino; mientras que el comportamiento de estos dos parámetros no correlaciona en el caso de la 6-mercaptopurina, el 5 fluorouracilo y el metrotexate (Rojas y cols., 1993). Lialiaris y cols., (1989) describen un retraso en la CPC de linfocitos humanos tratados con diferentes complejos de diplatino. Estudios realizados con derivados esteroideos modificados del ácido p-bis(2-cloroetil-aminofenilacético) han demostrado que el compuesto ASE, la más prometedora de todas las moléculas estudiadas, debido a su excelente actividad antitumoral en varias neoplasias de rata y ratón, es también un inductor efectivo de retraso en la división celular en cultivos de linfocitos humanos (Mourelatos y cols., 1987). Existen otros trabajos en donde se ha investigado la capacidad de las nuevas drogas antitumorales para inhibir la proliferación de los linfocitos en cultivos. El NSC 294859, un agente alquilante nuevo, modificado, es un efectivo inhibidor de la proliferación de linfocitos, incrementando la frecuencia de M1 en los cultivos (Tselipi y cols., 1989).

La capacidad de los rayos X de provocar retraso en la progresión del ciclo celular está bien establecida (Purrot y cols., 1980; Dutrillaux y cols., 1985; Al-Ackar y cols., 1988). Estos trabajos han permitido además, establecer una relación entre el daño inducido por los rayos X y la progresión de la división celular en el sentido de que la probabilidad de encontrar células con rearrreglos cromosómicos y que hayan llevado a cabo más de tres divisiones es altamente improbable.

La cafeína inhibe la reparación en células de mamíferos que han sido tratadas con agentes que dañan el ADN (Cleaver, 1969). También se ha observado que inhibió la proliferación de los linfocitos humanos pero solo con tratamientos in vitro crónicos, por encima de 0.5 mM, ya que cuando los linfocitos se exponen durante la fase G0 no se evidencia ningún efecto sobre la CPC (Guglielmi y cols., 1982). La interferencia de la cafeína con la reparación del daño causado por citostáticos podría, según Petrou y cols. (1990), incrementar el número de lesiones no reparadas en el momento en que las células llegan a la fase S de la división celular in vivo o in vitro, retrasando la proliferación celular e induciendo ICH.

Los radicales oxígeno, generados por la hipoxantina y la xantina oxidasa o por la fotorreducción de las flavinas en los cultivos de linfocitos, reducen el índice mitótico y retrasaron la CPC (Emerit, 1984).

El acetaldehído, primer metabolito de la oxidación del etanol, provoca un retraso en la división de linfocitos humanos, dependiente de la dosis en sujetos sensibles y normales (Böhlke y cols., 1983).

Las resinas acrílicas utilizadas frecuentemente en la cirugía, odontología y oftalmología son capaces de reducir la tasa del índice de proliferación en linfocitos estimulados con PHA sin efectos claros sobre la estructura del ADN (Bigatti y cols., 1989).

La exposición al benceno se ha relacionado con una alta frecuencia de leucemias; el benceno en sí mismo no ha demostrado inducir daño genotóxico (IARC, 1987). Sin embargo, sus metabolitos, en particular los derivados del catecol, son responsables de los efectos genotóxicos inducidos in vivo e in vitro. Asimismo, todos los metabolitos del benceno tienen la habilidad de reducir la proliferación de los linfocitos, siendo los derivados del catecol los más efectivos (Morimoto y Wolff, 1980).

Antiparasitarios como la dihidroemetina (antiamibiano), niclosamida (antihelmíntico) y el ketoconazol (antimicótico) inhiben la proliferación de linfocitos humanos estimulados con PHA cuando se les agrega *in vitro* (Ostrosky y cols., 1984).

Una ventaja de usar el método de la FPG en los estudios de genotoxicidad es que es posible analizar en paralelo el daño en la estructura del ADN y sus efectos en la progresión de la división celular. Esto ha llevado a algunas correlaciones entre ambos fenómenos como es el hecho que aquellos agentes que inducen daño cromosómico severo producen también una reducción en la velocidad de proliferación celular (Morimoto, 1984).

### ESTUDIOS DE CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN SÍNDROMES Y ENFERMEDADES

Los linfocitos de los individuos afectados por síndromes como la anemia de Fanconi (AF) proliferan más lentamente que los de individuos sanos (Morimoto y cols., 1984; Nazareno y Burmakina, 1984). Se ha descrito además, que los linfocitos de los individuos con AF son más sensibles al tratamiento con MMC que los de individuos sanos (Morimoto y cols., 1984; Frías y cols., 1991). Sin embargo en el caso de otro síndrome asociado también con defectos de reparación, como el síndrome de Bloom, sus linfocitos responden de manera similar a los linfocitos de individuos sanos de acuerdo a los reportes de Ray y German (1984).

Las aneuploidías asociadas a síndromes como el de Klinefelter no parecen producir diferencias en la CPC en distintas horas de cultivo y después del tratamiento con MMC (Yamagata y cols., 1989). Dutrillaux y Fose (1976) encuentran un ciclo celular más rápido que en personas normales, en los linfocitos de pacientes con síndrome de Down. Subsecuentemente Crossen y Morgan (1980) confirman estos hallazgos con un análisis de la CPC 72 horas después de estimularlos con PHA.

Se ha investigado también la cinética en los linfocitos de pacientes con enfermedades malignas, antes y después de la terapia. No se observan diferencias en los linfocitos de pacientes con cáncer de esófago (Adhvaryu y cols., 1988a) y mama (Adhvaryu y cols., 1988b) o con neoplasia endócrina múltiple tipo II (Butler y cols., 1987). Por otro lado, Adhvaryu y cols. (1988c) y Slavutsky y cols. (1988) reportan diferencias entre la CPC de linfocitos de testigos y pacientes con cáncer de ovario o adenoma y cáncer

de colon respectivamente. Los linfocitos estimulados con PHA de pacientes con melanoma maligno no familiar, muestran una CPC menor que los de sus parientes no afectados o que donadores no afectados (Ghidoni y cols., 1984).

El efecto de la quimioterapia sobre la CPC también ha sido estudiada. Gebhart y cols.(1980) detectan un retraso en el ciclo celular relacionado a la duración del tratamiento antineoplásico que utiliza varios agentes como la metilnitrosourea, el 5-fluorouracilo y la vincristina. Por el contrario, niños con más de tres años en remisión de leucemia linfoblástica aguda y por lo menos 9 meses sin quimioterapia exhiben una CPC más rápida que la observada para niños normales (Schuler y cols., 1981). Singh y D'Ambrosio (1984), trabajando con linfocitos aislados de pacientes bajo terapia de citostáticos encuentran que la mayoría de los protocolos de tratamiento, retardan la proliferación celular aunque la droga de elección no interactuase directamente con el ADN.

Las enfermedades infecciosas como las parasitosis alteran la capacidad de respuesta de los linfocitos a la estimulación a mitógenos (Kierszenbaum y cols., 1990; Sztejn y cols., 1990). Montero y cols.(1994) reportan en cultivos de pacientes con neurocisticercosis una mayor proporción de M1 en relación al porcentaje que se observa en los testigos sanos. Este retraso en la CPC se normaliza en algunos pacientes después del tratamiento con praziquantel, lo que sugiere que la infección y/o la terapia producen efectos inmunomoduladores. Otras drogas antiparasitarias como la colistina, un péptido antibiótico ampliamente utilizado para el tratamiento de la disentería y la colitis gastroentérica aguda y crónica y para infecciones provocadas por Pseudomonas, inducen un retraso en la proliferación celular cuando se agregaron in vitro a dosis de 142 y 214 unidades/ml (JaJu y cols., 1983).

La CPC también ha sido se investigada en individuos vacunados contra la rubeola (Alicata y cols., 1988). Estas personas muestran una proporción aumentada de células en su cuarta división celular después de 14 días de la vacunación, la cual disminuye para el día 28. Estudios realizados con otros factores inmunológicos como el interferón alfa de leucocitos humanos (IFN), denotan que éste produce una inhibición dependiente de la dosis (10-1000 UI/ml) en la división celular, aumentando los valores del tiempo promedio de proliferación (TPP) en linfocitos humanos pero no en células tumorales (Georgian y cols., 1986). Sin embargo, Lazutka y cols., (1989) describe un acortamiento en el TPP producido por la incubación por 24 horas con IFN a una concentración de 50 UI/ml. Moore y cols. (1984), analizando los cambios en la cinética de marcaje de las diferentes clases de ADN

sintetizado, encuentran una inhibición inducida por IFN, de la proliferación en líneas linfoblastoideas.

La desnutrición calórica severa también influye en la capacidad de proliferación de los linfocitos estimulados por PHA, provocando una CPC ligeramente aumentada en comparación con la observada en los testigos sanos (Mutchinick y cols., 1979).

## ESTUDIOS DE LA CPC EN CASOS DE EXPOSICION AMBIENTAL

La capacidad proliferante de los linfocitos se ha estudiado también en relación a exposición ambiental u ocupacional. Ostrosky y cols. (1991) reportan que los linfocitos de individuos expuestos crónicamente a As en el agua de bebida proliferan más lentamente que los de no expuestos y relacionan esta observación a un probable efecto inmunosupresor de la exposición crónica.

El efecto sobre la CPC de los linfocitos humanos, de las partículas suspendidas en el aire de zonas industriales en Alemania ha sido investigada por Hadnagy y cols.(1986). Estos investigadores observan una reducción en la proliferación celular en los extractos más concentrados del smog citadino. Por el contrario, cuando se analiza el efecto del SO<sub>2</sub> en células de una fábrica de ácido sulfúrico, Meng y Zhang (1990) no encuentran una diferencia entre la tasa de proliferación de los linfocitos de los individuos expuestos y los testigos.

El hábito de fumar afecta el sistema inmune("Smoking and Health", 1979). Husgafvel-Pursiainen (1987) observa un incremento en la frecuencia de M3 tanto en fumadores pasivos como en activos. Midiendo la incorporación de timidina tritiada al ADN como parámetro de proliferación, se demuestra que los linfocitos T de lavados pulmonares de fumadores manifiestan una respuesta menor que los testigos al estímulo de la PHA, efecto que no se observa en los linfocitos obtenidos de sangre periférica (Daniele y cols., 1977). Obe y cols.(1982) observan que los no fumadores presentan una mayor proporción de M2 en cultivos a 48 horas que los fumadores. Rupa y cols.(1989) por su parte mencionan que individuos fumadores que habían aplicado pesticidas de diferentes tipos, muestran un incremento significativo de M1, su magnitud está relacionada con la duración de la exposición. La CPC de los fumadores no expuestos es más rápida que el de los no fumadores no expuestos.

Ramírez, (1994) describe que el índice mitótico y el índice de replicación se inhiben en cultivos mixtos de linfocitos en donde la respuesta inmune celular se halla disminuida.

#### **FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR EN LA INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:**

Uno de los puntos más controvertidos para el análisis de los cambios que sufre la CPC es la variabilidad inter- e intra-individual en la respuesta mitogénica de los linfocitos.

Hay estudios que resaltan las diferencias en la estimulación por PHA, en los linfocitos humanos entre donadores (Lamberti y cols., 1983; Dewdney y cols. 1986). Speit y cols.(1986) observan variaciones individuales y temporales en la cinética de replicación en muestros repetidos de dos donadores sanos a lo largo de un año. La variabilidad individual en la respuesta a mitógenos o a agentes tóxicos puede ser alterada por una variedad de factores. Tice y cols.(1979) y Wen y Liew (1983) reportan que la velocidad de replicación disminuye con la edad de los donadores. Los sujetos de edad avanzada y los pacientes con un síndrome con características progeroides tienen un decremento en la tasa de proliferación celular en relación a la de individuos sanos y a la obtenida en cultivos de recién nacidos (Melaragno y Smith, 1990).

Las variaciones en la proporción de células T y B entre individuos podrían ser fuente de variabilidad interindividual. Lindblad y Lambert (1981) han reportado que la cinética de proliferación de los linfocitos T y B cultivados y estimulados con PHA bajo condiciones similares, es ligeramente más rápida para los linfocitos T. En 1987, Miller confirmó estas observaciones utilizando linfocitos T y B purificados, en condiciones en donde las células son de varios donadores y estimuladas con mitógenos diferentes. Modificaciones en las condiciones de cultivo pueden también influenciar la cinética de replicación de los linfocitos produciendo variaciones intra-individuales. Por ejemplo, células estimuladas en medio TC 199 muestran un ciclo celular más largo que las cultivadas en medio Ham F- 10 y McCoy's 5a (Obe y cols., 1975; Mutchinick y cols., 1980). Wolff y cols.(1984) describen que las células cultivadas en medio RPMI 1640 en ausencia de suero fetal de ternera (FCS) y de antibióticos proliferan más rápidamente que las células cultivadas en el mismo medio con FCS y antibióticos. Estos hallazgos coinciden con reportes previos en los que se usaron otros parámetros para medir la CPC (Auf der Maur y Berlinecourt-Bohni, 1979). Sin embargo existen trabajos en donde se afirma que la presencia o ausencia de FCS no altera la cinética de proliferación (Mutchinick y cols., 1980

y Sinha y cols., 1984). Además, no se observan diferencias marcadas en cuanto a la cinética cuando se compara la proliferación de linfocitos humanos cultivados en solución salina de Hank suplementado con plasma autólogo o en medio RPMI 1640 (Gonsebatt y Mutchinick, 1990).

Speit y cols. (1986) comparan las características de la proliferación en cultivos paralelos de linfocitos en sangre entera o aislados. Los resultados muestran similitud en promedio, aunque la CPC fue ligeramente menor en los cultivos de linfocitos aislados. De la misma forma, Larramendy y cols. (1990) encuentran una CPC retardada cuando la comparan en cultivos de linfocitos humanos o de cerdos aislados, con cultivos de sangre entera. Cuando se les agrega glóbulos rojos humanos o de cerdos a la hora 0 de la estimulación con PHA, la frecuencia de M1, M2 y M3 no son diferentes de los valores observados en los cultivos de sangre entera. Estudios en los que las células no se separan y se identifican con las técnicas de FPG y MAC (morfología, anticuerpos, cromosomas), demuestran que las porciones relativas de linfocitos T y B son las mismas antes y después de la estimulación con PHA o con el mitógeno pokeweed (PWM), proliferando más rápidamente aquellas células estimuladas con PWM (Larramendy y Knuutila, 1990).

La respuesta mitogénica que ocurre en la estimulación *in vitro* parece depender del mitógeno utilizado. La PHA y los extractos de *Wistaria floribunda* son más activos que los extractos de *Lens culinaris*, la mayor mitogenicidad podría relacionarse al mayor número de sitios de unión a carbohidratos de las primeras dos moléculas (Deknudt, 1982; Deknudt y Kamra, 1983).

Los anticoagulantes como el ácido cítrico o el EDTA (ácido acético-tetraetilendiamino), que quelan el ión  $Ca^{2+}$ , retrasan el ciclo celular de los linfocitos de sangre periférica con respecto a aquellos cultivos provenientes de sangre heparinizada (Tucker y Christensen, 1987). Este hecho coincide con la reducción en el índice mitótico observado por Littlefield y cols.(1984), cuando los cultivos son tratados con quelantes de calcio o zinc.

Si bien existen numerosos factores que pueden potencialmente modificar las condiciones de proliferación de las células y particularmente de los linfocitos en cultivo, cuando las condiciones experimentales son homogéneas y existen testigos adecuados, las evidencias son claras en el sentido de que la proliferación de los linfocitos en cultivo refleja la condición de los sujetos estudiados. En síndromes en donde la respuesta inmune se

encuentra comprometida, en individuos con enfermedades infecciosas o con exposiciones crónicas; en pacientes bajo radio o quimioterapia; en cultivos en donde no se espera respuesta inmune, el índice mitótico se encuentra disminuido y la cinética de proliferación celular es más lenta o se encuentra inhibida.

## **LAS ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN CULTIVOS DE LINFOCITOS COMO INDICADOR BIOLÓGICO DE GENOTOXICIDAD**

El daño al ADN puede ser visualizado a nivel cromosómico. Las aberraciones cromosómicas pueden ser estudiadas en cualquier población celular en ciclo, o que no esté en ciclo pero que pueda ser estimulada por un agente mitogénico. En animales hay varios tipos celulares que cumplen estos criterios, pero para estudios en humanos con cualquier propósito, se dispone de sólo dos tipos de células a las que se puede tener acceso de una manera práctica. Estas son las células de médula ósea, las cuales son una población en constante proliferación y los linfocitos de sangre periférica, los que normalmente no se están dividiendo, pero pueden ser estimulados in vitro cultivándolos con un mitógeno como la fitohemaglutinina (PHA) (WHO, 1985)

Debido a la fácil obtención de sangre, en contraste con las muestras de células de médula ósea, el ensayo con linfocitos ha sido utilizado en la mayoría de los estudios concernientes a la inducción de aberraciones cromosómicas en humanos (WHO, 1985).

Desde que Moorhead y cols. (1960) reportaron que los linfocitos podían ser estimulados con PHA y ser observados en metafase, se ha obtenido una enorme cantidad de datos sobre la inducción de alteraciones por radiación y agentes químicos usando este sistema (Preston y cols., 1981).

Comúnmente se asume que este ensayo es simple e informativo para el monitoreo en humanos, proveyendo de información sobre exposiciones potencialmente clastogénicas (o mutagénicas). Sin embargo, se debe hacer énfasis en que tal observación debe ser tomada en cuenta con cautela en el caso de supuestas exposiciones a agentes químicos, y se debe apreciar la distinción obvia para su uso en exposiciones a radiación (WHO, 1985).

Ya se han mencionado los aspectos relevantes de la cinética de proliferación celular en los cultivos de linfocitos. El estudio de estos marcadores biológicos (índice mitótico, CPC y aberraciones cromosómicas) se puede hacer simultáneamente. Debido a que algunos

rearreglos cromosómicos son inestables y se pierden al dividirse la célula, es necesario estudiar este tipo de daño en las metafases de las primeras divisiones. El agregado de BrdU facilita esto (Mutchinick y cols., 1982).

El tipo de aberraciones observado en los cultivos de linfocitos de individuos expuestos depende del agente con el que estuvieron en contacto. La radiación ionizante y un pequeño número de agentes químicos como la estreptonigrina, la bleomicina, la neocarzinostatina, la citocina arabinósida y la 8-metoxicafeína, son capaces de producir aberraciones en todos los estadios del ciclo celular, incluyendo aberraciones de tipo cromosómico en G1 y cromatídicas en S y G2 (Natarajan y Obe, 1984; WHO, 1985).

Cuando los linfocitos se ponen a cultivar, están esencialmente todos en la fase G0 de su ciclo celular, por lo que después de recibir radiación ionizante la aberraciones de tipo cromosómico serán inducidas en estos linfocitos en G1 y se podrán observar en la primera metafase después del estímulo mitogénico. El hecho de que se puedan producir aberraciones en células en G1 significa que su frecuencia puede relacionarse directamente con la dosis recibida. Además, para muchas especies, incluyendo al hombre (Brewen y cols., 1972), se ha mostrado que la frecuencia de aberraciones inducidas in vitro es la misma que la provocada por la misma dosis in vivo (Brewen y Gengozian, 1971; Preston y cols., 1972; Clemenger y Scott, 1973). Esto significa que una curva estándar dosis-respuesta, para cualquier tipo de radiación, puede obtenerse con exposiciones in vitro y puede usarse para estimar las dosis recibidas por individuos como resultado de accidentes durante exposiciones médicas o ambientales (Brandán y cols., 1990).

Con base en el éxito del sistema de linfocitos para la estimación de exposición a radiación, parecía apropiado analizar aberraciones cromosómicas en muestras de sangre de individuos expuestos ocupacionalmente a agentes químicos o a mezclas complejas de éstos (Office of Technology Assessment, US Congress, 1983), para determinar si había exposición a un clastógeno, y para correlacionar frecuencias de aberraciones con la dosis de la sustancia. Sin embargo, la estimación de dosis a partir de aberraciones en poblaciones expuestas a mutágenos químicos no es tan confiable como en el caso de la radiación hasta el momento (WHO, 1985).

La baja sensibilidad de los ensayos actuales para poder correlacionar la frecuencia de aberraciones cromosómicas con la exposición a agentes químicos se debe a los mecanismos de inducción de aberraciones por esos agentes. Estos mecanismos pueden dar

como resultado de la inducción de frecuencias de aberraciones indirectamente relacionadas con la dosis, en contraste con las aberraciones inducidas por radiación (Vogel y Natarajan, 1993).

Para que el daño al ADN inducido por tratamientos químicos, se traduzca en aberraciones cromosómicas las células deben pasar por la fase S. Así, la mayoría de las aberraciones serán de tipo cromatídico, aunque hay excepciones a esta hipótesis general (Evans y Vijayalaxmi, 1980; Preston y Gooch, 1981). Por lo tanto, es más apropiado considerar que la probabilidad de inducir aberraciones en células en  $G_1$  o en  $G_2$  después de un tratamiento con agentes químicos es baja, pero es considerablemente incrementada cuando las células tratadas están en, o pasan por, la fase S.

El daño al ADN inducido por agentes químicos en linfocitos no ciclantes no se convertirá en aberraciones hasta que las células sean estimuladas a entrar en ciclo in vitro, y empezar la duplicación del ADN. Dado que el daño al ADN puede ser reparado en las células en  $G_0$  así como durante el largo primer estadio de  $G_1$ , la frecuencia de aberraciones no será necesariamente proporcional a la cantidad de daño inducido al ADN sino más bien a la cantidad de daño que se mantiene en el momento de la duplicación. Queda claro que la cantidad de daño al ADN presente en el momento de la duplicación, el cual tiene el potencial de transformarse en aberraciones, dependerá de diversos factores, incluyendo: (a) la dosis recibida; (b) la cantidad inducida del tipo particular de daño al ADN que puede originar aberraciones (un valor que puede variar con el agente); (c) la cantidad de reparación en las células en  $G_0$  antes del muestreo (v.g. el tiempo entre la exposición y el muestreo); y (d) la cantidad de reparación en células en  $G_1$  a partir de la estimulación mitogénica hasta la primera fase S in vitro. Muchos de estos puntos estarán sujetos al mismo tiempo a variaciones individuales. El resultado es que, para la mayoría de los agentes químicos, sólo una proporción del daño inducido al ADN efectivamente se convierte en aberraciones en el momento de la duplicación. Estos factores de reparación del ADN reducen la sensibilidad del linfocito para la medición de exposición a agentes químicos, lo que originará una frecuencia de aberraciones que en el mejor de los casos es sólo indirectamente proporcional a la exposición (WHO, 1985).

Si se observa un incremento en las aberraciones cromosómicas en grupos potencialmente expuestos comparados con grupos testigos se puede concluir que ha habido exposición a un agente clastogénico, pero no se puede estimar el nivel de exposición o de los efectos en la salud adversos subsecuentes (genéticos o somáticos), para ello se utiliza la

**correlación de estos marcadores de efecto con marcadores biológicos de exposición. Por el otro lado, si no hay diferencias en la frecuencia de aberraciones entre los grupos expuestos y sus grupos testigos asociados, no es posible descartar exposición. Sin embargo en este caso, puede ser posible, con base en la experiencia previa, deducir un nivel de exposición máxima que no esté asociada con una diferencia notable a nivel de la frecuencia de aberraciones (WHO, 1985).**

## CAPITULO III

### EL ARSENICO COMO XENOTOXICO

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

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

Las propiedades de este elemento eran conocidas ya por los griegos. Hipócrates recomendaba el uso del  $As_4S_4$  para el tratamiento de úlceras. Muchos pueblos europeos utilizaban el arsénico en el alimento del ganado ya que incrementaba el peso. Diferentes soluciones arsenicales se recomendaban como tónico, ya que aumentaba el peso y el vigor de las personas. También se le empleó, ya en forma de compuesto inorgánico (solución de Fowler, solución de Donovan) o como organoarsenical (Salvarsan, Neosalvarsan) para combatir enfermedades como la anemia, la leucemia mielocítica crónica, psoriasis y asma bronquial o la sífilis, la disentería amibiana, la tripanosomiasis y la tricomoniasis. En estas aplicaciones clínicas fue en donde se notaron sus efectos adversos, que discontinuaron su uso terapéutico (IARC, 1980).

### **Distribución ambiental y transporte**

En sitios sin contaminación las concentraciones de arsénico en el aire son despreciables (WHO, 1981). Attrep (1977) demostró la presencia de As orgánico e inorgánico en las partículas aéreas. En los años cuarenta en Inglaterra se observó que la concentración de óxidos inorgánicos de As aumentaba de  $0.007\mu\text{g}/\text{m}^3$  a  $0.04\text{--}0.14\mu\text{g}/\text{m}^3$  en los meses de invierno, probablemente por la incineración de carbón vegetal para la calefacción (Bencko, 1987).

Concentraciones entre 2.3 y 312 mg/kg se han reportado en plantas de energía eléctrica generada por la combustión de carbón (EPA, 1984). El quemado de carbón mineral, de madera tratada con defoliantes o conservadores que contienen arsénico y la fundición de metales, constituyen la fuente principal de arsénico en el aire (Bencko, 1987; Vahter, 1988; Diaz-Barriga y cols., 1993).

El agua es la forma principal de transporte natural de este metaloide. En agua oxigenada el arsénico se encuentra usualmente como arseniato (sal pentavalente) pero en condiciones reductoras, por ejemplo, en pozos muy profundos, la forma trivalente (arsenito) predomina. La sedimentación del arsénico en asociación con el hierro y el aluminio es considerable. En el suelo se produce biometilación y la liberación de arsénico metilado al aire (WHO, 1981).

El agua puede estar naturalmente contaminada con arsénico al ponerse en contacto con sedimentos ricos en sales. Elevadas concentraciones de As se han encontrado en fuentes geotérmicas o en pozos (Borgono y cols., 1977; Tseng y cols., 1977; Cebrían, 1983; Sastre y cols., 1992). El depósito de las cenizas generadas por la combustión de carbón mineral de una planta generadora de energía eléctrica, elevó las concentraciones de arsénico en el agua de un río hasta  $0.21\text{ mg/l}$ , destruyendo a la mayoría de los microorganismos de ese sitio (Bencko, 1987).

Por medio de la agricultura se distribuyen grandes cantidades de arsénico en el suelo. En los suelos oxigenados el arsénico se encuentra en su forma pentavalente. La lixiviación del arseniato es lenta por su unión con los hidruros de hierro y aluminio. A pesar de ello, la bioacumulación del arsénico en los productos agrícolas no es alta (Vahter, 1988).

**Tabla 1. FORMULA DE LOS COMPUESTOS ARSENICALES MAS COMUNES**

Trióxido de arsénico	$As_2O_3$ o $As_4O_6$
Arsenito	$AsO_3^-$ , $AsO_2^-$
Arseniato	$AsO_4^{3-}$ , $HAsO_4^{2-}$ , $H_2AsO_4^-$
Trisulfito de arsénico	$As_2S_3$
Arsenuro de Galio	$GaAs$
Acido metilarsónico (MMA)	$CH_3AsO(OH)_2$
Acido metilarsínico (DMA)	$(CH_3)_2AsO(OH)$
Arsenobetaina	$(CH_3)_3As^+CH_2COO^-$
Arsenocolina	$(CH_3)_3As^+CH_2CH_2OH X^-$
Arsina	$AsH_3$
Trimetilarsina	$(CH_3)_3As$
Oxido de trimetilarsina	$(CH_3)_3As=O$

Vahter (1987)

### Exposición

La exposición humana al arsénico inorgánico ocurre por razones laborales, ambientales y desde luego a través de accidentes. En la Tabla 2 se resumen las formas más frecuentes de exposición a As.

La exposición por inhalación se da por razones ocupacionales o por fumar. El rango encontrado en el aire de áreas urbanas va de los  $0.002 \mu\text{g}/\text{m}^3$  a  $0.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Alrededor de fundidoras se han registrado valores de  $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Bencko, 1987).

**Tabla 2. FORMAS MAS FRECUENTES DE EXPOSICION A ARSENICO**

**Ocupacional** La exposición ocupacional ocurre principalmente por el arsénico inorgánico (óxido de arsénico) en el aire del ambiente de trabajo, como en:

- Fundidoras de metales como el cobre, oro, plomo y antimonio.
- Plantas productoras de arsénico (óxido de arsénico) y de pesticidas que contienen arsénico.
- En plantas generadoras de energía eléctrica a través de la combustión de carbón mineral.

**Ambiental** La exposición ambiental ocurre de manera natural por:

- Consumo de agua con elevadas cantidades de arsénico o,
- Consumo de alimentos (marinos)

O por la contaminación de:

- Fuentes de agua potable (ríos, lagos).
- El ambiente alrededor de las plantas fundidoras o productoras de arsénico inorgánico.

**Introgénica** Por el uso de medicamentos (principalmente antiparasitarios) que contienen arsénico: carbarsone, melarsoprol y triparasamida.

El agua potable contiene normalmente pocos  $\mu\text{g}$  por litro, pero la actividad industrial y/o agrícola han producido contaminaciones severas (por encima de 1 mg/l) en pozos. Además el agua puede contaminarse naturalmente con elevadas cantidades de As por el elevado contenido del metaloide en rocas del subsuelo, como ocurre en la región del norte de Chile y Argentina y en algunas zonas de la Comarca Lagunera, en el Noreste de México. El vino y el agua mineral contienen a veces niveles altos: en un muestreo de vinos de mesa en Estados Unidos, la mitad de las cantidades de arsénico determinadas excedían 0.05 mg/litro, el límite establecido por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1993) hasta 1993.

Las concentraciones de arsénico en la mayoría de los alimentos están por debajo de 1mg/kg. Los peces marinos pueden contener hasta 5 mg/kg de peso húmedo, los crustáceos marinos y los peces que se alimentan del fondo marino pueden contener elevadas concentraciones de As. En estos organismos la mayor proporción de As se encuentra como arsénico orgánico. En algas comestibles se han detectado niveles de arsénico que van de los 19 a los 172 mg/kg de peso seco. La acumulación en tejidos de aves y cerdo se da por la existencia de As en el alimento. En la población general, la ingesta diaria promedio es de menos de 0.2 mg por día, lo que varía si se consumen alimentos marinos (WHO, 1981).

La exposición terapéutica al As se ha producido por el antiguo uso en la medicina de productos arsenicales. La solución de Fowler (arsenito de sodio) ha sido utilizada para el tratamiento de leucemias y psoriasis y también como tónico en dosis de varios mg por día (Bencko, 1987; ATSDR, 1989).

La exposición ocupacional ocurre esencialmente a través de la inhalación de partículas que contienen arsénico. Ello se ocurre principalmente en o alrededor de fundidoras, o en la fabricación y el empleo de pesticidas que contienen arsénico (ATSDR, 1989).

### **Metabolismo**

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

### **Arsénico inorgánico**

Estudios en humanos y en diferentes especies animales han demostrado que posteriormente a la administración de As III y/o As V, se encuentran metabolitos metilados en la orina, entre los que predominan el DMA (ácido dimetil arsénico) y el MMA (ácido monometil arsénico) y una porción menor se elimina como As inorgánico. Se considera que el proceso de biometilación es un proceso desintoxicante, en la medida que los metabolitos orgánicos tienen menor afinidad por los tejidos y son más fácilmente eliminados por el riñón que el As inorgánico. Resulta interesante destacar que Yamanaka y cols. (1989 y 1990) han descrito que un metabolito del DMA, al reaccionar con oxígeno

molecular, genera un radical peróxido el cual se señala como inductor de rupturas en la cadena de ADN.

Crecelius (1977) determinó la presencia de compuestos orgánicos de As en orina humana, posterior a la ingestión de vino contaminado con As III, agua de bebida contaminada con As V y de alimentos de origen marino que contenían As orgánico. La presencia de DMA y MMA en orina demostró que el As inorgánico es biometilado in vivo, mientras que el As orgánico ingerido es eliminado en orina sin cambio alguno (Tam y cols., 1978, 1979a, b, c; Buchet y cols., 1981a, 1981b, 1982). La capacidad de biometilación en especies como rata, ratón, criceto, conejo y gato demostró diferir en cuanto a la excreción y distribución de metabolitos (Odanaka y cols., 1979; Vahter y Norin, 1980; Vahter, 1981 y Rowland y Davis, 1982). Ello hace que resulte difícil estudiar la toxicología del arsénico en animales de laboratorio.

Bertolero y cols. (1981) investigaron las relaciones entre la biotransformación del As y su unión a los tejidos. Encontraron que dicha unión depende en gran parte de la interacción del As inorgánico con componentes celulares, concluyendo que el proceso de biometilación disminuye la fijación del As a los tejidos, favoreciendo su eliminación.

Estudios de Mahieu y cols. (1981) en individuos intoxicados agudamente con As inorgánico, mostraron que aún cuando inicialmente la excreción de As inorgánico predomina, al noveno día después de la exposición el DMA y el MMA representaron el 95% del As excretado en la orina.

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

El arsénico ingerido es principalmente excretado a través del riñón, aunque existen otras vías de remoción en pequeñas cantidades. Como tiene gran afinidad por la piel (Vahter, 1988) la descamación diaria de la misma, ofrece una ruta de eliminación calculada entre 0.1-0.2  $\mu\text{g}/\text{día}$ . Las personas no expuestas eliminan por el pelo cantidades de arsénico alrededor de los 0.3  $\text{mg}/\text{kg}$ .

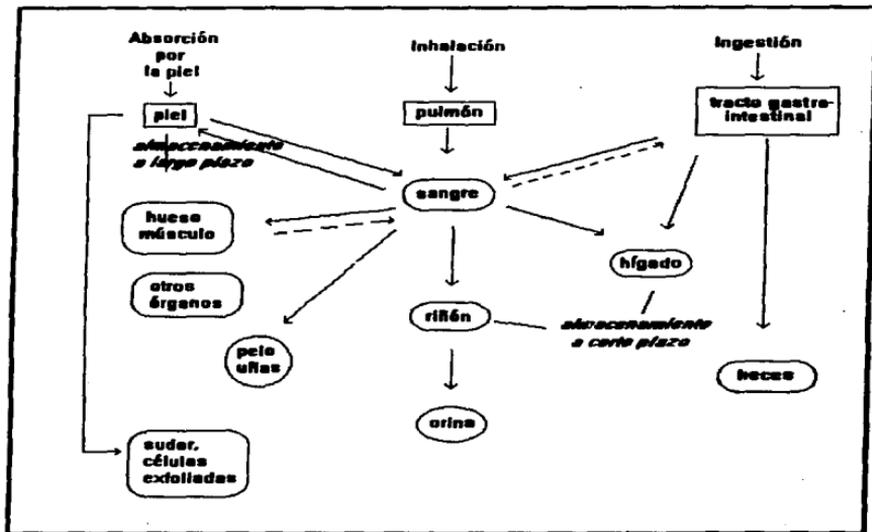
La cinética del arsénico inorgánico una vez incorporado al organismo se describe en la figura 3, mientras que en la 4 se presenta el proceso celular de desintoxicación (metilación del As).

#### **Indicadores biológicos de exposición a As**

La medición de los niveles de As en orina resulta un indicador biológico adecuado de exposición ya que los estudios de toxicología han demostrado que se excreta principalmente por esta vía. Es importante poder diferenciar entre el arsénico ingerido a través de alimentos de origen marino y los metabolitos del As inorgánico, por la toxicidad diferencial de los mismos, como vimos antes. Los niveles basales en personas no expuestas se estiman entre los 10-50  $\mu\text{g}/\text{l}$  (Vahter, 1988).

El As inorgánico es rápidamente depurado del plasma por lo que su detección en plasma podrá reflejar exposición por un breve periodo. Los niveles evaluados para personas no expuestas son 1.5-2.5  $\mu\text{g}/\text{l}$  (Vahter, 1988; ATSDR, 1989).

En el pelo, que como ya se mencionó anteriormente es un sitio de depósito, se observan niveles por debajo de 1  $\text{mg}/\text{kg}$ , para personas no expuestas. El problema al utilizar el contenido de As en el pelo como marcador de exposición, es que no es posible saber con certeza si el As cuantificado se debe al As ingerido o al depositado por contaminación externa (Vahter, 1988).



**Figura 3. Cinética del arsénico inorgánico. Vías de absorción, metabolismo, excreción y acumulación (Vahter, 1988)**

## EFFECTOS BIOLÓGICOS DEL As

### **Arsénico orgánico**

Existen aún medicamentos que utilizan arsénico orgánico para el tratamiento de parasitosis. Los efectos iatrogénicos se han descrito principalmente a nivel del sistema nervioso central. Encefalopatías con un tasa de mortalidad del 62.5% fue observada en el 1.5% de 1066 pacientes tratados con triparasamida para la tripanosomiasis; otro conocido efecto del tratamiento era la atrofia del nervio óptico (Bencko, 1987; ATSDR, 1989).

Efectos tóxicos a nivel del sistema nervioso han sido producidos en animales experimentales alimentados con dosis altas de ácido arsenilico, el cual es usado como un aditivo en la alimentación de aves y cerdos. Los datos disponibles indican que la toxicidad del arsénico orgánico presente en los alimentos de origen marino es baja, y los datos acerca de la carcinogenicidad de los compuestos organoarsenicales son escasos (Bencko, 1987; Vahter, 1988; ATSDR, 1989).

### **Arsénico inorgánico**

Los efectos tóxicos de la exposición a arsénico inorgánico en animales experimentales y en el hombre, se resumen en las figuras 5 y 6 (ATSDR, 1989).

En la intoxicación aguda y subaguda con As inorgánico se manifiestan síntomas a nivel de los sistemas respiratorio, gastrointestinal, cardiovascular, nervioso y hematopoyético. El As trivalente es más tóxico que el pentavalente. El As en solución es más tóxico que el As no disuelto, probablemente porque en solución se absorbe mejor (WHO, 1981).

La lesión principal de una intoxicación aguda con As inorgánico es el daño gastrointestinal con vómito y diarrea. Otros síntomas incluyen calambres musculares, edema facial y anormalidades cardíacas. Los individuos que sobreviven a intoxicaciones agudas, frecuentemente desarrollan problemas a nivel sensorial del Sistema Nervioso Periférico (WHO, 1981).

Efectos subagudos a compuestos irritantes como el óxido de As (III) en el aire, incluyen daño severo en las membranas mucosas del sistema respiratorio y de la piel

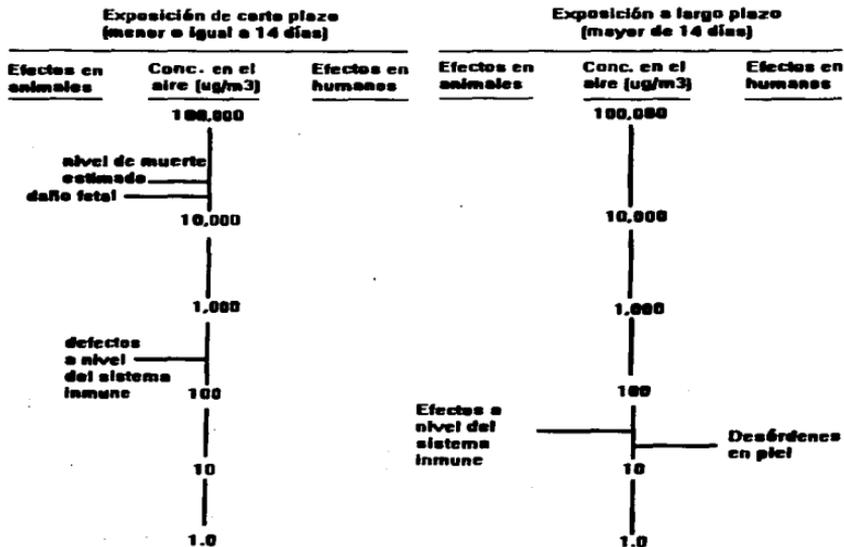


Figura 5. Efectos en la salud por inhalación de As inorgánica (ATSDR, 1989)

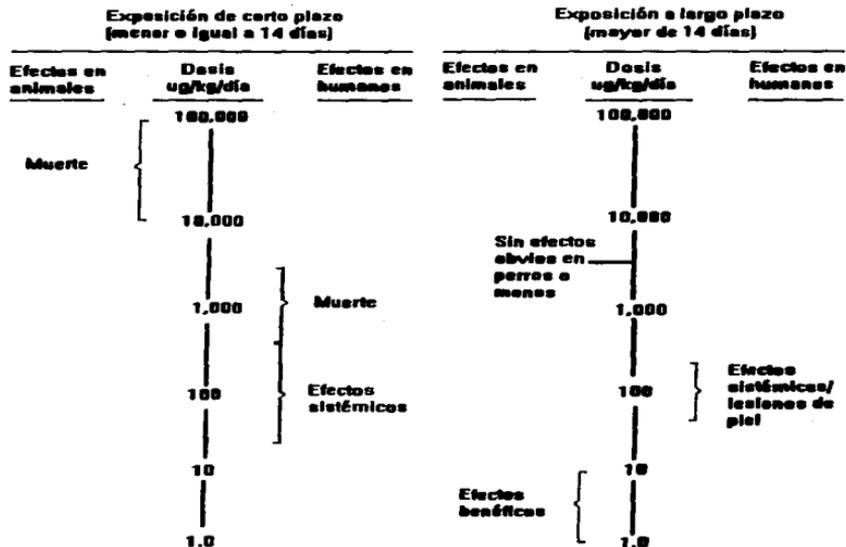


Figura 6. Efectos en la salud por ingestión de As inorgánica (ATSDR, 1989)

expuesta. Son frecuentes las perforaciones del septo nasal, irritación intensa de la mucosa nasal, laringe, bronquios y canal auditivo. Estos síntomas pueden además acompañarse de conjuntivitis y dermatitis. El sistema hematopoyético sufre también efectos caracterizados por anemia y leucopenia (granulopenia) (WHO, 1981; Bencko, 1987).

Exposiciones crónicas a niveles elevados de As inorgánico en trabajadores de fundiciones, producen lesiones en el tracto respiratorio superior y hasta perforaciones en el septo nasal. Alteraciones en la piel como hiperqueratosis palmoplantar, se desarrollan en individuos expuestos a niveles elevados de As en el agua de bebida, o en personas que están bajo medicación prolongada con soluciones como la de Fowler. Otros síntomas dermatológicos incluyen hipo e hiperpigmentaciones, aunque las lesiones hiperqueratosas son raras entre los trabajadores de las fundidoras (WHO, 1981; Bencko, 1987; ATSDR, 1989).

Se han observado alteraciones en las funciones hepáticas, tanto en animales como en el hombre, debidas a exposiciones crónicas a arsénico inorgánico. Datos epidemiológicos y toxicológicos indican que el daño hepático severo puede degenerar en cirrosis (Bencko, 1987).

Debido a que el As inorgánico (As III) tiene efecto sobre el sistema hematopoyético, ha sido utilizado durante mucho tiempo como un agente terapéutico para varias formas de leucemia, a menudo en dosis de varios mg/día. En algunos estudios en animales tratados con arsénico se ha observado una resistencia disminuida a infecciones virales (WHO, 1981).

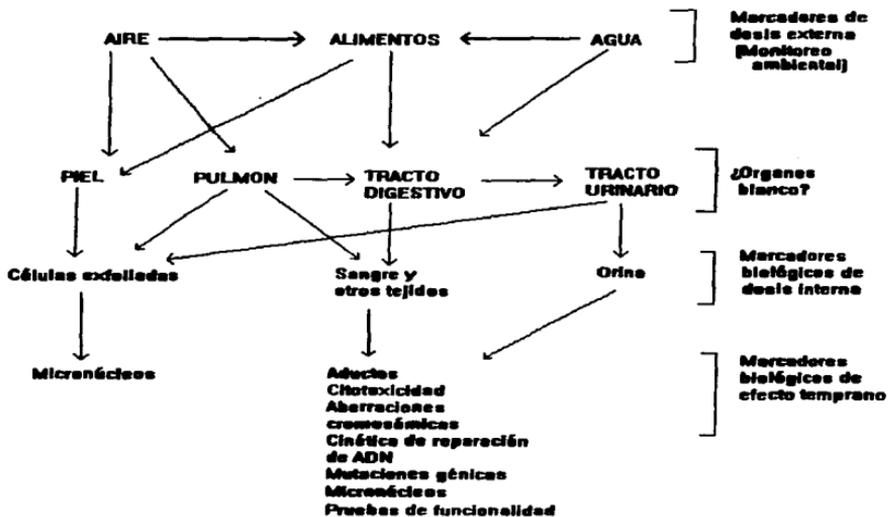
En algunos países como Chile, China, Argentina y México se han descrito enfermedades de tipo vascular en individuos expuestos diariamente a niveles por encima de 1 mg de As inorgánico (Tseng y cols., 1968; Zaldivar, 1974; García Salcedo y col., 1984). En nuestro país existen poblaciones rurales aisladas expuestas crónicamente a As inorgánico a través del agua de bebida. Esta exposición se ha asociado con una elevada prevalencia de alteraciones cutáneas y cáncer de la piel, aunada a afecciones vasculares periféricas y otras lesiones que disminuyen la calidad y la esperanza de vida (Cebrián y cols., 1983; García Salcedo y cols., 1984). Estudios similares realizados en Taiwán demostraron que el hidroarsenicismo no sólo se halla asociado a una mayor incidencia de cáncer de piel, sino que también la mortalidad debida a cáncer de vejiga, riñón, pulmón, hígado y colon se encuentra incrementada (Vahter, 1988).

Nordström y cols. (1978a,b y 1979a,b) encuentran una elevación en la tasa de nacidos muertos y de abortos entre las mujeres que trabajaban o vivían cerca de fundidoras en Suecia. En Hungría, Börzönyi y cols.(1992) reportan datos similares cuando comparan la frecuencia de nacidos muertos y de abortos entre dos áreas con altos (0.17-0.33 mg/l) y bajos (0.05-0.1 mg/l) niveles de As en el agua de bebida.

Con la intención de dilucidar los mecanismos involucrados en la toxicidad del arsénico se han estudiado marcadores biológicos de genotoxicidad en poblaciones expuestas. Frecuencias elevadas de aberraciones cromosómicas y de intercambios de cromátidas hermanas se han observado en cultivos de linfocitos de personas que han estado en contacto con el metaloide por razones médicas y laborales (Burgdoff y cols., 1977; Petres y cols., 1977; Nordenson y cols., 1978, 1979; Wen y cols., 1981). Sin embargo, también hay datos negativos (Burgdof y cols., 1977; Nordenson y cols., 1979). La Agencia Americana de Protección Ambiental (EPA) ha considerado que estas evidencias poseen limitaciones de diversa índole, por lo que considera que los datos existentes acerca de la clastogenicidad y la mutagenicidad del As en seres humanos no son concluyentes (EPA, 1984).

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

La relación entre las formas y vías de exposición de los organismos a arsénico, y los marcadores biológicos asociados a ella se esquematizan en la figura 7.



**Figura 7. Vías de exposición a As inorgánica y marcadores biológicos.**

## CAPITULO IV

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Recientemente realizamos un estudio piloto en un grupo de 11 habitantes de la Región Lagunera, con el propósito de evaluar la utilidad de diversos indicadores biológicos en la detección del posible daño genético producido por la exposición crónica a As (Ostrosky-Wegman y cols., 1991). La frecuencia de aberraciones cromosómicas y de intercambios de cromátidas hermanas fue similar en ambas poblaciones, aunque las aberraciones complejas (anillos, translocaciones, dicéntricos, etc.) fueron más frecuentes en el grupo expuesto. Un hallazgo importante de este trabajo fue la disminución en la cinética de proliferación celular en los cultivos de linfocitos de los individuos expuestos a arsénico. Estos resultados sugieren que la exposición a As altera la respuesta inmune celular en individuos expuestos, lo que podría contribuir a explicar la mayor incidencia de cáncer de piel que se ha reportado en la Región Lagunera, ya que se ha comunicado que pacientes inmunosuprimidos desarrollan neoplasias similares en piel (Walder y cols., 1974; IARC, 1992).

La inhibición de la proliferación en cultivos de linfocitos se utiliza para identificar sustancias y factores que modifican la respuesta inmune celular inducida por lectinas como la fitohemaglutinina (Orson y cols., 1989; Moller y cols. 1989; Mc Carthy y cols., 1990; Rodl y cols., 1990). Además, existen datos que indican que la supresión o disminución crónica de la respuesta inmune por fármacos (sustancias químicas) o por radiación, favorecen o se hallan asociadas con la aparición de ciertos tipos de cáncer (Zbinden, 1989; Sneller y Swober, 1990; IARC, 1992). Esto sugiere que el estudio de la estimulación y de la cinética de proliferación de linfocitos en individuos crónicamente expuestos, podría constituir un indicador de riesgo valioso para el monitoreo biológico de exposición a As y a otros contaminantes ambientales.

El hidroarsenicismo en poblaciones humanas constituye un problema de salud que puede resolverse evitando el consumo de agua contaminada, o eliminando mediante diferentes técnicas de extracción, el As del agua de bebida mediante el empleo de diferentes estrategias (Cusimano y cols., 1992; Sancha y cols., 1992; Sastre y cols., 1992).

La exposición que se provoca por la producción y la utilización industrial del arsénico en la fundición de metales, la combustión de carbón mineral en las plantas de energía eléctrica o en las geotérmicas, la disposición de las cenizas de la combustión mineral, la producción y e inadecuada disposición de envases que contienen pesticidas y herbicidas ricos en arsénico, resulta mucho más difícil e improbable de remover. La identificación de marcadores tempranos de daño por la exposición a arsénico inorgánico en poblaciones humanas, resulta entonces, una herramienta importante para el monitoreo de daño y la prevención del mismo.

Otro elemento que hace relevante la investigación de marcadores en grupos humanos expuestos, es el que los modelos de exposición crónica a As en animales, se han encontrado con el escollo de que el metabolismo del arsénico es diferente en los animales y en el hombre (Tamm, 1979).

Los hallazgos iniciales en esta población expuesta durante varios años y aun varias generaciones, a concentraciones elevadas de arsénico, nos lleva a plantear la necesidad de profundizar en una muestra más amplia sobre el efecto de la exposición crónica al arsénico en la frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas y en la cinética de proliferación de los linfocitos. Ello permitiría caracterizar con mayor certeza este último parámetro y discutir su utilidad como indicador temprano (marcador) de daño citotóxico y en la detección de individuos en riesgo de desarrollar cáncer o padecimientos asociados a la supresión crónica del sistema inmune.

### **HIPOTESIS GENERAL DE TRABAJO**

La capacidad citostática y genotóxica de las sales arsenicales permiten postular que la exposición crónica a arsénico a través del agua de bebida, modifica la proliferación estimulada con PHA, de los linfocitos en cultivo, e incrementa la frecuencia de aberraciones cromosómicas en este tejido.

## **OBJETIVO GENERAL DE TRABAJO**

**La evaluación de marcadores biológicos de citotoxicidad y de genotoxicidad, en individuos crónicamente expuestos a diferentes concentraciones de arsénico a través del agua de bebida en la Región Lagunera de México.**

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1. Determinar la posible utilidad de la cinética de proliferación de linfocitos como marcador del daño inmunológico producido por la exposición a arsénico.**
- 2. Estimar la carga corporal de arsénico y sus metabolitos en los individuos estudiados, empleando como parámetros las concentraciones de arsénico en sangre y orina.**
- 3. Determinar las relaciones existentes entre la carga corporal de arsénico de los individuos estudiados, los parámetros de citotoxicidad evaluados y los efectos en la salud de los marcadores biológicos estudiados.**
- 4. Evaluar la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales en cultivos de linfocitos de los mismos individuos para correlacionarlos con la exposición y con los parámetros de citotoxicidad.**
- 5. Investigar los efectos de arsenito, arseniato sobre las distintas fases de la respuesta mitogénica de los linfocitos, como son la síntesis de ADN y la mitosis en cultivos de donadores no expuestos.**

## MATERIAL Y METODOS

### Marcadores de citotoxicidad

Se tomaron como criterios de citotoxicidad al índice de marcaje (IMC), índice mitótico (IM), y a la cinética de proliferación (CPC) medida como la proporción de primeras, segundas y terceras divisiones a diferentes horas de cultivo y al índice de replicación ( $IR = \%primeras + 2 \times \%segundas + 3 \times \%terceras / 100$ ) (Ivett y Tice, 1982).

### Marcadores de genotoxicidad

Se evaluó la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales en metafases de primera división in vitro. Las metafases evaluadas tenían como mínimo 45 centrómeros. Las aberraciones estructurales se clasificaron en rompimientos cromatídicos o isocromatídicos y en rearrreglos cromatídicos o cromosómicos de acuerdo a los criterios del WHO (1985).

### Estudio poblacional

El estudio poblacional fue precedido por la caracterización de los parámetros demográficos y socioeconómicos de las poblaciones a estudiar (Ostrosky-Wegman y cols., 1991).

**Individuos a estudiar.** Se eligieron dos poblados rurales de la Comarca Lagunera: los habitantes de Santa Ana Coah. se consideraron como los individuos expuestos, ya que la concentración de arsénico en el agua de bebida ha sido superior a los 0.300 mg/l durante los últimos 8 años (Del Razo y cols., 1990). Una muestra de habitantes de Nazareno Dgo. fueron escogidos como la población testigo, ya que durante los últimos dos años los niveles de As en el agua han oscilado entre 0.019 y 0.026 mg/l (Del Razo y cols., 1990). Se estudiaron 30 individuos del poblado expuesto (la mitad aproximadamente tenía signos cutáneos de hidroarsenicismo crónico) y 30 del poblado testigo. Se eligieron preferentemente individuos de 20 a 60 años de edad. Se elaboraron historias clínicas, especialmente sobre los aspectos dermatológicos, al interrogarlos mediante cuestionarios que incluían antecedentes ocupacionales, tabaquismo, alcoholismo, tipo de dieta, condiciones socioeconómicas, etc., así como el tiempo de residencia en el lugar.

**Criterios de inclusión y exclusión.** Se consideraron los siguientes criterios de inclusión: i) Ser mayor de 20 años. ii) Haber vivido por lo menos 10 años en su respectivo poblado.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes: i) Antecedentes de exposición reciente y directa a plaguicidas, fertilizantes y medicamentos hormonales durante los últimos 3 meses; ii) Ingestión de bebidas alcohólicas durante los últimos 5 días o que sufrieran de alcoholismo crónico. iii) Individuos que estuvieran bajo tratamiento medicamentoso.

**Toma de muestras.** Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción en las primeras horas del día, fueron codificadas y transportadas inmediatamente por vía aérea al laboratorio, para iniciar los cultivos de linfocitos. Al mismo tiempo se recolectaron muestras de la primera emisión de orina por la mañana, las cuales se depositaron en frascos de plástico inerte previamente lavados con ácido nítrico al 10% en agua y enjuagados con agua bidestilada y desionizada. Se tomaron al azar cuatro muestras de agua en hogares de los dos poblados, para certificar los niveles de As. El muestreo de agua no se hizo más extensivo pues la fuente de este líquido es única para cada poblado.

**Estudios de cito y genotoxicidad.** Los cultivos de linfocitos se hicieron de la siguiente manera: se colocaron 0.5 ml de sangre periférica en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina y aminoácidos no esenciales. La proliferación de los linfocitos se estimuló mediante el agregado de 0.2 ml de la lectina fitohemaglutinina (PHA), Microlab, México, Lote N° 197 y después de 24 horas de iniciados los cultivos, se agregó el análogo de base bromodesoxiuridina (BrdU) SIGMA, U.S.A., a una concentración final de 32  $\mu$ M, para poder detectar las células en fase de síntesis de ADN (inducida por el mitógeno) y la cinética de proliferación. (excepto los cultivos de 36 h). La cosecha se realizó centrifugando los cultivos para extraer el medio de cultivo, a 800 x g durante 10', el botón celular se colocó durante 15-20' en 5 ml de solución hipotónica de KCl 0.075 M para provocar la dispersión de los cromosomas, después de lo cual se la extrajo, también por centrifugación y las células se fijaron en 3 cambios de fijador: metanol-ácido acético glacial (3:1). Las células fueron goteadas en laminillas y secadas a la flama.

El material depositado en las laminillas fue teñido para su análisis al microscopio. En el caso de los cultivos cosechados a las 36 horas, con anticuerpos anti-BrdU, revelados con peroxidasa (Montero y cols. 1991). Los cultivos cosechados a las 48, 60 y 72 horas, con la técnica de fluorescencia más Giemsa (Perry y Wolff, 1974).

Dado que el contenido celular en 0.5 ml de sangre puede variar de individuo a individuo, se realizó un conteo de leucocitos en cámara de Neubauer y un conteo diferencial para cuantificar el número total de linfocitos por cultivo, para cada individuo. De esta manera se pueden relacionar los parámetros de citotoxicidad, con el número de células por cultivo. Las células se cosecharon a 36, 48, 60 y 72 horas, después de agregar 0.2 ml de colcemid (Micolab) dos horas antes

**Índice de Marcaje:** Se contó la proporción de células marcadas en un total de 2500 núcleos, lo cual constituye el Índice de Marcaje (IMC).

**Índice Mitótico:** Se determinó calculando la proporción de núcleos en metafase de un total de 2000 núcleos consecutivos.

**Cinética de proliferación:** Para evaluar la cinética de proliferación se determinó la proporción de primeras, segundas y terceras o subsecuentes, metafases en 100 mitosis consecutivas para cada horario de cultivo, excepto el de 36 h. Con los datos se estimó el índice de replicación IR.

El IMC revela la proporción de linfocitos que han incorporado el análogo BrdU a las 36 horas de cultivo, período en el que se asume las células se encuentran en las fases S o G<sub>2</sub> del primer ciclo celular. El IM establece la proporción de núcleos que se encuentran en metafase mientras que el IR estima la cinética de la proliferación, su valor mínimo es 1 (sólo primeras divisiones) y el máximo es 3 (sólo terceras divisiones).

**Aberraciones cromosómicas:** El análisis de aberraciones cromosómicas se realizó en 100 metafases consecutivas de primera división. Todas con 45 o más centrómeros. El daño cromosómico se clasificó como: brechas cromatídicas o cromosómicas, rompimientos cromatídicos o cromosómicos, e intercambios cromatídicos (cuadrirradiales y trirradiales) o cromosómicos (dicéntricos, anillos, translocaciones) (Ostrosky-Wegman y cols., 1991)

**Determinación de arsénico en muestras de sangre, orina y agua.** Para la determinación de exposición, se cuantificó el arsénico presente en la orina y en el plasma. Ella se llevó a cabo en el Laboratorio de Toxicología del CINVESTAV. Brevemente, las muestras fueron digeridas de acuerdo con el método de Cox (1980) y se determinaron por absorción atómica a través de la generación de hidruros. El arsénico inorgánico y las formas metiladas se cuantificaron por la técnica de Foa (1984). Las muestras se analizaron contra

estándares de referencia de orina para metales tóxicos (SRM 2670) y de plasma construidos con diferentes concentraciones de arsénico.

## **ESTUDIOS "IN VITRO"**

Se realizaron cultivos de linfocitos de manera similar a la mencionada anteriormente, con sangre de 4 (dos hombres y dos mujeres) donadores sanos, no fumadores.

El tratamiento de los linfocitos con arsenito (As III) y arseniato (As V) de Na se hizo de dos formas diferentes: cuando estos estaban proliferando activamente y cuando se encontraban en fase  $G_0-G_1$ . Para el primer caso, el lote de cultivos se trataron a las 48 horas de incubación, cosechándose 24 horas después, de manera similar a la descrita anteriormente. En el segundo grupo de cultivos, las células se pusieron en contacto con las soluciones arsenicales antes de iniciar los cultivos, durante 2, 6 y 24 horas, las sales se removieron mediante lavados o se dejaron presentes en el medio de cultivo. Los cultivos se cosecharon a las 72 horas de iniciados.

Las concentraciones de arsenito y arseniato utilizadas fueron  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$  M, (similares a las encontradas en el plasma de los individuos expuestos).

Las laminillas codificadas se tñeron mediante la tinción de FPG para su posterior análisis al microscopio. Los parámetros de proliferación utilizados en este caso fueron el índice mitótico y las proporciones de M1, M2 y M3, con las que se calculó el índice de replicación.

*Análisis exploratorio de los datos obtenidos.* Se utilizaron pruebas de correlación lineal entre los distintos marcadores estudiados. Para las pruebas de hipótesis en el caso de las variables: concentración de As en orina y de sangre, IMC, IM, IR y frecuencia de aberraciones, se utilizó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney, primero de una sola cola y luego de dos colas para probar el alcance de la significancia. La prueba de Kruskal-Wallis se utilizó para el análisis de varianza (ANOVA) y la comparación múltiple no paramétrica de Dunn para diferenciar medias (Zar, 1984.)

## CAPITULO V

### RESULTADOS

#### **Marcadores de exposición:**

##### **Arsénico en muestras de agua, sangre y orina**

Las muestras de agua de Santa Ana revelaron un promedio de 0.412 mg/l con una desviación estándar de 0.016, en tanto que las de Nazareno promediaron 0.037 mg/l con un desviación estándar de 0.018 (Tabla 3a). Como punto de comparación para estos valores podemos mencionar que la norma internacional para el límite superior de arsénico inorgánico en el agua potable era de 0.050 mg/l hasta 1993, cuando la Organización Mundial de la Salud recomendó reducirla a 0.010 mg/l (WHO, 1993), por lo que los valores del agua de Santa Ana estuvieron por lo menos un orden de magnitud por encima de la norma internacional.

En las muestras de sangre se determinaron promedios de  $17.6 \pm 16.9 \mu\text{g/l}$  y de  $34 \pm 27.3 \mu\text{g/l}$  para testigos y expuestos, respectivamente. En orinas se encontró un promedio de  $36 \pm 36 \mu\text{g/l}$  de arsénico total, en los individuos testigos y de  $758.4 \pm 364.0 \mu\text{g/l}$  en los expuestos. La diferencia entre ambos grupos no fue significativa en el caso de la muestras de sangre, pero sí para las muestras de orina. Estos resultados se presentan en la tabla 3a, junto con otros parámetros de la poblaciones estudiadas como son la edad y el tiempo de residencia de los individuos estudiados. No hubo diferencias significativas entre estos parámetros poblacionales (U de Mann-Whitney de dos colas,  $p > 0.05$ ), mientras que la misma prueba mostró significancia ( $p < 0.01$ ) para los marcadores de exposición (arsénico en muestras de agua y de orina). En las tablas 3b y c se presenta el cálculo de la exposición ponderada a As por tiempo de residencia, para expuestos y testigos respectivamente. Esta variable se calculó multiplicando la concentración promedio de As en el agua de bebida por el tiempo de residencia (García Vargas, 1994), se puede observar que los individuos expuestos se estuvieron en su casi totalidad por encima de los  $5999 \mu\text{g As/l x años}$ .

#### **Marcadores de citotoxicidad**

Los individuos expuestos tuvieron, como grupo, una mayor proporción de linfocitos que los individuos testigos en sus muestras de sangre, sin embargo cuando los datos se

analizaron tomando en cuenta el sexo de los donadores, la diferencia fue significativa sólo entre las mujeres (Tablas 4a, b y c).

Los IMC entre testigos y expuestos no fueron significativamente diferentes (Tablas 5a, b y c), sin embargo cuando los datos de los individuos expuestos se correlacionaron con la presencia o ausencia de lesiones de piel se encontró que los IMC de los individuos con lesiones de piel, fueron significativamente menores que en los individuos sin lesiones de piel. Las lesiones se presentaron en individuos mayores de 28 años con más de 10 años de residencia en Santa Ana. Para estudiar el efecto de la edad y del tiempo de residencia sobre este parámetro, se compararon mediante un análisis de varianza de Kruskal-Wallis las edades y los tiempos de residencia de los individuos, hombres y mujeres con y sin lesiones de piel; la ANOVA fue significativa para los tiempos de residencia, pero no para las edades). Un análisis de comparaciones múltiples, no paramétrico, de Dunn (Zar, 1984) mostró significancia ( $p < 0.05$ ) entre los tiempos de residencia de las mujeres pero no entre la de los hombres (Tabla 5c).

Los índices mitóticos obtenidos a las distintas horas de cultivo se presentan en las tablas 6a, b y c. No se notaron diferencias significativas entre expuestos y testigos a 48 y 60 horas de cultivo (U de Mann-Whitney,  $p > 0.05$ ). Los individuos expuestos mostraron una elevación significativa del IM en los cultivos cosechados a las 72 h ( $p < 0.01$ ; Tabla 6c). Hombres y mujeres con lesiones de piel mostraron menores índices mitóticos a las 48 horas, manteniendo las mujeres esta tendencia también a las 60 horas, invirtiéndose en los cultivos a 72 horas. En los hombres esta diferencia desaparece o se invierte entre las 60 y 72 horas.

Los IM de metafases en primera división en los cultivos de 48 horas se correlacionaron con los IMC obtenidos en los cultivos de 36 horas. Los índices provenientes de los individuos testigos se relacionaron linealmente como se puede observar en la figura 8. La ecuación de la recta que describe esta relación es:  $Y = 0.022 + 0.44 X$ ; siendo el coeficiente de correlación  $r = 0.8579$  con una  $p < 0.0001$ . La relación entre ambos parámetros en el caso de los individuos expuestos no fue lineal ( $Y = 0.56 + 0.2 X$ ;  $r = 0.4419$ ;  $p = 0.0210$ ). Ambas pendientes fueron significativamente diferentes.

Los índices de replicación obtenidos en los cultivos testigos y expuestos fueron significativamente distintos en las tres horas de cultivo (Tablas 7a, b y c). Cuando se tomó en consideración la presencia de lesiones de piel, sólo a 48 horas las mujeres con lesiones

mostraron una reducción. Las diferencias encontradas en el grupo expuesto fueron debidas a los menores índices de replicación obtenidos en las mujeres y en los hombres sin lesiones, según el análisis de varianza de Kruskal-Wallis. Se linealizaron los índices de replicación de hombres y mujeres testigos y expuestos, con respecto a las diversas horas de cultivo en que fueron evaluados (Fig. 9). De esta manera es posible calcular el tiempo de proliferación para varios valores de Y. Por ejemplo, es posible calcular el tiempo de proliferación para cuando  $Y = 1$ , es decir cuando teóricamente todas las células serían M1. El valor de X (tiempo de proliferación) para  $Y = 1$ , fue de 46.23 horas para los expuestos y de 44.87 horas para los testigos. Como la BrdU se agregó a las 24 horas de iniciados los cultivos, podemos sustraerlas de los valores obtenidos. De esta manera para un I.R. de 1, el tiempo de proliferación promedio sería de 22.23 horas para los expuestos y de 20.87 para los testigos, mientras que para un I.R. de 2, el cálculo da 54.20 y 47.17 horas para expuestos y testigos respectivamente.

Los IM y los IR obtenidos en las distintas horas de cultivo se correlacionaron positivamente en testigos y expuestos, como se puede observar en la figura 10. El coeficiente de correlación para los testigos fue de  $r=0.57$ ,  $p<0.0001$  y para los expuestos  $r=0.7392$ ,  $p<0.001$ . Ambas correlaciones resultaron ser significativamente diferentes cuando se les aplicó una prueba de "t" de Student de una sola cola, con una  $p<0.05$ .

La cantidad de linfocitos en cada muestra no se correlacionó linealmente con los índices de marcaje, mitótico y de replicación. Los IMC, IM e IR no se correlacionaron linealmente con la concentración urinaria y plasmática de As o la edad de los individuos o el tiempo de residencia o la exposición ponderada.

Cuando los mismos marcadores se agruparon de acuerdo a los siguientes intervalos de exposición ponderada:  $<5999 \mu\text{g As/l}^\circ\text{años}$ ,  $6000-12000 \mu\text{g As/l}^\circ\text{años}$  y  $>12001 \mu\text{g As/l}^\circ\text{años}$ , se obtienen los datos que se presentan en la tabla 8. Los tres índices de estimulación y proliferación celular fueron mayores (con la excepción del IM a 72 h) en los individuos con Exposición Ponderada  $<6000 \mu\text{g As/l}^\circ\text{años}$ . Esta diferencia fue significativa para los índices de replicación.

### Resultados de los experimentos "in vitro"

En los experimentos realizados "in vitro" se demostró que la presencia o el tratamiento de los linfocitos con sales arsenicales en concentraciones similares a las reportadas en los individuos expuestos, inhibe su estimulación y su proliferación. Esta inhibición es mayor cuando el tratamiento es más prolongado (Tabla 9) y cuando el tratamiento se hace en ausencia del estímulo mitogénico. Cuando los linfocitos se encuentran proliferando también ocurre una inhibición de su cinética, relacionada con la dosis empleada (Fig. 11), como se puede observar en la disminución de los índices de replicación y mitótico (Tabla 10; Fig. 11).

### Marcadores de genotoxicidad

La frecuencia y los tipos de aberraciones cromosómicas de las poblaciones estudiadas se presentan en las tablas 11 y 12. Los individuos expuestos presentaron un porcentaje mayor de aberraciones de tipo cromatídico e isocromatídico que los individuos testigos. Asimismo el porcentaje de células con aberraciones en la población expuesta se encontró aumentada. No se halló correlación lineal entre el porcentaje de células con aberraciones y la edad o el tiempo de residencia, ni tampoco con la presencia de lesiones de piel. Con respecto a la Exposición Ponderada, los individuos con  $>6000 \mu\text{g As/l}^*\text{años}$  presentan una frecuencia de aberraciones mayor del doble de la encontrada en los individuos con menos de  $6000 \mu\text{g As/l}^*\text{años}$  (Tabla 8). 3 de los individuos expuestos habían sido estudiados anteriormente como se muestra en la tabla 11, observándose que el tipo y la frecuencia de aberraciones encontradas en este segundo estudio, realizado 4 años después, no difieren.

Se analizó la cinética de proliferación con respecto al daño cromosómico observado. En los individuos testigos no se manifestó una relación lineal de dependencia entre la cinética y el daño ( $r=0.209$ ,  $p=0.3$ ), sin embargo en el caso de los individuos expuestos se observó que el IR así como el porcentaje de M1 a 72 hs. (porcentaje de células que completan su primera división tardíamente), se correlacionaron linealmente con el porcentaje total de aberraciones, siendo sus coeficientes  $r=-0.432$ ,  $p=0.02$  y  $r=0.632$ ,  $p<0.001$ , respectivamente (Fig. 12).

## DISCUSION

La exposición crónica al As a través del agua de bebida, modifica la respuesta de proliferación inducida por PHA, en los linfocitos circulantes e induce daño cromosómico en estas células.

La PHA inicia una serie de eventos y procesos celulares similares a los que ocurren durante la respuesta inmune iniciada por los linfocitos T ayudadores (Klaus y Hawrylowicz, 1984). Estos son activados por la presencia de antígeno(s) foráneo(s) y de interleucina 1, y comienzan a sintetizar interleucina 2 y receptores para interleucina 2, eventos indispensables para la progresión de las fases G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> a la de síntesis de ADN (fase S). Algunos linfocitos pueden entrar a S 20 horas después de la estimulación y otros tardarse hasta 72 horas (Klaus y Hawrylowicz, 1984; Kovanen y Knuutila, 1989). Los individuos expuestos presentaron un mayor número de linfocitos circulantes (particularmente las mujeres) y una menor proporción de células en fase S después de 36 horas de estimulación con PHA (Tabla 5c). A las 48 y 60 horas la proporción de células en metafase también fue menor (Tabla 6c). El tratamiento in vitro de linfocitos con concentraciones de arsenito y arseniato similares a las encontradas en el plasma de los individuos expuestos, produjo una inhibición del IM, siendo ésta mayor cuando el tratamiento se realizó antes de iniciar los cultivos, en la fase en que se encontraban en la circulación sanguínea. Estas observaciones indican que la exposición a As inhibe o retarda la activación inducida por la PHA. Este efecto es más pronunciado en los individuos expuestos que presentan lesiones de piel (Tabla 5c), las que constituyen un síntoma clínico de intoxicación por arsénico (Goyer, 1991).

El análisis de la cinética de proliferación demostró que los cultivos de los individuos expuestos y los cultivos tratados in vitro presentaron índices de replicación menores que los testigos. Esta diferencia fue mayor en las mujeres expuestas y corrobora los datos obtenidos en observaciones previas realizadas en un estudio piloto. En este grupo de 9 mujeres y 2 hombres de la misma población, se encontró una cinética de proliferación más lenta (Ostrosky-Wegman y cols., 1991).

En individuos no expuestos Anderson (1988) describió que la transformación blastogénica inducida por PHA era mayor en mujeres que en hombres. También se han reportado diferencias genéricas a nivel de la respuesta inmune en varias especies de ratón

(Huber y cols., 1981; Rifkind y Frey, 1972; Rifkind, 1972; Anderson y Hanson, 1974), mientras que los machos son menos susceptibles a desarrollar enfermedades autoinmunes (Lillehoj y cols., 1981; Ansar y Penhales, 1982; Ansar y cols., 1983). Ratas y ratones castrados han mostrado una respuesta celular inmune mayor que antes de la castración (Chiodi, H., 1976), lo cual sugiere que las hormonas sexuales pueden estar modulando la respuesta de los linfocitos, lo que permitiría explicar las diferencias observadas en este estudio cuando agrupamos los datos por sexo.

El ciclo celular progresa de la fase S a la fase M para generar dos células hijas; se esperaría que una proporción de las células que se encuentren en S, lleguen a M en el periodo comprendido entre las 36 y 48 horas de cultivo, de tal manera que la correlación entre los IMC y los IM de las M1 a 48 horas de cultivo fuera lineal, tal como se observa en los individuos testigo (Fig. 7a). La falta de una correlación lineal entre estas fases como observamos en los expuestos, puede deberse a una prolongación en la duración de las fases S+G2 por diferentes razones, como la muerte celular, la inhibición o alargamiento de la síntesis replicadora debido a actividades de reparación del ADN (Petres y cols., 1977; Li y Rossman, 1989). Otra explicación para estos resultados sería la presencia, en la sangre de los individuos expuestos, de poblaciones linfocitarias que respondan más tardíamente al estímulo de la PHA (Kovanen y Knuutila, 1989; Burns y Munson, 1993). Resulta interesante destacar que Tice (1994) observó una eritropoyesis deprimida en ratones tratados por vía oral con arsenito de sodio.

Las aberraciones cromosómicas más frecuentes entre los individuos expuestos fueron los rompimientos de tipo cromatídico e isocromatídico. Nordenson y Beckman (1978) describieron daños similares en trabajadores de fundidoras, no encontrando como en este estudio, correlación con los niveles de As en orina. Los rompimientos cromatídicos e isocromatídicos constituyen aberraciones asociadas con la exposición crónica a mutágenos químicos (Al-Sabti y cols., 1992), aunque en nuestro caso la frecuencia y tipo de daño no se pudo correlacionar linealmente con el tiempo de residencia, es decir con el tiempo de exposición, los individuos con mayor exposición ponderada fueron los mostraron mayor daño genotóxico. En los hombres expuestos se observó una frecuencia de aberraciones mayor que en las mujeres, Chen (1990) opina que los hombres beben más agua que las mujeres lo que podría explicar esta diferencia. El arsenito y el arseniato inducen *in vitro* rompimientos de tipo cromosómicos e isocromatídicos principalmente (Vega y cols, 1994). El mecanismo por el cual se produce este tipo de daño S dependiente (WHO, 1985), no está claro. Una hipótesis atractiva para

explicar su origen es que la exposición inhibe la reparación del daño inducido por el arsénico o por otros clastógenos. Tice y cols.(1994) encuentran que linfocitos de ratones tratados con  $As\ 3^+$  exhiben en la electroforesis unicelular, un patrón de migración de ADN compatible con la presencia de enlaces cruzados a nivel de la cadena de ADN. Si la replicación y la reparación de la doble hélice está inhibida a nivel de los enlaces cruzados, o de otro tipo de daño (Li y Rossman, 1989; Yager y cols, 1993) la cadena perdería continuidad, lo que podría originar los rompimientos a nivel de las cromátidas que observamos con gran frecuencia en la población expuesta.

De acuerdo con las evidencias arriba mencionadas el As tiene capacidad para actuar como clastógeno y como co-clastógeno inhibiendo enzimas de reparación, y/o uniéndose al glutatión intracelular(Scott y cols., 1994), disminuyendo de esta manera la capacidad de las células para neutralizar otros radicales libres.

El porcentaje total de aberraciones se encontró directamente relacionado con el porcentaje de M1 a las 72 horas de cultivo, e inversamente relacionado con el índice de replicación. Se sabe que las células tratadas con clastógenos alargan su ciclo (Dutrillaux y cols., 1985; Morimoto y cols., 1985; Galloway, 1994), sin embargo el valor de los coeficientes de correlación obtenidos en este estudio indican que solamente una parte del retraso en la proliferación podría ser explicada por el daño cromosómico. Es necesario resaltar también que los mecanismos por los cuales se inducen las aberraciones son complejos, algunos de los cuales no necesariamente retrasarían la proliferación (Galloway, 1994).

La incidencia de los diversos tipos de cáncer asociados con la exposición a As, es distinto entre hombres y mujeres (Chen y cols., 1985; Bates y cols., 1992). Quedaría por investigar si las diferencias entre los dos sexos con respecto a la proliferación celular y a las aberraciones cromosómicas estructurales, puede asociarse con este fenómeno. La proliferación celular en las mujeres expuestas resultó más afectada que en los hombres, independientemente de que tuvieran lesiones en la piel, presentando además una menor frecuencia de aberraciones cromosómicas. Cuando los marcadores de efecto se agruparon de acuerdo a la exposición ponderada (Tabla 8) se evidenció que los parámetros de proliferación disminuyeron al aumentar la exposición, prolongándose el ciclo de proliferación del linfocito y se elevó la frecuencia de aberraciones cromosómicas así como la presencia de lesiones en la piel.

Sikorski (1989) describe que el arsenuro de galio (GaAs) suprime varias funciones inmunes mediadas por los linfocitos T como la respuesta en cultivos mixtos de linfocitos, la respuesta de hipersensibilidad retardada y la T citotóxica en ratones. Burns y Munson (1993) encontraron que el GaAs administrado como suspensión intratraqueal a ratones, deprimía el número de linfocitos CD4+ y la proliferación inducida por PHA y otros antígenos, de manera similar a lo observado en este trabajo. Los autores sugieren que la exposición induce una alteración en la expresión de moléculas en la superficie celular, críticas para las interacciones bioquímicas y fisiológicas de la reacción inmune. El aumento en la proporción de leucocitos y linfocitos encontrada en los individuos expuestos puede representar una estrategia del organismo para compensar la disminución en la eficiencia de la respuesta celular crónicamente disminuida, de manera similar al aumento en el número de eritrocitos que se observa exposición a bajas presiones parciales de oxígeno. Algunas lesiones de hiperqueratosis se malignizan (Chen y Lin, 1994). Los individuos con este tipo de lesiones presentaron una respuesta inmune abatida, esta condición facilitarían la aparición de células cancerosas al disminuir el monitoreo celular que realizan los linfocitos. La asociación de estos dos marcadores puede indicar un riesgo mayor de cáncer que la presencia de uno solo.

La genotoxicidad de una exposición resulta desde el punto de vista preventivo, una señal clara para la evaluación del riesgo. Sin embargo estudios epidemiológicos recientes demuestran que la incidencia de cáncer y de numerosas enfermedades entre las que se encuentran las autoinmunes es más elevada cuando el sistema inmune se halla comprometido (IARC, 1992; NCR, 1992). Un sistema inmune subclínicamente disminuido por periodos prologados como ocurriría en el caso de las exposiciones crónicas, aumenta el riesgo de contraer enfermedades infectocontagiosas en la población expuesta, lo que disminuye la calidad de vida y aumenta el gasto en salud (NCR, 1992).

El plomo, el arsénico, el metil mercurio y el calcio producen cambios inmunológicos en animales de laboratorio (Jaremin, 1983; NCR, 1992). Existe una gran cantidad de datos experimentales acerca de las propiedades inmunosupresivas de los metales, sus sales inorgánicas y componentes organometálicos (Koller, 1980); por ello pensamos que el monitoreo de poblaciones con exposición a estos elementos debería tomar en cuenta marcadores de citotoxicidad y de proliferación celular. Esta consideración resulta de particular importancia cuando el tejido sustituto en donde se evalúan los marcadores de efectos tempranos resulta ser el tejido linfoide.

## CONCLUSIONES

Los linfocitos circulantes de individuos expuestos crónicamente a niveles promedio de As inorgánico en el agua de bebida de 400  $\mu\text{g/l}$ , muestran una respuesta proliferante alterada en comparación con la obtenida en individuos no expuestos. Esta alteración es más evidente cuando los individuos expuestos son mujeres y cuando presentan lesiones de piel.

La exposición resulta genotóxica, el daño cromosómico más abundante lo representaron los rompimientos de tipo cromatídico. Los hombres resultaron más afectados que las mujeres. La genotoxicidad no se encontró asociada a factores como la edad o el tiempo de exposición, pero sí al índice de replicación. Estos parámetros se hallan inversamente relacionados en los individuos expuestos, siendo el coeficiente de correlación  $r=0.503$ .

Los parámetros de proliferación celular como el índice de marcaje, índice mitótico e índice de replicación obtenidos en cultivos de linfocitos, sufrieron cambios, evidencia que los convierte en marcadores útiles de toxicidad celular, en el monitoreo de individuos expuestos.

## PERSPECTIVAS

Los estudios poblacionales y los modelos de laboratorio (Sikorsky y cols, 1989; Ostrosky-Wegman y cols, 1991; Gonsbatt y cols., 1994) indican que los compuestos arsenicales presentan actividad inmunotóxica, por lo que el reproducir en modelos de laboratorio condiciones de exposición crónica similares a las de Comarca Lagunera, en los que se puedan estudiar los parámetros de proliferación celular investigados en la población expuesta, y correlacionarlos con pruebas inmunológicas que permitan caracterizar el nivel de inmunosupresión inducida por la exposición a As (y a otros metales de actividad similar), permitiría no solo estudiar detalladamente estos efectos sino también la posibilidad de implementar pruebas de inmunotoxicología para utilizarlas en el monitoreo de poblaciones expuestas.

Dadas las características del metabolismo y acumulación del arsénico, que involucra a varios tejidos y sistemas de órganos, resulta importante determinar que otros biomarcadores de efectos tempranos podrían utilizarse en la estimación de riesgo.

## REFERENCIAS

- Abdel-Fadil, M.R., Palmer, C.G., y Heerema, N. (1982) Effect of temperature variation on sister chromatid exchanges and cell cycle duration in cultured human lymphocytes, *Mutation Res.*, **104**, 263-267.
- Ackernecht, E. (1982) A short history of medicine. John Hopkins, Baltimore, U.S.A., pp. 277.
- Adhvaryu, S.G., Rawal, U.M. y Patel, J.V. (1988a) Elevated sister chromatid exchange frequencies in the lymphocytes of esophageal cancer patients, *Cancer*, **61**, 1867-1871.
- Adhvaryu, S.G., Rawal, U.M., Patel, J.V., y Balar, D.B. (1988b) Increased frequency of sister chromatid exchanges in lymphocytes of breast cancer patients, *Int. J. Cancer*, **41**, 394-398.
- Adhvaryu, S.G., Rawal, U.M. y Patel, J.V. (1988c) Enhancement of lymphocyte SCE frequencies in patients with ovarian cancer, *Neoplasma*, **35**, 103-108.
- Al-Achkar, W., Sabatier, L. y Dutrillaux, B. (1988) Transmission of radiation-induced rearrangements through cell divisions, *Mutation Res.*, **198**, 191-198.
- Alicata, P., Castro, A., Faro, S. y Mota (1988) Lymphocyte kinetics and SCE variation after rubella vaccination, *Mutation Res.*, **8**, 383-399.
- Al-Sabti, K., Lloyd, D.C., Edwards, A.A. y Stegnar, P. (1992) A survey of lymphocyte chromosome damage in Slovenian workers exposed to occupational clastogens, *Mutation Res.*, **280**, 215-223.
- Andersen, A.A. y Hanson, R.P. (1974) Influence of sex and age on natural resistance to St. Louis encephalitis virus infection in mice, *Infect. Immunol.*, **9**, 1123-1125.
- Anderson, D., Jenkinson, P.C., Dewdney, R.S., Francis, A.J., Godbert, P. y Butterworth, K.R. (1988) Chromosome aberrations, mitogen-induced blastogenesis and proliferative rate index in peripheral lymphocytes from 106 control individuals of the U.K. population, *Mutation Res.*, **204**, 407-420.
- Anderson, D., Francis, A.J., Godbert, P., Jenkinson, P.C. y Butterworth, K.R. (1991) Chromosome aberrations (CA), sister-chromatid exchanges (SCE) and mitogen-induced blastogenesis in cultured peripheral lymphocytes from 48 control individuals sample 8 times over 2 years, *Mutation Res.*, **250**, 467-476.
- Ansar, A.S. y Penhales, W.J. (1982) The influence of testosterone on the development of autoimmune thyroiditis in thymectomized and irradiated rats, *Clin. Exp. Immunol.*, **48**, 367-374.
- Ansar, A.S., Young, P.R. y Penhales, W.J. (1983) The effects of females sex steroids on the development of autoimmune thyroiditis in thymectomized and irradiated rats, *Clin. Exp. Immunol.*, **54**, 351-358.
- ATSDR (1989) Toxicological Profile for Arsenic, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) U.S. Public Health Service, Oak Ridge National Laboratory, USA.

- Attrep, M., J.R. y Anirudhan, M. (1977) Atmospheric inorganic and organic arsenic. *Trac Subst. Environ. Health*, **11**, 365-369.
- Auf der Maur, P. y Berlingourt-Bohni, K. (1979) Human lymphocyte cell cycle: studies with the use of BrdUrd. *Hum. Genet.*, **49**, 209-215.
- Bates, M.N., Smith, A.H. y Hopenhayn-Rich, C. (1992) Arsenic ingestion and internal cancers: a review. *Am. J. Epidemiol.*, **135**, 462-476.
- Bekesi, J.G., Holland, J.F., Anderson, H.A., Fishbein, A.S., Rom, W., Wolff, M.S. y Seikoff, I.J. (1978) Lymphocyte function of Michigan dairy farmers exposed to polybrominated biphenyls. *Science*, **199**, 1207-1209.
- Bencko, V. (1987) Arsenic, en: *Genotoxic and Carcinogenic Metals: Environmental and Occupational Occurrence and Exposure*, Fishbein, L., Furst, A. and Mehlman, M.A. Eds. Princeton Scientific Publishing Co, Princeton, New Jersey, pp 1-30.
- Bertolero, F., Marafate, E., Edel Rade, J., Pietra, R. y Sabbioni, E. (1981) Biotransformation and intracellular binding of arsenic in tissues of rabbits after intraperitoneal administration of <sup>74</sup>As labelled arsenite. *Toxicology*, **20**, 35-44.
- Bigatti, M.P., Lamberti, L., Cannas, M. y Rossi, E. (1989) Lack of sister-chromatid exchange induction by polymethyl methacrylate bone cement in human lymphocytes cultures in vitro. *Mutation Res.*, **227**, 21-24.
- Bölke, J.U., Dingh, S. y Goedde, H.W. (1983) Cytogenetic effects of acetaldehyde in lymphocytes of Germans and Japanese: SCE, clastogenic activity and cell cycle delay. *Hum. Genet.*, **62**, 285-289.
- Borgoño, J.M., Vincent, P., Venturino, H. e Infante, A. (1977) Arsenic in the drinking water of the city of Antofagasta: coudenuikigucak abd ckubucak study before and after the installation of a treatment plant. *Environ. Health Perspect.*, **19**, 103-105.
- Börzsönyi, M., Berecny, A., Rudnai, P., Csanady, M. y Horvath, A. (1992) Epidemiological studies on human subjects exposed to arsenic in drinking water in Southeast Hungary. *Arch. Toxicol.*, **66**, 77-78.
- Brewen, J.G. y Gengosian, N., (1971) Radiation-induced human chromosome aberration. II. Human *in vitro* irradiation compared to in vitro and in vivo irradiation of marmoset leukocytes. *Mutation Res.*, **13**, 383-391.
- Brewen, J.G., Preston, R.J. y Littlefield, L.G. (1972) Radiation-induced human chromosome aberration yields following an accidental whole-body exposure to Co-rays. *Radiat. res.*, **49**, 647-656.
- Brusick, D. (1987) *Principles of Genetic Toxicology*, 2da. ed., Plenum Press, Londres, pp.1-2.
- Buchet, J.P., Lauwerys, R. y Roels, H. (1981a) Comparison of the urinary excretion of arsenic metabolites after a single oral dose of sodium arsenite, monomethylarsenate or dimethylarsinate in man. *Inst. Arch. Occup. Environ. Health*, **48**, 71-79.

Buchet, J.P., Lauwerys, R. y Roels, H. (1981b) Urinary excretion of inorganic arsenic and its metabolites after repeated ingestion of sodium meta-arsenite by volunteers, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **48**, 111-118.

Buchet, J.P., Lauwerys, R., Mahieu, P. y Geubel, A. (1982) Inorganic arsenic metabolism in man, *Arch Toxicol. Suppl.*, **5**, 326-327.

Buchet, J.P. y Lauwerys, R. (1985) Study of inorganic arsenic methylation by rat liver *in vitro*: relevance for the interpretation of observations in man, *Arch. Toxicol.*, **57**, 125-129.

Burgdorf, W., Kurvink, K. y Cervenka, J. (1977) Elevated sister chromatid exchange rate in lymphocytes of subjects treated with arsenic, *Hum. Genet.*, **36**, 69-72.

Burns, L.A. y Munson, A.E. (1993) Gallium arsenide selectively inhibits T cell proliferation and alters expression of CD25 (IL-2R/p55), *J.Pharmacol Exp. Therapeutics*, **225**, 178-186.

Butler, M.G., Rames, L.J. y Joseph, G.M. (1987) Cytogenetic studies of individual from four kindreds with multiple endocrine neoplasia type II syndrome, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **28**, 253-260.

Cebrián, M.E. (1983) Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico, *Hum. Toxicol.*, **2**, 121-133.

Chee, C.A., Ilbery, P.L.T. y Rickinson, A.B. (1974) Depression of lymphocyte replicating ability in radiotherapy patients, *British J.Radiol.*, **47**, 37-43.

Chen, C-J, Chuang, Y-C, Lin, T-M y Wu, H-Y, (1985) Malignant neoplasm among residents of a blackfoot disease-endemic area in Taiwan: High-arsenic artesian well water and cancers, *Cancer Res.* **45**, 5895-5899

Chen, C-J. y Wang, C-J., (1990) Ecological correlation between arsenic level in well water and age-adjusted mortality from malignant neoplasms, *Cancer Res.* **50**:5470-5474.

Chiodi, H. (1976) Thymus hypertrophy induced by castration in old male rats and mice, *Fed. Proc.*, **35**, 277 (Abstract)

Cleaver, J.E. (1969) Repair replication of mammalian cell DNA: effects of compounds that inhibit DNA synthesis or dark repair, *Radiat. Res.*, **37**, 334-348.

Clemenger, J.F.P. y Scott, D. (1973) A comparison of chromosome aberration yields in rabbit blood lymphocytes irradiated *in vivo*. *Int. J. Radiat.*, **24**, 487-496.

Cohen, J.S., Knop, R.H., Navon, G. y Foxall, D. (1983) Nuclear magnetic resonance in biology and medicine. *Life Chem.Repts.*, **1**, 281-457.

Cox, D.H. (1980) Arsenic evolution-electrothermal atomic absorption method for the determination on nanogram levels of total arsenic in urine and water, *J. Anal. Toxicol.*, **4**, 207-211.

Crossen, P.E. y Morgan, W.F. (1980) Lymphocyte proliferation in Down's syndrome measured by sister chromatid differential staining, *Hum. Genet.*, **53**, 311-313.

Cusimano, N.O., Deambrosi, N.E., Albina, L.C. y Callegaro R.S., (1992) Arsenic in potable waters of the Republica Argentina. Techniques for its removal, arsenic in the environment and its incidence on health, International Seminar Proceedings, A.M.Sancha Ed., pp 51-58.

Daniele, R.P., Daubner, J.H., Altose, M.D., Rowlands, D.T. y Gorenberg, D.J. (1977) Lymphocyte studies in asymptomatic cigarette smokers. A comparison between lung and peripheral blood, *Am. Rev. Resp. Dis.*, **116**, 997-1105.

Deknudt, G. (1982) Cell kinetics and radiosensitivity of human lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin, *Wistarina floribunda* or Lentil lectin, *Can. J. Genet. Cytol.*, **24**, 761-769.

Deknudt, G., y Kamra, O. (1983) Influence of various mitogens on the yield of sister-chromatid exchanges, induced by chemicals in human lymphocytes, *Mutation Res.*, **111**, 161-170.

Del Razo, L.M., Arellano, M.A. y Cebrián, M.E. (1990) The oxidation states of arsenic in well-water from a chronic arsenicism area of northern Mexico, *Environ. Pollut.*, **64**, 143-153.

Deo, M.G., Gangal, S., Bhisey, A.N., Somasundaram, R., Balsara, B., Gulwani, B., Darbari, B.S., Bhide, S. y Maru, G.B. (1987) Immunological, mutagenic and genotoxic investigations in gas exposed population of Bhopal. *Indian J. Med. Res.* **86**(Suppl.), 63-76.

Descotes, J. (1988) Immunotoxicology of drugs and chemicals, 2nd Ed. Amsterdam: Elsevier. 444pp.

Dewdney, R.S., Lovel, L.P., Jenkinson, P.C. y Anderson, D. (1986) Variation in sister-chromatid exchange among 106 members of the general U.K. population, *Mutation Res.*, **171**, 43-51.

Diaz Barriga, F., Santos, M.A., Yañez, L., Cuellar, J.A., Ostrosky-Wegman, P., Montero, R., Perez, A., Ruiz, E., Garcia, A. y Gomez, H. (1993) Biological monitoring of workers at a recently opened hazardous waste disposal site. *J. Exp. Anal. Environ. Epidemiol.*, **3**, 1-9.

Doull, J. (1980) Factors influencing toxicology en Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, Doull, J., Klaassen, C.D. and Ambur, M.O. Eds., New York, MacMillan, 2nd Ed., pp 70-83.

Dutrillaux, B. y Fose, A.M. (1976) Utilization de BrdU dans L'etude du cycle cellulaire de sujets normaux et anormaux, *Ann. Genet.*, **19**, 95-102.

Dutrillaux, B., Viega-Poquignot, E., Prod'homme, M. y Sportes, M. (1985) Distribution of various radiation-induced chromosomal rearrangements in relation to the dose and sampling time, *Mutation Res.*, **152**, 197-203.

Ehling, U.H. (1991) Genetic risk assesment, *Ann. Rev. Genet.*, **25**, 255-280.

- Elinder, C-G, Gerhardsson, L. y Oberdoerster, G., (1987) Biological monitoring of toxic metals, en: T.W. Clarkson, L. Fiberg, G.F. Nordberg y P.R. Sager (Eds.). *Biological Monitoring of Toxic Metals*, Plenum Press, New York. pp 1-71.
- Emerit, I. (1984) Activated oxygen species at the origin of sister chromatid exchanges, en *Sister Chromatid Exchanges*, R.R. Tice y A. Hollaender (Eds.), Plenum Press, New York, U.S.A. pp 127-140.
- EPA (1984) Health Assessment Document for Inorganic Arsenic, Final Report, EPA 600/8-83-021F, Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC.
- Evans, H.J. y Vijayalaxmi (1980). Storage enhances chromosome damage after exposure of human leukocytes to mitomycin C. *Nature (Lond.)*, **284**, 370-372.
- Frias, S. Mendoza, S., Molina, B. y Carnevale, S. (1991) Effect of mitomycin-C and bromodeoxyuridine on Fanconi anemia lymphocytes, *Ann. Genet.* (en prensa).
- Foa, B., Colombi, A., Maroni, M., Buratti, M. y Calzaferrri, G. (1984) The speciation of the chemical forms of arsenic in the biological monitoring of exposure to inorganic arsenic, *Sci. Total Environ.*, **34**, 241-259.
- Galloway, S.M. (1994) Chromosome aberrations *in vitro*: Mechanisms, delayed expression, and intriguing questions, *Environm. Mol. Mutagen.*, **23**, Supplement 24, 44-53.
- García-Salcedo, J.J., Portales, A., Blakely, E., y Díaz, R. (1984) Estudio transversal de una cohorte de pacientes con vasculopatía por intoxicación crónica arsenical en poblados de los municipios de Francisco I.Madero y San Pedro, Coah, México. *Rev.Fac.Med.(Torreón)*, **1**,12-16.
- Gebhart, E., Windolph, B. y Wopfner, F. (1980) Chromosome studies on lymphocyte of patients under cytostatic therapy II. Studies using the BRDU-Labeling technique in cytostatic interval therapy, *Hum Genet.*, **56**, 157-167.
- Georgian L., Moraru, I., Ghyka, G., Savi, I. y Calugaru, A. (1986) The use of differential staining of sister chromatid to estimate the *in vitro* effect of human alfa interferon on cell division in normal and tumor cells, *Virologie*, **37**, 257-261.
- Ghidoni, A., Privitera, E., Raimondi, E., Rovini, D., Illeni, M.T. and Cascinelli, N. (1984) Sister chromatid exchange in phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes of nonfamilial cutaneous malignant melanoma patients, en: *Sister Chromatid Exchanges*, Tice, R.R. and Hollaender, A. Eds., Plenum-Press, New York, U.S.A. pp 855-858.
- Gibaldi, M. y Perrier, D. (1982) *Pharmacokinetics*, 2da ed., New York, Marcel Dekker, pp 459.
- Gonsebatt, M.E. y Mutchinick, O. (1990) Human lymphocyte proliferation kinetics in Hank's BSS supplemented with autologous plasma and in synthetic medium, *Mutation Res.*, **243**, 255-258.
- Gonsebatt, M.E., Vega, L., Herrera, L.A., Montero, R., Rojas, E., Cebrián, M.E. y Ostrosky-Wegman, P. (1992) Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation, *Mutation Res.*, **283**, 91-95.

Gonsebatt, M.E., Salazar, A.M., Montero, R., Diaz Barriga, F., Yañez, L., Gómez, H. y Ostrosky-Wegman, P. (1994) Genotoxic monitoring of workers at a hazardous waste disposal site in México, *Environ., Health Perspect.*, in press.

Gonsebatt, M.E., Vega, L., Montero, R., García Vargas, G., Del Razo, L.M., Albores, A., Cebrian, M.E. y Ostrosky-Wegman, P. (1994) Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water, *Mutation Res.*, (en prensa).

Goyer, R.A. (1991) Toxic effects of metals, en: Cassarett and Doull's Toxicology, Amdur, M.O., Doull, J. y Klaassen, C.D. (Eds.) Pergamon Press, New York, pp 623-680.

Guglielmi, G.E., Vogt, T.F. y Tice, R.R. (1982) Induction of sister chromatid exchanges and inhibition of cellular proliferation in vitro. I. Caffeine, *Environ. Mutagen.*, **4**, 191-200.

Hadgany, W., Seemayer, N.H. y Tomingas, R. (1986) Cytogenetic effects of airborne particulate matter in human lymphocytes in vitro, *Mutation Res.*, **175**, 97-101.

Harden, D.G., (1990) The molecular basis for inherited susceptibility to and action of carcinogens, en : G.N.Volans, J. Sims, F.M.Sullivan y P. Turner (Eds.) *Basic Science in Toxicology, Proceedings of the V International Congress of Toxicology*, Taylor and Francis, London, New York, Philadelphia, pp 7-21.

Heremberg, S.(1980) Biochemical and clinical effects and responses as indicated by blood concentration, en R.L.Singhai y J.A.Thomas (Eds.), *Lead Toxicity, Urban & Schwarzenberg*, Baltimore pp 367-399.

Hildebrand, B., Ashby, J., Grasso, P., Sharratt, Bontinck, W.J. y Smith, E. (1992) Early indicators of non-genotoxic carcinogenesis, *Mutation Res.*, **248**, 213-216.

Holt, P.G. y Keast, D. (1977) Environmentally induced effects of tobacco smoke and other contaminants in changes in immunological function: Acute and chronic risk and experimental animals, *Bacteriol. Rev.*, **41**, 205-216.

Huber, S.A., Job, P.L., Auld, J.K. y Woodroff, J.F. (1981) Sex related differences in the rapid production of cytotoxic spleen cells against uninfected myofibers during Coxsackie virus-B infection, *J. Immunol.*, **126**, 1336-1340.

Husgafvel-Pursiainen, K. (1987) Sister chromatid exchange and cell proliferation in cultured lymphocytes of passively and actively smoking restaurant personnel, *Mutation Res.*, **190**, 211-215.

IARC (1980) Monograph on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some metal and metallic compounds, Vol. 23, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

IARC (1987) IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, suppl 7, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

IARC (1992) Mechanisms of carcinogenesis in risk identification, Vainio, H., MaGee, P., McGregor, D., McMichael, A.J., (Eds.), International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA.

- Ivett, J.L., y Tice, R.R. (1982) Average generation time: a new method of analysis and quantitation of cellular proliferation kinetics, *Environ. Mutagen.*, **4**, 368 (Abstract)
- Jaju, M., Jaju, M. y Ahuja, Y.R. (1983) Cytogenetic effect of colistin on human lymphocytes in vitro: Chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, mitotic index, cell cycle kinetics and acrocentric associations, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, **3**, 515-526.
- Jaremin, B. (1983) Blast lymphocyte transformation (LTT), rosette (E-RFC) and leukocyte migration inhibition (MIF) test in persons exposed to the action of lead during work: Report II. *Bull. Inst. Marit. Trop. Med. Gdynia*, **34**, 189-197.
- Kierszenbaum, F., Cuna, W.R., Beltz, L.A. y Szein, M.B. (1990) Trypanosomal immunosuppressive factor: a secretion product(s) of *Trypanosoma cruzi* that inhibit proliferation and IL-2 receptor expression by activated human peripheral blood mononuclear cells, *J. Immunol.*, **144**, 4000-4004.
- Klassen, C.D. (1974) Biliary excretion of arsenic in rats, rabbits and dogs, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **29**, 107-108.
- Klassen, C.D. y Eaton, D.L., (1991) Principles of Toxicology, en: Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of Poisons, M.O. Amdour, J. Doull y C.D. Klassen (Eds.), Pergamon Press 4ta ed, ew York, U.S.A., pp 12-49.
- Klaus, G.G.B. y Hawrylowicz, C.M. (1984) Cell cycle control in lymphocyte stimulation, *Immunol. Today* **5**, 15-19.
- Koller, L.D. (1980) Immunotoxicology of heavy metals. *Int. J. Immunopharmacol.*, **2**, 269-279.
- Kovanen, P.E. y Knuutila, S. (1989) Mitotic cells in different lymphocyte subsets in unfractionated cultures stimulated by phytohemagglutinin or pokeweed mitogen, *Hereditas* **110**, 69-74.
- Lamberti, L., Bigatti, P. y Ardito, G. (1983) Cell kinetics and sister-chromatid exchange frequency in human lymphocytes, *Mutation Res.*, **120**, 193-199.
- Larramendi, M.L. y Knuutila, S. (1990) Immunophenotype and sister chromatid differentiation: a combined methodology for analyzing cell proliferation in unfractionated lymphocyte cultures, *Exp. Cell Res.*, **188**, 209-213.
- Larramendi, M.L., Reigosa, M.A. y Bianchi, M.S. (1990) Erythrocyte modulate the base line frequency of sister-chromatid exchanges and the kinetics of lymphocyte division in culture, *Mutation Res.*, **232**, 63-70.
- Lauwerys, R.R. (1983) Industrial chemical exposure: Guidelines for Biological Monitoring. Biomedical Publications, Davis, California, U.S.A, pp 150.
- Lazutka, J.R., Slapshite, C.V. y Lekavičius, R.K. (1989) Effects of natural human leukocyte interferon on cell cycle kinetics, the frequency of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in fopurin-treated human lymphocytes, *Tsitologija (USSR)*, **31**, 544-548.

- Lerman, S. y Clarkson, T.W., The metabolism of arsenite and arsenate by rat, *Fund. Appl. Toxicol.*, **3**, 309-314.
- Li, J-H y Rossman, T.G. (1989) Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis. *Molec. Toxicol.* **2**,1-9.
- Lialiaris T., Mourelatos, D., Boutis, L., Papageorgiu, A., Christianopoulou, M. Papageorgiu, V. y Dozi-Vassiliades, J. (1989) Comparative study on cytogenetic effects by diplatium complexes of the ligands of naphthazarine an squaricacid in human lymphocytes, *J. Pharmacol. Exp. Theor.*, **251**, 386-371.
- Lillehoj, H., Beisel, K. y Rose, N.R. (1981) Genetic factors controlling the susceptibility to experimental autoimmune thyroiditis in inbred rats strains, *J. Immunol.*, **127**, 654-660.
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA, *Nature*, **362**, 709-715.
- Lindblad, A. y Lambert, B. (1981) Relation between sister chromatid exchange, cell proliferation and proportion of B and T cells in human lymphocyte cultures, *Hum. Genet.*, **57**, 31-34.
- Littlefield, L.S., Joiner, E.E., Colyer, S.P., DuFrain, R.J. y Wasburn, L.C. (1984) Evaluation of cellular proliferation and chromosome breakages after *in vitro* exposure of human lymphocytes to calcium or zinc DTPA, *Radiat. Res.*, **99**, 129-139.
- Madle, S.(1981) Evaluation of experimental parameters in an S9/human leukocyte SCE test with cyclophosphamide, *Mutation Res.*, **85**, 347-356.
- Mahieu, P., Buchet, J.P., Roels, H.A. y Lauwerys, R. (1981) The metabolism of arsenic in humans acutely intoxicated by As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Its significance for the duration of BALB therapy, *Clinical Toxicol.*, **18**, 1067-1075.
- Marafate, E. y Vahter, M. (1984) The effect of methyltransferase inhibition on the metabolism of (<sup>74</sup>As) arsenite in mice and rabbits, *Chem. Biol. Interact.*, **50**, 49-57.
- Mc Carthy, M.A., J.P Michalski, E.S. Sears y C.C. McCombs (1990) Inhibition of polyamine synthesis suppresses human lymphocyte proliferation without decreasing cytokine production or interleukine 2 receptor expression, *Immunopharmacol.*, **20**, 11-20.
- Melaragno, M.I. y Smith M. de A. (1990) Sister chromatid exchange and proliferation pattern in lymphocytes from newborns, elderly subject and in premature ageing syndromes, *Mech. Ageing Dev.*, **15**, 43-53.
- Meng, Z.Q. y Zhang, L.Z.(1990) Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in lymphocytes of workers exposed to sulphur dioxide, *Mutation Res.*, **241**, 15-20.
- Miller, K. (1987) Proliferation kinetics of human B- and T-lymphocytes, *Cell Tissue Kinet.*, **20**, 611-615.
- Moller, J., Hoffman, B., Langhoff, E., Damgard Jacobsen, K., Odum, N., Dickmeiss, E., Ryder, L.P., Thastrup, O., Sharif, O. y Foder, B. (1989) Immunodeficiency after allogeneic bone marrow transplantation in man. Effect of phorbol ester (phorbol

myristate acetate) and calcium ionophore (A23187) in vitro. *Scan. J. Immunol.*, **30**, 441-447.

Montero, R., Norppa, H., Autio, K., Lindholm, C., Ostrosky-Wegman, P. y M. Sorsa (1991) Determination of 6-thioguanine resistant lymphocytes in human blood by immunohistochemical antibromodeoxyuridine staining, *Mutagenesis*, **6**, 169-170.

Montero, R., Gonsebatt, M.E., Gerson, R., Rojas, E., Herrera, L.-A. y Ostrosky-Wegman, P. (1993) AS-101: a modulator of in vitro T-cell proliferation, *Anti-Cancer Drugs*, **4**, 351-354.

Montero, R., Flisser, A., Madrazo, I., Cuevas, C. y Ostrosky-Wegman, P. (1994) Mutation at the HPRT locus in patients with neurocysticercosis treated with praziquantel, *Mutation Res.*, **305**, 181-188.

Moore, G., Gewert, D.R. y Clemens, M.J. (1984) Inhibition of cell proliferation by interferons. 2. Changes in processing and stability of newly synthesized DNA in human lymphoblastoid (Daudi) cells, *Eur. J. Biochem.*, **139**, 627-635.

Moorehead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, W.J., Battips, D.M. y Hungerford, D.A. (1960). Chromosome preparations of leukocytes from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.*, **20**, 613-616.

Moreno Toscano, A. (1976) El siglo de la conquista, en: *Historia general de México*, El Colegio de México, México D.F. Tomo I, pp. 289-358.

Morimoto, K. (1984) Proliferation kinetics and chemical-induced sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures, en: *Sister Chromatid Exchanges*, Tice, R.R. and Hollaender, A. (Eds.), Plenum-Press, New York, U.S.A. pp 677-693.

Morimoto, K. y Wolff, S. (1980) Increase of sister chromatid exchanges and perturbation of cell division kinetics in human lymphocytes by benzene metabolites, *Cancer Res.*, **40**, 1189-1193.

Mourelatos, D., Petrou, C., Boutis, L., Papageorgiu, A., Catsoulacos, P. y Dozi-Vassiliades, J. (1987) Induction of cytogenetic damage by modified steroidal derivatives of p-bis(2-chloroethyl)aminophenylacetic acid in human lymphocytes, *Mutation Res.*, **190**, 205-210.

Muller, H.J. (1927) Artificial transmutation of the gene, *Science* **66**: 84-87.

Mutchinick, O., Lisker, R., Ruz, L., Salamanca, F. y Armendares, S. (1979) Frequency of sister chromatid exchanges in severe protein calorie malnutrition, *Ann. Genet.*, **22**, 129-132.

Mutchinick, O., Ruz, L., y Casas, L. (1980) Time of first-generation metaphases. I. The effect of various culture media and of fetal calf serum in human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, **72**, 127-134.

Natajan, A.T. y Obe, G. (1984) Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations, III. restriction endonucleases, *Chromosoma (Berl)* **90**, 120-127.

- NRC (1989) National Research Council. Biological Markers in Reproductive Toxicology, Commission on Life Sciences, National Academic Press, Washington, D.C., pp. 15-29.
- NRC (1992) National Research Council. Commission on Life Sciences, Board on Environmental Studies and Toxicology, Subcommittee on Immunotoxicology Committee on Biological Markers. Biological Markers in Immunotoxicology, National Academic Press, Washington, D.C., pp 68-71.
- Nazareno, S.A. y Burmakina, I.E. (1984) Relationship of spontaneous chromosome instability and sister chromatid exchanges in Fanconi's anemia, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **98**, 334-336.
- NIHES (National Institute for Environmental Health) Task Force 3 (1985) Biochemical and Cellular Markers of Chemical Exposure and Preclinical Indicators of Disease, Washington, D.C., U.S. Department of Health and Human Services.
- Nordenson, I., Beckman, G., Beckman, L. y Nordström, S. (1978) Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. II. Chromosomal aberrations in workers exposed to arsenic, *Hereditas*, **88**, 47-50.
- Nordenson, I., Salmonson, S., Brun, E., y Beckman, G. (1979) Chromosome aberrations in psoriatic patients treated with arsenic, *Hum. Genet.*, **48**, 1-8.
- Nordstrom, S., Beckman, L. y Nordenson, I. (1978a) Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. Variations in birth weight, *Hereditas* **88**, 43-46.
- Nordstrom, S., Beckman, L. y Nordenson, I. (1978b) Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. III. Frequencies of spontaneous abortions, *Hereditas* **88**, 51-54.
- Nordstrom, S., Beckman, L. y Nordenson, I. (1979a) Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. V. Spontaneous abortion among females employees and decreased birth weight in their offspring, *Hereditas* **90**, 291-296.
- Nordstrom, S., Beckman, L. y Nordenson, I. (1979b) Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. VI. Congenital malformations, *Hereditas* **90**, 297-302.
- Obe, G., Beek, B. y Dudin, G. (1975) The human leukocyte test system. V. DNA synthesis and mitosis in PHA-stimulated 3-day cultures, *Humangenetik*, **28**, 295-302.
- Obe, G., Vogt, H.J., Madle, S., Fahning, H. y W.D. Heller (1982) Double-blind study on the effect of cigarette smoking on the chromosomes of human peripheral blood lymphocytes in vivo, *Mutation Res.*, **92**, 309-319.
- Odanaka, Y., Matano, O. y Goto, S. (1980) Biometilation of inorganic arsenic by the rat and some laboratory animals, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **24**, 452-459.
- Offergelt, J.A., Roels, H., Buchet, J.P., Boeckx y Lauwerys, R. (1992) Relation between airborne arsenic trioxide and urinary excretion of inorganic arsenic and its methylated metabolites *Brit. J. Indust. Med.*, **49**, 387-393.

- Office of technology assessment, US Congress (1983). The role of genetic testing in the prevention of occupational disease, Washington DC, US Office of Technology Assessment, pp. 243 (GTA-BA-194).
- Okui, T. y Fujiwara, Y. (1986) Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the co-mutagenic effect in V79 Chinese hamster cells, *Mutation Res.*, **172**, 69-76.
- Omenn, G.S. (1986) Susceptibility to occupational and environmental exposure to chemicals, *Prog. Clin. Biol. Res.* **214**, 527-545.
- Orson, F.M., Saadeh, C.K., Lewis, D.E. y Nelson, D.L. (1989) Interleukin 2 receptor expression by T cells in human aging, *Cell Immunol.*, **124**, 278, 291.
- Ostrosky-Wegman, P., García, G., Arellano, L., Espinosa, J.J., Montero, R. y Cortinas de Nava, C. (1984) Genotoxicity of antiamebic, antihelminthic and antimycotic drugs in human lymphocytes en: *Sister Chromatid Exchanges*, Tice, R.R. and Hollaender, A. Eds., Plenum-Press, New York, U.S.A. pp 915-925.
- Ostrosky-Wegman, P., García, G., Montero, R., Perez Romero, B., Alvarez Chacón R. y Cortinas de Nava, C. (1986) Susceptibility to genotoxic effects of niclosamide in human peripheral lymphocytes exposed *in vitro* and *in vivo*, *Mutation Res.*, **173**, 81-87.
- Ostrosky-Wegman, P., Gonsebatt, M.E., Montero, R., Vega, L., Barba, H., Espinosa, J., Palao, A., Cortinas, C., García-Vargas, G., del Razo, L.M. y Cebrián M. (1991) Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico, *Mutation Res.*, **250**, 477-482.
- Perera, F.P. y Westein, I.B. (1982) Molecular epidemiology and carcinogen-DNA adduct detection: New approaches to studies of human cancer causation, *J. Chronic Dis.*, **35**, 581-600.
- Perry, P. y Wolff, S. (1974) New Giemsa method for differential staining of sister chromatids, *Nature (London)*, **261**, 156-161.
- Petres, J., Baron, D. y Hagerdorn, M. (1977) Effects of arsenic on cell metabolism and cell proliferation: cytogenetic and biochemical studies, *Environ. Health Perspect.*, **19**, 223-227.
- Petrou, C., Mourelatos, D., Dozi-Vassiliades, J. y Catsoulacos, O. (1990) Synergistic induction of cytogenetic damage by the homo-aza-steroidal ester of p-bis(2-chloroethyl)aminophenylacetic acid in combination with caffeine in human lymphocytes *in vitro* an in Ehrlich ascites tumor cells *in vivo*, *Mutation Res.*, **243**, 109-113.
- Preston, R.J., Brewen, J.G., y Jones, K.P. (1972). Radiation-induced chromosome aberrations in chinese hamster leukocytes. A comparison of *in vivo* and *in vitro* exposures, *Int. J. Radiat. Biol.*, **21**, 397-450.
- Preston, R.J. y Gooch, P.C. (1981). The induction of chromosome-type aberrations in G by methyl methanesulfonate and 4-nitroquinoline-N-oxide and the non-requirement of an S-phase for their production, *Mutation Res.*, **83**, 395-402.

- Preston, R.J., Au, W., Bender, M.A., Brewen, J.G., Carrano, A.V., Heddle, J.A., McFee, A.F., Wolff, S., y Wasson, J.S. (1981). Mammalian *in vivo* and *in vitro* cytogenetic assays: a report of the US EPA's Gene-tox Program, *Mutation Res.*, **87**, 143-188.
- Purchase, I.F.H. y Kimber, I., (1990) Basic science in toxicology en: G.N.Volans, J. Sims, F.M.Sullivan and P. Turner (Eds.), *Basic Science in Toxicology, Proceedings of the V International Congress of Toxicology*, Taylor and Francis, London, New York, Philadelphia, pp 1-4
- Purrot, R.J., Vulpis, N. y Lloyd, D.C. (1980) The use of harlequin staining to measure delay in the human lymphocytes cell cycle induced by *in vitro* X irradiation, *Mutation Res.*, **69**, 275-282.
- Ramirez, P. (1994) El cultivo mixto de linfocitos (MLC): Cinética de proliferación celular y su capacidad predictiva de una futura reacción inmunológica hacia aloantígenos HLA. Tesis de Licenciatura, FES Cuautitlán, UNAM, México.
- Ray, J.H. y German, J. (1984) Bloom's syndrome and EM) cells in BrdU-containing medium exhibit similarly elevated frequencies of sister chromatid exchange but dissimilar amounts of cellular proliferation and chromosome disruption, *Chromosoma*, **90**, 383-388.
- Reali, D., Di Marino, F., Bahramandpour, S., Carducci, A., Barale, R. y Loprieno, N. (1987) Micronuclei in exfoliated urothelial cells and urine mutagenicity in smokers, *Mutation Res.*, **192**, 145-149.
- Rifkind, D. (1972) Influence of gonadectomy on *Candida albicans* urinary tract infection in CFW mice, *Infect. Immunol.*, **5**, 363-369.
- Rifkind, D. y Frey, J. (1972) Sex differences in antibody response of CFW mice to *Candida albicans*, *Infect., Immunol.*, **5**, 695-698.
- Roitt, I.M. Brostoff, J. y Male D.K. (1989) *Immunology*, The C.V. Mosby Company, St Louis, U.S.A.
- Rodl, S., Fuchs, G., Khoshsror, G., Iberer, F. y Tscheliessnigg, K.H. (1990) Lipoprotein-induced modulation of cyclosporine-a-mediated immunosuppression, *Eur.J.Clin.Invest*, **20**, 248-252.
- Rojas, E., Montero, R., Herrera, L.A., Sordo, M., Gonsebatt, M.E., Rodríguez, R. y Ostrosky-Wegman, P. (1992) Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology testing?, *Mutation Res.*, **282**, 283-286.
- Rojas, E., Herrera L.A., Sordo M., Gonsebatt, M.E., Montero, R., Rodríguez, R. y P. Ostrosky-Wegman (1993) Mitotic index and cell proliferation kinetics for the identification of antineoplastic activity, *Anti-Cancer Drugs*, **4**, 637-640.
- Rowland, I.R. y Davies, M.J. (1982) Reduction and methylation of sodium arsenate in the rat, *J. Appl. Toxicol.*, **2**, 294-299.
- Rupa, D.S., Reddy P.P. y Reddi, O S. (1989) Analysis of sister-chromatid exchange, cell kinetics and mitotic index in lymphocytes of smoking pesticide sprayers, *Mutation Res.*, **223**, 253-258.

- Sancha, A.M., Vega, F.y Fuentes, S. (1992) Efficiency in removing arsenic from water supplies for large towns. Salar del Carmen Plant, Antofagasta, Chile. Arsenic in the environment and its incidence on health. International Seminar Proceedings, A.M.Sancha Ed., pp 159-163.
- Sastre, M.S.R. de, Varillas, A., Kirschbaum, P., Boemo, A., Rodríguez, H., Salim, B. de, Chalabe, G. de y Franco, J. (1992) Chronic endemic regional hydroarsenicism. Arsenic in the environment and its incidence on health. International Seminar Proceedings, A.M.Sancha Ed.,pp 123-130.
- Schuler, D., Szollar, J., Kozs, R., Szakmbry, E. y Bogbthy, B. (1981) The investigation of late cytogenetic effect in children with acute leukemia in long remission and of all chemotherapy, *Hum. Genet.*, **56**, 339-344.
- Scott, D., Galloway, S., Marshall, R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. y Myhr B. (1991) Genotoxicity under extreme culture conditions, *Mutation Res.*, **257**, 147-205.
- Scott, N., Hatleid, K.M., MacKenzie, N.E. y Carter, D. (1994) Reactions of Arsenic (III) and Arsenic (V) species with glutathione, *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 102-106.
- Shamsuddin, A.K., Sinopoli, N.T., Hemminki, K., Boesch, R.R. y Harris, C.C. (1985) Detection of Benzo(a) pyrene: DNA adducts in human white blood cells, *Cancer Res.*, **45**, 66-68.
- Shingal, R.L. y Thomas, J.A. (1980) Lead Toxicity, Urban & Schwarzerberg, Baltimore, U.S.A. pp 514.
- Silbergeld, E.K. (1983) Experimental studies of lead neurotoxicity: Implications for mechanism, dose-response and reversibility, en: *Lead Versus Health: Sources and Effects of Low Level Lead*, Rutter, M. y Russel, R. Eds., Wiley, New York, U.S.A. pp 191-216.
- Sikorski, E.E., McCay, J.A. y White, K.L., Jr.(1989) Immunotoxicity of the semiconductor gallium arsenic in female B6C3F 1 mice, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **13**, 843-858.
- Singh, N.P. y D'ambrosio, S.M. (1984) Sister chromatid exchange frequency and cell cycle kinetics in cancer patients treated with cytostatic drugs, en: *Sister Chromatid Exchanges*, Tice, R.R. and Hollaender, A. Eds., Plenum-Press, New York, U.S.A. pp 885-893.
- Singhal, R.L. y Thomas, J.A. (1980) Lead Toxicity , Urban & Schwarzenberg, Baltimore, U.S.A. pp 514.
- Sinha, A.K., Linscombe, V.A., Gollapudi, B.B., y Flaske, R.E. (1984) Evaluation of culture media for effects on cell cycle kinetics and incidence of chromosomal aberrations in human blood cells, *Can. J. Genet. Cytol.*, **26**, 7-12.
- Slavutsky I., Mudry, M. D., Labal de Vinuesa, M., Meiss, R., Chopita, N. y Larripa, I. (1988) Sister chromatid exchange and cellular kinetics in lymphocytes of patients with adenoma and colonic cancer, *Gastroenterol. Clin. Biol. (France)*, **12**, 935-940.
- Smoking and Health (1979) A report of the surgeon general, DHEW Publication N° (PHS) 79-50066.

- Sneller, M.C. y Swober W. (1990) Abnormalities of lymphokine gene expression in patients with common variable immunodeficiency, *J. Immunol.*, **144**, 3762-3769.
- Snyder, C.A. y Valle C.D. (1991) Lymphocyte proliferation assays as potential biomarkers for toxicant exposures, *J. Toxicol. Environ. Health*, **34**, 127-139
- Speit, G., Düring, R., y Mehnert, K. (1986) Variation in the frequency of sister chromatid exchanges in repeated human lymphocyte cultures, *Hum. Genet.*, **72**, 179-181.
- Stöhrer, G. (1991) Arsenic: opportunity for risk assessment, *Arch. Toxicol.*, **65**, 525-531.
- Sztejn, M.B., Cuna, W.R. y Kierszenbaum (1990) Trypanosoma cruzi inhibits the expression of CD3, CD4, CD8 and IL-2R by mitogen activated helper and cytotoxic human lymphocytes, *J. Immunol.*, **144**, 3558-3562.
- Tamm, K.H., Charboneau, S.M., Bryce, F. y Lacroix, G. (1978) Separation of arsenic metabolites in dog plasma and urine following intravenous injection of  $^{74}\text{As}$ , *Annal., Biochem.*, **86**, 505-511.
- Tamm, G.K.H., Charboneau, S.M., Brice, F., Pomroy, C. y Sandi, E. (1979) Metabolism of inorganic arsenic ( $^{74}\text{As}$ ) in humans following oral ingestion, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **50**, 19-322.
- Tam, K.H., Charboneau, S.M., Bryce, F. y Lacroix, G. (1979a) Confirmation of inorganic arsenic and dimethylarsinic acid in urine and plasma of dog by ion-exchange and TCL, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **21**, 371-374.
- Tam, K.H., Charboneau, S.M., Bryce, F. y Lacroix, G. (1979b) In vitro methylation of  $^{74}\text{As}$  in urine, plasma and red blood cells of human and dog, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **22**, 69-71.
- Tam, K.H., Charboneau, S.M., Bryce, F. y Lacroix, G. (1979c) Metabolism of inorganic arsenic ( $^{74}\text{As}$ ) in humans following oral ingestion, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **50**, 319-322.
- Tice, R.R., Schmidt, M.T., Andrews, P.W. y Yager, J.W. (1994) DNA damage in normal and choline deficient male B6C3F1 mice treated on four consecutive days by oral gavage with sodium arsenite, *Environ. Molec. Mutagen.* **23**, 66, Supplement 23.
- Tice, R.R., Schneider, E.L., Kram, D., y Therne, P. (1979) Cytokinetics analysis of the impaired proliferative response of peripheral lymphocytes from aged humans to phytohemagglutinin, *J. Exp. Med.*, **149**, 1029-1041.
- Tomatis, L. (1990) Cancer: Causes Occurrence and Control (IARC Sci Pub N° 100) International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- Tselepi, M.R., Demopoulos, N.A. y Catsoulacos, O. (1989) Induction of sister chromatid exchanges and cell division delays in human lymphocytes by the anti-tumor agent homo-aza-steroidal ester of p-bis(2-chloroethyl)aminophenoxy acetic acid, *Mutagenesis*, **4**, 361-364.
- Tseng, W.P., Chu, H.M., How, S.W., Fong, J.M., Lin, C.S. y Yeh, S. (1968) Prevalence of skin cancer in an endemic area of chronic arsenicism in Taiwan, *J. Natl. Cancer Inst. (U.S.)* **40**, 453-463.

Tseng, W.P. (1977) Effects and dose-response relationship of skin cancer and blackfoot disease with arsenic, *Environ. Health Perspect.*, **19**, 109-119.

Tucker, J.D., y Christensen, M.L. (1987) Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges cell cycle kinetics and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Res.*, **190**, 225-228.

Vahter, M. (1981) Biotransformation of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice and rats, *Environ. Res.*, **25**, 286-293.

Vahter, M. (1988) Arsenic, en: T.W. Clarkson, L. Fiberg, G.F. Nordberg y P.R. Sager (Eds.) *Biological Monitoring of Toxic Metals*, Plenum Press, New York.

Vather, M. y Norin, H. (1980) Metabolism of  $^{74}\text{As}$ -labeled trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice, *Environ. Res.*, **21**, 446-457.

Vega, L., Gonsebatt, M.E. y Ostrosky-Wegman, P. Aneplogenic effect of sodium arsenite, (manuscript in preparation).

Vogel, E.W. y Natarajan, A.T. (1993) DNA damage and repair in somatic cells and in germ cells in vivo, *Mutation Res.* (submitted for publication).

Walder, B.K., Robertson, M.R. y J. Jeremy (1971) Skin cancer and immunosuppression, *Lancet*, *ii*, 1282-1283.

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

Welch, W.J. (1992) Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins, and Implications for Medicine and disease, *Physiol.Rev.*, **72**, 1063-1081.

Wen, W.-N. y Lie T.-L. (1983) The effect o age y cell proliferation on the frequency of sister chromatid exchange in human lymphocyte cultured in vitro, *Mech. Ageing Rev.*, **21**, 377.

Wen, W.-N., Lieu T.-L. , Chang H.-J., Wu S. W., Yau L.-L. and Jan K. Y. (1981) Baseline and sodium arsenite-induced sister chromatid exchanges in cultured lymphocytes from patients with Blackfoot disease and healthy persons, *Hum. Genet.*, **59**, 201-203.

WHO (1981) *Arsenic. Environmental Health Criteria 18*, World Health Organization, Ginebra.

WHO (1984) *World Health Organization. Guidelines for drinking water quality. Vol 1 and 2*, Ginebra.

WHO (1985) *Guidelines for the study of genetics effects in human populations*, *Environ. Health Criteria 46*, Ginebra.

WHO (1992) *Revision of the WHO guidelines for drinking water quality. Report of the final task group meeting*, Ginebra.

Wild, C.P. (1990) Antibodies to DNA alkylation as analytical tools in chemical carcinogenesis, *Mutation Res.*, **233**, 219-233.

Wogan, G.N. y Gorelick, N.J. (1985) Chemical and biochemical dosimetry of exposure to genotoxic chemicals. *Environ. Health Perspect.* **62**, 5-18.

Wolff, S., Afzal, V. y Brown, L.P. (1984) Cultured human lymphocytes proliferate faster in medium lacking fetal calf serum and antibiotics, *Mutation Res.*, **129**, 207-213.

Yager, J.W. y Wiencke J.K. (1993) The effect of sodium arsenite on poly-(ADP-ribose) polimerase activity, *Environ. Molec. Mutagén.*, **21**, 78 (Supplement 22).

Yamagata, Z., Iijima, S., Takeshita, T., Ariizumi, C. y Higurashi, M. (1989) Mitomycin-C-induced sister-chromatid exchanges and cell-cycle kinetics in lymphocytes from patients with Klinefelter syndrome, *Mutation Res.*, **212**, 263-268.

Yamanaka, K., Hasegawa, A., Sawamura, R. y Okada, S. (1989) Dimethylated arsenics induce DNA strand breaks in lung via the production of active oxygen in mice, *Biophys. Res. Comm.* **165**, 43-50.

Yamanaka, K., Hoshino, M., Okamoto, M., Sawamura, R., Hasegawa, A. y Okada, S., (1990) Induction of DNA damage by dimethylarsine, a metabolite of inorganic arsenics, is for the major parte likely due to its peroxy radical, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **168**, 58-64.

Yamasaki, H., Galiana, C. y Nakazawa, H. (1992) Do genetic alterations found in tumors reflect exposure to carcinogens? en: *New Frontiers in Cancer Causations* Ed. O.H.Iversen, Taylor & Francis, Washington, D.C.p 153-166.

Zaldívar, R. (1974) Arsenic contamination of drinking water and foodstuff causing endemic chronic poisoning, *Beitr. Pathol.*, **151**, 383-400.

Zar, J. (1984) *Biostatistical Analysis*, Ed Prentice-Hall, Inc., pp 201; 292-298.

Zbinden, G. (1990) The relationship between clinical immunology and classical experimental immunotoxicology en: G.N.Volans, J. Sims, F.M.Sullivan and P. Turner (Eds.), *Basic Science in Toxicology*, Proceedings of the V International Congress of Toxicology, Taylor and Francis, London, pp 344-353.

**TABLA 3a. EXPOSICION PONDERADA EN TESTIGOS**

<b>CODIGO</b>	<b>EDAD/ SEXO</b>	<b>A. DE RES.</b>	<b>LESIONES DE PIEL</b>	<b>E.PONDER.</b>
00236	36/M	36	NO	1320,6
88629	37/M	37	NO	1316,8
96887	38/M	38	NO	1357,8
62111	39/M	39	NO	1153,2
34833	39/M		NO	1450,8
12479	43/M	22	NO	818,4
46614	45/M	45	NO	1488
50948	46/M	36	NO	1359,2
13428	45/M	45	NO	1655,4
17918	47/M	47	NO	1748,4
29881	52/M	52	NO	1934,4
60609	64/M	64	NO	2380,8
53342	22/F	22	NO	781,2
83091	24/F	24	NO	892,8
93758	26/F	26	NO	967,2
17676	28/F	28	NO	1041,6
55784	32/F	32	NO	1190,4
78258	33/F	10	NO	372
87894	34/F	34	NO	1264,8
63700	34/F	34	NO	1264,8
33851	36/F	36	NO	1339,2
37231	35/F	20	NO	744
67879	39/F	39	NO	1450,8
99547	40/F	40	NO	1469,4
01412	44/F	43	NO	1618,2
62880	44/F	44	NO	1636,8
89964	45/F	23	NO	855,6
42626	45/F	44	NO	1636,8
44105	62/F	62	NO	2306,4
89380	41/F	0	NO	
94211	29/F	0	NO	

**A.DE RES.:** años de residencia.

TABLA 3b. EXPOSICION PONDERADA EN EXPUESTOS

CODIGO	EDAD/	A. DE RES.	LESIONES DE PIEL	E. PONDER.
83463	28/M	10	1,4	4000
94771	32/M	32	NO	12800
67079	32/M	28	NO	11200
22554	34/M	34	NO	13600
05999	38/M	38	2,3	14400
42866	38/M	16	NO	6400
47366	38/M	38	NO	15200
76999	40/M	40	4	15600
64620	41/M	41	1,2,3,4,5	16400
66892	42/M	19	2,3,4,5	7600
15345	43/M	43	NO	17000
85436	44/M	17	1,2,3,4,6	6600
58212	46/M	46	NO	17800
39765	49/M	49	2,3	19600
67382	68/M	65	2,3,4	19200
54463	24/F	3	NO	1200
81619	27/F	27	NO	10800
13858	28/F	28	NO	11200
82627	29/F	13	NO	5200
01432	30/F	15	NO	6000
65978	31/F	15	NO	6000
05437	33/F	33	4	13200
63116	33/F	9	NO	3600
39220	33/F	7	NO	2800
82995	37/F	20	NO	8000
06468	38/F	20	NO	8000
00015	42/F	42	4	16800
16777	42/F	42	2,3,4	16800
29085	43/F	26	NO	10400
84318	44/F	44	4	17600
97017	47/F	47	NO	18800
47361	47/F	30	NO	12000
39693	66/F	36	4	14400

A- DE RES.: años de residencia

Clasificación de las lesiones de piel:

1: hiperhidrosis, 2: hipocromías, 3: hiperpigmentación, 4: hiperqueratosis puntata palmoplantar, 5: hiperqueratosis papular, 6: cuernos cutáneos.

Tabla 3c. Edad, años de residencia y marcadores de exposición.

	Testigos	Expuestos
Edad Prom. años $\pm$ DS rango	40.6 $\pm$ 10.6 (22-64)	39.0 $\pm$ 9.7 <sup>a</sup> (24-68)
Prom. años de residencia $\pm$ DS rango	35.8 $\pm$ 11.1 (10-52)	30.6 $\pm$ 13.7 <sup>a</sup> (3-65)
As Total en sangre $\mu\text{g/L} \pm$ DS	17.6 $\pm$ 16.9	34.0 $\pm$ 27.3 <sup>a</sup>
As Total en orinas $\mu\text{g/L} \pm$ DS	36.7 $\pm$ 36.7	758.4 $\pm$ 364.0 <sup>b</sup>
As Total en muestras de agua $\mu\text{g/L} \pm$ DS	37.2 $\pm$ 18	412.0 $\pm$ 16

<sup>a</sup>U de Mann-Whitney de dos colas,  $p > 0.05$ ; <sup>b</sup>U de Mann-Whitney de dos colas,  $p << 0.05$

TABLA 4a. NUMERO DE LINFOCITOS Y LEUCOCITOS POR ML EN TESTIGOS

CODIGO	CEL.x 10 <sup>6</sup>		EDAD/ SEXO	A. DE RES.	LES.DE PIEL
	LINFOC.	LEUCOC.			
00236	2.340	7.80	36/M	36	NO
88629	2.095	6.35	37/M	37	NO
96887	2.496	7.80	38/M	38	NO
62111	1.984	6.40	39/M	39	NO
34833	2.262	4.10	39/M		NO
12479	3.570	8.50	43/M	22	NO
46614	1.550	6.20	45/M	45	NO
50948	2.332	5.30	46/M	36	NO
13428	1.040	3.25	45/M	45	NO
17918	2.000	5.00	47/M	47	NO
29881	4.758	11.75	52/M	52	NO
97978	3.562	6.85	66/M	47	NO
60609	5.092	9.70	64/M		NO
53342	4.450	8.90	22/F	22	NO
83091	3.575	13.00	24/F	24	NO
93758	3.260	8.05	26/F	26	NO
17676	3.118	7.70	28/F	28	NO
55784	1.100	5.50	32/F	32	NO
78258	1.442	5.15	33/F	10	NO
87894	1.200	4.00	34/F	34	NO
63700	1.116	9.05	34/F	34	NO
33851	3.273	6.75	36/F	36	NO
37231	3.981	12.25	35/F	20	NO
67879	2.232	7.20	39/F	39	NO
99547	2.337	5.50	40/F	40	NO
01412	1.295	3.70	44/F	43	NO
62880	2.983	7.85	44/F	44	NO
89964	ND		45/F	23	NO
42626	3.330	11.10	45/F	44	NO
44105	1.423	7.3	62/F	62	NO
94211	ND		29/F	0	NO

LINFOC.: linfocitos; LEUCOC.: leucocitos; A.DE RES.: años de residencia  
 LES.DE PIEL: lesiones de piel.

Tabla 4b. NUMERO DE LINFOCITOS Y LEUCOCITOS POR ML EN INDIVIDUOS EXPUESTOS

CODIGO	CEL.x 10 <sup>6</sup>		EDAD/ SEXO	A. DE RES.	LES.DE PIEL
	LINFOC.	LEUCOC.			
83463	2.488	7.20	28/M	10	1,4
94771	3.503	11.30	32/M	32	NO
67079	2.488	7.25	32/M	28	NO
22554	2.952	7.20	34/M	34	NO
05999	2.842	11.60	38/M	38	2,3
42866	3.360	8.00	38/M	16	NO
47366	2.432	7.05	38/M	38	NO
76999	0.967	6.45	40/M	40	4
64620	2.719	7.35	41/M	41	1,2,3,4,5
66892	2.437	12.50	42/M	19	2,3,4,5
15345	2.436	5.80	43/M	43	NO
85436	2.150	12.65	44/M	17	1,2,3,4,6
58212	6.187	12.50	46/M	46	NO
39765	2.760	12.00	49/M	49	2,3
67382	5.620	9.95	68/M	65	2,3,4
54463	2.572	10.50	24/F	3	NO
81619	2.790	9.00	27/F	27	NO
13858	2.201	6.20	28/F	28	NO
82627	3.105	13.80	29/F	13	NO
01432	ND		30/F	15	NO
65978	3.526	7.75	31/F	15	NO
05437	3.798	10.55	33/F	33	4
63116	4.463	7.90	33/F	9	NO
39220	4.745	13.00	35/F	7	NO
82995	2.583	7.45	37/F	20	NO
06468	3.737	10.10	38/F	20	NO
00015	ND		42/F	42	4
16777	2.855	7.00	42/F	42	2,3,4
29085	3.165	10.05	43/F	26	NO
84318	1.330	7.00	44/F	44	4
97017	3.074	5.80	47/F	47	NO
47361	3.180	12.00	47/F	30	NO
39693	2.273	5.35	66/F	36	4

LINFOC.: linfocitos; LEUCOC.:leucocitos;A.de RES.: años de residencia;  
LES. DE PIEL: lesiones de piel.

Clasificación de las lesiones de piel:

1: hiperhidrosis; 2: hipocromías; 3: hiperpigmentación; 4: hiperqueratosis punctata palmoplantar; 5: hiperqueratosis papular; 6: cuernos cutáneos.

**Tabla 4c. Promedios del número de leucocitos y linfocitos ( $\times 10^6$  cells/ml) en testigos y expuestos**

	<b>TESTIGOS</b>		<b>EXPUESTOS</b>	
<b>Hombres</b>				
Linfocitos	13 <sup>a</sup>	2.70 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	15	3.00 $\pm$ 1.2
Leucocitos		6.85 $\pm$ 2.3		9.25 $\pm$ 2.5 <sup>c</sup>
<b>Mujeres</b>				
Linfocitos	16	2.40 $\pm$ 1.1	16	3.10 $\pm$ 0.8 <sup>c</sup>
Leucocitos		7.69 $\pm$ 2.7		9.87 $\pm$ 2.5
<b>Todos</b>				
Linfocitos	29	2.60 $\pm$ 1.1	31	3.10 $\pm$ 1.0 <sup>c</sup>
Leucocitos		6.85 $\pm$ 2.3		9.10 $\pm$ 2.5 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> número de individuos; <sup>b</sup> promedio  $\pm$  desviación estándar; <sup>c</sup> U-de Mann-Whitney,  $p < 0.05$

TABLA 5a. INDICES DE MARCAJE Y MITOTICOS EN INDIVIDUOS TESTIGOS

CODIGO	EDAD/ SEXO	A. DE RES.	LESIONES DE PIEL	INDICE DE MARCAJE	I. M. M1
00236	36/M	36	NO	14,24	0.89
88629	37/M	37	NO	1,88	0.50
96887	38/M	38	NO	NC	NC
62111	39/M	39	NO	0.00	0
34833	39/M	39	NO	1,92	2.26
12479	43/M	22	NO	3,04	1.76
46614	45/M	45	NO	3,20	0.99
50948	46/M	36	NO	2,40	0.37
13428	45/M	45	NO	3,76	1.10
17918	47/M	47	NO	3,52	1.98
29881	52/M	52	NO	1,28	0.94
97978	66/M	47	NO	4,16	0.83
61210	36/M	0	NO	1,76	1.10
82414	47/M	0	NO	2,92	1.41
60609	64/M	64	NO	0,48	0.62
53342	22/F	22	NO	6,24	3.24
83091	24/F	24	NO	3,24	1.41
93758	26/F	26	NO	9,64	5.08
17676	28/F	28	NO	NC	NC
55784	32/F	32	NO	4,88	1.67
78258	33/F	10	NO	5,20	1.67
87894	34/F	34	NO	NC	NC
63700	34/F	34	NO	3,16	1.35
33851	36/F	36	NO	1,92	0.80
37231	35/F	20	NO	1,52	1.17
67879	39/F	39	NO	1,24	0.37
99547	40/F	40	NO	3,84	2.14
01412	44/F	43	NO	*21,4	1.86
62880	44/F	44	NO	4,88	1.91
89964	45/F	23	NO	14,80	3.19
42626	45/F	44	NO	1,44	0.97
44105	62/F	62	NO	NC	NC
89380	41/F	0	NO	4,48	1.93
94211	29/F	0	NO	1,60	.096

NC: No creció, \* no se consideró por presentar otitis.

TABLA 5b. INDICES DE MARCAJES Y MITOTICOS EN INDIVIDUOS EXPUESTOS

CODIGO	EDAD/ SEXO	A. DE RES.	LESIONES DE PIEL	INDICE DE MARCAJE.	I. M. MI
83463	28/M	10	1,4	1.04	1.68
94771	32/M	32	NO	NC	
67079	32/M	28	NO	4.84	1.04
22554	34/M	34	NO	2.96	1.90
05999	38/M	38	2,3	0.05	0
42866	38/M	16	NO	2.36	3.75
47366	38/M	38	NO	1.28	0.23
76999	40/M	40	4	1.08	0.52
64620	41/M	41	1,2,3,4,5	4.68	1.39
66892	42/M	19	2,3,4,5	1.00	0.44
15345	43/M	43	NO	8.80	1.75
85436	44/M	17	1,2,3,4,6	NC	
58212	46/M	46	NO	NC	
39765	49/M	49	2,3	5.04	2.16
67382	68/M	65	2,3,4	NC	
54463	24/F	3	NO	4.96	0.54
81619	27/F	27	NO	5.72	2.16
13858	28/F	28	NO	2.96	1.12
82627	29/F	13	NO	5.52	2.25
01432	30/F	15	NO	4.08	1.82
65978	31/F	15	NO	2.12	2.35
05437	33/F	33	4	6.24	2.22
63116	33/F	9	NO	NC	
39220	35/F	7	NO	NC	
82995	37/F	20	NO	0.48	0.04
06468	38/F	20	NO	4.20	1.15
00015	42/F	42	4	2.04	0.39
16777	42/F	42	2,3,4	3.12	2.67
29085	43/F	26	NO	0.36	0
84318	44/F	44	4	4.00	0.29
97017	47/F	47	NO	3.20	0.40
47361	47/F	30	NO	5.20	0.54
39693	66/F	36	4	2.40	0.96

NC: No creció.

Clasificación de lesiones de piel:

1: hiperhidrosis; 2: hipocromías; 3: hiperpigmentaciones; 4: hiperqueratosis punctata palmoplantar; 5: hiperqueratosis papular; 6: cuernos cutáneos.

Tabla 5c. Valores promedios de los IMC en testigos y expuestos.

INDICES DE MARCAJES

Cultivos a 36 h

	TESTIGOS				EXPUESTOS			
	N	$\bar{X} \pm EE^a$	EDAD <sup>b</sup>	A de R <sup>c</sup>	N	$\bar{X} \pm EE$	EDAD	A de R
<b>Hombres</b>								
c/les. <sup>d</sup>					6	2.14 ± 0.86 (0.05-4.6) <sup>e</sup>	39.6±2.7	32.8±6.1
s/les. <sup>f</sup>	12	3.32 ± 1.06 (0-14.24)	46.6±2.8	42.4±2.9	5	4.05 ± 1.31 (1.28-8.8)	37.0±1.9	31.8±2.8
<b>Mujeres</b>								
c/les.					5	2.74 ± 0.32 (2.04-4.0)	45.4±5.5	39.4±2.1
s/les.	13	4.77 ± 1.06 (1.2-14.8)	35.0±2.1	30.3±2.9	11	3.90 ± 0.49 (0.36-6.24)	35.4±2.2	22.72±3.2 <sup>h</sup>
<b>Total</b>								
c/les.					11	2.42 ± 0.49	42.2±2.9	35.8±3.4
s/les.	25	3.37 ± 0.61 (0.48-14.8)	40.6±2.0	36.2±2.3	16	3.95 ± 0.56 <sup>g</sup> (0.36-8.8)	35.8±1.6	25.5±2.7

<sup>a</sup> Error estándar; <sup>b</sup> promedio ± desviación estándar; <sup>c</sup> años de residencia (promedio ± desviación estándar); <sup>d</sup> con lesiones de piel; <sup>e</sup> rango; <sup>f</sup> sin lesiones de piel; <sup>g</sup> Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ; <sup>h</sup> q' de dos colas, test de Dunn no paramétrico,  $p < 0.05$ .

TABLA 6a. INDICES MITOTICOS EN INDIVIDUOS TESTIGOS

CODIGO	EDAD/ SEXO	A. DE RES.	LESIONES DE PIEL	I.M. 48 H	I.M. 60 H	I.M. 72 H
00236	36/M	36	NO	0.95	3.75	3.40
88629	37/M	37	NO	0.50	1.15	0.80
96887	38/M	38	NO	NC	NC	NC
62111	39/M	39	NO	0.05	3.55	3.70
34833	39/M	39	NO	2.90	1.20	4.40
12479	43/M	22	NO	2.15	3.20	4.20
46614	45/M	45	NO	1.00	2.35	2.65
50948	46/M	36	NO	0.40	1.50	5.20
13428	45/M	45	NO	1.15	3.00	5.00
17918	47/M	47	NO	2.20	4.55	5.00
29881	52/M	52	NO	1.00	2.40	3.80
97978	66/M	47	NO	0.90	2.55	1.50
61210	36/M	0	NO	1.15	5.60	2.65
82414	47/M	0	NO	1.50	2.20	NC
60609	64/M	64	NO	0.65	1.20	2.70
53342	22/F	22	NO	4.50	12.60	4.50
83091	24/F	24	NO	1.50	3.35	3.55
93758	26/F	26	NO	7.70	3.90	6.40
17676	28/F	28	NO	NC	NC	NC
55784	32/F	32	NO	2.20	4.65	4.40
78258	33/F	10	NO	2.90	7.80	4.90
87894	34/F	34	NO	NC	1.70	2.00
63700	34/F	34	NO	1.55	5.25	4.40
33851	36/F	36	NO	0.95	3.00	3.15
37231	35/F	20	NO	1.25	2.85	4.70
67879	39/F	39	NO	0.40	1.65	2.10
99547	40/F	40	NO	2.95	2.85	0.05
01412	44/F	43	NO	2.30	8.10	5.50
62880	44/F	44	NO	2.20	6.80	6.10
89964	45/F	23	NO	3.85	6.80	7.20
42626	45/F	44	NO	1.05	2.25	4.30
44105	62/F	62	NO	NC	NC	0.25
89380	41/F	0	NO	2.25	5.10	2.95
94211	29/F	0	NO	0.10	2.30	6.00

A.DE RES.: años de residencia; NC: No creció.

TABLA 6b. INDICES MITOTICOS EN CULTIVOS DE INDIVIDUOS EXPUESTOS

CODIGO	EDAD/ SEXO	A. DE RES.	LESIONES DE PIEL	I.M.	I.M.	I.M.
				48 H	60 H	72 H
83463	28/M	10	1, 4	1.70	4.30	5.20
94771	32/M	32	NO	2.45	3.35	7.75
67079	32/M	28	NO	1.20	3.55	7.50
22554	34/M	34	NO	2.05	2.30	2.50
05999	38/M	38	2, 3	0.05	1.50	5.50
42866	38/M	16	NO	3.95	4.40	9.00
47366	38/M	38	NO	0.25	2.75	5.80
76999	40/M	40	4	0.55	4.80	5.95
64620	41/M	41	1, 2, 3, 4, 5	1.50	3.90	5.65
66892	42/M	19	2, 3, 4, 5	0.45	1.05	4.25
15345	43/M	43	NO	1.75	5.40	3.65
85436	44/M	17	1, 2, 3, 4, 6	3.35	4.05	4.95
58212	46/M	46	NO	NC	0.05	NC
39765	49/M	49	2, 3	2.35	3.90	NC
67382	68/M	65	2, 3, 4	0.70	4.95	10.35
54463	24/F	3	NO	3.35	2.70	9.10
81619	27/F	27	NO	0.65	NC	1.85
13858	28/F	28	NO	2.55	6.10	8.00
82627	29/F	13	NO	1.32	7.50	11.00
01432	30/F	15	NO	2.90	NC	NC
65978	31/F	15	NO	2.25	7.40	7.00
05437	33/F	33	4	2.50	3.55	11.50
63116	33/F	9	NO	2.65	5.35	5.50
39220	35/F	7	NO	3.10	2.90	10.15
82995	37/F	20	NO	0.05	0.50	4.00
06468	38/F	20	NO	1.60	2.65	5.00
00015	42/F	42	4	0.45	1.65	3.35
16777	42/F	42	2, 3, 4	2.70	2.90	6.90
29085	43/F	26	NO	0.00	0.70	3.75
84318	44/F	44	4	0.30	4.55	6.20
97017	47/F	47	NO	0.45	2.45	2.75
47361	47/F	30	NO	0.65	3.95	6.75
39693	66/F	36	4	1.15	3.60	9.40

A. de Res.: años de residencia; NC: No creció.

Clasificación de la lesiones de piel:

1: hiperhidrosis; 2: hipocromías; 3: hiperchromías; 4: hiperqueratosis punctata palmoplantar; 5: hiperqueratosis papular; 6: cuernos cutáneos.

Tabla 6c. Valores promedios de los IM en los cultivos a 48, 60 y 72 hs.

INDICES MITOTICOS			
TESTIGOS			
Horas de cultivo			
	48h	60h	72h
<b>Hombres</b>	1.15 ± 0.23 <sup>a</sup> (12) <sup>b</sup>	2.53 ± 0.30(12)	3.52 ± 0.37(12)
<b>Mujeres</b>	2.54 ± 0.48(13)	4.68 ± 0.80(14)	3.96 ± 0.52(13)
<b>Total</b>	1.87 ± 0.30(25)	3.69 ± 0.50(26)	3.78 ± 0.34(25)
EXPUESTOS			
Horas de cultivo			
	48h	60h	72h
<b>Hombres</b>	1.59 ± 0.29(14)	3.35 ± 0.39(14)	6.00 ± 0.55(13)
<b>c/lesiones</b>	1.37 ± 0.44 (6)	3.84 ± 0.58 (6)	6.05 ± 0.89 (6)
<b>s/lesiones</b>	1.75 ± 0.44 (8)	3.39 ± 0.40 (8)	5.95 ± 0.79 (7)
<b>Mujeres</b>	1.59 ± 0.26(17)	3.65 ± 0.48(16)	6.60 ± 0.69(17)
<b>c/lesiones</b>	1.42 ± 0.63 (5)	3.25 ± 0.47 (5)	7.47 ± 1.39 (5)
<b>s/lesiones</b>	1.65 ± 0.33(12)	3.97 ± 0.70(11)	6.23 ± 0.81(12)
<b>Total</b>	1.59 ± 0.20 (31)	3.51 ± 0.32(30)	6.34 ± 0.45(30) <sup>c</sup>
<b>c/lesiones</b>	1.39 ± 0.39 (11)	3.57 ± 1.07(11)	6.70 ± 0.78(11)
<b>s/lesiones</b>	1.69 ± 0.38 (20)	3.47 ± 0.44(19)	6.13 ± 0.59(19)

<sup>a</sup> promedios ± error estándar; <sup>b</sup> número de individuos; <sup>c</sup> U de Mann-Whitney, p<0.05.

TABLA 7a. INDICES DE REPLICACION EN CULTIVOS DE INDIVIDUOS TESTIGOS

CODIGO	EDAD/ SEXO	A. DE RES.	LESIONES DE PIEL	I.R. 48 H	I.R. 60 H	I.R. 72 H
00236	36/M	36	NO	1.06	1.42	2.40
88629	37/M	37	NO	1.00	1.31	1.60
96887	38/M	38	NO	NC	NC	NC
62111	39/M	39	NO	NC	1.15	1.35
34833	39/M	39	NO	1.22	1.56	2.06
12479	43/M	22	NO	1.18	1.51	1.92
46614	45/M	45	NO	1.01	1.40	1.87
50948	46/M	36	NO	1.07	1.56	2.24
13428	45/M	45	NO	1.04	1.56	2.16
17918	47/M	47	NO	1.10	1.47	2.03
29881	52/M	52	NO	1.06	1.42	2.01
97978	66/M	47	NO	1.07	1.52	2.11
61210	36/M	0	NO	1.04	1.43	2.05
82414	47/M	0	NO	1.06	1.43	NC
60609	64/M	64	NO	1.04	1.37	1.47
53342	22/F	22	NO	1.30	1.47	1.81
83091	24/F	24	NO	1.06	1.50	1.88
93758	26/F	26	NO	1.34	1.66	2.22
17676	28/F	28	NO	NC	NC	NC
55784	32/F	32	NO	1.24	1.73	2.07
78258	33/F	10	NO	1.10	1.42	1.91
87894	34/F	34	NO	NC	1.09	2.19
63700	34/F	34	NO	1.13	1.37	2.02
33851	36/F	36	NO	1.16	1.52	2.14
37231	35/F	20	NO	1.06	1.65	2.07
67879	39/F	39	NO	1.08	1.46	1.87
92547	40/F	40	NO	1.16	1.72	NC
01412	44/F	43	NO	1.29	1.66	2.52
62880	44/F	44	NO	1.13	1.88	2.18
89964	45/F	23	NO	1.17	1.59	2.16
42626	45/F	44	NO	1.07	1.41	2.02
44105	62/F	62	NO	NC	NC	2.23
89380	41/F	0	NO	1.14	1.62	2.23
94211	29/F	0	NO	1.04	1.48	2.02

A. DE RES.: años de residencia; NC: No creció.

Tabla 7b. INDICES DE REPLICACION EN CULTIVOS DE INDIVIDUOS EXPUESTOS

CODIGO	EDAD/ SEXO	A.DE RES.	LESIONES DE PIEL	I.R. 48 H.	I.R. 60 H.	I.R. 72 H.
83463	28/M	10	1,4	1,01	1,45	2,11
94771	32/M	32	NO	1,00	1,32	1,25
67079	32/M	28	NO	1,13	1,26	1,79
22554	34/M	34	NO	1,07	1,24	2,14
05999	38/M	38	2,3	1,00	1,05	1,30
42866	38/M	16	NO	1,05	1,37	2,16
47366	38/M	38	NO	1,07	1,38	1,72
76999	40/M	40	4	1,05	1,65	2,41
64620	41/M	41	1,2,3,4,5	1,03	1,36	1,66
66892	42/M	19	2,3,4,5	1,02	1,26	1,83
15345	43/M	43	NO	1,02	1,57	1,80
85436	44/M	17	1,2,3,4,6	1,21	1,70	2,20
58212	46/M	46	NO	NC	NC	NC
39765	49/M	49	2,3	1,08	1,52	NC
67382	68/M	65	2,3,4	1,02	1,39	2,29
54463	24/F	3	NO	1,20	1,26	1,85
81619	27/F	27	NO	1,05	NC	1,38
13858	28/F	28	NO	1,20	1,41	1,97
82627	29/F	13	NO	1,15	1,63	2,03
01432	30/F	15	NO	1,02	NC	NC
65978	31/F	15	NO	1,19	1,45	2,00
05437	33/F	33	4	1,06	1,38	1,79
63116	33/F	9	NO	1,16	1,76	2,06
39220	35/F	7	NO	1,03	1,23	1,87
82995	37/F	20	NO	1,05	1,16	1,38
06468	38/F	20	NO	1,28	1,28	2,03
00015	42/F	42	4	1,14	1,22	1,79
16777	42/F	42	2,3,4	1,01	1,35	2,05
29085	43/F	26	NO	1,00	1,36	1,64
84318	44/F	44	4	1,03	1,56	1,66
97017	47/F	47	NO	1,09	1,18	1,80
47361	47/F	30	NO	1,16	1,34	1,96
39693	66/F	36	4	1,18	1,47	2,15

A.DE RES.: años de residencia; NC: no creció

Clasificación de las lesiones de piel: 1: hiperhidrosis; 2: hipocromías; 3: hiperpigmentación; 4: hiperqueratosis punctata palmoplantar; 5: hiperqueratosis papular; 6: cuernos cutáneos.

Tabla 7c. Valores promedio de IR a 48, 60 y 72 hs de cultivo

INDICES DE REPLICACION

TESTIGOS

Horas de cultivo

	48h	60h	72h
<b>Hombres</b>	1.07 ± 0.01 <sup>a</sup> (11) <sup>b</sup>	1.43 ± 0.03(12)	1.93 ± 0.09(12)
<b>Mujeres</b>	1.16 ± 0.02(15)	1.54 ± 0.04(14)	2.08 ± 0.04(14)
<b>Total</b>	1.12 ± 0.01(26)	1.49 ± 0.03(26)	2.01 ± 0.04(26)

EXPUESTOS

Horas de cultivos

	48h	60h	72h
<b>Hombres</b>	1.06 ± 0.01(14)	1.39 ± 0.04(14)	1.89 ± 0.09(13)
<b>c/lesiones</b>	1.06 ± 0.03 (6)	1.46 ± 0.07 (6)	2.08 ± 0.11 (6)
<b>s/lesiones</b>	1.06 ± 0.01 (8)	1.33 ± 0.05 (8)	1.73 ± 0.10 (7)
<b>Mujeres</b>	1.10 ± 0.02(18) <sup>c</sup>	1.37 ± 0.04(16) <sup>c</sup>	1.84 ± 0.05(17) <sup>c</sup>
<b>c/lesiones</b>	1.08 ± 0.03 (5)	1.39 ± 0.05 (5)	1.88 ± 0.09 (5)
<b>s/lesiones</b>	1.10 ± 0.02(13)	1.36 ± 0.05(11)	1.83 ± 0.06(12)
<b>Total</b>	1.08 ± 0.01(32) <sup>c</sup>	1.38 ± 0.02(30) <sup>c</sup>	1.86 ± 0.05(30) <sup>c</sup>
<b>c/lesiones</b>	1.07 ± 0.02(11)	1.44 ± 0.02(11)	1.99 ± 0.07(11)
<b>s/lesiones</b>	1.09 ± 0.01(21)	1.36 ± 0.03(19)	1.80 ± 0.06(19)

<sup>a</sup>promedio ± error estándar; <sup>b</sup>número de individuos; <sup>c</sup>prueba U- de Mann-Whitney, p<0.05



TABLA 9. EFECTO EN LAS PROPORCIONES DE M1, M2 Y M3 Y EN EL I.M. DEL TRATAMIENTO "IN VITRO" CON As III y As V  $10^{-9}$ M EN GO

		Duración del tratamiento		
		2 horas	6 horas	24 horas
<b>En ausencia de FNA</b>		Promedios +/- e. estándar		
M1	Testigo	13.00±0.99	12.50±1.49	18.00±0.99
	As III	24.75±1.24*	38.75±9.24*	73.00±0*
	As V	24.50±0*	33.25±2.74*	50.00±35.46*
M2	Testigo	31.50±2.49	39.50±4.49	37.00±4.99
	As III	38.25±5.74	34.50±3.99	9.00±0
	As V	39.50±0	45.00±3.99	16.67±20.47
M3	Testigo	55.50±1.49	48.00±5.99	45.00±3.99*
	As III	37.00±4.49	26.75±5.24	18.00±0
	As V	36.00±0	21.75±6.74	33.34±40.94
IIM	Testigo	2.47±0.57	1.80±0.22	1.15±0.45
	As III	1.35±0.55*	1.05±0.95*	0
	As V	1.55±0.08*	0.87±0.07*	0
<b>En presencia de FNA</b>				
M1	Testigo	11.50±3.50	14.50±0.49	16.00±0.99
	As III	22.00±2.49*	35.00±0.49*	44.00±0*
	As V	19.75±4.24*	33.50±2.99*	46.50±5.49*
M2	Testigo	29.50±3.49	36.50±6.49	36.00±0.99
	As III	34.50±1.49	30.50±0.99	36.00±0
	As V	37.25±5.74	37.75±2.74*	34.50±2.49
M3	Testigo	59.00±0	49.00±6.99	48.00±1.99
	As III	43.50±0.99	34.50±1.49	20.00±0
	As V	43.00±1.49	28.75±6.99	19.00±2.90
IIM	Testigo	2.38±0.20	1.82±0.12	2.97±0.17
	As III	1.48±0.50*	1.51±0.39*	0.27±0.22*
	As V	1.28±0.45*	1.67±0.26*	0.67±0.17*

\*Prueba de Ji cuadrada,  $p < 0.05$ . En esta tabla se presentan a manera demostrativa los promedios de los porcentajes. Para la prueba estadística se usó el número total de células en M1, M2, etc. de las cuatro muestras.

TABLA 10. EFECTO SOBRE EL I.R. DEL TRATAMIENTO IN VITRO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AS III y AS V, EN MUESTRAS DE 4 INDIVIDUOS.

	Concentraciones de arsénico inorgánico			
	0	$10^{-9}$ M	$10^{-8}$ M	$10^{-7}$ M
Promedios +/- e. estándar				
Testigo	2.33±0.04			
As III		2.12±0.07*	1.89±0.10*	1.62±0.11*
As V		2.16±0.07*	1.96±0.13*	1.73±0.08*

\* Prueba de "t" de Student,  $p < 0.05$

Tabla 11. FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN INDIVIDUOS TESTIGOS

Tipos de aberraciones

CODIGO	EDAD/ SEXO	A. DE RESID.	LES. DE PIEL	Brechas	Isobrech Cromat.	Rompin. Isocromat.	Rompin. Isocromat.	Interc. Cromat.	Interc. Cromos.	N° cél/ aberr.	N°aberr/ célula
00236	36/M	36	NO	6						0	0
88629	37/M	37	NO	5	1	2				2	0,02
62111	39/M	39	NO	1		6	1			7	0,07
34833	39/M		NO	5		5				4	0,04
12479	43/M	22	NO	5		5	5		2	9	0,09
46614	45/M	45	NO	7		4	1			4	0,04
50948	46/M	36	NO	4		1				1	0,01
13428	45/M	45	NO	3		1	1			2	0,02
17918	47/M	47	NO	3						0	0
29881	52/M	52	NO	3		1				1	0,01
97978	66/M	47	NO	2		1	1			2	0,02
60609	64/M	64	NO	1		1	1			2	0,02
53342	22/F	22	NO	3	1					0	0
83091	24/F	24	NO	3		3			1	4	0,04
93758	26/F	26	NO	7			1			1	0,01
55784	32/F	32	NO	1	2					0	0
78258	33/F	10	NO	10		4				4	0,04
87894	34/F	34	NO	5	1	6	1			8	0,08
63700	34/F	34	NO	5					1	0	0
33851	36/F	36	NO	2	1	3				3	0,03
37231	35/F	20	NO	4		2				2	0,02
67879	39/F	39	NO	2	1	2				2	0,02
99547	40/F	40	NO	4		1				1	0,01
01412	44/F	43	NO	2						0	0
62880	44/F	44	NO	4		4	1			5	0,05
89964	45/F	23	NO	5	1	3	5			8	0,08
42626	45/P	44	NO	10		5	4			8	0,08
<b>Promedios</b>				4.14	0	2.85	1.83	0	0.8	2.96	0.029
<b>S. Estándar</b>				0.04	0	0.03	0.03	0	0.01	0.05	0

Isobrech: isobrechas; Rompin. Cromat.: rompimiento cromatídico; Interc. Cromat.: intercambio cromatídico; Interc. Cromos.: intercambio cromosómico; N° cél/aberr.: número de células con aberraciones; N°aberr/célula: número de aberraciones por célula. Se usaron las mismas abreviaturas en la tabla 11.

Tabla 12. FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN INDIVIDUOS EXPUESTOS

## Tipos de aberraciones

CODIGO	EDAD/ SEXO	A. DE LESIONES		Brechas	Isobrech	Rompin.	Rompin.	Interc.	Interc.	N°cel/ aberr.	N°aberr/ célula
		RES.	DE PIEL								
83463	28/M	10	1,4	5		17	4			13	0,13
94771	32/M	32	NO	16		31	5			22	0,22
67079	32/M	28	NO			1			1	2	0,02
22554	34/M	34	NO	6	1	7	6			10	0,1
05999	38/M	38	2,3	8		14	14	1		18	0,18
42866	38/M	16	NO	6		3	2			5	0,05
47366	38/M	38	NO	2		2	2			4	0,04
76999	40/M	40	4	12	2	9	5			14	0,14
64620	41/M	*41	1 al 5	1		6	1		1	7	0,07
66892	42/M	19	2,3,4,5	7		4	3			7	0,07
15345	43/M	43	NO	5		3	1			4	0,04
85436	44/M	17	1 al 4,6	8	4	3				7	0,07
39765	49/M	49	2,3	14		10	5			9	0,09
67382	68/M	65	2,3,4	1		1	1			2	0,02
54463	24/F	3	NO	1	1	3		1		4	0,04
13858	28/F	28	NO	1	1				1	1	0,01
82627	29/F	13	NO			2				2	0,02
01432	30/F	15	NO	5	2	7	4		1	11	0,11
65978	31/F	15	NO	2		2		1		3	0,03
05437	33/F	33	4	1		1		1		2	0,02
63116	33/F	9	NO	16		4	9			12	0,06
39220	35/F	7	NO	2		4	2		1	7	0,07
82995	37/F	20	NO	8		20	2	1		20	0,2
06468	38/F	20	NO	3		6	6		2	12	0,12
00015	42/F	*42	4	3		7	3		1	10	0,1
16777	42/F	42	2,3,4	1		1	1			2	0,02
29085	43/F	26	NO	2		3	1			4	0,04
84318	44/F	44	4	5		5	2		1	3	0,03
97017	47/F	*47	NO	4		5	1			6	0,06
47361	47/F	30	NO	3		2				2	0,02
39693	66/F	36	4	10		2	2			4	0,04

Promedios 5,44 1,57 6,2 3,56 1 1,12 7,38 0,07

S. Estándar 0,07 0,01 0,1 0,04 0 0 0,08 0

\*individuos estudiados anteriormente; lesiones de piel: 1: hiperhidrosis, 2: hiperocromías, 3: hiperocromías, 4: hiperqueratosis punctata palmoplantar, 5: hiperqueratosis papular, 6: cuernos cutáneos.

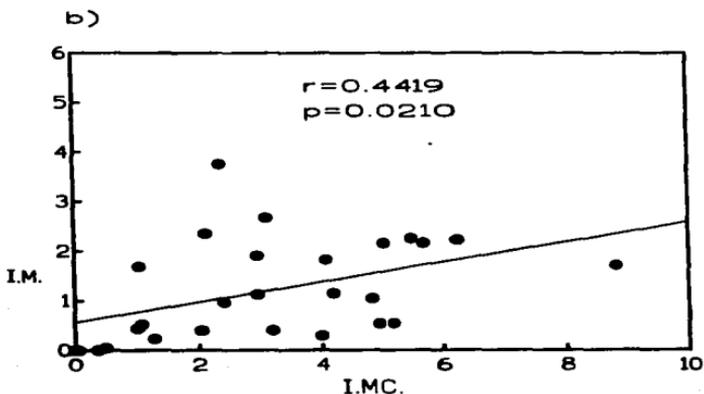
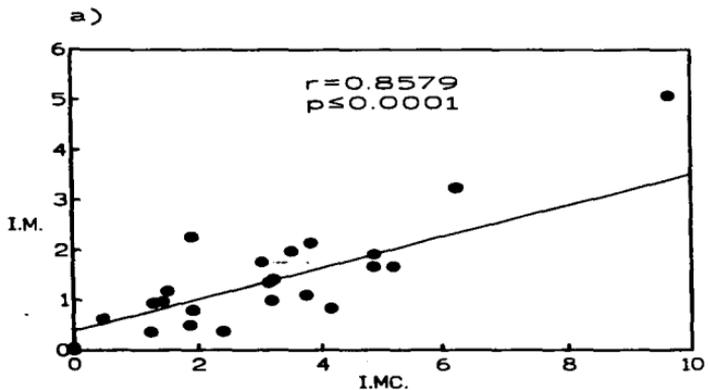


Figura 8. Correlación entre IMC e IM de MI (48 hs) entre a) testigos y b) expuestos

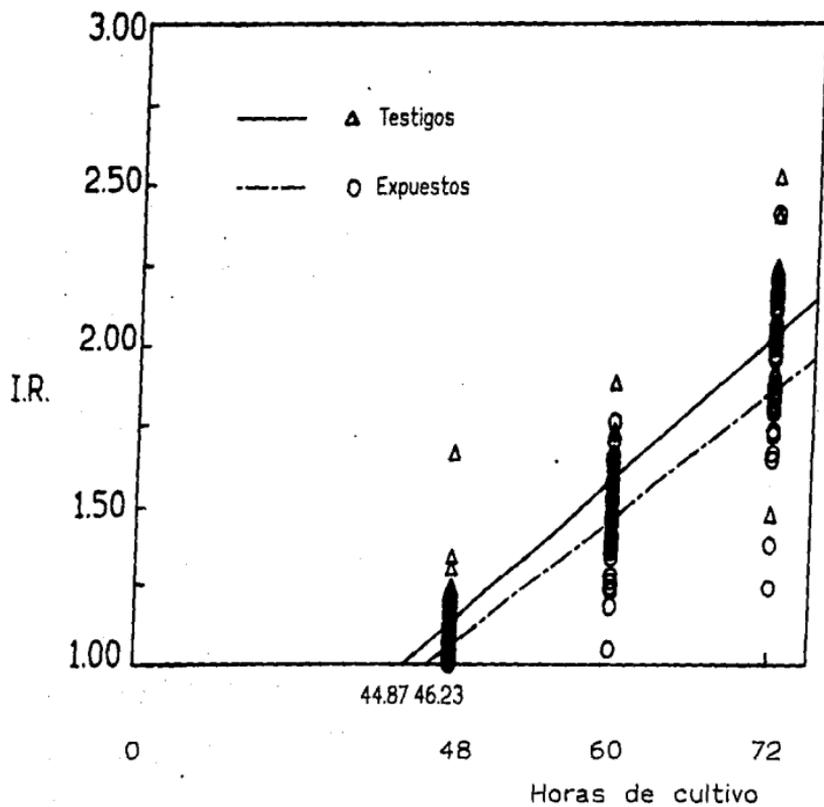


Fig.9. Analisis del tiempo de proliferacion

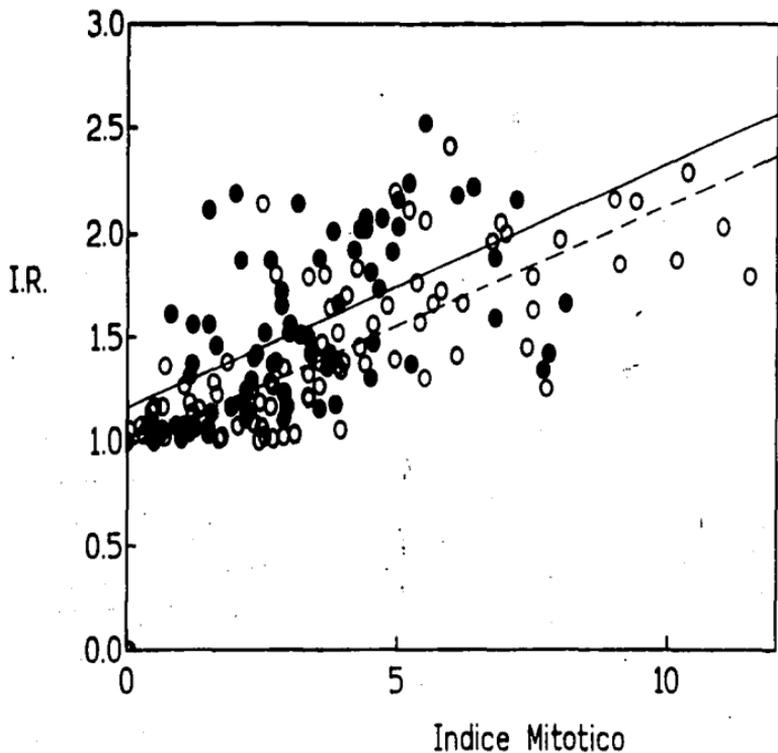


Fig. 10. Correlaciones entre los IM y los IR obtenidos a las diferentes horas de cultivo (● testigos; ○ expuestos).

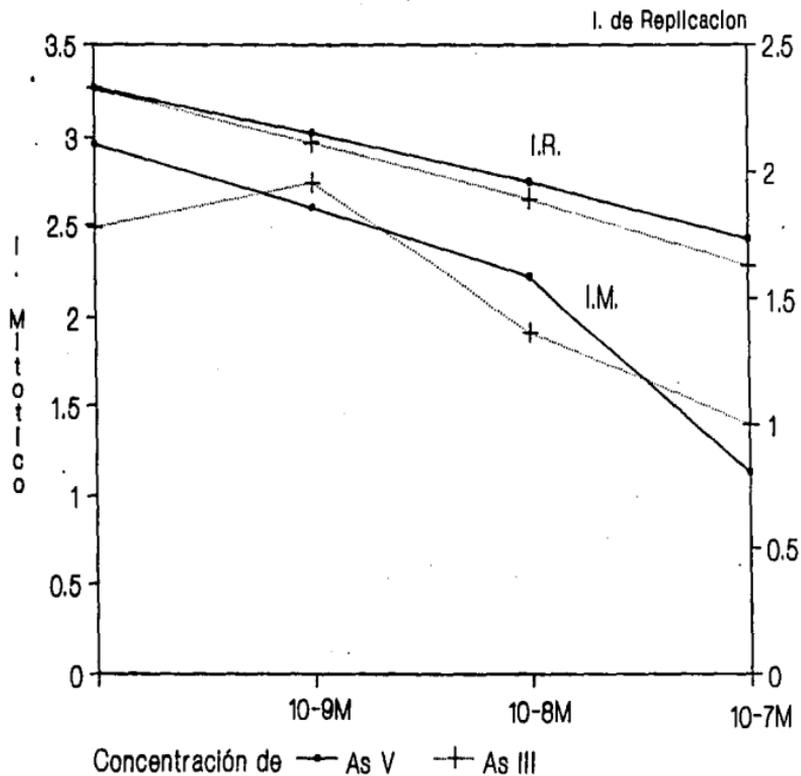


Fig. 11 Efectos "in vitro" del As Inorgánico.

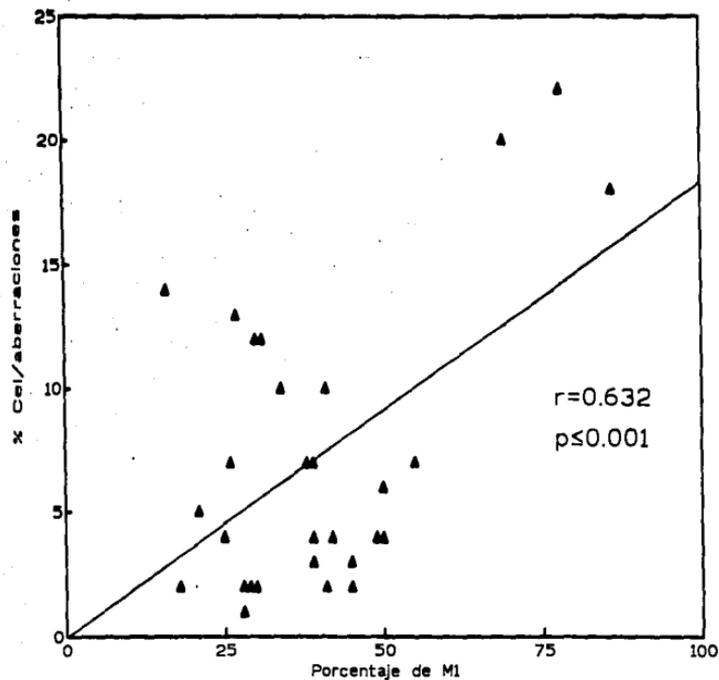


Fig.12. Correlacion entre el porcentaje de M1 a 72 hs de cultivo y el porcentaje de celulas con aberraciones en expuestos.