

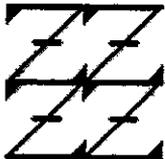


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

ESTUDIO DEL EFECTO GENOTÓXICO DEL
 TeCl_4 EN CULTIVO DE LINFOCITOS
HUMANOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
GRACIELA BARRAZA DIAZ



LO HUMANO EJE DE
NUESTRA REFLEXIÓN

DIRECTOR DE TESIS:
DR. MARIO A. ALTMIRANO LOZANO

MÉXICO, D. F.

1999

TESIS CON
BARRA DE ORIGEN

277931



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.

Agradezco de todo corazón a mis padres Maria Luisa y Contran por guiarme y apoyarme en cada momento de mi vida.

A la memoria de mi hermano Jaime, porque a pesar de que ya no esté con nosotros, siempre estará en nuestro corazón.

A mis hermanos Elizabeth, Armando, Rocio y Laura, porque a pesar de ser tan diferentes, hemos salido adelante.

A Jonás González Barraza, porque es la razón de mi vida.

Agradezco infinitamente al Dr. Mario Altamirano Lozano por aceptar dirigir esta Tesis y apoyarme en todo momento.

Agradezco sinceramente a los miembros del jurado:

Dr. Mario Altamirano Lozano
M. en B.E. Enrique Mendieta Márquez
M. en IBSH. Elia Roldán Reyes
Dra. Isabel Soto Cruz
Dr. Isaac Rodrigo Zambrano Ramírez

Por sus valiosas sugerencias y recomendaciones.

Mi agradecimiento infinito a los donadores:

Gerardo Reyes Zamora
Elizandro Pineda Herrera
Victor Joel Román Cárdenas
Honorio Juárez Flores

Porque además de contribuir en la parte experimental de esta Tesis, son excelentes compañeros y amigos.

INDICE

Pág.

RESUMEN

I

INTRODUCCIÓN

Toxicología Genética	1
El Linfocito como Sistema de Prueba	4
Aberraciones Cromosómicas	5
Tipo Cromosómico	6
Tipo Cromatídico	8
Asociación de Satélites	10
Electroforesis Unicelular	12
Contaminación Ambiental por Metales	13

TELURIO

Propiedades Físicas y Químicas	14
Usos	15
Exposición y Absorción	16
Distribución y Excreción en el organismo	17
Efectos en el organismo	
Animales de Laboratorio	19
Humanos	19
Antecedentes	21

JUSTIFICACIÓN

22

HIPÓTESIS

23

OBJETIVOS

24

MATERIAL Y METODOS

Protocolo 1	25
Protocolo 2	26
Análisis Estadístico	28

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1) Índice Mitótico	29
2) Aberraciones Cromosómicas	32
3) Asociación de Satélites	36
4) Electroforesis Unicelular	44

CONCLUSIONES

48

COMENTARIOS FINALES

49

REFERENCIAS

50

RESUMEN

En éste trabajo se estudió el efecto citotóxico y genotóxico del Tetracloruro de Telurio (TeCl_4) en linfocitos humanos en cultivo. Se hicieron tratamientos por 3 y 48 horas aplicándose las siguientes dosis de TeCl_4 : 0, 3.7, 7.4 y 14.8 μM . Se evaluó el Índice Mitótico (IM), la frecuencia y tipo estructural de Aberraciones Cromosómicas (AC), así como la frecuencia de Asociación de Satélites (AS). Se utilizó el método tradicional de cultivo de linfocitos humanos *in vitro*. También se evaluó el daño al ADN aplicándose la técnica de Electroforesis Unicelular (EU) en condiciones alcalinas y se obtuvo el porcentaje de viabilidad en cada una de las dosis utilizadas. Para cada una de las evaluaciones realizadas se utilizaron pruebas estadísticas como Z de proporciones, "t" de Student y Ji cuadrada.

Los resultados indican que el TeCl_4 disminuyó el IM al aplicarse las dosis de 7.4 y 14.8 μM en el tratamiento por 3 horas, a diferencia de los tratamientos por 48 horas en donde solo el IM disminuyó significativamente en la dosis de 14.8 μM con respecto al testigo. La frecuencia de AC que se observaron en los linfocitos expuestos al TeCl_4 fueron mayores en las dosis de 7.4 y 14.8 μM en comparación con el testigo, tanto en los tratamientos por 3 horas como en los de 48 horas. Las aberraciones que se presentaron con mayor frecuencia fueron del tipo cromatídico, ya que en los cromosomas en metafase se observaron principalmente fragmentos sencillos.

En la evaluación de la frecuencia de AS en los linfocitos expuestos al TeCl_4 en tratamientos de 3 y 48 horas, los resultados no fueron significativamente diferentes aunque, en tratamiento de 3 horas sí se observó una disminución en el total de AS por célula y el total de células con AS en la dosis de 14.8 μM .

Los resultados que se obtuvieron al evaluar el porcentaje de viabilidad fueron mayores al 95 %. En cuanto al daño al ADN se observó un aumento en la migración de células dañadas conforme la dosis se iba incrementando, siendo significativo para la dosis más alta.

Con base a los resultados obtenidos podemos concluir que el TeCl_4 es un compuesto citotóxico, que produce aberraciones de tipo cromatídico por lo que se considera un agente S-independiente y, al producir rompimientos de cadena sencilla del ADN se puede considerar como un agente genotóxico. No afecta en gran medida la frecuencia de AS por lo que no interviene en la región organizadora del nucleolo (NOR).

INTRODUCCIÓN

Toxicología Genética

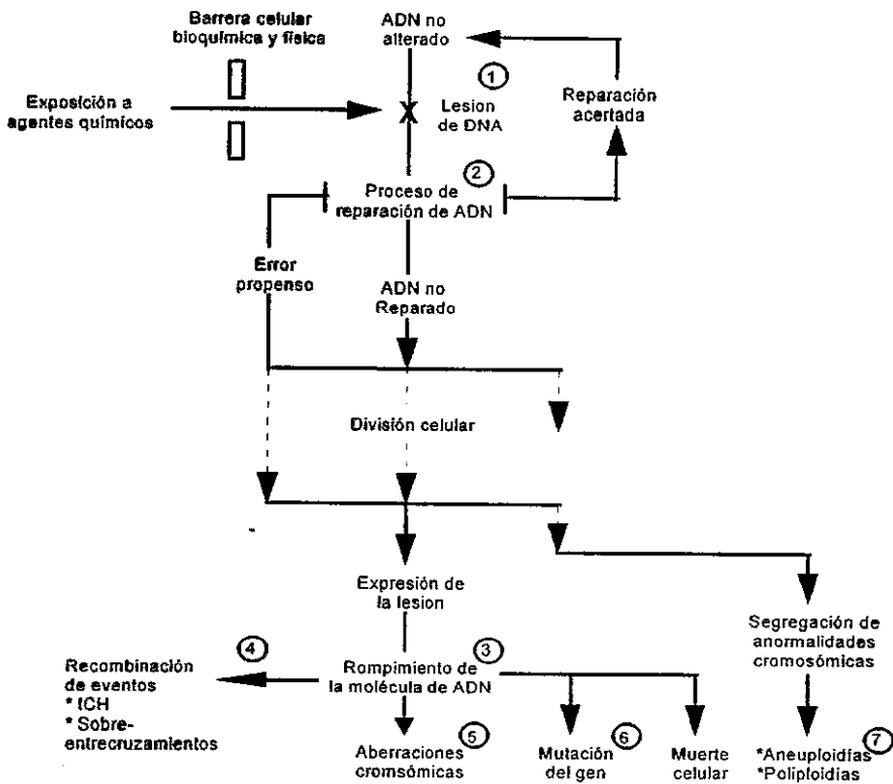
La Toxicología Genética es una rama de la Toxicología que identifica y analiza la acción de agentes físicos, químicos y biológicos sobre el material genético de los organismos vivos (Brusick, 1987; Li y Heflich, 1991). El objetivo de la Toxicología Genética es, precisamente, la de detectar y analizar el peligro potencial de todos aquellos agentes que interaccionan con los ácidos nucleicos y logran producir de alguna manera alteraciones en concentraciones subtóxicas (Brusick, 1987).

Los agentes que producen alteraciones en el material genético en exposiciones subtóxicas y que da como resultado modificaciones hereditarias características o inactivación en alguna parte de la cadena del ADN son llamados **genotóxicos**. Las sustancias genotóxicas usualmente tienen propiedades químicas o físicas que facilitan su interacción con los ácidos nucleicos (Brusick, 1987). Esta relación provoca modificaciones en la estructura de la cadena, y estas alteraciones son generalmente llamadas **mutaciones**, las cuales pueden ocurrir tanto en células somáticas como en células germinales (Li y Heflich, 1991).

El potencial de los agentes genotóxicos para producir efectos en la salud humana trae como consecuencia el iniciar un camino que pasa por diversas transformaciones citológicas que si no son reparadas terminan con la inducción de mutaciones o alteraciones cromosómicas y cuya expresión puede ser muy variable en los organismos. El daño producido al ADN por los agentes químicos se clasifican en dos categorías: alteraciones macroscópicas detectables por el análisis citogenético de los cromosomas (aberraciones cromosómicas) y cambios o alteraciones no visibles, los cuales ocurren a nivel de los nucleótidos (mutaciones) (Brusick, 1987). En la figura 1 se observa que cuando hay exposición a agentes químicos que pueden dañar el ADN (punto 1), inmediatamente los procesos inherentes de reparación de la célula empezarán a corregir la lesión (punto 2). Si esto, no pudo ser reparado, entonces la célula realizará todas sus funciones (síntesis, replicación, etc.), como normalmente lo hace, hasta llegar a la división

celular, en donde se pueden observar dos posibles eventos: en el primero se expresa la lesión causada, generalmente con el rompimiento de la molécula de ADN (punto 3) y va a culminar, ya sea con la recombinación de eventos en forma de intercambio de cromátidas hermanas o sobre-entrecruzamientos (punto 4), aberraciones cromosómicas (punto 5), mutación de genes (punto 6) o muerte celular (citotoxicidad); en el segundo se da la segregación de anomalías cromosómicas, generalmente con aneuploidías y poliploidías (punto 7).

Figura 1. Relación entre el agente genotóxico y el resultado del daño al ADN en las células (Brusick, 1987).



El resultado de la lesión al ADN puede manifestarse en el individuo como envejecimiento celular, cáncer o malformaciones congénitas, las cuales pueden ser

compatibles con la vida; en caso contrario, pueden ocurrir abortos espontáneos. Si la alteración se produce en los gametos (óvulos o espermatozoides) o en las células de tipo gonial que originan a los gametos, el daño tiene la posibilidad de manifestarse en las siguientes generaciones en forma de enfermedades genéticas transmisibles (mutaciones génicas), alteraciones cromosómicas no transmisibles (mutaciones letales dominantes), malformaciones congénitas, infertilidad y esterilidad (Brusick, 1987).

Diversos estudios han mostrado que en el hombre una de las causas más importantes de la morbilidad y mortalidad están relacionadas con alteraciones en los cromosomas, los cuales son responsables de diversos trastornos como la muerte fetal temprana, muerte del recién nacido, algunos casos de retraso mental, malformaciones del neonato y cardiopatías congénitas y otras enfermedades (Altamirano-Lozano, 1992).

Durante la evolución de las disciplinas científicas, la Toxicología Genética ha permitido que se hayan desarrollado más de 200 sistemas de prueba tanto *in vivo* como *in vitro*; sin embargo, únicamente algunos han sido validados debido a su posibilidad de estandarización y a la facilidad de detectar la inducción de cambios en el material hereditario de los organismos, mediante el uso de una gran variedad de tipos celulares, entre los cuales se incluyen bacterias, hongos, cultivo de células de mamíferos, células somáticas y germinales de plantas superiores y animales, y en algunos casos hasta organismos completos (Li y Heflich, 1991; Roldán-Reyes, 1992).

Según Moutschen (1985), los sistemas biológicos de prueba pueden ser clasificados en cuatro grupos en base a su potencial y tipo de daño que sean capaces de detectar en el material genético:

I. Aquellas pruebas que detectan daño al ADN a nivel molecular y, debido a la suficiente información que dan, permiten clasificar a los agentes como mutágenos potenciales.

II. Pruebas que detectan mutaciones a nivel celular ya sea de manera directa o indirecta mediante el empleo de microorganismos, plantas, células en cultivo o mamíferos completos, tanto *in vivo* como *in vitro*.

III. Todos aquellos sistemas que permiten evaluar el daño causado directamente sobre los cromosomas (efectos mutagénicos y clastogénicos), tanto *in vivo* como *in vitro*.

IV. Sistemas que recopilan una serie de ensayos a largo plazo que permiten evaluar el efecto en los organismos complejos y en su descendencia.

El Linfocito como Sistema de Prueba

La sangre presenta muchos tipos celulares con funciones muy diversas que abarcan desde el transporte de oxígeno hasta la producción de anticuerpos. La característica más notable entre todas las células es que se generan a partir de una célula madre común de la médula ósea roja. Esta célula madre hematopoyética es pluripotencial, ya que da lugar a los distintos tipos de células sanguíneas diferenciadas (Alberts *et al*, 1994).

Las células de la sangre se pueden clasificar en glóbulos rojos y blancos. Los glóbulos rojos o eritrocitos carecen de núcleo por lo que en un cultivo no se reproducirían. Los glóbulos blancos, o leucocitos se dividen en tres categorías: granulocitos, monocitos y linfocitos (Alberts *et al*, 1994; González-Morán, 1996); estos últimos son células que responden fácilmente a cualquier tipo de estímulo, son células responsables de la especificidad inmunitaria y se dividen en: células T (se originan en el timo) que son las responsables de la inmunidad mediada por células, y las células B (en adultos se originan en la médula ósea roja y en el feto en el hígado) que producen a los anticuerpos (Alberts *et al*, 1994).

El cuerpo humano contiene alrededor de 5 litros de sangre, que supone un 7% del peso corporal. Los glóbulos rojos constituyen alrededor de un 45% de este volumen y los glóbulos blancos alrededor de un 1%, el resto es el plasma sanguíneo líquido. Las células T se encuentran en una concentración aproximada de 1×10^9 células/litro y las células B en una concentración de 2×10^9 células/litro (Alberts *et al*, 1994).

Los linfocitos son células diferenciadas y en condiciones normales no se dividen en la sangre; sin embargo, en cultivo son estimulados por un mitógeno (como la fitohemaglutinina), para que sinteticen ADN y puedan dividirse durante la mitosis (Alberts *et al*, 1994; González-Morán, 1996). La actividad mitótica inicia en las primeras 24 horas,

después de haberse adicionado el mitógeno y alcanza su máxima actividad a las 72 horas (Rooney y Czepulkowski, 1986; Kirkland, 1990).

El análisis de linfocitos de sangre periférica se ha utilizado como un monitor biológico para exposición humana a sustancias genotóxicas. Algunos estudios sobre cultivos celulares expuestos a agentes físicos y químicos han demostrado que los linfocitos de sangre periférica humana son un indicador extremadamente sensible tanto en pruebas *in vitro* como *in vivo* que inducen cambios estructurales cromosómicos; estos cambios en la estructura del cromosoma indican evidencias de daño en el material genético (Evans, 1984; Brusick, 1987).

Desde el punto de vista mutagénico el linfocito ofrece un serie de ventajas como: el presentar una vida media de 2 a 4 años, lo que permite que acumule lesiones en su ADN; generalmente se encuentra en un estado definido del ciclo celular (G_0); puede ser inducido a la división celular mediante un mitógeno, y posee una baja actividad de reparación. Gracias a dichas ventajas se han podido realizar una gran variedad de análisis como: Aberraciones Cromosómicas (AC), Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH), Asociación de Satélites (AS), Cinética de División Celular (CDC), Micronúcleos (MCN), Mutaciones Puntuales Dominantes (MPD), etc. (Moutschen, 1985; Roldán-Reyes, 1992).

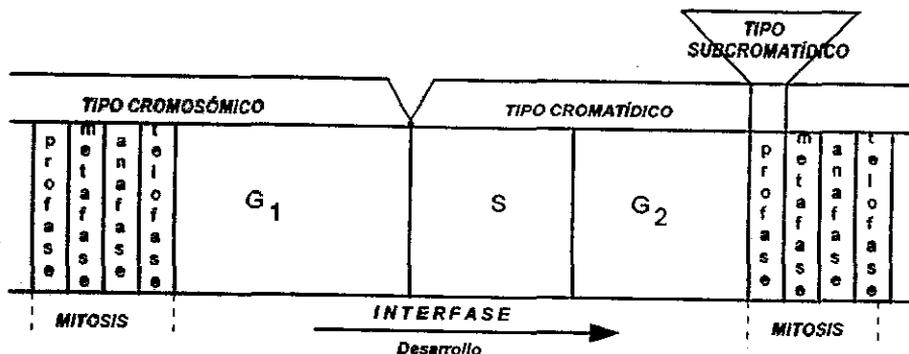
Aberraciones Cromosómicas

Las AC son alteraciones en la cadena del ADN que se reflejan en la estructura de los cromosomas. Las AC constituyen una clase de evento de mutación; cuando las células sanguíneas son expuestas a algún agente dañino, la posibilidad de riesgo puede ir más allá de las células somáticas (implicándose al tejido germinal que puede tener impacto en la capacidad reproductiva y causar enfermedades genéticas) (Brusick, 1987; Kirkland, 1990).

El daño cromosómico que se distingue en metafase puede ser dividido en dos tipos: el cromosómico y el cromatídico (figura 2). Los linfocitos en fase de G_0 o G_1 del ciclo celular expuestos a radiación ionizante y otros agentes mutagénicos induce daño de

tipo cromosómico donde la unidad de rompimiento y reunión es el cromosoma completo (tabla 1); cuando las células son expuestas a los mismos agentes en estado de S o G₂ del ciclo celular y, los cromosomas se han dividido ya en dos cromátidas hermanas, y se producen por lo tanto aberraciones de tipo cromatídico donde la cromátida simple sufre rompimiento o cambio (tabla 1). Algunos otros agentes (como los alcalinos) pueden, usualmente, producir aberraciones de tipo cromatídico cuando las células se exponen al mutágeno en estado de G₁, (Evans, 1984).

Figura 2. Tipo de aberración que se presenta en las fases del ciclo celular cuando se exponen las células a radiación y a agentes químicos (Evans, 1984)



• Aberraciones de tipo cromosómico

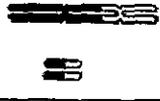
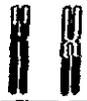
En este tipo de aberraciones encontramos siete clases que se pueden distinguir en metafase. Las primeras 5 suponen únicamente un cromosoma simple y son conocidos como intra-cambios, mientras que los tipos 6 y 7 suponen los cambios de partes entre cromosomas y por lo tanto se clasifican como inter-cambios. Estas clases de aberraciones son: **1) deleción terminal**, en la cual pares de fragmentos resultan del rompimiento del cromosoma apareciendo como una aberración obvia; **2) minutas (intersticial, isodiamétrico o deleción en punto)** o pares de fragmentos acéntricos, pequeños en tamaño que aparecen como un par de esferas de cromatina; **3) anillos acéntricos**, pares de segmentos de cromatina sin un centrómero que se junta para formar un anillo; **4) anillos céntricos**, formados de un anillo que contiene un centrómero,

pueden ser fácilmente distinguidos por su morfología, ya que además del tipo de anillo acéntrico que presenta va acompañado de un fragmento; 5) **inversiones**, que se clasifican en dos categorías: a) *paracéntricas*, cuando ambos puntos de rompimiento y reunión se dan en el mismo brazo del cromosoma y, b) *pericéntrica*, cuando los puntos de rompimiento e inversión se dan en el lado opuesto del centrómero; 6) **translocaciones recíprocas**, aberraciones que suponen rompimiento de dos cromosomas y cambios recíprocos de segmentos rotos entre dichos cromosomas y, 7) **aberraciones policéntricas o dicéntricas (intercambios asimétricos)**, aberraciones que se originan por un cambio entre dos o más cromosomas que resultan en la reunión de productos céntricos en caminos semejantes para formar una estructura dicéntrica y una asociación de fragmentos acéntricos (figura 3) (Evans, 1984; Kirkland, 1990).

Tabla 1. Tipo de eventos que se presentan en las células durante el ciclo celular cuando se exponen a radiación y a agentes químicos (Brusick, 1987)

Estado del Evento	Fase G1	Fase S (Síntesis de ADN)	Fase G2	Mitosis
Cadena de ADN	1	1→2	2	2→1
Tipo de aberración observada	Rompimiento cromosómico. Anillos. Translocaciones. Deleción. Dicéntricos. Fragmentos.	Combinaciones de todos los anteriores	Rompimiento cromatídico, Cuadrirradiales Trirradiales, Fragmentos	
Sensibilidad relativa a efectos genotóxicos	Baja	Alta	Moderada	Baja

Figura 3. Tipo de aberraciones que se presentan en los cromosomas cuando se exponen a agentes genotóxicos (Evans, 1984)

ABERRACIONES CROMOSÓMICAS						
	NORMAL	DELECCIÓN TERMINAL	DELECCIÓN INTERSTICIAL	ANILLO + FRAGMENTO CÉNTRICO	ANILLO CÉNTRICO	INVERSIÓN PERICÉNTRICA
INTRA-CAMBIO						
INTER-CAMBIO	NORMAL	DICÉNTRICO + FRAGMENTO		INTERCAMBIO SIMÉTRICO		
						

♣ Aberraciones de tipo cromatídico

Las aberraciones de este tipo son consecuencia de errores en la replicación cuando ocurre la síntesis de ADN y generalmente son inducidas cuando la célula se encuentra en el estado de S o G₂ de la interfase (figura 2) (Evans, 1984).

Las aberraciones cromatídicas pueden ser: 1) **rompimientos cromatídicos**, que muestran claramente un mal alineamiento de la parte proximal y distal de la cromátida rota; 2) **rompimientos isocromatídicos**, muestra replicación o unión entre cromátidas hermanas al final del rompimiento; cuando la replicación es incompleta (no unión) la proximidad o distanciamiento de los fragmentos puede ser alineado o desalineado; 3) **cambios cromatídicos** o intercambios entre cromosomas, cuando es formado un fragmento acéntrico y una cromátida dicéntrica comúnmente llamada cuadrirradial; 4) **Intercambios con un cromosoma**: a) entre brazos (intercambio inter-brazo), que pueden ser *asimétricos*, cuando se forma un anillo acéntrico, o *simétricos*, cuando se produce una inversión en una cromátida; y b) con un brazo (intercambio intra-brazo), en

que a menudo quedan asociados con el cromosoma de origen; **5) Intercambios cromatídicos/isocromatídicos de un trirradial**, que forman un *dicéntrico trirradial*, produce fragmentos y no es una aberración independiente, o *trirradiales monocéntricos*, y **6) Intercambios cromatídicos**, aberraciones con un cromosoma que puede incluir rompimiento con algún locus sobre ambas cromátidas hermanas creando intercambio entre las mismas (pueden ser vistas únicamente por autorradiografía o por técnica de tinción con Bromodesoxiuridina (BrdU)) (figura 4). Las aberraciones de intercambio también pueden ser clasificadas como asimétricas o simétricas dependiendo si se forma un fragmento acéntrico (Rooney y Czepulkowski, 1986; Kirkland, 1990).

Figura 4. Algunos tipo de aberraciones cromatídicas en los cromosomas cuando son expuestos a agentes genotóxicos (Evans, 1984)

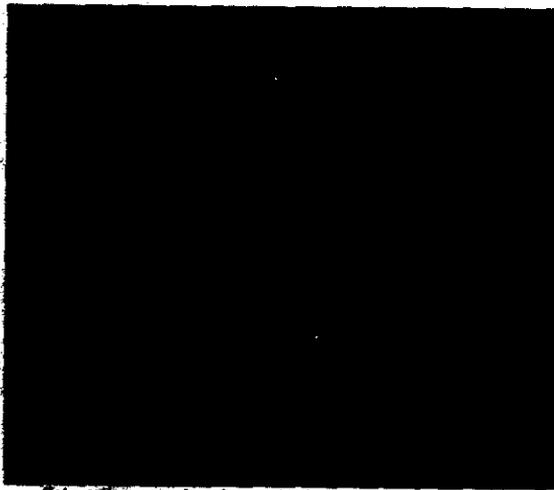
Cromosomas Normales en G ₂	Aberraciones Cromatídicas en Metafase	Aberraciones Cromatídicas en Anafase	Tipo de Aberración que se forma
			Rompimiento Cromatídico
			Rompimiento Isocromatídico
			Cambios Cromatídicos
			Intercambios con un Cromosma

Asociación de Satélites

Cuando en una metafase de células humanas preparada bajo condiciones estándares, los cromosomas se observan orientados entre sí por sus brazos pequeños (cromosomas acrocéntricos, grupo D y G) se dice que hay una "Asociación de Satélites" (AS) (figura 5); esto se debe a la tendencia de asociación entre cromosomas acrocéntricos a través de su Región Organizadora Nucleolar (RON), que se encuentra localizada en las constricciones secundarias de dichos cromosomas (Pérez-López, 1992).

Figura 5. Célula humana en metafase indicando una AS

(100 X)



Fotografía proporcionada por el Laboratorio de Citogenética,
Mutagénesis y Toxicología Reproductiva. FES-Zaragoza. UNAM.

Las RON son grandes secuencias de ADN procedentes de varios cromosomas, cada uno de los cuales contiene uno o más grupos de genes codificantes de ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) que se transcriben con gran frecuencia por la ARN polimerasa I dentro del nucleolo. El nucleolo se forma al final de la mitosis (en telofase) y es el sitio en donde se realiza la transcripción continua de múltiples copias génicas de moléculas de ARNr que son empaquetados con las proteínas ribosómicas; carece de membrana que lo delimite, y sin embargo se pueden distinguir tres regiones: el primero es el centro fibrilar que contiene ADN, que no está siendo transcrito activamente; el segundo

es el componente fibrilar que contiene moléculas de ARN en proceso de transcripción y, el tercero, es el componente granular que contiene precursores de las proteínas ribosomales maduras (Alberts *et al*, 1994).

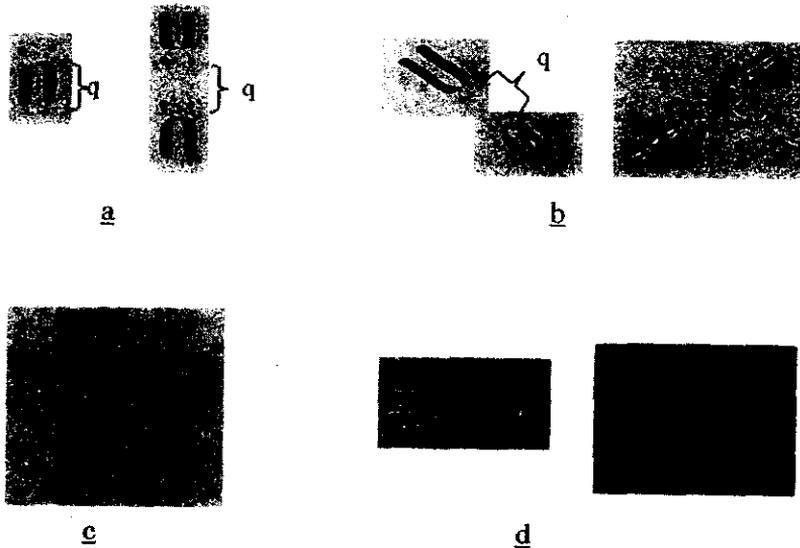
Las AS fueron descritas por primera vez por Ferguson-Smith, Handmaker y Harnden en 1961, estableciendo que éste fenómeno es importante en la producción de algunas anomalías cromosómicas humanas, como las no disyunciones y las translocaciones, donde la probabilidad es superior entre cromosomas satelizados (Pérez-López, 1992).

Criterios para considerar la asociación de satélites

Zang y Back (1968) propusieron cuatro criterios para considerar las asociaciones de satélites cuando se observaban en preparaciones de células en metafase (figura 6):

- 1) la distancia entre los cromosomas acrocéntricos no debe sobrepasar del largo del brazo "q" ya sea de los cromosomas D o G (figura 6a),
- 2) los cromosomas acrocéntricos están orientados exactamente sobre el mismo eje longitudinal (figura 6b),
- 3) cuando la orientación de los brazos cortos de un cromosoma acrocéntrico adicional es directa hacia la asociación principal y no se queda por debajo de la "línea del centrómero" de cualquiera de los cromosomas acrocéntricos. La "línea del centrómero" es la que cruza el centrómero y es perpendicular al eje longitudinal (figura 6c) y,
- 4) los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos se encuentren conectados por un hilo visible y claro con una composición semejante a los mismos (figura 6d).

Figura 5. Modelo de asociación de satélites según el criterio de evaluación propuestos por Zang y Back, 1968.



Electroforesis Unicelular

La electroforesis en gel de células individuales, también conocida como "ensayo cometa", es una técnica rápida y simple para medir y analizar rompimientos al ADN en células de mamíferos (Singh *et al*, 1988; Olive *et al*, 1990). Esta es una adaptación de otros métodos en donde los rompimientos de hebra simple son comúnmente evaluados por procedimientos que incluyen tratamientos con pH elevado al realizarse el desenrollamiento de la cadena; el principio de este desenrollamiento en condiciones alcalinas, elución alcalina o sedimentación en sacarosa en un medio alcalino es que si algunos pares de bases de ADN son rotos por álcali, la discontinuidad en la hebra simple podría ser detectada (McKelvey-Martin *et al*, 1993).

En 1984, Ostling y Johanson presentaron una técnica electroforética con pH elevado capaz de detectar rompimiento en hebras simples de ADN y sitios alcali-lábiles

en células individuales (Singh *et al*, 1988). Esta técnica consiste en suspender las células en gel de agarosa sobre un portaobjetos y sumergirlas en una solución que contenga detergentes y gran cantidad de sales a un pH de 10 para lisarlas; posteriormente se exponen a la electroforesis por corto tiempo bajo condiciones alcalinas. Posterior a la electroforesis, se sigue la tinción con bromuro de etidio observándose la preparación en un microscopio de fluorescencia; las células que presentan daño en el ADN se observan con una migración del núcleo hacia el ánodo que va incrementándose conforme es mayor al rompimiento de la hebra (Tice *et al*, 1990, McKelvey-Martin *et al*, 1993).

La importancia de esta técnica es que permite la observación de diferencias intercelulares en daño al ADN y reparación en una población de células eucariotas que pueden ser obtenidas fácilmente en una suspensión de células simples (Tice *et al*, 1990).

Algunas ventajas de esta técnica son: a) se requiere de una muestra extremadamente pequeña (1 a 10 000 células), b) proporciona posibilidades para medir el cometa, c) es extremadamente sensible en comparación con otras técnicas, d) los resultados pueden ser obtenidos en un solo día, e) puede ser reproducible las veces que se desee en el momento en que se hace el experimento y f) su costo es relativamente bajo (Singh *et al*, 1988; Olive *et al*, 1990; Tice *et al*, 1990; McKelvey-Martin *et al*, 1993).

Contaminación Ambiental por Metales

En la actualidad la contaminación del agua, aire y suelo se debe en gran parte a las emisiones antropogénicas, debido a que una gran cantidad de sustancias después de haber sido utilizadas y procesadas son liberadas al ambiente como desechos, ya sea en forma líquida, sólida y gaseosa. Dentro de esta fuente importante de contaminación se encuentran principalmente las actividades derivadas de la vida doméstica, las emisiones automotrices, las aspersiones y fumigaciones agrícolas, así como otras fuentes menores de contaminación que juegan un papel importante en la acumulación de sustancias nocivas en el ambiente (Ma *et al*., 1982; Altamirano-Lozano, 1992).

Dentro de las sustancias y compuestos que interactúan con el hombre en su vida cotidiana tenemos a los metales (cobre, cadmio, mercurio, zinc, estaño, plomo, vanadio, litio, cromo, molibdeno, magnesio, cobalto y níquel) los cuales, siempre están presentes en el ambiente, solos o en combinación con otros elementos formando parte de suelos, rocas, agua y materia biológica (Nriagu, 1988). Estos elementos son considerados como peligrosos y de alto riesgo para el ser humano por diferentes organizaciones como: la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia de Protección Ambiental (EPA), el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (Ortiz-Monasterio *et al*, 1987; Bolaños, 1990). También se encuentran otros elementos como el arsénico, germanio, selenio, antimonio y telurio que poseen propiedades químicas y físicas típicas de metales y a su vez poseen características de elementos no metálicos; éstos son llamados metaloides (Altamirano-Lozano, 1992).

Desafortunadamente en países como México en los que el problema de contaminación ambiental y las alteraciones de reproducción son altos (Altamirano-Lozano, 1992) no se cuenta con este tipo de asociaciones que estén a la expectativa de dichos problemas y la población esta expuesta continuamente a xenobióticos sin saber lo que puede repercutir en futuras generaciones.

TELURIO

Propiedades Físicas y Químicas

El telurio (Te) es un metaloide que pertenece al grupo VI-A de la Tabla Periódica; tiene peso atómico de 127.6 g/mol; su número atómico es 52; los números de valencia que presenta son 2-, 4+, 6+; es diatómico (Te_2) en estado de vapor; su densidad en estado metálico es de 6.2 g/ml a 20°C, en polvo amorfo es de 6.0 g/ml a 20°C; su punto de fusión es de 449.5°C y su punto de ebullición es de 989.8°C (Clayton y Clayton, 1981; Merck Index, 1989).

Dentro de las sustancias y compuestos que interactúan con el hombre en su vida cotidiana tenemos a los metales (cobre, cadmio, mercurio, zinc, estaño, plomo, vanadio, litio, cromo, molibdeno, magnesio, cobalto y níquel) los cuales, siempre están presentes en el ambiente, solos o en combinación con otros elementos formando parte de suelos, rocas, agua y materia biológica (Nriagu, 1988). Estos elementos son considerados como peligrosos y de alto riesgo para el ser humano por diferentes organizaciones como: la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia de Protección Ambiental (EPA), el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (Ortiz-Monasterio *et al*, 1987; Bolaños, 1990). También se encuentran otros elementos como el arsénico, germanio, selenio, antimonio y telurio que poseen propiedades químicas y físicas típicas de metales y a su vez poseen características de elementos no metálicos; éstos son llamados metaloides (Altamirano-Lozano, 1992).

Desafortunadamente en países como México en los que el problema de contaminación ambiental y las alteraciones de reproducción son altos (Altamirano-Lozano, 1992) no se cuenta con este tipo de asociaciones que estén a la expectativa de dichos problemas y la población esta expuesta continuamente a xenobióticos sin saber lo que puede repercutir en futuras generaciones.

TELURIO

Propiedades Físicas y Químicas

El telurio (Te) es un metaloide que pertenece al grupo VI-A de la Tabla Periódica; tiene peso atómico de 127.6 g/mol; su número atómico es 52; los números de valencia que presenta son 2-, 4+, 6+; es diatómico (Te_2) en estado de vapor; su densidad en estado metálico es de 6.2 g/ml a 20°C, en polvo amorfo es de 6.0 g/ml a 20°C; su punto de fusión es de 449.5°C y su punto de ebullición es de 989.8°C (Clayton y Clayton, 1981; Merck Index, 1989).

El Te existe en dos formas alotrópicas, en polvo y cristales isomorfos. Tiene ocho isótopos estables: 120 (0.089 %), 122 (2.46 %), 123 (0.87 %), 124 (4.61 %), 125 (6.99 %), 126 (18.71 %), 128 (31.79 %) y 130 (34.48 %); de igual forma presenta isótopos radiactivos artificiales que son: 114-119, 121, 127, 129, 131-134. Está presente en la corteza terrestre en una concentración de 0.002 ppm, aproximadamente. Se encuentra en forma de teluridos en combinación con metales en los minerales como la tetradimita, altaíta, coloradodita. Comúnmente, los teluritos se encuentran como dióxidos y en forma nativa se encuentran asociados con la plata y el oro. Fue descubierto por Reichenstein en 1782 y en 1798 Klaprot le dio su nombre actual (Gerhardsson *et al*, 1986; Merck Index, 1989).

Es insoluble en agua, benceno y disulfuro de carbono, es soluble en alcohol, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico y álcalis, y en presencia de aire se disuelve en hidróxido de potasio. Algunos compuestos como el óxido de telurio son casi insoluble en agua y algunos fluidos; el ácido telurico es soluble en agua con una tendencia firme para polimerizar; el Te_2Cl_4 es descompuesto en agua en dióxido de telurio y ácido clorhídrico; el $TeCl_4$ es blanco y muy higroscópico, se funde como un líquido amarillento y a altas temperaturas es de color rojo oscuro, es soluble en alcohol absoluto y tolueno (Carson *et al*, 1987; Merck Index, 1989).

Los Estados Unidos de América, Canadá, Perú y Japón son grandes productores de Te, y obtienen el elemento durante el refinamiento electrolítico de una burbuja de cobre a través de los lodos formados en el ánodo; estos lodos contienen arriba del 4% de Te que es extraído por disolución en sosa cáustica seguida de una electrolización (Gerhardsson *et al*, 1986).

Usos

El Te es utilizado en la industria como aditivo metalúrgico para mejorar las características de aleaciones de cobre y acero, en la fundición del hierro, aluminio y bronce. También es utilizado en algunos procesos químicos como catalizador. El Te muestra gran conductividad dependiendo de la configuración de sus átomos,

conductividad que se incrementa ligeramente con la exposición a la luz (Kudryavtsev, 1974).

El Te puede formar pastas con la plata, el cobre, el oro, el estaño u otros elementos que son utilizados para el acabado de metales, preparación de explosivos, antioxidantes, transmisores de vidrio infrarrojo y también para uso en la termoeléctrica y otros dispositivos. Su mayor uso ha sido en la vulcanización del caucho, en donde es utilizado para reducir el tiempo de curtimiento y mejorar las características del mismo incrementando la resistencia al calentamiento y la abrasión. El vapor de Te es utilizado en lámparas de luz domésticas (Kudryavtsev, 1974; Clayton y Clayton, 1981).

A principios de siglo, el Te fue utilizado como un agente terapéutico para detener la transpiración nocturna en pacientes tuberculosos (DeMeio y Henriques, 1947) y para el tratamiento de sífilis en forma de suspensión administrándolo por vía intramuscular; esto producía síntomas secundarios como olor a ajo en el aliento y sabor metálico en la boca (Brownin, 1969).

Algunos compuestos como el ácido graso de Te tratado con yodo radiactivo (TPDA) ha sido utilizado para la exploración del miocardio (Bianco *et al*, 1984), o como el tricloro de amonio [dioxetilfen-O,O]telurato (AS-101) que es utilizado en la aplicación terapéutica como anticancerígeno e inmunomodulador (Sredni *et al*, 1990).

Exposición y Absorción

El Te que se encuentra en el aire es originado principalmente por emisiones industriales y combustión de carbón; se estima que anualmente alrededor de 40 toneladas de Te son desprendidos en cenizas junto con otros derivados metálicos subproductos de la combustión. Por otra parte, alrededor de 2 μg de Te/ m^3 al día son liberados por plantas electrolíticas de refinamiento de cobre, el cual cubre una distancia de 2 Km. (Selijankina y Alekseeva, 1971; Davidson y Lakin, 1972).

El Te emitido en forma de dióxido de Te y ácido telúrico en los procesos industriales, de combustión y metalúrgicos, representa una fuente de exposición laboral

múltiple que puede incluir además al plomo, zinc, arsénico, selenio, cadmio y talio (Izrael'son, 1973). En un estudio realizado por Steinberg *et al* (1942) sobre los niveles de contaminación en aire en los procesos de fundición de hierro, se reportaron de 0.01 a 0.1 mg/m³, de los cuales un 70% de los resultados estaban entre 0.1 y 0.05 mg/m³ (Gerhardsson *et al*, 1986).

Schroeder *et al* (1967) realizaron una investigación sobre el contenido de Te en muestras de comida y reportaron lo siguiente: carne (en general) 4.2 mg/kg; productos de leche 4.8 mg/kg; cereales 2.8 mg/kg; grasas y aceites 1.8 mg/kg; vegetales y frutas 1.1 mg/kg, dieta de hospitales 0.44 mg/kg. Después de analizar estos resultados, Nason y Schroeder (1967) estimaron la absorción diaria al organismo de aproximadamente 100 µg/kg (Gerhardsson *et al*, 1986).

En el hombre, la absorción del Te no ha podido ser cuantificada bajo las bases de información disponible (DeMeio, 1946; DeMeio y Jetter 1948). En comparación con los vegetales, en una sola ocasión se ha reportado la presencia del Te en plantas de cultivo; en este estudio, las muestras de sales en arbustos contenían 2 mg/kg y en cactus 25 mg/kg (Gerhardsson *et al*, 1986). Asimismo, en animales de laboratorio, principalmente en ratas, la absorción de teluritos se estimó de 10 a 15% llegando a un 25% (Hollins, 1969; Slouka y Hradil, 1970).

El Te es inhalado por exposición a los gases desprendidos en los procesos metalúrgicos y refinamientos del caucho. En muchas ocasiones es ingerido por alimentos que han sido expuestos directa o indirectamente, como las carnes rojas, cereales, grasas y aceites, vegetales y frutas; otra manera de absorción es a través de la piel, por exposición directa a los vapores en los hornos industriales y compuestos sólidos; en ésta exposición se causa salpullido y graves quemaduras acompañadas de un olor a ajo en el aliento y en la sudoración (Gerhardsson *et al*, 1986).

Distribución y Excreción en el Organismo

Algunos investigadores han realizados estudios en animales de laboratorio con telurito de sodio y ácido telúrico en solución y han demostrado que la vía de

administración, ya fuera intravenosa, intraperitoneal u oral, no altera el patrón de distribución y deposición dentro del organismo (DeMeio y Henriques, 1947; Moskalev, 1960; Hollins, 1969; Slouka y Hradil, 1970), ya que el tiempo aproximado para la deposición dentro del organismo, es de una a dos horas después de la administración. Los sitios en donde se ha observado mayor acumulación de estos compuestos son el riñón, hígado, pulmón, tiroides, bazo y sangre; en el músculo la incorporación es lenta y en el hueso es acumulado a largo plazo (Gerhardsson *et al*, 1986).

Hollins (1969) estimó el tiempo de vida media en diferentes órganos de rata; como se muestra a continuación:

Órgano	Tiempo de Vida Media
	(Días)
Sangre	9.2
Hígado	10.2
Músculo	17.7
Riñón	23.0

En 1986 Gerhardsson encontró que en hueso también se acumula y sugiere que prácticamente no se libera el Te depositado en ese órgano (Friebert *et al*, 1990)

En las ratas, el telurito de sodio inyectado, ya sea por vía intraperitoneal o intravenosa, es excretado principalmente por la orina (14-27% entre las 24 hrs.; 33% en una semana aproximadamente); en excreción fecal la cantidad es de aproximadamente 6% en 24 hrs. y 14% en una semana. En otro estudio con perros hembra, la inyección por vía intravenosa de telurito de sodio, demostró que la excreción era alrededor de 11 al 16% en 1 hora y 23% en 6 días (DeMeio y Henriques, 1947; Hollins, 1969; Slouka y Hradil, 1970).

Efectos en el Organismo

Animales de Laboratorio

En ratas tratadas con un compuesto de Te, se reportó neuropatía periférica con debilidad y parálisis en las partes traseras (1 a 1.25% en la dieta); además se observó desmielinización gradual en células del sistema nervioso, la cual desaparece alrededor de una semana después (DeMeio y Jetter, 1948; Lampert *et al*, 1970; Lampert y Garret, 1971).

Garro y Pentschew (1964) aplicaron Te a ratas Long-Evans preñadas, y evaluaron el efecto en las crías encontrando que los fetos presentaban hidrocefalia y pérdida de peso. Resultados similares fueron reportados por Agnew *et al* (1968) en ratas hembra Wistar aplicándoles Te metálico en la dieta durante la gestación, para lograr determinar el periodo embrionario de susceptibilidad teratogénica. Finalmente Pérez-D'Gregorio y Miller (1988) evaluaron la toxicidad del Te_2O_2 durante el periodo fetal en ratas Wistar observando edema, hernia umbilical y hemorragia ocular además de los hallazgos ya descritos por los autores anteriores (Pérez-D'Gregorio y Miller 1988).

Humanos

En investigaciones realizadas en 1920 se encontraron los primeros indicios de contaminación por Te en el organismo humano en trabajadores que laboraban en hornos industriales; la exposición incluía ácido telúrico y dióxido de telurio en polvo. Algunos de éstos trabajadores presentaban olor a ajo en el aliento, sudor y orina, sequedad en la boca y sabor metálico. Otros presentaban inhibición de la función sudorativa o mostraban una piel seca y sarnosa, anorexia, náusea, vómito, depresión y somnolencia (Gerhardsson *et al*, 1986; Friberg *et al*, 1990).

En investigaciones realizadas en trabajadores de una fundidora, se encontró congestión, edema y degeneración de grasa en hígado; se estimó la ingestión de telurito de potasio durante 7 días y se observó que era de 0.4 a 0.88 g aproximadamente, además de provocar anorexia, náusea, depresión cardíaca y el característico olor a ajo (Brownin, 1969).

Posteriormente, en 1942, se reportaron los mismos resultados, además de falta de apetito en trabajadores expuestos al humo de una fundidora de hierro. Popova *et al* (1965) investigaron dos casos de envenenamiento no fatal por vapor de Te (no fue dado el nivel de exposición), los síntomas que se presentaban fueron debilidad, tos, escalofríos, amnesia, palidez de la piel y decoloración verde-negrusco en la mucosa de la lengua y nasofaringe; temperatura elevada y pulso acelerado, además de leucopenia y neutrofilia (Gerhardsson *et al*, 1986).

Finalmente Blackader y Manderson (1975), examinaron a dos químicos que inhalaron accidentalmente hexafluoruro de Te, y sus únicos síntomas fueron el cansancio y el dormir inevitablemente por las tardes; uno de ellos presentaba una pigmentación azul-negrusca bajo la superficie de la piel, bajo el tejido de sus dedos y en menor grado en las líneas de su cuello y cara; esta deposición intradérmica del Te toma una palidez que dura semanas, lo que se ha considerado como una rara forma de absorción en la piel probablemente de los ésteres volátiles de Te (Gerhardsson *et al*, 1986).

ANTECEDENTES

Los estudios que demuestran mutagenicidad y genotoxicidad producidos por Te en organismos inferiores (principalmente bacterias) ha sido limitada; de ello tenemos un sólo estudio realizado en 1980 por Kanematsu y colaboradores, en el cual observaron que en ensayos con *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, compuestos de Te como el $\text{Na}_2\text{H}_4\text{TeO}_6$ y el Na_2TeO_3 en concentraciones de $10 \mu\text{M}$ eran potentes mutágenos, mientras que para el TeCl_4 con una concentración de $1 \mu\text{M}$ no se reportó mutagenicidad alguna (Kanematsu *et al.*, 1980).

Estudios realizados en animales de laboratorio, tratados con Te o alguno de sus compuestos han sido de gran relevancia, ya que muestran las alteraciones morfológicas y teratógenas que se pueden producir en descendientes de los organismos tratados; sin embargo, hace falta más información sobre la posible citotoxicidad, mutagenicidad o genotoxicidad en dichos organismos. Por otra parte, las investigaciones realizadas en humanos son insuficientes, ya que de ello únicamente tenemos como referencia un sólo estudio con leucocitos humanos *in vitro* tratados con telurito de sodio ($1.2 \times 10^{-3} \mu\text{M}$) y telurito de amonio ($2.4 \times 10^{-4} \mu\text{M}$) en donde se observó un incremento significativo con respecto al testigo de rompimientos cromatídicos (Patton y Allison, 1972) siendo la única evidencia de genotoxicidad del Te.

JUSTIFICACIÓN

El Te es liberado al ambiente por procesos metalúrgicos y de combustión de carbón representando esto una exposición inevitable para el organismo humano y cualquier otra especie biológica (Selijankina y Alekseeva, 1971; Davidson y Lakin, 1972; Gerhardsson, 1986).

Los estudios que demuestran la citotoxicidad y genotoxicidad del Te en cultivos de células del organismo humano prácticamente no existen ya que, sólo se tienen estudios sobre leucocitos *in vitro* tratados con telurito de sodio y telurito de amonio en donde se observaron rompimientos cromatídicos significativo (Patton y Allison, 1972), y en otros estudios algunos autores señalan que compuestos que contienen Te (como el AS-101) han sido utilizados como agentes citostáticos (Sredni *et al.*, 1987). Los antecedentes anteriores nos hacen pensar en los posibles efectos genotóxicos que el Te pudiera tener en el organismo humano; es por ello que en el presente trabajo se decidió estudiar tanto el efecto citotóxico como genotóxico del TeCl_4 en linfocitos humanos tratados *in vitro*.

HIPÓTESIS

Se ha observado que algunos compuestos que contienen Te son capaces de producir daño al ADN en procariontes (*E. coli* y *S. typhimurium*), y en eucariontes el estudio de los efectos cito y genotóxicos no son concluyentes; sin embargo, se ha reportado que en cultivos de células humanas (leucocitos) se han observado alteraciones como rompimientos cromosómicos. Por lo que, si cultivos de linfocitos humanos son tratados con TeCl_4 en diferentes fases del ciclo celular, este compuesto probablemente inducirá alteraciones en la división celular y daño al ADN.

OBJETIVOS

General

Estudiar el efecto citotóxico y genotóxico del TeCl_4 en linfocitos humanos *in vitro*.

Específicos

Evaluar el efecto del TeCl_4 sobre el índice mitótico de linfocitos humanos tratados *in vitro*.

Analizar el tipo y determinar la frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) en linfocitos humanos *in vitro* tratados con TeCl_4 .

Evaluar el tipo y la frecuencia de asociación de satélites (AS) en cultivos de linfocitos humanos *in vitro* tratados con TeCl_4 .

Evaluar la posible inducción de rupturas de cadenas sencillas en el ADN de linfocitos humanos *in vitro* tratados con TeCl_4 , mediante la técnica de Electroforesis Unicelular (EU).

MATERIAL Y MÉTODOS

Compuestos Químicos

Se utilizó Tetracloruro de Telurio (TeCl_4) (ALDRICH, USA) en concentraciones de 0, 3.7, 7.4 y 14.8 μM solubilizado en etanol al 96 % y esterilizado por filtración a través de una membrana Millipore de 0.22 μm .

Obtención de la Muestra

A partir de donadores varones clínicamente sanos (que no estuvieran en tratamiento médico, que no fueran bebedores ni fumadores, etc.), de entre 25 a 30 años de edad, se extrajeron 10 ml de sangre periférica, con una jeringa previamente heparinizada y se siguieron dos protocolos.

Protocolo I

Para la obtención de Metafases

Los experimentos se hicieron por duplicado con su repetición cada uno. Se cultivaron 0.5 ml de sangre colocados en 5 ml de medio RPMI-1640 suplementado con L-glutamina (SIGMA, USA) y fitohemaglutinina, en tubos cónicos de polipropileno de 15 ml y se incubaron durante 48 hrs a 37°C.

Tratamiento

Al inicio de los cultivos y a las 45 horas de incubación a cada tubo se le adicionó el tratamiento con TeCl_4 en concentraciones de 0, 3.7, 7.4 y 14.8 μM en medio de cultivo. De manera paralela, se realizaron cultivos únicamente con etanol en concentraciones de 0, 47.9, 95.8, 191.6 ó 383.3 μM , para saber si el efecto se debía al TeCl_4 o al etanol. Dos horas antes de terminar las 48 hrs de incubación, a cada tubo de cultivo, se le agregaron 0.1 ml de colcemida (IRVINE SCIENTIFIC).

Cosecha

La cosecha de los cultivos se realizó mediante centrifugación a 1000 r.p.m. durante 5 min; posteriormente, se extrajo el sobrenadante y el botón celular se sometió a un choque hipotónico con KCl 0.75 M durante 25 min a una temperatura de 37°C. Transcurridos los 25 min se centrifugó nuevamente a 1000 r.p.m. durante 5 min, se extrajo el sobrenadante y se agregaron 5 ml de fijador (metanol-ácido acético, 3:1); esto se realizó tres veces por tiempos de 15 min el primero y los dos últimos de 10 min respectivamente, cada una con su respectiva centrifugación.

Preparación de Laminillas

Se hicieron las preparaciones colocando tres gotas de la suspensión celular en cada portaobjetos (cuatro laminillas por tratamiento), éstas se secaron con ayuda de la flama de un mechero y finalmente se tiñeron con Giemsa (SIGMA, México). Se observaron al microscopio y se contaron 1000 células por laminilla para obtener el Índice Mitótico (IM), se observaron 100 metafases (25 metafases por laminilla) para determinar el número y tipo de AC (tanto cromatídicas como cromosómicas, según se diera el caso), mientras que para AS, a las mismas metafases se les observó la distribución y localización de los cromosomas D y G.

Protocolo II

Electroforesis Unicelular

Tratamiento

Se hicieron cultivos con 20 µl de sangre en 200 µl de medio RPMI-1640 en tubos Eppendorf de polipropileno de 1 ml de volumen, se adicionó el TeCl₄ en concentraciones de 0, 3.7, 7.4 y 14.8 µM y se incubaron durante 2 hrs. De manera paralela, se realizaron cultivos únicamente con etanol en concentraciones de 0, 47.9, 95.8, 191.6 ó 383.3 µM.

Preparación de Laminillas

Se preparó agarosa de bajo punto de fusión al 0.5 % (125 mg en 25 ml de solución amortiguadora) y agarosa regular al 1.0 % (500 mg en 50 ml de solución amortiguadora). En un portaobjetos se agregaron 200 μ l de agarosa regular y se le colocó un cubreobjetos, se dejó por 5 min o hasta que solidificó a 4°C; después de este tiempo, se removió el cubreobjetos y se agregaron 75 μ l de agarosa de bajo punto de fusión mezclado con 10 μ l de la muestra tratada, se colocó nuevamente el cubreobjetos y se dejó por 5 min o hasta que solidificó a 4°C. Posteriormente, se removió el cubreobjetos y se le agregaron 75 μ l de agarosa de bajo punto de fusión dejando la laminilla en las mismas condiciones que la primera vez. Finalmente, a la laminilla se le retiró el cubreobjetos y se les colocó en una solución de lisis fría preparada 1 h antes, refrigerada a 4°C.

Al mismo tiempo se hicieron 2 preparaciones con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sirviendo como testigo positivo; este compuesto se conoce a través de la bibliografía como un efectivo agente clastogénico.

Electroforesis

Las laminillas se retiraron de la solución de lisis y se colocaron en una cámara para electroforesis que contenía solución amortiguadora alcalina (NaOH 10 N y EDTA 200 mM a pH=13) para realizar la corrida y se dejó por 20 min para que el ADN se desenrollara. Posteriormente, se ajustaron el voltaje y la corriente a 25 Volts y 300 Amperes y se permitió la migración del ADN durante 20 min.

Tinción de Laminillas

Las laminillas se retiraron de la cámara de electroforesis y se enjuagaron 3 veces, 5 min en cada ocasión con una solución amortiguadora neutralizante (Tris 0.4 M a pH=7.5). Finalmente se agregaron 50 μ l de bromuro de etidio y se colocó un cubreobjetos para poder observarse al microscopio de fluorescencia. Se evaluaron 50 células por laminilla (2 laminillas por tratamiento) para poder hacer el análisis estadístico.

Viabilidad

Para evaluar viabilidad se hizo una mezcla de 20 μ l de muestra más 20 μ l de solución de trabajo (5-6 diacetato de carboxifluoresceína + bromuro de etidio) para tefir y se incubó por 5 min a 37°C evitando la luz; después de este tiempo se agregaron 100 μ l de medio para enjuagar, se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 3 min y se extrajo sólo la mitad de sobrenadante, se resuspendió y se tomaron 10 μ l que se colocaron en un portaobjetos y se observaron al microscopio de fluorescencia. Se contaron 100 células, tomando las verdes como vivas y las anaranjadas como células muertas.

Análisis Estadístico

Para evaluar las diferencias en el porcentaje del índice mitótico se aplicó la prueba de diferencia de proporciones (Z; $P < 0.05$ y 0.01 valores críticos para ensayos de dos colas), para la evaluación del total de células con aberraciones cromosómicas, la electroforesis en gel de células individuales y la asociación de satélites se utilizó el análisis estadístico de Ji cuadrada ($P < 0.05$), mientras que para la frecuencia de aberraciones cromosómicas se utilizó la prueba de "t" de Student ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los marcadores biológicos son aquellos parámetros relacionados con la actividad de los organismos que permiten determinar eventos relacionados con su fisiología de manera cualitativa o cuantitativa (Espinosa-Rivera, 1997) y van a depender del evento que se quiera medir. Los marcadores de citotoxicidad evalúan y comparan la tasa de proliferación celular, por ejemplo: el índice mitótico (IM) el cual es un parámetro que indica el porcentaje de células que está en división o la cinética de proliferación celular (CPC) que es aquella que indica qué tanto se han dividido las células y con qué frecuencia (Ostrosky-Wegman *et al*, 1991; Gonsebatt-Bonaparte, 1994).

Actualmente se ha dado una mayor importancia a los marcadores de genotoxicidad como son: las aberraciones cromosómicas (AC), los intercambios de cromátidas hermanas (ICH's), los micronúcleos (MN), las mutaciones génicas y los rompimientos de cadena en ADN en donde se utiliza la técnica del "ensayo cometa" ya sea en condiciones alcalinas (cuando se quiere detectar cadena sencilla) o condiciones neutras (cuando se quiere detectar cadena doble) (Singh *et al*. 1988; Gonsebatt-Bonaparte, 1994; Rodríguez-Reyes, 1996).

1) ÍNDICE MITÓTICO

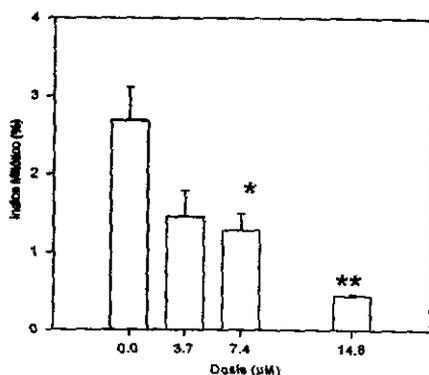
Los cambios que provoca un compuesto sobre el proceso de división celular, son un criterio importante para la identificación del daño en los sistemas genéticos. La toxicidad celular producida por un medicamento o compuesto, es uno de los índices que generalmente se evalúa para detectar los efectos de los agentes químicos; los parámetros más utilizados para este fin son el índice mitótico y la tasa de proliferación linfocítica. Este último aporta también información sobre la duración del ciclo celular. La citotoxicidad se mide por cambios indirectos al ADN, es decir, sobre enzimas, membranas, estructuras proteicas y lisosomas, entre otros, que nos conducen a una inhibición del crecimiento o alteración de la actividad mitótica y muerte celular (Sharma y Talukder, 1987; Rojas-Castillo *et al*, 1993).

Se sabe que la mayoría de los metales son capaces de afectar la división celular y producir alteraciones en las fibras del huso mitótico, lo que conduce a la formación de

diplocromosomas, poliploidias y a una disminución del IM (Sharma y Talukder, 1987).

En el presente estudio se dan evidencias del efecto citotóxico de un compuesto de Telurio en el sistema de linfocitos humanos *in vitro*, en concentraciones de 3.7, 7.4 y 14.8 μM . La citotoxicidad se evaluó mediante el IM que es el porcentaje de células que entran en mitosis con respecto a las que no entraron en mitosis. Los resultados obtenidos muestran que el TeCl_4 aplicado 3 horas antes de la cosecha en las dosis de 7.4 y 14.8 μM disminuye significativamente el IM con respecto al testigo (gráfica 1), mientras que en los tratamientos por 48 horas se observó que únicamente la dosis de 14.8 μM disminuyó de manera significativa este parámetro con respecto al testigo (gráfica 2). Estos resultados demuestran que el TeCl_4 es un compuesto citotóxico y lo más probable es que, la dosis subtóxica del compuesto se encuentre entre los 7.4 y 14.8 μM .

Gráfica 1. Efecto del TeCl_4 sobre el índice mitótico en cultivos de linfocitos humanos (tratados por 3 horas)



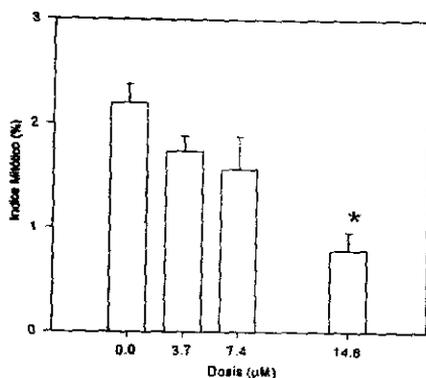
* $P < 0.1$ con prueba de Z.

** $P < 0.05$ con prueba de Z.

Nuestros resultados tienen el mismo comportamiento que los reportados por Patten y Allison (1972), los cuales determinaron los niveles de toxicidad de algunas sales de telurio (telurato de amonio, 2.4×10^{-5} μM y telurito de sodio, 1.2×10^{-4} μM) en cultivos de fibroblastos y leucocitos, encontrando una reducción significativa del IM. Las variaciones observadas en cuanto a las dosis de los compuestos puede deberse a que el TeCl_4 es

más estable que los compuestos utilizados por Patton y Allison, además de que, es probable que los iones de Cl que acompañan al Te le proporcionen características (de solubilidad, por ejemplo) adecuadas para entrar fácilmente a la célula.

Gráfica 2. Efecto del TeCl_4 sobre el índice mitótico en cultivos de linfocitos humanos (tratados por 48 horas)



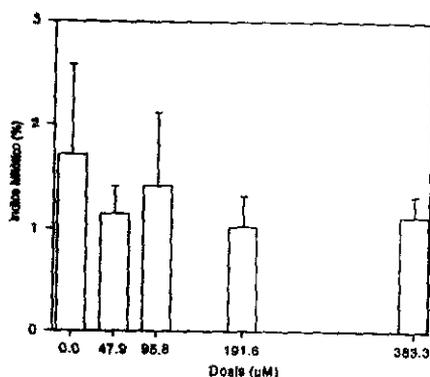
* $P < 0.1$ con prueba de Z.

Se ha visto que en otros compuestos de Te como el AS-101 que se utiliza como droga citostática en pacientes con cáncer, además de ser un agente inmunomodulador permite la incorporación de timidina (^3H) en el ADN en los espacios de timidina; estimula la producción de interleucina-2 (IL-2) activando a sus receptores en células monoclonales e inhibe el IM en células proliferantes (estimuladas con PHA), esto se incrementa conforme aumenta la dosis; en algunos casos también se ha observado disminución de la cinética de proliferación celular, esto se podría deber a alguna reacción que pudiera inhibir a alguna cinasa cuando las células se encuentran en una activación continua debido a la PHA. El AS-101 actúa de dicha manera ya que inhibe la división sucesiva de las células dañadas (Sredni *et al*, 1987; Sredni *et al*, 1990; Montero *et al*, 1993).

En este trabajo se utilizó el etanol para preparar la solución de trabajo con el TeCl_4 ; conforme se realizaban los experimentos también se hicieron tratamientos individuales con las dosis de 47.9, 95.8, 191.6 ó 383.3 μM de etanol para descartar la posible relación del efecto citotóxico que pudiera tener el etanol con el compuesto de Te;

como se observa en la gráfica 3, ninguna de las dosis del etanol utilizadas, modificó de manera significativa el IM en los linfocitos humanos en cultivo (tratados por 48 horas) éstos resultados descartan la posibilidad de que el efecto citotóxico observado en los tratamientos por 3 y 48 horas con el compuesto sea debido al etanol.

Gráfica 3. Efecto del etanol sobre el índice mitótico en cultivos de linfocitos humanos (tratados 48 horas)



2) ABERRACIONES CROMOSÓMICAS

En mamíferos, algunos de los compuestos con iones de metales pesados provocan en la actividad mitótica un abatimiento, al incrementar el número de anomalías cromosómicas; la actividad clastogénica generalmente se ve incrementada de acuerdo con la tabla periódica y a la familia, por el peso atómico, electropositividad y solubilidad, así como ambas se incrementan con el tipo de enlace que se forma, por ejemplo, algunos metales como el vanadio o arsénico pueden formar enlaces covalentes o covalentes coordinados con las macromoléculas biológicas (Sharma y Talukder, 1987).

En nuestros resultados observamos aberraciones de tipo cromatídico (figura 7), principalmente fragmentos sencillos o dobles (cuando se observaba uno o dos fragmento entre la metafase) (figura 7a), rompimiento sencillo o doble (cuando una cromátida o ambas del cromosoma estaban rotas) (figura 7b), células pulverizadas (cuando la

metafase presentaba tantos fragmentos que no se distinguía ningún cromosoma completo) (figura 7c) y gap (espacios muy pequeños que quedaban entre las cromátidas y sólo se observaba una fibra que unía un extremo con el otro) (figura 7d).

En la tabla 2 se observan los resultados de la frecuencia de aberraciones estructurales en los cultivos de linfocitos humanos tratados con TeCl_4 por 3 horas (fase G_2). En estos resultados se observa que el total de AC estructurales por célula, en los tratamientos con dosis de 7.4 y 14.8 μM aumenta de manera significativa con respecto al testigo. Para cultivos tratados durante 48 horas se observa un aumento significativo en la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales y en el total de aberraciones cromosómicas por célula en las dosis de 7.4 y 14.8 μM (tabla 3).

Tabla 2. Frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) estructurales en linfocitos humanos en cultivo tratados con TeCl_4 (por 3 horas).

Tratamiento (μM)	Total de Células con AC (%)	Total de AC/Cél. (%)	Frecuencia de Aberraciones Cromosómicas					
			Fragmento		Rompimiento		Células Pulverizadas	gap
			Sencillo	Doble	Sencillo	Doble		
			($X \pm D.E$)	($X \pm D.E$)	($X \pm D.E$)	($X \pm D.E$)	($X \pm D.E$)	($X \pm D.E$)
0	13/300 (4.33)	14/300 (4.66)	(0.030 \pm 0.170)	(0.003 \pm 0.058)	(0.01 \pm 0.099)	0	0	(0.006 \pm 0.031)
3.7	39/300 (13.00)	55/300 (18.33)*	(0.036 \pm 0.187)	(0.043 \pm 0.203)*	(0.053 \pm 0.224)*	(0.003 \pm 0.058)	0	0
7.4	50/300 (16.66)	69/300 (23.00)*	(0.123 \pm 0.329)*	(0.033 \pm 0.180)*	(0.026 \pm 0.161)	(0.006 \pm 0.081)	(0.003 \pm 0.058)	0.01 \pm 0.099)
14.8	56/222 (25.22)*	87/222 (39.18)*	(0.256 \pm 0.436)*	(0.031 \pm 0.174)*	(0.063 \pm 0.243)*	(0.006 \pm 0.066)	(0.067 \pm 0.251)*	(0.004 \pm 0.066)

* $P < 0.05$ con prueba de Ji cuadrada

* $P < 0.05$ con prueba de Tⁿ de Student para Frecuencia de AC

Cuando los linfocitos están en cultivo se encuentran esencialmente en la fase G_0 del ciclo celular; una vez que el compuesto se ha puesto en contacto con el ADN, del modo de acción del agente dependerá el que se produzca un daño cromosómico particular, por lo que se pueden presentar aberraciones de tipo cromosómico, que ocurren durante la fase G_1 en la que el cromosoma está constituido por una sola cadena de ADN y, el daño cromatídico, que ocurre durante la fase de síntesis o en la fase de G_2 en las

que hay dos cadenas (Ostrosky-Wegman, 1986; Gonsebatt-Bonaparte, 1994). En este último, después de que el cromosoma se ha dividido en dos cromátidas hermanas, se observará a una de las cromátidas involucradas ya sea en forma de rompimiento o de intercambio (Evans, 1984). Con lo mencionado anteriormente, podemos afirmar que el TeCl_4 es un compuesto que produce aberraciones de tipo cromatídico ya que principalmente se observaron fragmentos sencillos (tabla 2).

En los tratamientos por 3 horas (tabla 2) con el TeCl_4 también se observa que la frecuencia de AC estructurales es mayor que en los tratamientos por 48 horas (tabla 3); esto se puede deber a que dichas lesiones pueden perderse debido a muerte celular, dilución de las lesiones mediante la división de células progenitoras o los mecanismos intrínsecos en la célula (Kligerman *et al.*, 1988). En esta misma observamos que al utilizar una dosis de $14.8 \mu\text{M}$ se disminuye el número de metafases analizadas, este hecho se podría deber a la disminución del índice mitótico que presentan los cultivos.

Tabla 3. Frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) estructurales en linfocitos humanos en cultivo tratados con TeCl_4 (por 48 horas).

Tratamiento (μM)	Total de células analizadas (n)	Porcentaje AC (%)	Frecuencia de Aberraciones Cromosómicas					
			Fragmento		Rompimiento		Beldijas	
			Sencillo (%)	Doble (%)	Sencillo (%)	Doble (%)	Envenezadas (%)	Tras (%)
0	13/300 (2.33)	2.66	(0.116 ± 0.114)	(0.003 ± 0.058)	(0.005 ± 0.081)	0	0	(0.081 ± 0.081)
3.7	24/300 (8.00)	48/300 (13.33)	(0.023 ± 0.150)	(0.063 ± 0.187)*	(0.01 ± 0.099)*	(0.013 ± 0.114)*	0	(0.043 ± 0.203)*
7.4	39/300 (11.00)	54/300 (17.00)*	(0.043 ± 0.203)*	(0.023 ± 0.150)*	(0.026 ± 0.161)	(0.026 ± 0.161)*	0	(0.040 ± 0.197)*
14.8	41/300 (13.66)*	54/300 (18.00)*	(0.09 ± 0.286)*	(0.023 ± 0.150)*	(0.030 ± 0.170)*	(0.006 ± 0.081)	0	(0.054 ± 0.226)*

* $P < 0.05$ con prueba de Ji cuadrada

* $P < 0.05$ con prueba de "t" de Student para Frecuencia de AC

Un factor importante en los cultivos *in vitro* es el tiempo durante el cual estos están expuestos a los agentes genotóxicos. Alrededor de las 48 horas de cultivo a 37°C la mayoría de los linfocitos experimentan su primera división. Las preparaciones celulares

que se mantienen en cultivo por largos períodos pueden contener proporciones crecientes de células en su segunda o subsecuente división; consecuentemente, los linfocitos con daño cromosómico en ocasiones son descartados ya que han tenido repetidas divisiones *in vitro* y no reflejan el verdadero nivel de aberración; además, una proporción de aberraciones de tipo cromosómico observado puede ser el "derivado" de una aberración de tipo cromatídico que se había producido inicialmente (Evans, 1984).

Los resultados obtenidos en los tratamientos por 3 y 48 horas mostraron que el compuesto de Te es un agente clastógeno S-independiente que produce principalmente aberraciones de tipo cromatídico. Patton y Allison, además de determinar el efecto citotóxico de sales de Te (telurato de amonio, 2.4×10^{-5} μM y telurito de sodio, 1.2×10^{-4} μM), también evaluaron el daño cromosómico de las mismas sales sobre leucocitos tratados por 48 horas; en sus resultados encontraron un alto índice de rompimientos cromatídicos y en altas dosis observaron daño cromosómico severo. En nuestros resultados también encontramos daño severo (que es a lo que llamamos células pulverizadas) en la dosis de 14.8 μM en los tratamientos por 3 horas; esto nos podría indicar que dichos compuesto están actuando de manera dosis-dependiente.

La citotoxicidad y genotoxicidad de los compuestos que contienen iones metálicos dependen de varios factores que determinan una respuesta final. La expresión de sus efectos están relacionados directamente con la dosis, la forma y vehículo de administración, de sus propiedades químicas, el sistema empleado, su distribución y retención en cualquier tejido o célula de modo que pueda ser metabolizado e interactuar con una molécula blanco, y de esta manera ocasionar perturbaciones a diferentes niveles (Duffus, 1983; Sharma y Talukder, 1987).

Los experimentos con TeCl_4 se realizaron por duplicado y a doble ciego, también se realizaron experimentos con etanol de ésta misma manera y como ya se había mencionado en IM. La tabla 4 muestra la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales en linfocitos humanos en cultivos por 48 horas, tratados con 0, 47.9, 95.8, 191.6 y 383.3 μM de etanol. Estos resultados no fueron estadísticamente significativos con respecto al testigo, en cualquiera de las dosis utilizadas; sin embargo, se observa que en la dosis de 383.3 μM disminuye el número de células en metafase analizadas, esto se puede deber a que el etanol a altas concentraciones suele ser citotóxico. En esta

evaluación también se descarta la posibilidad de que el etanol tuviera alguna relación con la frecuencia de aberraciones cromosómicas en los tratamientos con el TeCl_4 por 3 y 48 horas ya que la cantidad de etanol utilizado en los tratamientos no rebasa la dosis de $191.6 \mu\text{M}$.

Tabla 4. Frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) estructurales en linfocitos humanos en cultivo tratados con etanol (por 48 horas)

Tratamiento (μM)	Total de Células con AC (%)	Total de AC/Cél. (%)	Frecuencia de Aberraciones Cromosómicas					
			Fragmento		Rompimiento		Células Pulverizadas	gap
			Sencillo	Doble	Sencillo	Doble		
			($X \pm D.E$)	($X \pm D.E$)	($X \pm D.E$)	($X \pm D.E$)	($X \pm D.E$)	($X \pm D.E$)
0	11/560 (1.96)	13/560 (2.32)	(0.014 \pm 0.118)	(0.001 \pm 0.042)	(0.005 \pm 0.073)	0	0	0
47.9	7/560 (1.25)	10/560 (1.78)	(0.005 \pm 0.073)	(0.003 \pm 0.059)	(0.001 \pm 0.042)	(0.001 \pm 0.042)	0	0
95.8	21/560 (3.75)	33/560 (5.89)	(0.021 \pm 0.144)	(0.010 \pm 0.102)	(0.008 \pm 0.094)	(0.003 \pm 0.059)	0	(0.001 \pm 0.042)
191.6	20/560 (3.57)	30/560 (5.35)	(0.014 \pm 0.118)	(0.008 \pm 0.094)	(0.003 \pm 0.059)	(0.008 \pm 0.94)	0	(0.007 \pm 0.084)
383.2	16/472 (3.38)	22/472 (4.66)	(0.021 \pm 0.143)	(0.012 \pm 0.112)	0	0	0	(0.009 \pm 0.136)

3) ASOCIACIÓN DE SATÉLITES

En el hombre, la alta incidencia de asociaciones entre los diez autosomas acrocéntricos es atribuido a la **Región Organizadora Nucleolar (RON)** localizada sobre los brazos cortos de los cromosomas D y G. Una asociación ha sido definida como la consecuencia de la fusión nucleolar en la interfase anterior, así como en la interfase que le va a seguir. Esta fusión es el resultado de movimientos, crecimiento y proximidad nucleolar y posiblemente a la afinidad entre la heterocromatina de los brazos pequeños de los acrocéntricos (Gani, 1978).

Si la asociación es determinada por el tiempo que hay entre la telofase tardía y el período post-telofásico, entonces habrá factores que puedan afectar la tendencia a la asociación de un acrocéntrico. Dentro de éstos se puede incluir el tamaño, duración y período de actividad de este proceso, junto con cualquier tendencia del proceso a unirse a la membrana nuclear. Si en una asociación en particular ocurre el retraso en la dispersión de las ribonucleoproteínas o en la pérdida de la conectividad del ADN ribosómico, en mitosis, esto puede incrementar la posibilidad de que la misma asociación aparezca en el núcleo hijo con una alta incidencia de esa combinación (Gani, 1978).

En la tabla 5 se muestra el número de cromosomas involucrados en asociación (2 a 6 acrocéntricos), en el total de asociaciones y el total de células con asociación de satélites; se observa que no hay diferencia significativa con respecto al testigo. Sin embargo, en todos los tratamientos se observó una tendencia a disminuir las AS de manera dosis-dependiente. Esto podría estar ocurriendo debido a que el tratamiento con el compuesto fue por 3 horas únicamente y no se permitió la formación del nucleolo, por lo que no hubo interacción compuesto-nucleolo. Choo *et al* (1988) propone que los grupos de cromosomas acrocéntricos (D y G) tienden a asociarse en el nucleolo durante la división celular, proceso que no ocurrió en la mayoría de las células que evaluamos en los tratamientos por 3 horas.

Tabla 5. Asociación de satélites con 2 o más cromosomas acrocéntricos tratados con TeCl₄ por 3 horas en linfocitos humanos

Tratamiento	Número de cromosomas involucrados en asociación					Total de asociaciones		Total de células con asociación de satélites	
	2	3	4	5	6	Número	%	Número	%
Control	25/211	63/211	12/211	7/211	1/211	108/300	(36.00)	177/300	(59.00)
10 ⁻⁶ M	25/211	63/211	12/211	7/211	1/211	108/300	(36.00)	177/300	(59.00)
10 ⁻⁵ M	25/226	39/226	12/226	6/226	1/226	83/300	(27.67)	177/300	(59.00)
10 ⁻⁴ M	44/65	14/65	2/65	4/65	1/65	65/222	(29.72)	54/222	(24.32)

En la tabla 6, se muestra el número de cromosomas involucrados en asociación (2 a 6 acrocéntricos), el total de asociaciones y el total de células con asociación de satélites

para cultivos tratados durante 48 horas. Se observa que no hay diferencias significativas con respecto al testigo; sin embargo, sí hay un incremento en comparación a las AS observadas a las 3 horas, esto puede deberse a que en el momento de la formación del nucleolo y estar presente el TeCl_4 en lugar de inhibir la formación de las AS, el compuesto indujo dichas asociaciones.

Tabla 6. Asociación de satélites con 2 o más cromosomas acrocéntricos tratados con TeCl_4 por 48 horas en linfocitos humanos

Tratamiento (h)	Número de cromosomas en asociación (%)						Total de asociaciones (%)	Total de células con asociación (%)
	2	3	4	5	6	7		
Control	10/198 (5.05)	32/200 (16.00)	102/315 (32.40)	3/315 (0.95)	0/315 (0.00)	0/315 (0.00)	145/315 (46.03)	287/315 (91.11)
3 h	15/200 (7.50)	16/200 (8.00)	16/66 (24.24)	10/95 (10.53)	0/95 (0.00)	0/95 (0.00)	47/200 (23.50)	197/200 (98.50)
6 h	10/198 (5.05)	13/200 (6.50)	18/116 (15.52)	1/116 (0.86)	2/116 (1.72)	0/116 (0.00)	34/200 (17.00)	197/200 (98.50)
12 h	10/200 (5.00)	10/200 (5.00)	12/65 (18.46)	1/65 (1.54)	0/65 (0.00)	0/65 (0.00)	23/200 (11.50)	197/200 (98.50)
24 h	10/200 (5.00)	10/200 (5.00)	12/65 (18.46)	1/65 (1.54)	0/65 (0.00)	0/65 (0.00)	23/200 (11.50)	197/200 (98.50)
48 h	10/200 (5.00)	10/200 (5.00)	12/65 (18.46)	1/65 (1.54)	0/65 (0.00)	0/65 (0.00)	23/200 (11.50)	197/200 (98.50)
Total	57/796 (7.16)	71/800 (8.88)	140/461 (30.37)	15/461 (3.25)	2/461 (0.43)	0/461 (0.00)	175/796 (22.11)	793/800 (99.13)

En la tabla 7 se muestra el número de cromosomas involucrados en asociación (2 a 6 acrocéntricos), el total de asociaciones y el total de células con asociación de satélites de los tratamientos con etanol. Como en lo observado con el TeCl_4 , no hay diferencia significativa con respecto al testigo. Estos resultados demuestran que el etanol no tiene efecto sobre las AS.

En la literatura se ha propuesto que cuando se dan las AS, en ocasiones, hay intercambio entre cromosomas no homólogos que pueden ser responsables de algunos síndromes (como el Down o Patau) o translocaciones (como la Robertsoniana), estos generalmente involucran la recombinación de los brazos de cromosomas acrocéntricos y son considerados como las aberraciones cromosómicas más comunes en el hombre teniendo una incidencia de 1:1000. En otros casos, la translocación se puede dar entre los cromosomas 13 y 14 del grupo D, y entre 14 y 21 de los grupos D y G, los cuales, han sido observados por ser mucho más frecuentes que otros intercambios, teniendo una incidencia de un 80 % de los casos (Choo *et al*, 1988). Con los datos obtenidos podemos considerar que el compuesto utilizado no modificó la frecuencia de aparición de las AS.

Tabla 7. Asociación de satélites con 2 o más cromosomas acrocéntricos tratados con etanol por 48 horas en linfocitos humanos

tratamiento (μ M)	Núm. de cromosomas en asociación (%)					Total de A. S./Cél. (%)	Total de Cél./A. S. (%)
	2	3	4	5	6		
0	383/505 (75.84)	93/505 (18.41)	25/505 (4.95)	3/505 (0.59)	1/505 (0.19)	505/560 (90.17)	358/560 (63.92)
47.9	437/546 (80.03)	90/546 (16.48)	14/546 (2.56)	4/546 (0.73)	1/546 (0.18)	546/560 (97.5)	371/560 (66.25)
95.8	355/520 (68.26)	129/520 (24.80)	29/520 (5.57)	6/520 (1.15)	1/520 (0.19)	520/560 (92.85)	390/560 (69.64)
191.6	463/571 (81.08)	88/571 (14.88)	20/571 (3.50)	3/571 (0.52)	0	571/560 (100)	399/560 (71.25)
383.3	262/349 (75.07)	65/349 (18.62)	16/349 (4.58)	4/349 (1.14)	2/349 (0.57)	349/472 (73.94)	261/472 (46.60)

En las tablas 8-10 se presenta el número de asociaciones (0-4) de cromosomas acrocéntricos por célula; los resultados muestran que en ninguno de los tratamientos con TeCl_4 o etanol se modificaron estadísticamente con respecto al testigo, aunque en el tratamiento por 3 horas si se observa una disminución con la dosis más alta.

Tabla 8. Frecuencia de asociación de satélites en cultivos de linfocitos humanos tratados con TeCl_4 por 3 horas

Tratamiento (μ M)	Número de asociaciones por célula (%)				
	0	1	2	3	4
0	83/300 (27.66)	155/300 (51.66)	57/300 (19.00)	5/300 (1.66)	0
3.7	134/300 (44.66)	127/300 (42.33)	33/300 (11.00)	6/300 (2.00)	0
7.4	123/300 (41.00)	130/300 (43.33)	45/300 (15.00)	2/300 (0.66)	0
14.8	168/222 (75.67)	44/222 (19.81)	9/222 (4.05)	1/300 (0.33)	0

Una de las hipótesis que trata de relacionar esos hechos menciona que la mayoría de los linfocitos circulantes en sangre periférica están en la fase de G_0 y se han mantenido

en este estado por un prolongado tiempo. La posición del cromosoma en la primera figura mitótica puede por lo tanto parecerse a la posición que había tenido durante esa larga interfase. Las mitosis subsecuentes pueden conducir a ciertas alteraciones de estas posiciones, y el acortamiento de la duración del ciclo puede impedir las reasociaciones (Sigmund et al, 1979).

Tabla 9. Frecuencia de asociación de satélites en cultivos de linfocitos humanos tratados con TeCl₄ por 48 horas

Tratamiento (μM)	No. de asociaciones por célula (%)				
	0	1	2	3	4
0	63/300 (21.00)	156/300 (52.00)	74/300 (24.66)	7/300 (2.33)	0
3.7	76/300 (25.33)	140/300 (46.66)	74/300 (24.66)	10/300 (3.33)	0
7.4	104/300 (34.66)	134/300 (44.66)	55/300 (18.33)	7/300 (2.33)	0
14.8	117/300 (39.00)	118/300 (39.33)	53/300 (17.66)	11/300 (3.66)	1/300 (0.33)

Tabla 10. Frecuencia de asociación de satélites en cultivos de linfocitos humanos tratados con etanol por 48 horas

Tratamiento (μM)	No. de asociaciones por célula (%)				
	0	1	2	3	4
0	202/560 (36.07)	237/560 (42.32)	97/560 (17.32)	22/560 (3.92)	0
47.9	189/560 (33.75)	223/560 (39.82)	122/560 (21.78)	26/560 (4.64)	0
95.8	170/560 (30.35)	271/560 (48.39)	108/560 (19.28)	11/560 (1.96)	0
191.6	161/560 (28.75)	247/560 (44.92)	132/560 (23.57)	20/560 (3.57)	0
383.3	211/472 (44.70)	181/472 (38.34)	73/472 (15.46)	7/472 (1.48)	2/472 (0.42)

En una preparación, al observar la metafase, uno o todos los cromosomas acrocéntricos pueden formar asociación de satélites; según Zang y Back (1968), se espera que los cromosomas del grupo D participen más en las asociaciones ya que tienen un 60% de probabilidad de asociarse, a diferencia de los cromosomas G que solo tienen un 40%. En las tablas 11 y 12 se presenta la proporción de cromosomas asociados; se observa que, efectivamente los cromosomas del grupo D tienen una mayor tendencia a asociarse que los cromosomas del grupo G. La tendencia a asociarse puede deberse a algunos factores como son; la diferencia entre individuos, las técnicas de cultivo y preparación de portaobjetos; así mismo puede ser debido a la correlación con la edad, sexo y enfermedades que se hayan encontrado en el individuo (Zang y Back, 1968), otra causa podría ser el tiempo de tratamiento, ya que en el cultivo por 3 horas (tabla 11) la posibilidad de interacción nucleolo- TeCl_4 fue menor comparada con el tratamiento por 48 horas (tabla 12).

Tabla 11. Efecto del TeCl_4 sobre la proporción de cromosomas acrocéntricos asociados en linfocitos humanos en cultivo (tratados 3 horas)

Tratamiento (μM)	Total de Crom. Asociados	Proporción		N
		D	G	
0	709	55.00	45.00	300
3.7	524	54.00	46.00	300
7.4	547	52.21	47.78	300
14.8	464	52.31	47.68	222

Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Zang y Back (1968), y con los de DiLernia (1980); este último encontró en una población normal que el porcentaje de participación para los cromosomas del grupo D era de un 59.44% y de un 40.56% para el grupo G.

Tabla 12. Efecto del TeCl₄ sobre la proporción de cromosomas acrocéntricos asociados en linfocitos humanos en cultivo (tratados 48 horas)

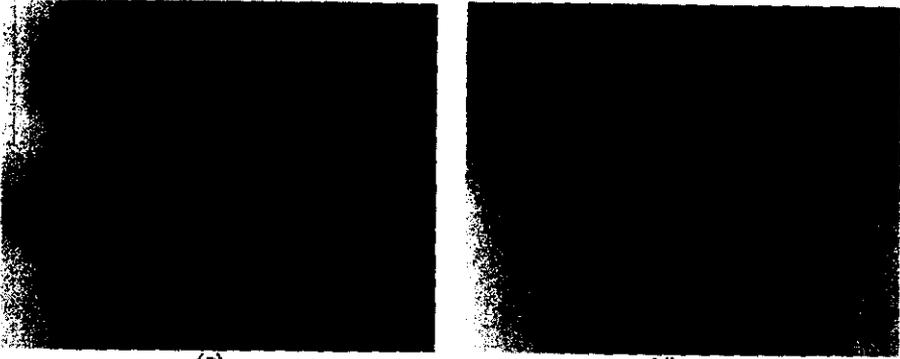
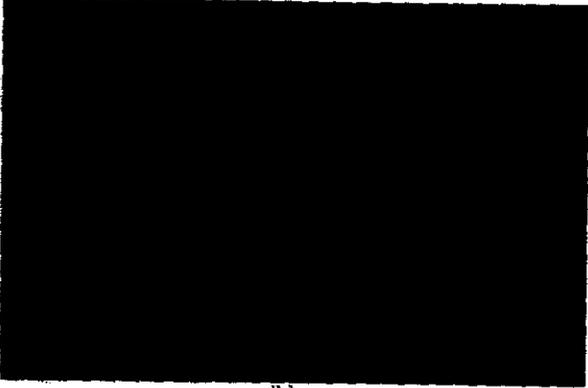
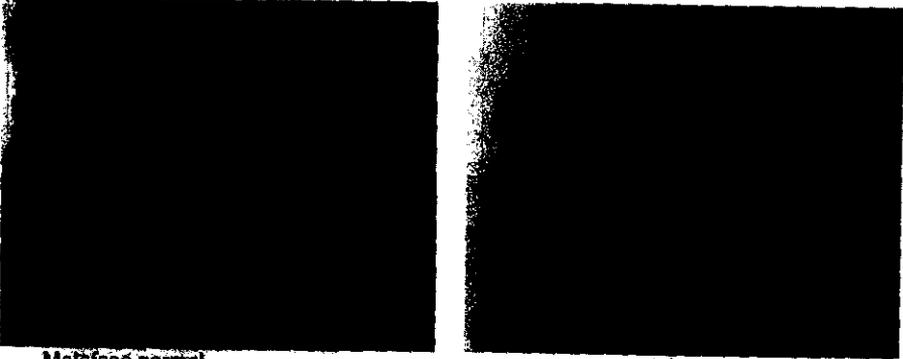
Tratamiento (μ M)	Total de Crom. Asociados	Proporción		N
		D	G	
0	733	55.30	44.69	300
3.7	706	57.00	43.00	300
7.4	607	55.61	44.38	300
14.8	587	57.68	42.31	300

La tabla 13 presenta la proporción de cromosomas del grupo D y G en los tratamientos con etanol; los resultados obtenidos no muestran variación significativa con respecto al testigo y se observa que en efecto, los cromosomas D tuvieron una mayor asociación que los cromosomas del grupo G, lo que indica que tampoco se alteró la relación de cromosomas D y G con los tratamiento del etanol.

Tabla 13. Efecto del etanol sobre la proporción de cromosomas acrocéntricos asociados en linfocitos humanos en cultivo (tratados 48 horas)

Tratamiento (μ M)	Total de Crom. Asociados	Proporción		N
		D	G	
0	1155	56.67	43.33	560
4.26	1226	57.81	42.18	560
8.53	1239	47.55	52.44	560
12.79	1276	54.29	45.70	560
38.33	615	52.29	47.70	560

Figura 7. Aberraciones observadas en células en metafase tratadas con $TeCl_4$



4) ELECTROFORESIS UNICELULAR

Viabilidad celular

La determinación del porcentaje de células viables permite evaluar las condiciones de las células que se cultivan y ayuda a valorar si algún tratamiento causa la muerte de las mismas. El porcentaje de viabilidad en cualquier suspensión celular para cultivo o congelación, debe ser mayor del 80%; cuando es menor, es probable que el cultivo no progrese correctamente y las células muertas alteren el desarrollo de las vivas (González-Moran, 1996).

En nuestro trabajo experimental se evaluó la viabilidad de los linfocitos humanos en cultivo, tratados con el TeCl_4 y etanol, en los resultados que obtuvimos observamos que para ambos compuestos el porcentaje de células viables era mayor del 95% (ver tabla 14 y 15).

Ensayo cometa

La genotoxicidad se da por cambios directos sobre la molécula del ADN por medio de mutaciones, o bien por cambios indirectos, por ejemplo, el modificar la síntesis de proteínas (Sharma y Talukder, 1987).

La mayoría de los métodos comúnmente utilizados para cuantificar el daño al ADN son capaces de proporcionar medidas de respuesta promedio. En ocasiones, al utilizar poblaciones heterogéneas los promedios no son adecuados para describir los efectos de la radiación ionizante y de los agentes químicos, y esto se dificulta más cuando en los sistemas de prueba hay resistencia a las drogas y la sensibilidad celular está presente.

El ensayo cometa, permite medir el daño de células individuales detectando rompimiento de hebra sencilla en ADN, incluyendo deficiencias del super enrollamiento, además de que detecta la presencia de enlaces cruzados (Olive et al, 1990). En 1988, Singh et al, reportaron que la longitud de la cola reflejaba la cantidad de rompimientos de ADN en la célula; por otra parte, en otros trabajos se ha reportado que la longitud de la cola es constante sobre un rango de frecuencia de rompimientos de ADN de $1-14 \times 10^{10}$

Daltones, y que la intensidad de la fluorescencia en la cola se incrementa marcadamente con la frecuencia del rompimiento (McKelvey-Martin et al, 1993).

En el presente trabajo se evaluó el daño producido por el TeCl_4 en células individuales de sangre periférica, utilizando las mismas dosis (0, 3.7, 7.4 y 14.8 μM) que para la determinación de las aberraciones cromosómicas. La tabla 14 muestra los resultados obtenidos, observándose que la dosis de 14.8 μM incrementó el número de células con daño de manera significativa con respecto al testigo (figura 8). En la literatura se dice que la mayoría de los metales puede interactuar con el ADN de dos formas, directa o indirectamente (Hartmann y Speit, 1994); en nuestro caso se podría pensar que la interacción se dio de forma directa ya que suponemos, que el TeCl_4 indujo lesiones que consistieron en el rompimiento o separación de una o ambas hebras de la cadena de ADN. Esta separación de hebras pudo haber tenido su origen en el rompimiento de alguna de las uniones fosfodiéster que une a las dos cadenas de polinucleótidos o por la eliminación de alguna base dañada en el curso de la reparación de dicha cadena. Debido a éste hecho se pudo observar la migración del ADN al momento de someter las laminillas a un campo eléctrico.

Tabla 14. Efecto del TeCl_4 sobre linfocitos humanos mediante la técnica de ensayo cometa

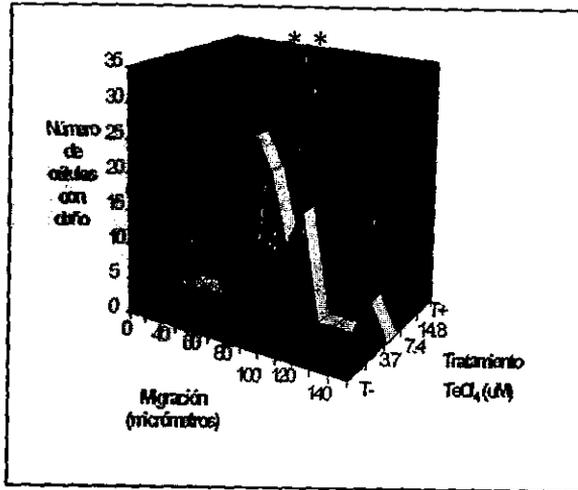
Tratamiento (nM)	Número de Cél. con Daño	Núm. de Cél. sin Daño	Núm. de Cél. con Daño	Número de Nubes	Viabilidad (%)
0	400	399	1	0	100
3.7	400	391	9	0	99
7.4	400	385	15	0	99
14.8	400	357	22 *	21*	99
Testigo (+)	200	0	31 *	169*	0

* $P < 0.05$ con prueba de Ji cuadrada

La gráfica 4 muestra el daño producido al aplicarse las diferentes dosis del TeCl_4 , en donde se observa que el número de células dañadas aumenta conforme se aumenta la dosis del compuesto, la migración del ADN que se presenta con las primeras dosis es de 10 a 50 μm aproximadamente, mientras que al aplicarse la última dosis la migración se observa entre los 70 y 130 μm aproximadamente. Al parecer, cuando los linfocitos

humanos son expuestos al TeCl_4 , se observa un comportamiento dosis dependiente en donde se producen rompimientos de cadena sencilla en ADN.

Gráfica 4. Distribución de la migración del ADN en linfocitos humanos tratados con TeCl_4



* $P < 0.05$ prueba de Ji cuadrada

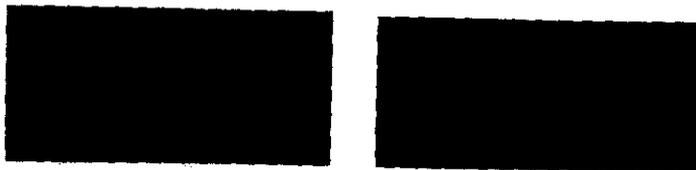
En la tabla 15 se muestran las dosis de etanol utilizadas y el número de células que presentaron daño. Se observa que ninguna de las dosis causa un efecto estadísticamente significativa con respecto al testigo.

Tabla 15. Efecto del etanol sobre linfocitos humanos mediante la técnica de ensayo cometa

Etanol (µM)	Núm. de Cél. Analizadas	Núm. de Cél. sin Daño	Núm. de Cél. con Daño	Número de Nubes	Viabilidad (%)
0	400	398	2	0	99
47.9	400	398	2	0	98
95.8	400	397	3	0	98
191.6	400	392	8	0	97
383.3	400	400	0	0	98
Testigo (+)	200	0	92 *	108	0

* $P < 0.05$ con prueba de Ji cuadrada

Figura 8. Células con daño observadas en las preparaciones con TeCl_4



De acuerdo a nuestros resultados la evaluación de rompimientos de cadena de ADN por la técnica de ensayo cometa constituye un parámetro sensible para determinar daño en cromosomas humanos y comprobar que el TeCl_4 si produce daño en dicha cadena pudiendo correlacionar con otras técnicas como la de aberraciones cromosómica, desafortunadamente el estudio del Te no es muy amplio y nos limita para hacer alguna comparación y decir si nuestros resultados concuerdan con los de otros investigadores.

CONCLUSIONES

✕ Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el TeCl_4 resultó ser un compuesto citotóxico sobre linfocitos humanos en cultivo tratados por 3 ó 48 horas, efecto que se evidenció por la disminución del índice mitótico.

✕ El TeCl_4 mostró ser un agente clastógeno S-independiente debido a que produce principalmente rompimientos de una de las cromátidas, esto es, de tipo cromatídico.

✕ El compuesto utilizado no altera la frecuencia de asociación de satélites, por lo que podemos concluir que a pesar de producir rompimientos cromatídicos no interactúa con la Región Organizadora del Nucleolo (RON).

✕ El TeCl_4 es un compuesto de acción directa que en condiciones alcalinas produce rompimientos de cadena sencilla de ADN que se comporta de manera dosis-dependiente, por lo que se puede considerar como un agente genotóxico.

COMENTARIOS FINALES

El Te es un metal que se puede obtener fácilmente como producto en la extracción de varios elementos como el cobre, plata, fierro y oro en algunas plantas electrolíticas, por lo que en el momento de su producción, la interacción con el hombre es inminente. Los resultados que se obtuvieron al utilizar uno de sus compuestos, el tetracloruro de telurio (TeCl_4) en cultivos de linfocitos humanos y en dosis bajas, se encontró que produce daño en la cadena de ADN. Consideramos que este estudio no debe terminar aquí sino que se deben seguir buscando metodologías como son la de ICH, micronúcleos u otras que permitan detectar daño en el organismo completo y no únicamente en alguna parte del mismo, así como en pruebas de carcinogénesis y toxicología reproductiva.

Estos resultados pueden ser el inicio de alguna investigación más completa que se pueda tomar en cuenta para alguna normatividad que posteriormente sirva para beneficio de la población, más aún la del Distrito Federal ya que cada año, los índices de contaminación van en aumento en donde podemos encontrar desde metales, hidrocarburos, etc.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

REFERENCIAS

- ☆ Alberts, B. Bray, D. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. y Watson, J. (1994). Biología Molecular de la Célula. 2a. edición. Ed. Omega. Barcelona, España. Pp 1300.
- ☆ Altamirano-Lozano, M. (1992). Efectos Mutagénicos y Alteraciones del Ciclo Celular Reproductivo del Ratón Producidos por Pentóxido de Vanadio. Tesis Doctoral. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. México. Pp 84.
- ☆ Bianco, J. Pape, L. Alpert, J. Zheng, M. Hnatowich, D. Goodman, M. y Knapp, F. (1984). En: Handbook on the toxicology of metals. (Eds) Friberg, L. Nordberg, G. F. y Vouk, V. Elsevier Sci. Pub. Amsterdam. Cap. 21. Pp 532-548.
- ☆ Bolaños, F. (1990). El Impacto Biológico: Problema Ambiental Contemporáneo. México. Cap. 5 y 7.
- ☆ Brownin, E. (1969). Toxicity of Industrial Metals. 2nd. ed. Butterworths, London. Pp 310-316.
- ☆ Brusick, D. (1987). Principles of Genetic Toxicology. 2nd. ed. Ed. Plenum Press. New York. Pp 284.
- ☆ Carson L. Bonnie; Ellis III. Harry y McCann L. Joy. (1987). Toxicology and Biological Monitoring of Metals in Humans. 2nd. ed. Ed. Lewis Publishers, Inc. U. S. A. Pp 238-242.
- ☆ Clayton George D. y Clayton Florence E. (1981). Tellurium. En: Patty's Industrial Hygiene and Toxicology. Vol. II-A. Cap. 31. 3a. ed. Ed. Wiley-Interscience. New York. Pp 1466.

☆ Choo, K. H. Vissel, B. Brown, R. Filby, R. G. y Earle, E. (1988). Homologous Alpha Satellite Sequences on Human Acrocentric Chromosomes with Selectivity for Chromosomes 13, 14 and 21: Implications for Recombination between Nonhomologues and Robertsonian Translocations. *Nucleic Acid Res* 16:1273-1283.

☆ Davidson, D. F. y Lakin, H. W. (1972). Metals. US Geologic Survival Prof Pap. 820:627-630.

☆ DeMeio, R. H. (1946). En: Handbook on the Toxicology of Metals. (Eds) Friberg, L. Nordberg, G. F. y Vouk, V. Elsevier Sci. Pub. Amsterdam. Cap. 21. Pp 532-548.

☆ DeMeio, R. H. y Henriques, F. C. (1947). Excretion and Distribution in Tissues Studied With a Radioactive Isotope. *J. Biol. Chem.* 169:609-623.

☆ DeMeio, R. H. y Jetter, W. W. (1948). En: Handbook on the Toxicology of Metals. (Eds) Friberg, L. Nordberg, G. F. y Vouk, V. Elsevier Sci. Pub. Amsterdam. Cap. 21. Pp 532-548.

☆ DiLemia, R. Riva, M. Dalpra, L. y Gimelli, E. (1980). Satellite Associations and Silver Staining in a Case of Multiple G and D Variants. *Hum. Genet.* 53:237-240.

☆ Duffus, J. H. (1983). Toxicología Ambiental. Editorial Omega. Barcelona España.

☆ Espinosa-Rivera, V. E. (1997). Efectos del zinc y aluminio sobre marcadores biológicos del daño temprano. Evaluación del efecto sobre marcadores de cito y genotoxicidad. Tesis de Licenciatura. Carrera de Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México. Pp 59.

☆ Evans, H. J. (1984). Human Peripheral Blood Lymphocytes for the Analysis of Chromosome Aberrations in Mutagen Test. Handbook of Mutagenicity Test Procedures. Ed. Elsevier. Pp 405-440.

☆ Friberg, L; Nordberg, F. y Vouk, V. (1990). Handbook on the Toxicology of Metals. 2a. ed. Ed. Elsevier. Amsterdam. Vol. II. Pp 704.

☆ Gani, R. (1978). Nucleoli of Cultured Human Lymphocytes. Hum. Genet. 42:271-282.

☆ Garro, F. y Pentschew, A. (1964). En: Handbook on the Toxicology of Metals. (Eds) Friberg, L. Nordberg, G. F. y Vouk, V. Elsevier Sci. Pub. Amsterdam. Cap. 21. Pp 532-548.

☆ Gerhardsson, L.; Glover, R. J. Gunnar, F. y Velimir Vouk. (1986). Tellurium. Vol. II. Cap. 21. Handbook on the Toxicology of Metals. Elsevier Science. Publishers. Pp 532-548.

☆ Gonsebatt-Bonaparte. M. E. (1994). Marcadores Biológicos de Exposición a Arsénico Inorgánico. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM. Pp 68.

☆ González-Moran, Ma. Genoveva. (1996). Técnicas en biología celular. Ed. AGT. México. Pp 208.

☆ Hartmann, A. y Speit, G. (1994). Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the Single Cell Gel (SCG) assay and the Sister Chromatid Exchange (SCE) test. Environ. Mol. Mutag. 23:299-305.

☆ Hollins, J. G. (1969). En: Handbook on the Toxicology of Metals. (Eds) Friberg, L. Nordberg, G. F. y Vouk, V. Elsevier Sci. Pub. Amsterdam. Cap. 21. Pp 532-548.

☆ Izrael'son, Z. Y. (1973). In: Problems of industries Hygiene and Occupational Diseases in Work with Rare Metals. Izrael'son, Z. Y. Mogilevskaja, O. J. and Suvorov, S. V. Eds. Medicina. Rusia. Pp 258-266.

☆ Kanematsu, N., Hara, M. y Kada, T. (1980). Rec Assay and Mutagenicity Studies on Metal Compounds. *Mutat. Res.* 77:109-116.

☆ Kirkland, J. D. (1990). Basic Mutagenicity Test: UKEMS Recomendend Procedures. Ed. Cambridge University Press. Great Britain. Pp 144.

☆ Kligerman, A. D. Bryant, M. F. Erexon, G. L. y Rabinowits, J. R. (1988). Persistence of ICH-inducing Lesions in Lymphocytes of Mice Exposed to Diaziquone. *Environ. Mol. Mutag.* 12:185-199.

☆ Kudryavtsev, A. A. (1974). The Chemistry and Technology of Selenium and Tellurium. Collet. London.

☆ Lampert, P. W. y Garret, R. S. (1971). En: Handbook on the Toxicology of Metals. (Eds) Friberg, L. Nordberg, G. F. y Vouk, V. Elsevier Sci. Pub. Amsterdam. Cap. 21. Pp 532-548.

☆ Lampert, P., Garro, F. y Pentschew, A. (1970). En: Handbook on the Toxicology of Metals. (Eds) Friberg, L. Nordberg, G. F. y Vouk, V. Elsevier Sci. Pub. Amsterdam. Cap. 21. Pp 532-548.

☆ Li, P. A. y Heflich, R. H. (1991). Genetic Toxicology. Ed. CRC Press. New Jersey. Pp 493.

☆ Ma, T. H., Anderson, V. A. y Ahmed, Y. (1982). Environmental Clastogens Detected by Meiotic Pollen Mothers Cells of *Tradescantia*. En: Genotoxic Effects of Air Bone Agents. Editado por Tice, R. R; Costa, D. L. y Schaich, K. L. Ed. Plenum Pub. Co.

☆ McKelvey-Martin, V. J. Green, M. H. Schmezer, P. Pool-Zobel, B. L. DeMéo, M. P. y Collins, A. (1993). The Single Cell Gel Electrophoresis Assay (comet assay): A European Review. *Mutat. Res.* 288:47-63.

☆ MERCK INDEX. (1989). An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 11a. ed. Ed. MERCK y CO., INC. U. S. A. Pp 1439.

☆ Montero, R. Gonsebatt, M. E. Gerson, R. Rojas, E. Alonso, H. L. y Ostrosky-Wegman, P. (1993). AS-101: a Modulador of *in vitro* T-cell Proliferation. *Anti-Cancer Drugs.* 4:351-353.

☆ Moskalev, Y. I. (1960). En: Handbook on the Toxicology of Metals. (Eds) Friberg, L. Nordberg, G. F. y Vouk, V. Elsevier Sci. Pub. Amsterdam. Cap. 21. Pp 532-548.

☆ Moutschen, J. (1985). Introduction to Genetic Toxicology. Ed. John Wiley y Sons. Great Britain. Pp 184.

☆ Nriagu, J. O. (1988). A Silent Epidemic of Environmental Poisoning?. En: Evaluación de las Frecuencias de Asociación de Satélites y su Posible Relación con Síndrome Down Regular y Traslocado. Pérez-López. L. E. Tesis de Licenciatura. Carrera de Biología. ENEP-Zaragoza. UNAM. México. Pp 73.

☆ Olive, L. P., Banatáh, P. J. y Durand, E. R. (1990). Heterogeneity in Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal Cells Measured Using the "Comet" Assay. *Radiat. Res.* 122:86-94.

☆ Ortíz -Monasterio, P. F.; C. Cortinas de Nava y Maffey García, L. (1987). Manejo de los Desechos Industriales Peligrosos en México. Ediciones Universo 21. México.

☆ Ostling, O. y. Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic Study of Radiation-induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123:291-298.

☆ Ostrosky-Wegman, P. (1986). Efecto de Drogas Antiparasitarias. Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. UNAM. México. Pp 131.

☆ Ostrosky-Wegman, P. Gonsebatt, R. Montero, L. Vega, H. Barba, J. Espinosa, A. Palao, C. Cortinas de Nava, G. García-Vargas, L. M. Del Raso y Cebrian, M. (1991). Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in México. *Mutation Res.* 250:477-482.

☆ Patton, R. G. y Allison, A. C. (1972). Chromosome Damage in Human Cell Cultures Induced by Metals Salts. *Mutation. Res.* 16:332-336.

☆ Pérez-López, L. E. (1992). Evaluación de las Frecuencias de Asociación de Satélites y su Posible Relación con Síndrome Down Regular y Translocado. Tesis de Licenciatura. Carrara de Biología. ENEP-Zaragoza. UNAM. México. Pp 73.

☆ Pérez-D'Gregorio, E. R. y Miller, K. R. (1988). Teratogenicity of Tellurium Dioxide: Prenatal Assessment. *Teratology.* 37:307-316.

☆ Rodríguez-Reyes, R. G. (1996). Destino *in vivo* de las Lesiones Causadas al ADN por Agentes Alquilantes e Involucradas en la Producción de ICH. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM.

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

- ☆ Roldán-Reyes, E. (1992). Efectos Mutagénicos y Teratogénicos del Pentóxido de Vanadio. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México. Pp 109.
- ☆ Rooney, D. E. y Czepulkowski, B. H. (1978). Human Citogenetics. Ed. Erl Press. Washington D. C. Pp 241.
- ☆ Seljankina, K. P. y Alekseeva, L. S. (1971). Tellurium. *Gig. Sanit.* 35:95-96. (in Russian).
- ☆ Sharma, A. y Talukder, G. (1987). Effects of Metals on Chromosomes of Higher Organisms. *Environ. Mutagen.* 9:191-226.
- ☆ Sigmund, J. Schwarzacher, H. G. y Mikelsar, A. V. (1979). Satellite Association Frequency and Number of Nucleoli Depend on Cell Cycle Duration and NOR-Activity. *Hum. Genet.* 50:81-91.
- ☆ Singh, N. P. McCoy, M. T. Tice, R. R. y Schneider, E. L. (1988). A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Exp. Cell Res.* 237:123-130.
- ☆ Slouka, V. y Hradil, J. (1970). En: Handbook on the Toxicology of Metals. (Eds) Friberg, L. Nordberg, G. F. y Vouk, V. Elsevier Sci. Pub. Amsterdam. Cap. 21. Pp 532-548.
- ☆ Sredni, B. Caspi, R. Klein, A., Kalechman, Y. Danziger, Y. Benyakov, M. Tamari, T. Shalit, F. y Albeck, M. (1987). A New Immunomodulating Compound (AS-101) with Potential Therapeutic Application. *Nature* 330:173-176.
- ☆ Sredni, B. , Kalechman, F., Shalit y Albeck, M. (1990). Synergism Between AS101 and PMA in Lymphokine Production. *Immunology.* 69:110-116.

☆ Tice, R. R., Andrews, P. W. y Singh, N. P. (1990). *The Single Cell Gel Assay: A Sensitive Technique for Evaluating Intercelular Differences in DNA Damage and Repair*. Ed. Plenum Press, New York. pp 291-301.

☆ Zang, K. y Back, E. (1968). Quantitative studies on the arrangement of human metaphase chromosomes. I. Individual features in the association pattern of the acrocentric chromosomes of normal males and females. *Cytogenetics* 7:455-470.