

21

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

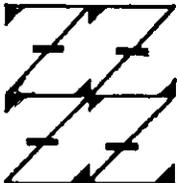
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

"ESTUDIO DEL EFECTO GENOTOXICO Y  
TERATOGENO DEL TRIOXIDO DE CROMO ( $CrO_3$ )  
DURANTE EL DESARROLLO FETAL DEL RATON  
*in vivo*".

297233

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A :  
**VICTORIA LOPEZ SANTIAGO**

UNAM  
FES  
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE  
DE NUESTRA REFLEXIÓN

DIRECTORA DE TESIS:  
M. en C. MA. DEL CARMEN GARCIA RODRIGUEZ

MEXICO, D. F.

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación de Genética y Toxicología Ambiental de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza" UNAM encabezada por el Dr. Mario A. Altamirano Lozano, en el Laboratorio de Antimutagénesis, Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis, bajo la dirección de la M. en C. Ma. del Carmen García Rodríguez.

Durante el desarrollo de la tesis de Licenciatura se contó con el apoyo de PADEP-UNAM, proyecto 500406 y beca del Programa "Iniciación temprana a la Investigación" otorgado por la UNAM.

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

*Goethe*

*"Sólo con el corazón se puede ver bien; lo esencial es invisible para los ojos"*

*Antoine de Saint-Exapery*

## ***Gracias por siempre***

A la M. en C. y futura Doctora Ma. Del Carmen García Rodríguez por su ayuda brindada en la elaboración de esta tesis, sobre todo por su paciencia, por su valiosa amistad y por confiar en mí en todo momento.

Al Dr. Mario A. Altamirano Lozano por abrimme las puertas del laboratorio y permitirme colaborar en su grupo de trabajo.

A mis distinguidos sinodales.

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

I.B.Q. Hilda Olvera Del Valle

M. en C. Ma. Del Carmen García Rodríguez

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dr. Mario Altamirano Lozano

M en I.B.S.H. Elia Roldán Reyes

A mis compañeros del laboratorio con quienes he aprendido mucho.

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

***Muchísimas gracias***

## ***Gracias infinitas...***

### ***A Toñita:***

Quien me ha dado la oportunidad de existir. Por brindarme todo su amor y su confianza y por ser en todo momento mi apoyo más firme y constante. Te quiero Mamá y admiro tu fortaleza.

### ***A Rosy y Eve:***

Por el cariño y la comprensión en los momentos más difíciles, por estimular y compartir conmigo cada uno de mis logros y tropiezos, así como también momentos de alegría, amor y respeto.

### ***A Héctor:***

Por tu apoyo y comprensión en todo momento e incluso por tus consejos.

### ***Al pequeño Alex:***

Porque con tu sonrisa haces que me olvide de los problemas.

### ***A Efraín.***

Por estimularme para concluir uno de mis grandes sueños y por escucharme en todo momento. Gracia amor. Solo recuerda que te Amo.

***A ustedes les dedico mis mejores esfuerzos...***

## ÍNDICE

Página

I. RESUMEN	
II. INTRODUCCIÓN	1
1. METALES	2
1.1. CROMO	3
a) Propiedades fisico-químicas	3
b) Usos	3
c) Funciones biológicas	4
d) Exposición al cromo	4
e) Carcinogénesis	6
f) Toxicidad	6
g) Citotoxicidad y genotoxicidad	7
h) Mecanismos de inducción de daño	10
2. EVALUACIÓN DE DAÑO GENOTÓXICO	13
2.1 MICRONÚCLEOS	13
a) Formación	13
b) Ventajas y desventajas	15
c) Sistemas de evaluación	16
3. DESARROLLO EMBRIONARIO Y FETAL	18
4. ALTERACIONES DEL DESARROLLO EMBRIONARIO Y FETAL	18
a) Toxicidad materna, embrionaria y fetal	18
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
IV. HIPÓTESIS	26
V. OBJETIVOS	27
1. OBJETIVO GENERAL	27
2. OBJETIVOS PARTICULARES	28
VI. MATERIALES Y MÉTODO	29
1. ANIMALES	29
2. TRATAMIENTOS	29
3. PREPARACIÓN DE LAMINILLAS CON NARANJA DE ACRIDINA	31
4. OBTENCIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA	31
a) Materna	31
b) Fetal	32
5. EVALUACIÓN DE MICRONÚCLEOS	32
6. EVALUACIÓN DE ALTERACIONES	34
a) Externas	34
b) Esqueléticas	35

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
VII. RESULTADOS	38
1. SEGUIMIENTO DEL PESO MATERNO	38
2. COMPORTAMIENTO DEL DESARROLLO DE LAS CAMADAS	38
3. ALTERACIONES EXTERNAS	40
4. ALTERACIONES ESQUELÉTICAS	41
5. INDUCCIÓN DE ERITROCITOS POLICROMÁTICOS MICRONUCLEADOS EN LOS FETOS	43
6. FRECUENCIA DE ERITROCITOS POLICROMÁTICOS EN LOS FETOS	47
7. INDUCCIÓN DE ERITROCITOS POLICROMÁTICOS MICRONUCLEADOS EN LAS MADRES	51
8. FRECUENCIA DE ERITROCITOS POLICROMÁTICOS EN LAS MADRES.	53
VIII. DISCUSIÓN	57
IX. CONCLUSIONES	64
X. COMENTARIOS FINALES	66
XI. REFERENCIAS	67

## I. RESUMEN

El cromo (Cr) es considerado un elemento traza, sin embargo a elevadas concentraciones puede inducir daño en los organismos vivos, siendo la forma hexavalente la más tóxica. En algunos estudios epidemiológicos se ha encontrado una alta correlación entre la incidencia de cáncer y alteraciones en los procesos reproductivos, como los abortos y la inducción de malformaciones, con la exposición a los compuestos del cromo, en trabajadores ocupacionalmente o accidentalmente expuestos.

El trióxido de cromo ( $\text{CrO}_3$ ) es ampliamente utilizado en diferentes industrias, sus efectos han sido probados en diferentes sistemas biológicos de prueba, en los cuales se ha observado que induce daños genotóxicos, mutagénicos y cancerígenos; e inclusive teratogénicos, sin embargo los resultados obtenidos no son concluyentes, por lo que, en la actualidad aún se siguen estudiando ampliamente, de hecho una de las áreas que se esta empezando a explorar más a fondo es la de los procesos reproductivos por su impacto en las poblaciones.

En este estudio se evaluó el efecto genotóxico y teratogéno del  $\text{CrO}_3$ , mediante el análisis de la inducción de Eritrocitos policromáticos micronucleados (EPMN) en sangre periférica tanto materna como fetal y de la evaluación de la inducción de alteraciones del desarrollo en los fetos, empleando ratones hembras de la cepa CD-1 tratados con una sola dosis de 20 mg/kg de  $\text{CrO}_3$  en el día 15 de gestación.

Para la evaluación del daño genotóxico se utilizó la técnica de micronúcleos (MN), la cual consistió en la obtención de sangre periférica (S.P) tanto de la madre como de sus crías cada 24 h después de la administración del  $\text{CrO}_3$ . La S.P se colectó directamente en laminillas cubiertas con Naranja de Acridina (NA).

El daño teratogénico se evaluó mediante la identificación directa en el estereoscopio de las alteraciones externas, mientras que para las óseas los fetos fueron fijados en etanol, desviscerados de manera mecánica, transparentados con KOH, teñidos con rojo de alizarina, montados en glicerina y finalmente analizados directamente bajo el estereoscopio.

Los resultados obtenidos nos indican que el  $\text{CrO}_3$  induce daño genotóxico tanto en las hembras preñadas como en sus crías, ya que en las madres incrementó el número de EPMN a partir de las 24 h, alcanzándose la máxima inducción a las 48 h después del tratamiento, mientras que en los fetos la inducción se presentó a partir de las 24 h, pero en estos se mantiene constante hasta las 72 h.

En cuanto a la citotoxicidad se encontró que el  $\text{CrO}_3$  induce alteraciones solo en la madre pero no en sus crías, ya que al comparar los grupos tratados con el testigo solo se encontró una disminución en la frecuencia de EPC en las hembras gestantes, sin embargo al comparar las frecuencias de EPC de los fetos entre horas de los mismos grupos, si se disminuye la frecuencia del EPC con respecto al día de gestación, por lo que este efecto se debe al desarrollo fetal y no al tratamiento.

En cuanto a las alteraciones en el desarrollo fetal se encontró que el  $\text{CrO}_3$  presentó efectos sobre la velocidad del desarrollo como lo son párpados abiertos y falta de osificación en esternones (doble apariencia y disminución en los puntos de osificación) y extremidades (disminución de los puntos de osificación), sin embargo el tipo y la frecuencia de las alteraciones nos hacen suponer que estas se deben a un efecto fetotóxico y no teratogénico.

A partir de los resultados obtenidos podemos concluir que el  $\text{CrO}_3$  es un agente genotóxico tanto para las hembras preñadas como para sus crías y que induce algunas alteraciones en el desarrollo fetal.

## II. INTRODUCCIÓN

El incremento en el uso de nuevas tecnologías, la industria, el crecimiento demográfico y los nuevos métodos de agricultura, han generado un aumento en la contaminación tanto en el agua como en el aire y en el suelo (Brooks *et al.*, 1984). Algunas estimaciones han identificado aproximadamente unos 6 millones de sustancias químicas en el ambiente, aunque se calcula un número mayor. Tan solo de ellas entre 60 y 70 mil se producen comercialmente para su uso común (IRPTC 1985; Vega y Reynaga, 1990). En contraste a estos datos, las sustancias estudiadas en cuanto a sus interacciones con los organismos no exceden las 2000 y este número aumenta con lentitud (Casarret, 1968; Houge, 1984; Greadel *et al.*, 1986; Albert, 1988). Si además de estos agentes químicos consideramos que en el ambiente están los agentes físicos como son el calor, el ruido, las radiaciones X,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , además de otros agentes biológicos tales como los virus, las bacterias y los hongos, estamos hablando de una exposición compleja y constante que diariamente enfrentamos.

Los agentes químicos a los que estamos expuestos se pueden asimilar y transformar en el organismo o bien eliminarse, sin embargo debido al incremento constante de dichas sustancias, en muchos casos se rebasan estas capacidades y por lo tanto se rompe el equilibrio y se incrementa el riesgo de las alteraciones en la salud induciendo en algunos casos cáncer en diferentes órganos, enfermedades congénitas, hereditarias y reproductivas (Albert 1988; Clarkson *et al.*, 1988). Es por esta razón que organizaciones internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), la Dirección General del Medio Ambiente (MOPU) y la Organización

Panamericana de la Salud (OPS) entre otras, han tratado de controlar la entrada de nuevas sustancias al ambiente y de estudiar las ya presentes; por medio de diversas pruebas como son las de toxicidad, citotoxicidad, genotoxicidad, carcinogenicidad y teratogenicidad (Houge 1984, Graedel *et al.*, 1986; Albert 1988).

## **1. METALES**

Dentro de los contaminantes químicos considerados como peligrosos se encuentran los metales, los cuales constituyen más de las tres cuartas partes de los elementos de la tabla periódica (Vouk 1986).

Los metales se encuentran en casi todos los seres vivos y son utilizados como micronutrientes, tal es el caso del Fe, el Cd, el Zn, el As, el V, el Cu, el Cr entre otros, también como componentes del sistema enzimático y redox (Mertz 1969, Ortiz *et al.*, 1987; Friberg y Nordberg, 1990; Gillespie *et al.*, 1990). El grado de toxicidad de los metales depende de sus propiedades químicas, de su estado de oxidación y su solubilidad principalmente (Newman e Intosh, 1991).

Uno de los metales que ha llamado más la atención para su estudio es el Cr, debido a que forma parte de compuestos ampliamente utilizados en la industria y a su asociación con diferentes alteraciones en los organismos como es el cáncer; algunos compuestos del Cr han mostrado ser mutagénicos, genotóxicos y teratógenos en diferentes sistemas biológicos de prueba (Nishio y Uyeki, 1985; Hartwin 1995; Mirsalis *et al.*, 1996).

## 1.1. CROMO

### a) Propiedades Fisicoquímicas

El número atómico del Cr es 24 y su peso molecular es de 52 g, su densidad es de 7.19 g/cm<sup>3</sup>, su punto de fusión 1857 ± 20 °C, su punto de ebullición 2672 °C, pertenece a las primeras series de los elementos de transición. Sus estados de oxidación van de 2- a 6+, siendo las formas más comunes 3+ y 6+. Los compuestos crómicos trivalentes son más estables y tienen una fuerte tendencia a formar complejos y quelatos, las formas hexavalentes están siempre ligadas a oxígeno, por lo que son fuertes oxidantes. El Cr como metal se produce por reducción de los cromatos (Norseth, 1981).

### b) Usos

El Cr es ampliamente utilizado en la industria para el recubrimiento de diversos componentes de los automóviles (defensas, faros, etc.), en el curtido de pieles y tinción (De Serres 1983), en las procesadoras de cemento (Gillespie *et al.*, 1990), como anticorrosivo en sistemas refrigerantes y calentadores de agua (Friberg y Nordberg 1990), en la fabricación del material fotográfico y materiales refractarios (Cervantes y Moreno, 1999), en la coloración y endurecimiento del mármol, en el pulido de metales, en la coloración de vidrios, en los cromados del acero inoxidable etc. (Carson *et al.*, 1987).

El Cr también es utilizado en la fabricación de productos de lavandería como detergentes en polvo y líquidos, blanqueadores líquidos y suavizantes (Cervantes y Moreno, 1999). También es utilizado como componente de fertilizantes ya que se ha observado que incrementa el

crecimiento y desarrollo de plantas e injertos y mejora la producción y contenido de azúcar en frutas como el mango (Mertz, 1969).

### **c) Funciones biológicas**

El Cr es un elemento esencial en funciones bioquímicas como por ejemplo para el metabolismo de lípidos y glucosa, también se ha mostrado que tiene efectos sobre la actividad enzimática, además de que interviene en el crecimiento de los seres vivos (Mertz 1969; Carson *et al.*, 1987).

Schroeder en 1962 mostró que el Cr se encuentra en todos los tejidos humanos desde la vida fetal. Otros estudios indican que existe una alta concentración de Cr entre el segundo y séptimo mes del desarrollo fetal humano, esto debido posiblemente a la alta transferencia de este metal de la madre al feto, por lo que se cree que el Cr juega un papel importante en el desarrollo (citado por Gómez y Villalobos, 1983).

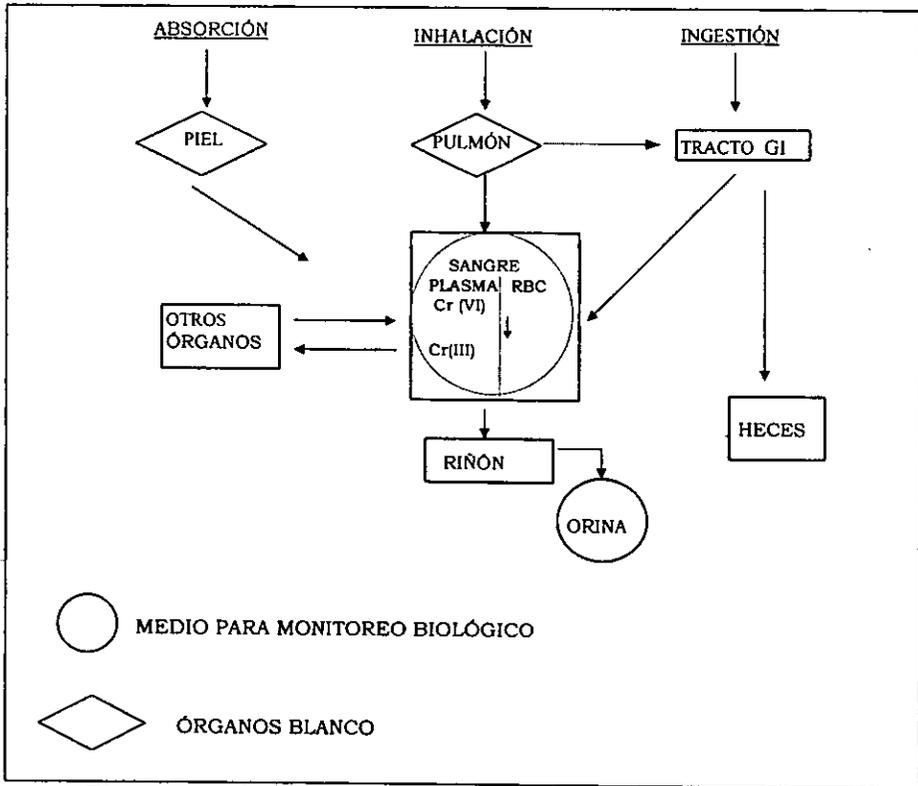
### **d) Exposición al Cromo**

En la figura 1 se observan las diferentes vías por donde los compuestos del Cr pueden ingresar al organismo humano:

1. Por inhalación del aire; el Cr se deposita en el pulmón y posteriormente es eliminado por medio de la orina.
2. Por absorción; el Cr al absorberse por piel puede llegar a la sangre principalmente a los eritrocitos.
3. Por ingestión llegar al tracto gastrointestinal y eliminarse por medio de las heces fecales (Miranda 1992).

Una vez que los compuestos de Cr (VI) ingresan al organismo pueden llegar a la sangre y ahí reducirse a Cr (III), posteriormente ser eliminados ya sea por orina y/o por heces fecales o distribuirse a otros tejidos.

Debido a que es difícil analizar directamente la cantidad de Cr acumulado en el tejido humano, se emplean diferentes medios para evaluar su concentración, por ejemplo se utiliza la sangre ya sea estudiando el plasma o los eritrocitos o bien la orina como monitoreos biológicos (Clarkson *et al.*, 1988).



**Figura 1.- Vías de exposición al Cromo (tomado de Clarkson 1988).**

GI: gastrointestinal  
RBC: reticulocitos

### **e. Carcinogénesis**

En estudios epidemiológicos se ha correlacionado una alta incidencia del cáncer en trabajadores que están directamente expuestos a algunos de los compuestos del Cr, encontrándose una mortalidad por cáncer entre 5 y 40 veces más alta de lo esperado, identificándose en particular adenocarcinomas en la nariz (Friberg y Nordberg 1990).

Por otra parte estudios *in vivo* con animales de experimentación como son las ratas, los ratones y los hámster, expuestos por diferentes vías a los compuestos del Cr, se encontró un incremento en la incidencia de cáncer en el pulmón y en la cavidad nasal (Rojas *et al.*, 1999).

Se ha descrito que las formas insolubles de Cr (VI) y Cr (III) son más cancerígenas que las más solubles, ésto probablemente se debe a las formas solubles no perduran en los tejidos expuestos y rápidamente se reducen por los fluidos del cuerpo (De Flora *et al.*, 1990). En un estudio realizado con ratas tratadas con diferentes compuestos de Cr, se observó que el óxido de cromo provoca cáncer en el músculo esquelético, pero no así el dicromato de potasio y el dicromato de sodio (Foulkes 1990).

### **f) Toxicidad**

El Cr metálico por sí solo no parece tener efectos adversos en la salud, sin embargo varios de sus compuestos, como el trióxido de cromo ( $\text{CrO}_3$ ), el óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) sí inducen toxicidad. En diversos estudios epidemiológicos realizados con trabajadores ocupacionalmente expuestos a los compuestos del Cr, se han encontrado efectos tóxicos tanto agudos como crónicos como son: neurotoxicidad, toxicidad reproductiva, cardiotoxicidad y genotoxicidad (Bagchi *et al.*, 1997), además de que se observan efectos visibles como lo son la irritación de la membrana de la mucosa y de la piel (dermatitis alérgica), reacciones

asmáticas (Mertz 1969), manchas y úlceras en las manos y en las uñas, perforación del septum nasal (por inhalación), además de causar necrosis en el riñón, en el hígado e incluso ocasionar la muerte (Friberg y Nordberg 1990).

#### **g) Citotoxicidad y genotoxicidad**

La citotoxicidad de los compuestos del Cr se ha relacionado con dos de sus propiedades:

1. La solubilidad, que afecta tanto de manera extracelular como intracelular.
2. El estado de oxidación del Cr, en donde la forma hexavalente al parecer es la que causa el mayor daño citotóxico.

Los efectos citotóxicos y genotóxicos del Cr se han estudiado principalmente en ensayos *in vitro* empleando células de mamíferos, en donde se ha encontrado que algunos de sus compuestos inducen daño en el crecimiento celular, en la síntesis de proteínas, en los ácidos nucleicos y alteran el ciclo mitótico; por ejemplo al administrarse diferentes compuestos del Cr (VI) poco solubles a células de hámster Chino, se encontró que se inhibe fuertemente la síntesis de ácidos nucleicos después de 2 horas de preincubación y este daño se incrementa mientras el periodo de incubación aumenta. De igual manera en otro estudio se encontró que al administrar diferentes concentraciones de  $K_2Cr_2O_7$  en células de hámster Chino, se inhibe la síntesis macromolecular produciendo un rápido bloqueo de la replicación del ADN, mientras que la síntesis del RNA se reduce y la síntesis de proteína se afecta (Levis y Majone 1981).

Los efectos genotóxicos de los compuestos del Cr han sido estudiados ampliamente tanto en sistemas de prueba *in vitro*; en donde se ha mostrado que induce sustitución de pares de bases en Guanina-

Citosina y Adenina-Timina, como *in vivo* con células de mamíferos encontrándose que induce aberraciones cromosómicas (AC) (como formación de gap cromatídicos y rompimientos cromosómicos), intercambio de cromátidas hermanas (ICH), enlaces cruzados, fragmentación y daño en la replicación del ADN e inhibición del huso mitótico (Bianchi *et al.*, 1980; De Flora *et al.*, 1990; Foulkes 1990).

En el cuadro 1 se muestra la comparación de los diferentes efectos genotóxicos tanto del Cr (III) como del Cr (VI) en diferentes estudios empleando sistemas de prueba *in vitro*, en donde se observa que la forma hexavalente resulta ser positivo en todos los sistemas estudiados en comparación con los del Cr (III) (Bianchi *et al.*, 1980).

**Cuadro 1.- Efectos genéticos del Cr (III) y Cr (VI) *in vitro***  
(Bianchi *et al.*, 1980).

<b>SISTEMA EXPERIMENTAL</b>	<b>Cr (VI)</b>	<b>Cr (III)</b>
Alteraciones físico-químicas del ADN	+	+
Alteración en la replicación del ADN	+	+
Mutación génica en <i>Escherichia coli</i>	+	-
Mutación génica en <i>Salmonella typhimurium</i>	+	-
Recombinación mitótica en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	NP
Mutación génica en células de mamíferos <i>in vitro</i>	+	-
AC en células de mamíferos	+	±
ICH en células de mamíferos	+	-
Reparación del ADN en células de mamíferos	+	-

NP no probados.

En el cuadro 2 se muestra un resumen del efecto de algunos compuestos del Cr (VI) estudiados en diferentes sistemas de prueba tanto *in vivo* como *in vitro*, en donde se observa los diferentes efectos de los

compuestos como son: clastogenicidad, incremento de ICH, inhibición de la síntesis del ADN, estrés oxidativo, alteraciones cromosómicas, inducción de micronúcleos (MN), etc.

**Cuadro 2.- Estudios realizados con algunos compuestos del Cr (VI).**

<b>Compuesto estudiado</b>	<b>Sistema de prueba</b>	<b>Dosis</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referencia</b>
K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	Medula ósea de ratón <i>in vivo</i>	30, 40, 50 mg/kg	clastogenicidad	Trivedi <i>et al.</i> , 1989
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Células de roedores <i>in vitro</i>	10 <sup>-3</sup> mM	Incrementa ICH	Bianchi <i>et al.</i> , 1980
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Células ratón <i>in vitro</i>	10 µM	Inhíbe la síntesis de ADN	Nishio <i>et al.</i> , 1985
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Células <i>in vitro</i>	1,10, 100 µg/ml	Afecta ácidos. nucléicos, se inhibe la síntesis del ADN	Bianchi <i>et al.</i> , 1980
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Ratas <i>in vivo</i>	2.5 mg/kg	Estrés oxidativo y daño en los tejidos	Bagchi <i>et al.</i> , 1997
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> , Na <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Algas y plantas <i>in vivo</i>	20-10 000 µg/l	Inhibición de la fotosíntesis y retardo en el crecimiento, desbalance en la concentración de K, P, Fe, Mg, Ca	Cervantes y Moreno, 1999
CrO <sub>3</sub>	Vicia faba <i>in vitro</i>	0.001, 0.01, 0.05, 1-3 %	Alteraciones cromosómicas (fragmentos y puentes), anomalías en el huso mitótico y MN	Villagómez, 1981
CrO <sub>3</sub>	Sangre periférica de ratón <i>in vivo</i>	20 y 25 mg/kg de peso corporal	Inducción de MN	García-Rodríguez <i>et al.</i> , 1998

## **h) Mecanismos de inducción del daño**

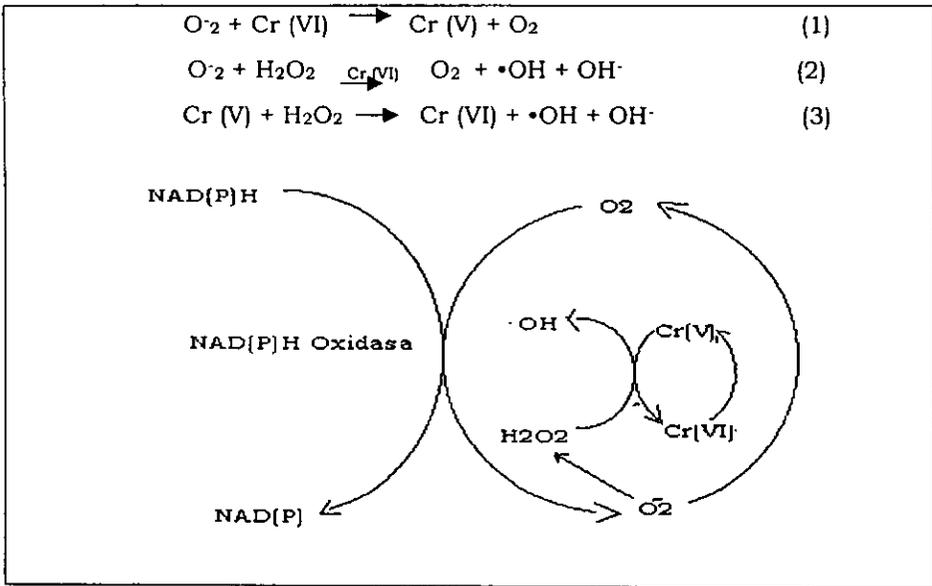
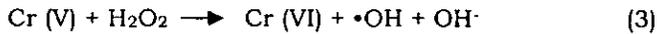
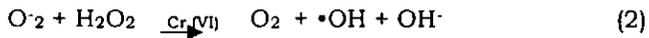
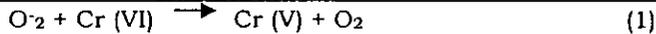
Se ha observado que el Cr (VI) pasa fácilmente la membrana celular y el Cr (III) parece no tener esta propiedad. Una vez en la célula el Cr (VI) es reducido hasta Cr (III) y en sangre este último es transportado principalmente por el plasma, predominantemente ligado a la transferrina. Algunos estudios han mostrado que el Cr (VI) puede ser espontáneamente reducido en plasma y esta reducción es acelerada por una alta concentración del ácido ascórbico, aunque también se puede reducir en piel ya que la metionina, la cisteína, la cistina, el ácido láctico, la hemoglobina y las globulinas han sido consideradas como reductantes (Mertz, 1969).

El sitio en la célula para que se lleve a cabo esta reducción puede ser el retículo endoplasmático, la mitocondria, la membrana plasmática o el núcleo celular (Norseth 1981; De Flora *et al.*, 1989).

El Cr (VI) pasa fácilmente a la membrana celular por los canales de proteínas (Mertz, 1969) o por el sistema de transporte facilitado probablemente ayudado por otro sistema que es el de transporte de sulfatos (Pei-Shan y Meng-Kai, 1997). Se ha observado que el daño que causa el Cr, se debe a la reducción intracelular; durante este proceso de reducción se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) los cuales desencadenan reacciones tóxicas como es la peroxidación lipídica que daña a los ácidos nucleicos (rompimiento de cadena del ADN, se forman sitios apurínicos/apirimídicos, induce enlaces cruzados y daño oxidativo al ADN), a las proteínas y causa rompimiento de desoxirribosafosfato (Mertz 1969, Bianchi *et al.*, 1980; Tamino *et al.*; 1981; Foulkes 1990; Liu y Dixon 1996, Bagchi *et al.*, 1997). El Cr (VI) se reduce a Cr (V) hasta llegar a la forma más estable que es el Cr (III), este proceso se debe a los antioxidantes como lo es el ácido ascórbico, el glutatión, las flavoenzimas

dependientes de NADPH (como son glutatión reductasa y deshidrogenasa lipídica), la ferredoxin-NADP<sup>+</sup> y los microsomas.

El Cr (VI) reacciona con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular y lleva a la formación de tetraperoxocromato (V), esta descomposición genera radicales hidroxil, y ROS vía el ciclo de Haber-Weiss (Fernandes 1999; Fernandes *et al.*, 2000). Cuando el Cr (V) entra en el ciclo de Haber-Weiss, éste vuelve a reaccionar con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular para generar radicales •OH. El radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> se considera de gran importancia porque es producido en el organismo por macrófagos y otros constituyentes celulares especialmente durante el fenómeno de fagocitosis aunque también está implicado en la genotoxicidad al llevarse a cabo la conversión de O<sub>2</sub><sup>-</sup> a •OH (figura 2) (Shi y Dalal, 1992).



**Figura 2. Representación esquemática del ciclo de Haber-Weiss.**

(1) Son varias las fuentes generadoras de ROS pero se considera que la mitocondria es la más importante. El primer producto de la reducción parcial de oxígeno es el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) que es producido en condiciones fisiológicas en la cadena transportadora de electrones y es convertido en peróxido de hidrogeno  $\text{H}_2\text{O}_2$  espontáneamente o por la acción de la enzima superóxido dismutasa (Mendoza, 2000).

(2) Aunque el peróxido de hidrogeno no es un radical libre, es un compuesto importante en la bioquímica de los radicales libres porque puede descomponerse fácilmente, particularmente en presencia de iones de metales de transición para producir el más reactivo y dañino radical libre de oxígeno, el hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) (Mendoza, 2000).

(3) La reacción de Fenton es otra vía por la cual se generan  $\cdot\text{OH}$  en las células al estar en contacto con los cromatos (Fernandes *et al*, 2000).

## **2. EVALUACIÓN DE DAÑO GENOTÓXICO**

Para evaluar el daño genotóxico que puede inducir un compuesto existen diferentes ensayos, dentro de estos se encuentra la prueba de Ames, la determinación de locus específicos, recesivos letales ligados al sexo, AC, ICH, síntesis no programada de ADN, dominantes letales y MN, entre otros.

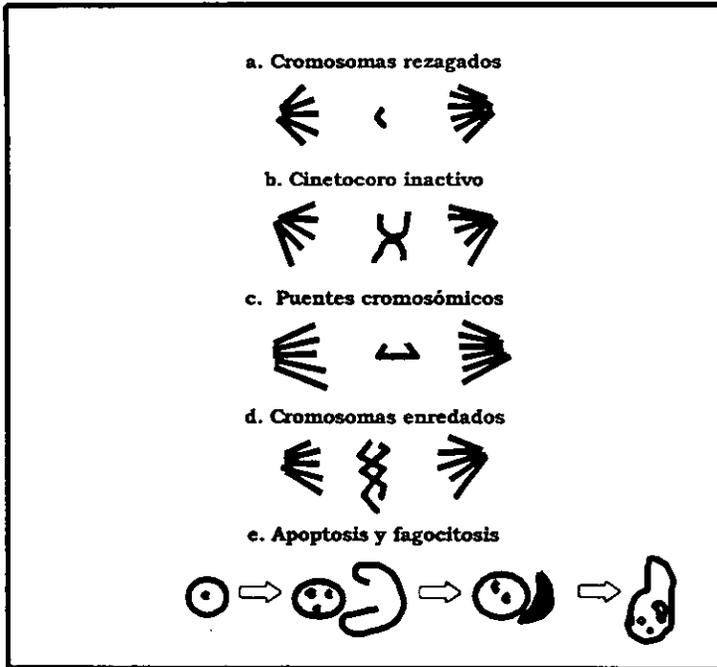
### **2.1 MICRONÚCLEOS**

Los MN son pequeños cuerpos de cromatina que se originan de fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que no son incorporados dentro del núcleo de las células hijas después de la mitosis (Schmid y Ledebur, 1973; Heddle *et al.*, 1983).

La técnica de MN fue desarrollada por Schmid y Bolter en 1970, es relativamente simple, rápida y comúnmente usada como ensayo de corto término (citado en Schmid y Ledebur *et al.*, 1973). Detecta daño citogenético asociado con la frecuencia de AC, evalúa el daño en cromosomas enteros o en fragmentos y también permite identificar daño citotóxico. Es una de las pruebas recomendadas por la "The Fourth International Conference on Harmonisation (ICH4) Genotoxicity Guidelines" (Soo *et al.*, 2000).

#### **a) Formación**

En la figura 3 se observan algunos de los mecanismos por los cuales un MN puede formarse:

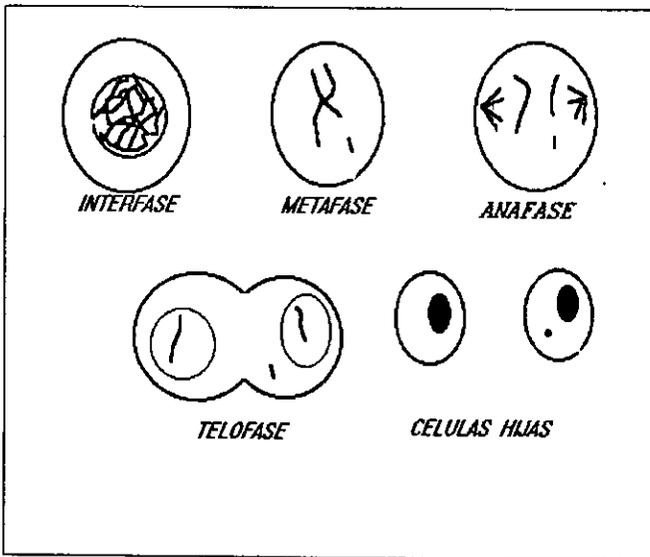


**Figura 3.- Mecanismos por los cuales pueden ser formados los MN o estructuras similares además de los mecanismos clastogénicos (tomado de Heddle et al., 1991).**

1. Pérdida mitótica de fragmentos acéntricos, el tamaño del fragmento y el tamaño de la célula pueden influir para que éste quede incluido en un núcleo dañado.
2. Como una consecuencia de rompimientos cromosómicos, por la formación de puentes cromosómicos o cromosomas enredados, etc.
3. Pérdida mitótica de cromosomas enteros.
4. Apoptosis (muerte celular programada), es una forma de destrucción nuclear en donde se forman fragmentos nucleares y se desintegra el núcleo. La apoptosis puede ocurrir de manera natural y en respuesta al daño celular por químicos.

5. También pueden surgir por meiosis, por ejemplo, cuando se presenta un quiasma dentro de una inversión paracéntrica que podría generar un fragmento acéntrico y formar un MN (Heddle *et al.*, 1991):

La formación de un MN se basa en el hecho de que en la anafase un fragmento cromosómico no está integrado en el núcleo para la orientación del huso mitótico y después en el curso de la telofase este material es incorporado en una de las células dañadas en donde puede fusionarse con el núcleo principal o formar uno o varios núcleos secundarios más pequeños por lo que los MN son también incluidos en el citoplasma de las células dañadas como se muestra en la figura 4.



**Figura 4.- Principales mecanismos por los cuales son formados los MN, que son inducidos por agentes clastogenos (tomado De Serres, 1983).**

### **b) Ventajas y Desventajas**

La técnica de MN tiene las siguientes ventajas: es rápida en comparación con la técnica de AC, su análisis es fácil, no requiere de

células en metafase y frecuentemente es utilizada para cuantificar el daño ocasionado por la exposición a compuestos químicos o radiación. La desventaja de esta técnica es que no se puede identificar el tipo de aberraciones cromosómicas ni la frecuencia que pueden originarse al administrar un compuesto químico (Heddle *et al.*, 1983; Li y Heflich 1991; Tucker *et al.*, 1996).

### **c) Sistemas de evaluación**

Los MN pueden ser evaluados en células que están en una constante proliferación como por ejemplo los mieloblastos, mielocitos, medula ósea de ratón (eritrocitos), eritrocitos de sangre periférica, eritrocitos de hígado y de sangre periférica fetal, células binucleadas en sangre periférica (linfocitos) así como también células uroteliales y exfoliadas de la mucosa bucal y nasal; y en células de vegetales como son las del tejido meristemático y tétradas en tradescantia (Schmid y Ledebur 1973; Cole *et al.*, 1981; Heddle *et al.*, 1983; Tucker *et al.*, 1996).

En las células eritroides se distinguen claramente los eritrocitos maduros y los jóvenes. Los eritrocitos maduros sufren cambios en su arquitectura incluyendo la pérdida de RNA, mitocondrias, retículo endoplásmico y ribosomas, retiene altas concentraciones de hemoglobina y son llamados eritrocitos normocromáticos (ENC), además en esta etapa son acidofílicos. Los eritrocitos jóvenes son llamados policromáticos (EPC) tienen RNA y son basofílicos. Los MN se observan en los EPC de forma redonda con un diámetro de alrededor 1/20 a 1/5 de un eritrocito.

Para poder diferenciar entre ENC, EPC y MN se utilizan diferentes colorantes como son May-Grünwald y Giemsa, en donde los EPC se observan de color azul y los ENC de color anaranjado y los MN se tiñen de un color púrpura (Schmid y Ledebur, 1973). Actualmente se utilizan laminillas teñidas con Naranja de Acridina (NA) esta técnica fue propuesta

por Hayashi *et al.*, en 1990; los cuales al observar al microscopio de fluorescencia, encontraron que los EPC presentan color rojo por el ARN-mitocondrial que aún contienen, a diferencia de los ENC que no se tiñen (ya perdieron el ARN-mitocondrial), por que se observan de color oscuro y los MN se tiñen de color verde fosforescente por la presencia de ADN.

Se ha encontrado que los EPC tienen un tiempo de vida media en el humano de alrededor de 24 h (Heddle *et al.*, 1983); sin embargo otros autores han propuesto que algunos eritrocitos pueden llegar a tener un ciclo vital de hasta 120 días en la especie humana y 55 días en los ratones. Los eritrocitos maduros son fagocitados y digeridos por los macrófagos del hígado cuando terminan su ciclo (Schmid y Ledebur 1973; Venitt y Parry, 1984; Krishna *et al.*, 2000).

Por otra parte en el tejido fetal también puede evaluarse el daño genotóxico, principalmente en eritrocitos tanto de sangre periférica como de hígado. Para dicho análisis se eligen a los eritroblastos porque su proliferación en el feto es rápida (el ciclo celular es cada 6.5 h: G1 0.5 h, S 4.5 h, G2 1.5 h), además la mayor proporción del ciclo celular es ocupada por la síntesis del ADN. La proliferación es dependiente de la hormona eritropoyetina (Cole *et al.*, 1983). En el feto de ratón la eritropoyesis toma lugar entre el día 12 y 16, exclusivamente en el hígado y después de estos días toma lugar en la sangre periférica por lo que este último es considerada para realizar la prueba de MN, además de que presenta una alta proporción de EPC y una baja proporción de células nucleadas (King y Wild 1979). Durante las últimas etapas de la gestación se desarrolla la capacidad metabólica del hígado fetal la cual excede a la de la medula ósea y es entonces cuando en este tejido se pueden evaluar también los MN (Cole *et al.*, 1983).

### **3. DESARROLLO EMBRIONARIO Y FETAL**

Cada una de las etapas del desarrollo embrionario consisten de una serie de mecanismos secuenciados y específicamente programados. Para poder entender las alteraciones es necesario conocer como se lleva a cabo el crecimiento normal desde la fecundación hasta el nacimiento. Por tal motivo varios autores se han dado a la tarea de estudiar los procesos y mecanismos de diferenciación, que ocurren durante el desarrollo embrionario y fetal de los organismos. Las etapas son las siguientes: a) *Gametogénesis y fertilización*, b) *Preimplantación*, c) *Implantación*, d) *Placentación*, e) *Gastrulación*, f) *Neurulación*, g) *Desarrollo de órganos (organogénesis)*, h) *Histogénesis* (Scialli, 1992).

De los trabajos realizados durante las diferentes etapas del desarrollo embrionario y fetal se ha concluido que el periodo de organogénesis es el más sensible a cambios inducidos por los agentes, ya que al ser tratadas las hembras preñadas durante ésta etapa los tipos y la frecuencia de malformaciones aumentan considerablemente en los productos. Durante la organogénesis se puede provocar alteraciones en: en el sistema nervioso, en ojos, en orejas, en el paladar, en el esqueleto, en estructuras urogenitales (King y Wild 1979; Scialli, 1992).

### **4. ALTERACIONES DEL DESARROLLO EMBRIONARIO Y FETAL**

#### **a) Toxicidad materna, embrionaria y fetal**

Los efectos tóxicos en las hembras preñadas han sido poco estudiados a pesar de que son de gran importancia ya que la exposición a los diferentes agentes también se presenta durante la preñez y los efectos no solo se observan en la madre sino también en sus crías. El daño causado a los fetos puede ser por dos vías diferentes:

a) Directa; el agente atraviesa la placenta y causa toxicidad en el desarrollo del embrión o feto.

b) Indirecta; el agente induce alteraciones en la homeostasis de la madre y por lo tanto estos desórdenes alteran el desarrollo fetal (Cole *et al.*, 1979; Clarkson *et al.*, 1988; Rutledge 2000).

Los signos de toxicidad materna y fetal que se encuentran con mayor frecuencia se muestran en el cuadro 3 (King y Wild 1979; Khera 1991; Chahoud *et al.*, 1999).

**Cuadro 3.- Signos de toxicidad observados en madres y crías de roedores (Tomada de García-Rodríguez, 1996).**

<b>EFFECTOS MATERNOS</b>	<b>EFFECTOS EN LAS CRÍAS</b>
a) Reducción del peso corporal	a) Reabsorciones
b) Diarrea, hipoactividad, falta de apetito, etc.	b) Inducción de malformaciones
c) Disminución en el peso de la placenta	c) Alteraciones esqueléticas
d) Aborto	d) Muerte
e) Muerte	

Durante el desarrollo de un organismo se pueden presentar diferentes procesos anormales que pueden inducir alguna alteración, tal es el caso de los teratógenos, éstos interfieren con el desarrollo normal de las crías, por la ineficiencia de los mecanismos de detoxificación, las reacciones de eliminación (glucuronidación) y la excreción renal que causan altas concentraciones de xenobióticos y de sus metabolitos en órganos fetales, es por esto que los compuestos administrados a las madres rápidamente alcanzan al feto (Cole *et al.*, 1979; King y Wild *et al.*, 1979; Cole *et al.*, 1981).

Por otra parte los compuestos de Cr han sido asociados con alteraciones del desarrollo, por lo que diversos investigadores han realizado estudios para corroborar esto, encontrando que al ser administrados en sistemas de prueba tanto *in vivo* como *in vitro* éstos compuestos inducen alteraciones y efectos embriotóxicos y fetotóxicos (cuadro 4).

**Cuadro 4.- Estudios realizados con algunos compuestos del Cr (VI) en diferentes sistemas de prueba.**

<b>Compuesto estudiado</b>	<b>Sistema de prueba</b>	<b>Dosis</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referencia</b>
CrO <sub>3</sub>	Hámster <i>in vivo</i>	8 mg/kg	Paladar hendido, reabsorciones	Gale <i>et al.</i> , 1979
Na <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Ratones <i>in vivo</i>	10 mg/kg	Inhibe la formación de cartilago	Danielsson <i>et al.</i> , 1982.
Na <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Células de embriones de pollos <i>in vitro</i>	0.1 µg/ml	Inhibe condrogénesis	Danielsson <i>et al.</i> , 1982.
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Ratones <i>in vivo</i>	250,500, ppm	Ausencia de sitios de implantación, malformaciones externas y esqueléticas	Trivedi <i>et al.</i> , 1989

Algunos mecanismos propuestos por Scialli (1992) para saber como actúa un agente para inducir daño en el desarrollo embrionario y fetal son los siguientes:

a) Muerte celular.- Las células son importantes mediadoras de los eventos embrionarios, éstas forman parte de la arquitectura de los tejidos,

producen compuestos químicos biológicamente activos e influyen en el desarrollo y función de otras células. Uno de los mecanismos de la teratogénesis es la muerte celular, es decir que un teratógeno puede destruir células importantes para el desarrollo de un tejido u órgano

b) Deficiencia de sustancias esenciales.- Se ha comprobado que durante la preñez algunos nutrientes están asociados con el desarrollo anormal del producto. Estos nutrientes actúan como análogos o antagonistas, es decir, que crean un estado de deficiencia y comienzan a incorporarse en los procesos dependientes de estos nutrientes, por ejemplo la aminoptina o el metotraxate que actúan como análogos del ácido fólico cuando es deficiente en la dieta y estos análogos afectan la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos.

c) Daño en el suministro de energía.- Los agentes que interfieren en la respiración mitocondrial y en la generación del ATP pueden tener efectos adversos en la capacidad celular para llevar a cabo la diferenciación en el embrión.

d) Alteración de membranas.- Las membranas de las células son importantes en la viabilidad y función de las mismas y un cambio en ésta podría generar anomalías en el desarrollo. Las membranas incluyen la envoltura de las células así como también de organelos intracelulares. La alteración de las membranas puede resultar en muerte o una disrupción de la función celular. Una función importante de las membranas es la comunicación entre las células a través de estructuras especializadas como los desmosomas y la alteración de esta comunicación durante la embriogénesis puede originar alteraciones.

e) Genotóxicidad.- Existen agentes genotóxicos que también pueden ser potentes teratógenos. Una alteración en el material genético de una célula puede resultar en la muerte de la misma, es importante considerar la posibilidad de que se origine una mutación y esto afecte el desarrollo

embrionario. Las mutaciones pueden originar defectos en el nacimiento por tratamientos dados durante la embriogénesis. Así por ejemplo los genes consisten de segmentos de ADN que codifican para proteínas. Estas proteínas constituyen moléculas estructurales tales como, las enzimas que catalizan reacciones bioquímicas importantes. Existen dos posibles mecanismos por los cuales una mutación puede causar un desarrollo anormal. El primero es cuando hay un gen no funcional y esto ocurre por el daño al ADN. El segundo es la producción de un gen alterado.

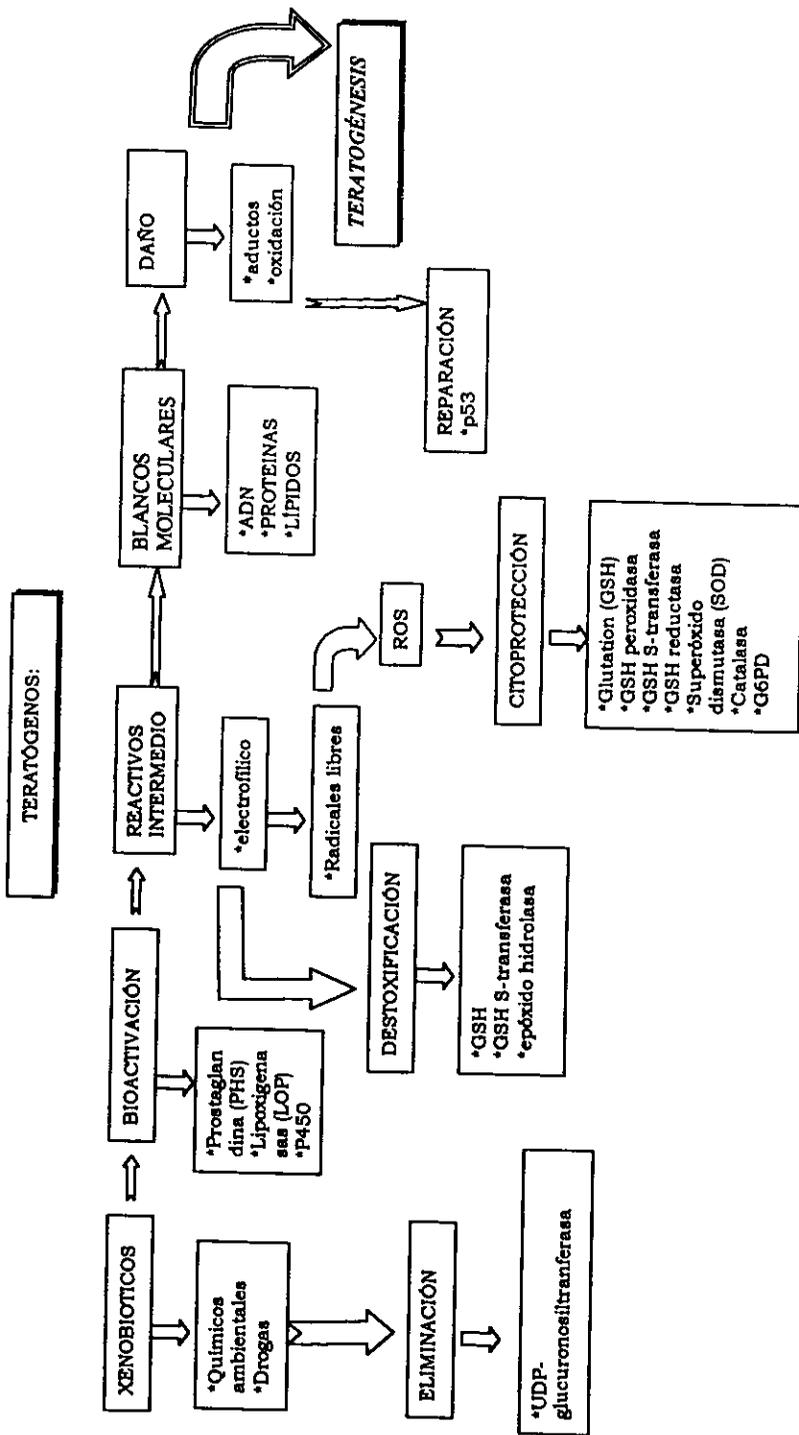
f) Interferencia mitótica.- Algunos agentes no son estrictamente genotóxicos porque no dañan el material genético totalmente, pero interfieren con la división celular. Un ejemplo es la colchicina, que es un veneno del huso mitótico que ocasiona un arresto en la metafase del ciclo celular y da una alta incidencia de embrioletalidad.

g) Alteración de la función de los ácidos nucleicos.- La función principal tanto del ADN como del RNA es la síntesis de proteínas incluyendo enzimas. Es posible que algún agente interfiera con la transcripción del ADN o la traducción del RNA y pueda causar defectos en el desarrollo embrionario.

h) Inhibición enzimática.- Existen algunos agentes que pueden inhibir la actividad de las enzimas y esto tiene que ver con la transcripción o traducción de los ácidos nucleicos que codifican para estas enzimas, por ejemplo la inhibición de la anhidrasa carbónica por acetazolamida, una droga que induce alteraciones en las extremidades de los roedores.

i) Xenobióticos.- Otro mecanismo de teratogenicidad se debe a xenobióticos, algunos pueden ser no tóxicos y otros son metabolitos altamente tóxicos, los cuales pueden seguir diferentes rutas en el organismo: 1) pueden eliminarse gracias a la enzima UDP-glucuronosiltransferasa y no causar ninguna alteración, 2) bioactivarse por el citocromo p450 embrionario, prostaglandina H sintetasa (PHS) y

lipoxigenasas (LOP) y a partir de ahí se generan radicales libres los cuales pueden inhibirse gracias al sistema de defensas antioxidantes como son el glutatión (GSH), glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasa, superóxido dismutasa (SOD) etc. y 3) dañar a las macromoléculas y ocasionar alteraciones por oxidación o formación de aductos y causar daño teratogénico (cuadro 5) (Wells, *et al.*, 1997).



**Cuadro 5.- Teratogénesis: determinantes moleculares y bioquímicos (tomado de Wells et al., 1997). En esta figura se muestra las diferentes rutas que puede seguir un xenobiótico al ingresar al organismo; como por ejemplo puede bioactivarse por diferentes moléculas y causar daño teratogénico o bien puede eliminarse gracias a la actividad de algunas enzimas**

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En algunos estudios epidemiológicos se ha encontrado una alta correlación entre la incidencia de cáncer y alteraciones en los procesos reproductivos, como los abortos y la inducción de malformaciones, con la exposición a los compuestos del cromo, en trabajadores ocupacionalmente o accidentalmente expuestos. Los compuestos del Cr que inducen mayor daño son los que se encuentran en estado de oxidación (VI), debido a su fuerte poder oxidativo.

El trióxido de cromo ( $\text{CrO}_3$ ) es ampliamente utilizado en diferentes industrias, sus efectos han sido probados en diferentes sistemas biológicos de prueba tanto *in vitro* como *in vivo*, en los cuales se ha observado que induce daños genotóxicos, mutagénicos y cancerígenos; e inclusive teratogénicos, sin embargo los resultados obtenidos no son concluyentes, de hecho aunque es uno de los metales más estudiados los mecanismos de inducción de daño apenas se están tratando de explicar. Una de las áreas que esta tomando gran auge es la del estudio de los compuestos del cromo sobre los procesos reproductivos por su impacto en las poblaciones, tanto a nivel genotóxico como teratogénico.

Debido a lo anterior en el presente trabajo se decidió estudiar el efecto genotóxico y teratogénico del  $\text{CrO}_3$  al ser administrado durante la gestación a hembras de ratón, mediante la evaluación de la inducción de MN en sangre periférica tanto en las madres expuestas, como en su descendencia, así como el estudio de la inducción de posibles alteraciones en el desarrollo embrionario y fetal.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Si se ha mostrado en diferentes sistemas de prueba que algunos compuestos del Cr con estado de oxidación (VI) inducen algunos efectos citotóxicos, mutagénicos, genotóxicos, embriotóxicos, fetotóxicos y cancerígenos, en particular el  $\text{CrO}_3$  es capaz de aumentar la frecuencia de ICH y AC en ratones y presentar efectos embriotóxicos al ser administrado en Hámster durante la gestación. Por lo tanto se espera que al administrar una dosis de 20 mg/kg de  $\text{CrO}_3$  en el día 15 de gestación a ratones hembras preñadas se induzca daño genotóxico mediante la inducción de EPMN en sangre periférica tanto en las madres como en las crías, así como alteraciones en el desarrollo de los fetos.

## **V. OBJETIVOS**

### **1. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto genotóxico y teratogéno del  $\text{CrO}_3$  mediante el análisis de la inducción de EPMN en sangre periférica tanto materna como fetal y de la evaluación de la inducción de alteraciones del desarrollo en los fetos, empleando ratones hembras de la cepa CD-1 tratados con una sola dosis de 20 mg/kg de  $\text{CrO}_3$  en el día 15 de gestación.

## **2. OBJETIVOS PARTICULARES**

2.1 Analizar el tiempo de mayor inducción de EPMN en sangre periférica de las hembras preñadas tratadas con  $\text{CrO}_3$ , mediante la evaluación de EPMN cada 24 h a partir del día 15 de gestación.

2.2 Analizar el tiempo de mayor inducción de EPMN en sangre periférica de los fetos obtenidos de las hembras tratadas con  $\text{CrO}_3$ , mediante la evaluación de EPMN en los fetos obtenidos en los días 15, 16, 17 y 18 de gestación.

2.3 Estudiar el daño citotóxico del  $\text{CrO}_3$  en las hembras preñadas, mediante la evaluación de la frecuencia de EPC en sangre periférica materna, obtenida cada 24 h a partir del día 15 de gestación.

2.4 Estudiar el daño citotóxico del  $\text{CrO}_3$  en los fetos, mediante la evaluación de la frecuencia de EPC en sangre periférica fetal, obtenida en los días 15, 16, 17 y 18 de gestación.

2.5 Analizar el daño teratogénico y/o fetotóxico del  $\text{CrO}_3$ , mediante la evaluación de tipo y la frecuencia de malformaciones tanto externas como esqueléticas, la muerte fetal, el número de reabsorciones, en los fetos obtenidos en los días 15, 16, 17 y 18 de gestación.

## **VI. MATERIAL Y MÉTODO**

### **1. ANIMALES**

Se emplearon ratones hembras y machos adultos de la cepa CD-1 de 2 a 3 meses de edad, con un peso corporal entre 25-32 g. Los ratones fueron alimentados con nutricubos (Purina), con libre acceso al agua y se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12-12 h). Las cruas se realizaron colocando un macho con tres hembras durante la noche (de las 7 p.m. a las 7 a.m.), se tomó como día 0 de preñez la presencia de tapón espermático y a partir de ese momento las hembras fueron pesadas cada tercer día hasta el día de su sacrificio (García-Rodríguez, 1996).

### **2. TRATAMIENTOS**

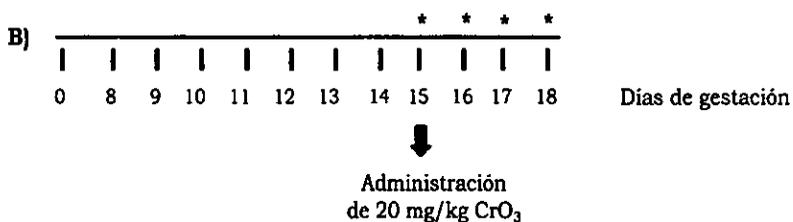
Se emplearon grupos de cuatro hembras preñadas cada uno. Las hembras fueron inyectadas por vía intraperitoneal (i.p) en el día 15 de gestación y se distribuyeron de la siguiente manera (figura 5):

- A) Grupos testigo, se les administró por vía i.p. 0.25 ml de agua destilada.
- B) Grupos tratados; se les administró 20 mg/kg de peso corporal de  $\text{CrO}_3$  (Sigma) diluido en un volumen de 0.25 ml de agua destilada.

**GRUPOS TESTIGO:**



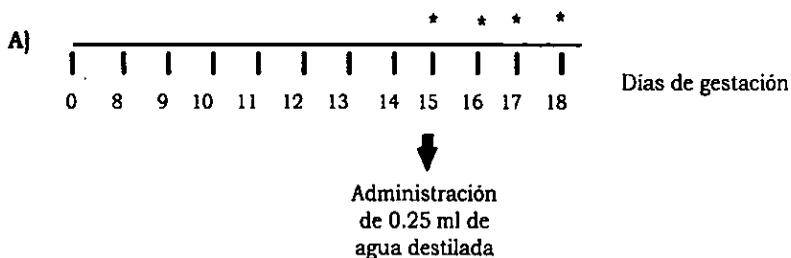
**GRUPOS TRATADOS ( $\text{CrO}_3$ ):**



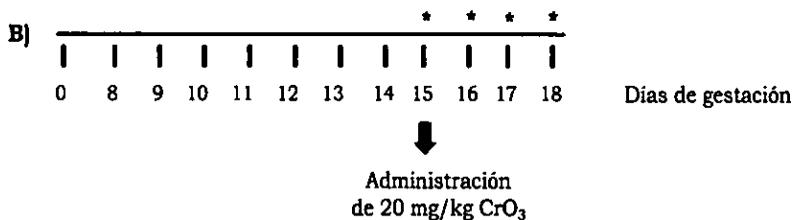
\* toma de muestra de sangre periférica materna.

**Figura 5.- Protocolo para la evaluación de EPMN y la frecuencia de EPC en sangre periférica materna.**

**GRUPOS TESTIGO:**



**GRUPOS TRATADOS ( $\text{CrO}_3$ ):**



\* toma de muestra de sangre periférica materna.

**Figura 5.- Protocolo para la evaluación de EPMN y la frecuencia de EPC en sangre periférica materna.**

### **3. PREPARACIÓN DE LAMINILLAS CON NARANJA DE ACRIDINA**

La naranja de acridina (NA) (Sigma) se disolvió en agua destilada a una concentración de 5 mg/ml. Se tomaron 10  $\mu$ l de esta solución y se colocaron sobre laminillas precalentadas (aproximadamente a 70 °C), con ayuda de otro portaobjetos se extendió el colorante. Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente y se guardaron en la oscuridad hasta su uso como recomienda Hayashi *et al* (1990).

### **4. OBTENCIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA**

La evaluación de EPMN y de la frecuencia de EPC se realizó en sangre periférica tanto de las madres como de los fetos cada 24 h a partir del día 15 en el que fue administrado el tratamiento, hasta el día 18 de preñez.

#### **a) Materna**

Con tijeras se cortó la punta de la cola, con ayuda de una micropipeta se tomaron 5  $\mu$ l de sangre periférica (S.P.) la cual se colocó directamente en las laminillas preparadas con NA, inmediatamente se le puso un cubreobjetos y se sellaron las orillas con Ruber Cement (ROSS). Las preparaciones se guardaron en cajas de plástico en la oscuridad a 4°C y después de 12 h se analizaron; se procuró no evaluar las laminillas después de 5 días de haber sido preparadas ya que estas preparaciones no son permanentes y pueden contaminarse. Se prepararon 2 laminillas por cada hembra.

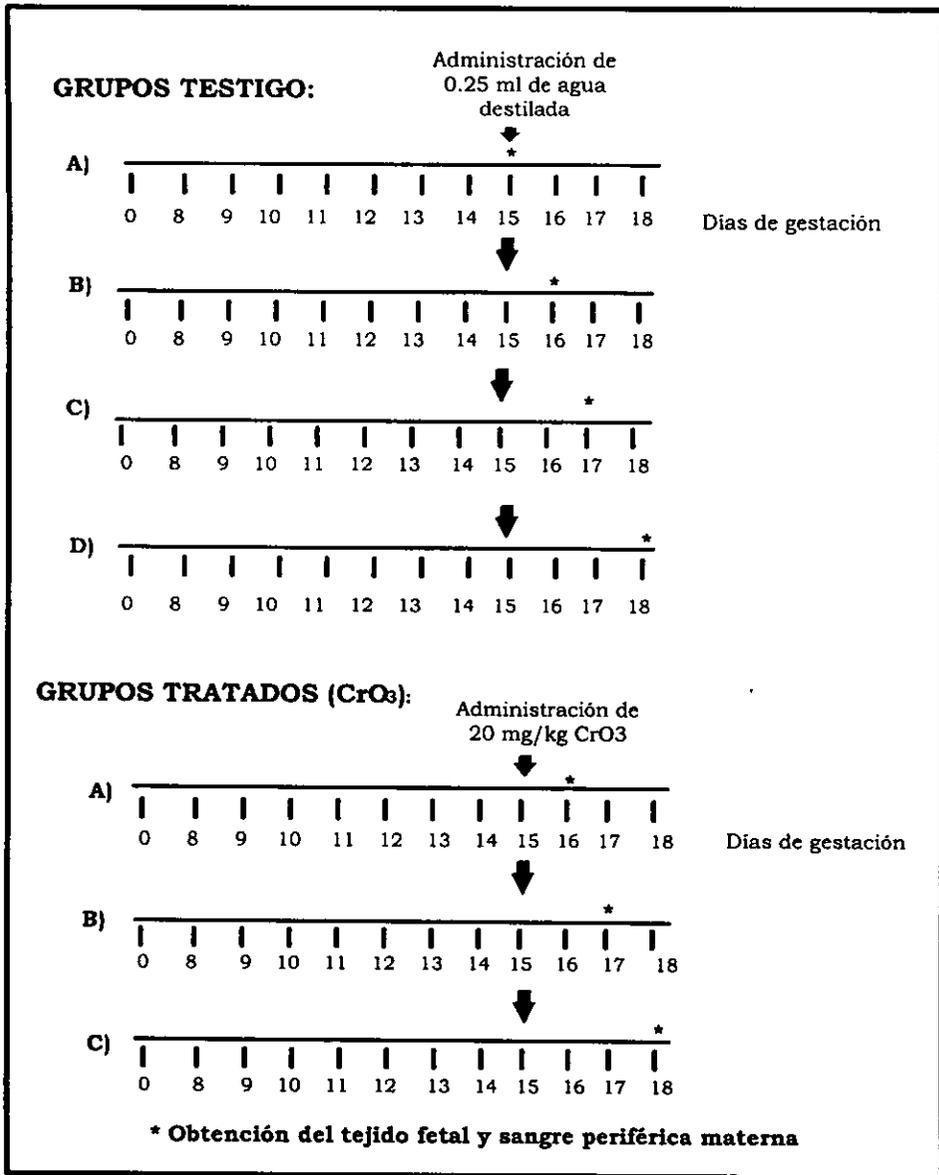
## **b) Fetal**

Después de sacrificar a la madre por dislocación cervical se extrajo el útero y se colocó en una mezcla fría ( $0 \pm 1^\circ\text{C}$ ) de solución Tyrodes (Sigma): suero fetal inactivado con calor (Gibco BRL) en una relación 1:1 (Solución A). Los fetos fueron removidos del útero, se tomaron cuatro fetos al azar y se lavaron con la solución A, posteriormente fueron lavados únicamente con suero fetal frío, se les decapitó con unas tijeras y se obtuvieron 5  $\mu\text{l}$  de S.P con la ayuda de una micropipeta. La S.P se colocó directamente en laminillas preparadas con NA. Se prepararon 2 laminillas por cada feto (figura 6) (King y Wild, 1979).

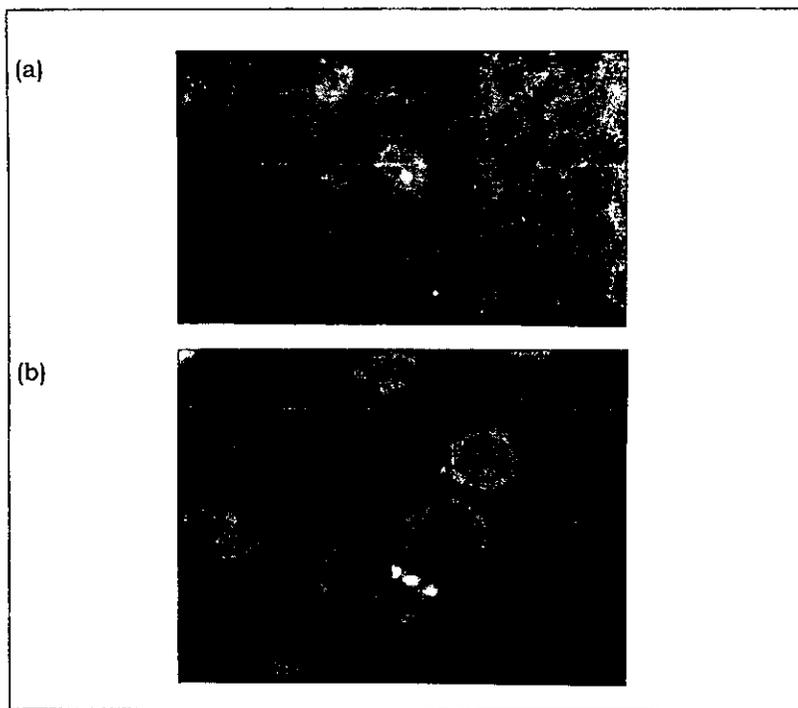
## **5. EVALUACIÓN DE MICRONÚCLEOS**

Con la ayuda de un microscopio de fluorescencia (Nikon OPTIPHOT-2) con filtros DIA-ILL y TRIPLE D-F-T y un objetivo de 100X se realizó la cuantificación de 1000 eritrocitos, distinguiendo los ENC de los EPC, para la evaluación del daño citotóxico mediante la evaluación de la frecuencia de EPC. Además se contaron 2000 EPC de los cuales se identificó la presencia (EPMN) o ausencia de MN como se observa en la figura 7 (a) las células de color oscuro son ENC, las de color rojo son los EPC y el punto amarillo un MN y b) EPC con tres MN. La inducción neta de la frecuencia (NIF) de EPMN se calculo de la siguiente manera (García-Rodríguez, *et al*, 2001):

$$\text{NIF} = \text{número de EPMN} - \text{número de EPMN al tiempo 0}$$



**Figura 6.- Protocolo para la evaluación de los EPMN y de la frecuencia de EPC en sangre periférica fetal.**



**Figura 7.- Eritrocitos normocromáticos y policromáticos de sangre periférica de ratón.**

## **6. EVALUACION DE ALTERACIONES**

### **a) Externas**

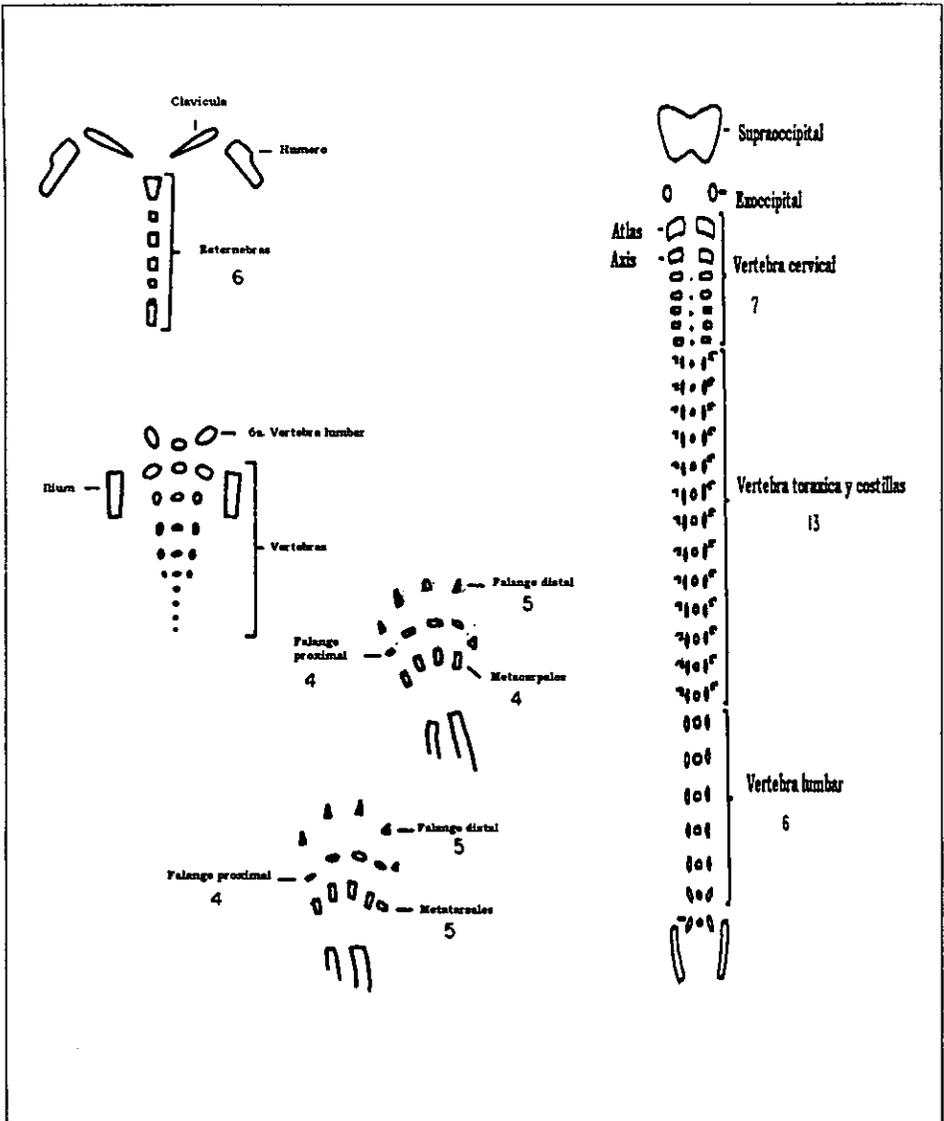
Una vez extraído el útero de las hembras se evaluaron los siguientes parámetros: el número de implantes, número de reabsorciones, muerte fetal

Los fetos se pasaron a una solución de etanol (Baker) al 70 % y ahí permanecieron hasta el momento en que se analizaron las alteraciones con la ayuda de un estereoscopio; posteriormente se realizó la técnica de transparentación (Dawson 1926; Aliverti *et al.*, 1979).

## **b) Esqueléticas**

La evaluación de las alteraciones esqueléticas se realizó en los fetos fijados en etanol, desviscerándolos para posteriormente pasarlos a una solución de KOH (Baker) al 1% durante 24 h aproximadamente, después se les agregaron de 2 a 3 gotas de solución saturada de rojo de alizarina (Merk) (24 h), para teñir el esqueleto y por último se colocaron en glicerina para quitarles el exceso de colorante, haciendo los cambios necesarios de glicerina hasta dejarlos aclarados para montarlos (Staples *et al.*, 1964). Una vez aclarados los fetos se analizaron en un estereoscopio para identificar alteraciones esqueléticas. Se contaron los puntos de osificación de las extremidades delanteras y traseras (metacarpales, falanges proximal y distal), en la columna, número de esternones, número de costillas (figura 8), los puntos de osificación se contaron según Taylor (1986) y las alteraciones encontradas se identificaron de acuerdo a Wise *et al.* (1997).

Las alteraciones esqueléticas únicamente fueron evaluadas en los fetos obtenidos a las 48 y 72 h después del tratamiento ya que a las 0 y 24 h aun no completan su crecimiento.



**Figura 8.- Esquema de los puntos de osificación en el desarrollo normal del ratón (Taylor 1986).**

## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de la inducción de MN y de la frecuencia de los EPC se presentan en media  $\pm$  desviación estándar y se compararon aplicando la prueba estadística de ji cuadrada. A los datos individuales se les aplicó un análisis exploratorio (empleando cajas con bigotes) y se calculó el NIF al cual se le aplicó la misma prueba estadística.

Los resultados de fetos vivos, muertos y las reabsorciones, se muestran como media  $\pm$  desviación estándar y se analizaron mediante la prueba de "t" de Student. La inducción de alteraciones tanto externas como internas se presentan en porcentajes y se analizaron con la prueba de Z para proporciones.

Para la realización de todas las pruebas estadísticas se empleó el paquete estadístico STATISTICA V6™ y el nivel de significancia usados en todos los análisis fue de  $P < 0.05$ .

## **VII. RESULTADOS**

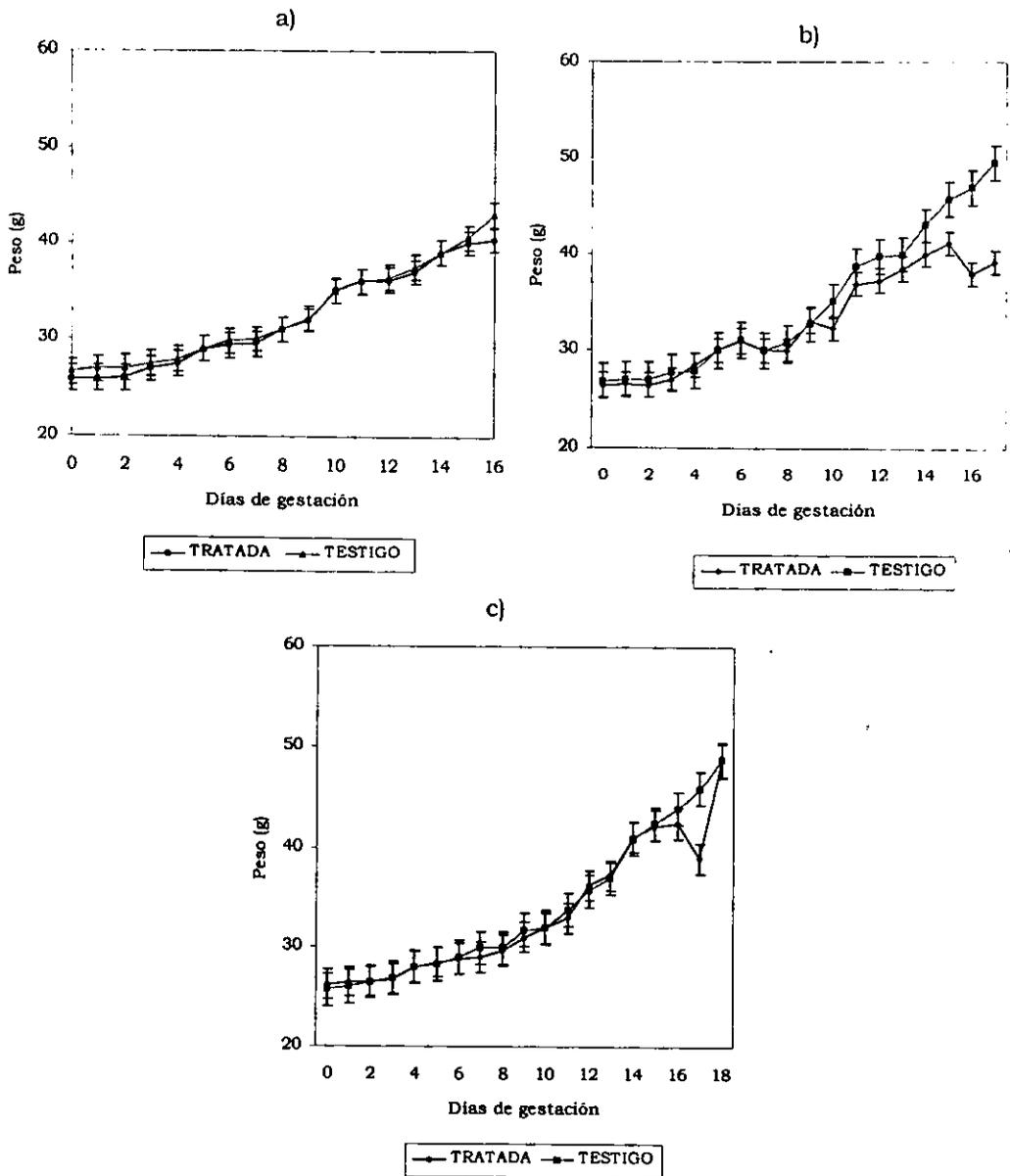
### **1. SEGUIMIENTO DEL PESO MATERNO**

En la figura 9 se muestra el comportamiento del incremento en el peso de las hembras preñadas tanto testigos como tratadas y sacrificadas en los días: a) 16, b) 17 y c) 18, en donde se observa que para todos los grupos tratados se disminuyó el peso después de la administración del  $\text{CrO}_3$  tratamiento, pero no resultó estadísticamente significativo, además de que las hembras recuperan el peso aproximadamente al tercer día.

### **2. COMPORTAMIENTO DEL DESARROLLO DE LAS CAMADAS**

Las evaluaciones se realizaron en los días 15, 16, 17 y 18 de gestación o bien 0, 24, 48 y 72 h postratamiento.

En el cuadro 6 se muestra el comportamiento en el desarrollo de las camadas, en donde se observa que el promedio de fetos vivos disminuyó en las hembras tratadas que fueron sacrificadas a las 48 h postratamiento (alrededor de 6 fetos), así mismo para este grupo se incrementó el número de reabsorciones (alrededor de 3), pero el número de estos efectos no resultó estadísticamente significativo.



**Figura 9.- Seguimiento del aumento de peso en las hembras preñadas tanto testigo como tratadas y sacrificadas en los días a)16, b)17 y c)18 de gestación.**

**Cuadro 6- Comportamiento de las camadas obtenidas a las 24, 48 y 72 h después del tratamiento con CrO<sub>3</sub>.**

HORAS POSTRATA- MIENTO	24		48		72	
	DOSIS DE CrO <sub>3</sub> (mg/kg)	0	20	0	20	0
No. DE HEMBRAS PREÑADAS	4	4	4	6	4	4
IMPLANTES/ HEMBRA ( $\bar{x} \pm de$ )	9.0 $\pm$ 1.8	10.0 $\pm$ 0.81	12.2 $\pm$ 2.1	9.8 $\pm$ 1.7	10.0 $\pm$ 3.5	11.0 $\pm$ 2.1
FETOS VIVOS ( $\bar{x} \pm de$ )	8.7 $\pm$ 2.2	9.5 $\pm$ 1.2	11.7 $\pm$ 2.8	5.5 $\pm$ 4.3	9.0 $\pm$ 3.5	10.5 $\pm$ 2.6
FETOS MUERTOS ( $\bar{x} \pm de$ )	0.0 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 1.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 1.6	0.2 $\pm$ 0.5	0.0 $\pm$ 0.0
REABSOR- CIONES ( $\bar{x} \pm de$ )	0.2 $\pm$ 0.5	0.0 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 1.0	3.5 $\pm$ 4.0	0.7 $\pm$ 1.5	0.5 $\pm$ 0.5

### 3. ALTERACIONES EXTERNAS

Al analizar los fetos obtenidos de las hembras sacrificadas a las 0, 24, 48 ó 72 h postratamiento (cuadro 7), únicamente se encontró alteraciones en el grupo de las 48 h, ya que se incrementó el porcentaje de fetos con párpados abiertos (de 12.9 a 75 %).

**Cuadro 7.- Alteraciones externas en los fetos obtenidos a las 0, 24, 48 y 72 h postratamiento con CrO<sub>3</sub>.**

HORAS POSTRATAMIENTO	24		48		72	
DOSIS DE CrO <sub>3</sub> (mg/kg)	0	20	0	20	0	20
No. CAMADAS ANALIZADAS	4	4	4	5	4	4
FETOS ANALIZADOS	18	23	31	16	20	26
FETOS ALTERADOS	0	0	0	0	0	0
ALTERACIONES EXTREMIDADES ANTERIORES	0	0	0	0	0	0
ALTERACIONES EXTREMIDADES POSTERIORES	0	0	0	0	0	0
PÁRPADOS ABIERTOS / FETOS (%)	0	4/23 (17.3)	4/31 (12.9)	12/16 (75) *	0	0
HEMATOMAS / FETOS (%)	8/18 (44.4)	7/23 (30.4)	6/31 (19.3)	2/16 (12.5)	0	0

\* vs. testigo h 48

#### 4. ALTERACIONES ESQUELÉTICAS

En el cuadro 8 se muestran las alteraciones esqueléticas en los fetos obtenidos a las 48 y 72 h después del tratamiento, en donde se observa lo siguiente: se incrementó el número de fetos con esternebras de doble apariencia, a sí como también los fetos con poca osificación de las esternebras (de 0 a 47%) para los grupos sacrificados a las 48 h postratamiento resultando estadísticamente significativo y aunque se

observó un ligero incremento en el número de fetos con costillas rudimentarias, para este mismo grupo, este no resultó estadísticamente significativo.

**Cuadro 8- Alteraciones esqueléticas en los fetos obtenidos a las 48 y 72 h después del tratamiento con CrO<sub>3</sub>.**

HORA	48		72	
	0	20	0	20
DOSIS DE CrO <sub>3</sub> (mg/kg)				
No. DE FETOS ANALIZADOS	30	17	21	25
No. DE COSTILLAS/FETO ( $\bar{x} \pm de$ )	13.0 $\pm$ 0.0	13.0 $\pm$ 0.0	12.9 $\pm$ 0.06	12.95 $\pm$ 0.10
FETOS CON COSTILLAS RUDIMENTARIAS (%)	1/30 (3.3)	2/17 (11.8)	1/21 (4.8)	3/25 (12.0)
FETOS CON COSTILLAS SUPERNUMERARIAS (%)	0/30 (0.0)	0/17 (0.0)	0/21 (0.0)	1/25 (4.0)
No. DE ESTERNEBRAS/FETO ( $\bar{x} \pm de$ )	5.9 $\pm$ 0.10	5.8 $\pm$ 0.14	6.0 $\pm$ 0.00	5.6 $\pm$ 0.62
FETOS CON ESTERNEBRAS DE DOBLE APARIENCIA (%)	15/30 (50.0)	15/17 * (88.2)	2/21 (9.5)	8/25 (32.0)
FETOS CON ESTERNEBRAS ASIMÉTRICAS (%)	0/30 (0.0)	1/17 (5.8)	0/21 (0.0)	1/25 (4.0)
FETOS CON ESTERNEBRAS POCO OSIFICADAS (%)	0/30 (0.0)	8/17 * (47.0)	0/21 (0.0)	1/25 (4.0)

\* vs. testigo h 48

En cuanto a los puntos de osificación de las extremidades delanteras y traseras para las 72 h postratamiento se observó una tendencia hacia la disminución de éstos pero únicamente resultaron estadísticamente significativos los de la falange proximal y distal (cuadro 9).

**Cuadro 9- Puntos de osificación en extremidades tanto delanteras como traseras en los fetos obtenidos a las 48 y 72 h después de administrar de CrO<sub>3</sub>.**

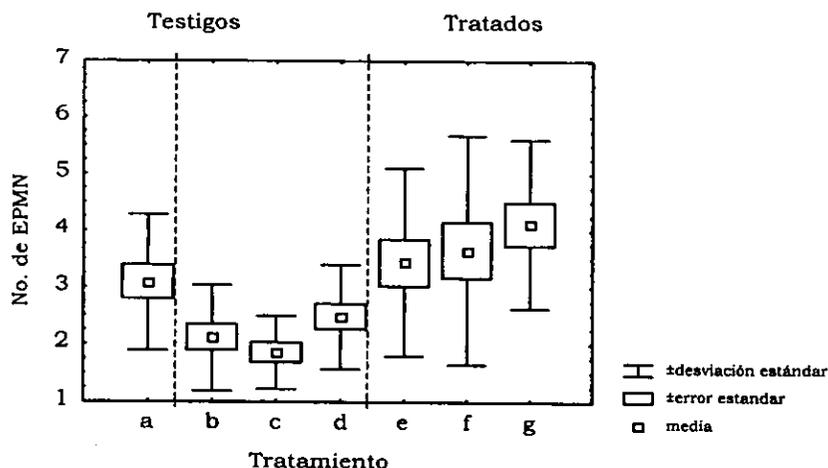
A) HORA 48	EXTREMIDADES DELANTERAS		EXTREMIDADES TRASERAS	
	DOSIS DE CrO <sub>3</sub> (mg/kg)	0	20	0
FETOS ANALIZADOS	30	17	30	17
METACARPALES/FETO ( $\bar{x} \pm de$ )	6.4 ± 0.7	6.9 ± 0.8	7.8 ± 0.3	7.7 ± 0.3
FALANGE PROXIMAL/FETO ( $\bar{x} \pm de$ )	0.9 ± 1.8	0.8 ± 1.1	0.6 ± 0.0	0.0 ± 0.0
FALANGE DISTAL/FETO ( $\bar{x} \pm de$ )	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
<b>B) HORA 72</b>				
DOSIS DE CrO <sub>3</sub> (mg/kg)	0	20	0	20
FETOS ANALIZADOS	21	25	21	25
METACARPALES/FETO ( $\bar{x} \pm de$ )	8.0 ± 0.0	6.9 ± 2.1	9.8 ± 0.3	7.0 ± 2.2
FALANGE PROXIMAL/FETO ( $\bar{x} \pm de$ )	7.9 ± 0.1	4.7 ± 3.3	8.0 ± 0	3.4 ± 2.9 *
FALANGE DISTAL/FETO ( $\bar{x} \pm de$ )	6.8 ± 4.7	4.5 ± 3.1	10.0 ± 0.0	4.8 ± 3.5 *

\* vs. testigo h 0

## 5. INDUCCIÓN DE ERITROCITOS POLICROMÁTICOS MICRONUCLEADOS EN LOS FETOS

En la figura 10 se muestra el comportamiento de los datos individuales, a los cuales se les aplicó un análisis exploratorio de cajas con bigotes, en donde el tamaño de la caja nos indica el error estándar, el punto al centro la media y "el bigote" la desviación estándar en donde se

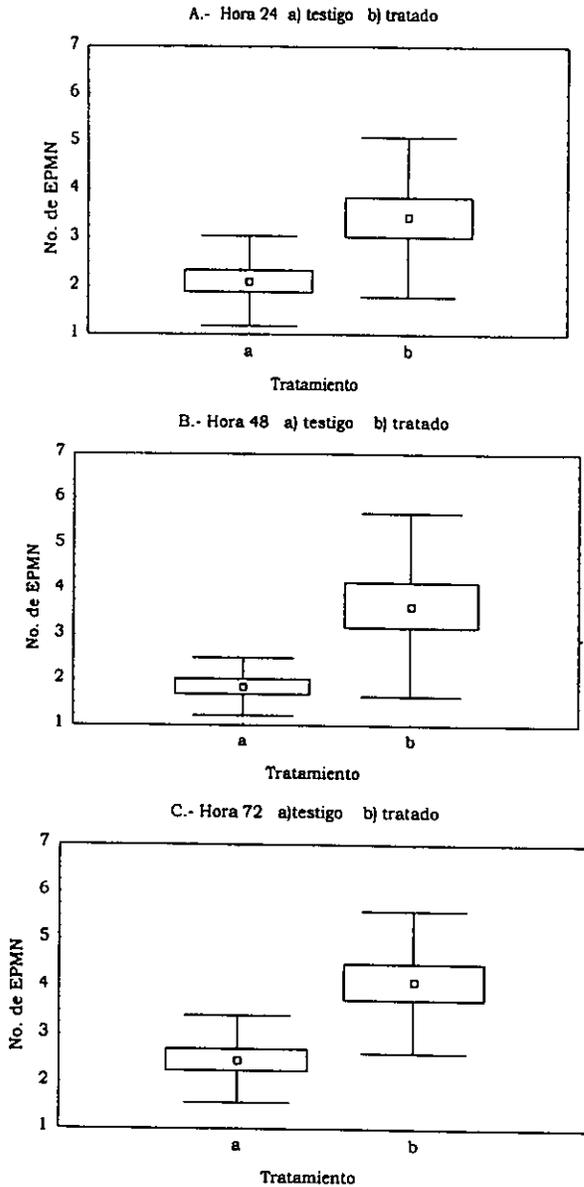
observa la variabilidad de la inducción de EPMN de los grupos tanto testigos como tratados. Se observa que los grupos se desplazan, lo cual indica que se trata de dos poblaciones distintas. El rango de inducción de los grupos testigos se encuentra entre 1 y 4 EPMN mientras que para el grupo tratado el rango se encuentra de 1 a 8 EPMN por lo tanto podemos decir que el tratamiento presenta efecto ya que se incrementó la inducción de EPMN.



Testigos: a) 0 h testigo absoluto, b) 24 h, c) 48 h, d) 72 h postratamiento  
 Tratados e) 24 h, f) 48 h, g) 72 h postratamiento

**Figura 10.- Cajas con bigotes de la inducción de EPMN en sangre periférica fetal de los grupos testigos y tratados.**

En la figura 11 se muestra el análisis de cajas con bigotes de la inducción de EPMN en S.P. fetal analizados por h; en donde se observa que para todos los grupos tratados hay un desplazamiento de las cajas hacia arriba siendo mayor a las 48 h, lo cual nos indica que posiblemente a este tiempo se da la mayor inducción de EPMN.



**Figura 11.- Inducción de EPMN en sangre periférica fetal A) 24, B) 48 y C) 72 h postratamiento comparados por hora.**

En el cuadro 10 se muestran en  $\bar{x} \pm de$  la inducción de EPMN por grupo y por hora para los fetos obtenidos a las 0, 24, 48 ó 72 h postratamiento, en donde se puede observar que la administración del  $CrO_3$  incrementó el número de EPMN a partir de las 24 h, presentándose la mayor inducción a las 72 h postratamiento.

**Cuadro 10- Promedio de la de inducción de EPMN en sangre periférica fetal a las 0, 24, 48 y 72 h después del tratamiento con  $CrO_3$ .**

<b>Dosis de <math>CrO_3</math> (mg/kg)</b>	<b>No. de fetos</b>	<b>Hora postratamiento</b>	<b>EPMN/1000 células. (<math>\bar{x} \pm de</math>)</b>
<b>0</b>	16	0	2.96 $\pm$ 0.42
	16	24	2.10 $\pm$ 0.29
	16	48	1.85 $\pm$ 0.54
	16	72	2.48 $\pm$ 0.91
<b>20</b>	16	0	2.96 $\pm$ 0.42
	16	24	3.44 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>
	16	48	3.65 $\pm$ 1.80 <sup>bc</sup>
	16	72	4.11 $\pm$ 0.94 <sup>cd</sup>

a vs. testigo h 24

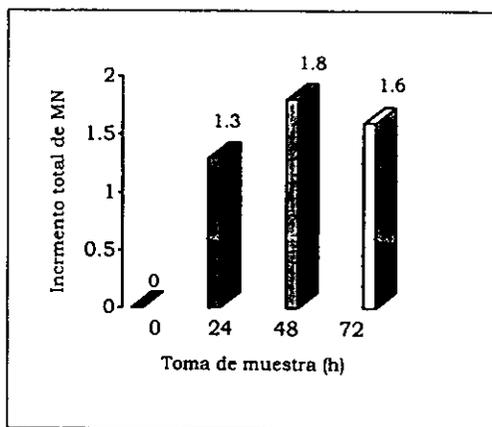
b vs. testigo h 48

c vs. testigo h 0

d vs. testigo h 72

En la figura 12 se muestra el NIF de EPMN de los fetos obtenidos a las 0, 24, 48 ó 72 h postratamiento, en donde se puede observar que la inducción neta de MN se presenta a las 48 h después del tratamiento (de

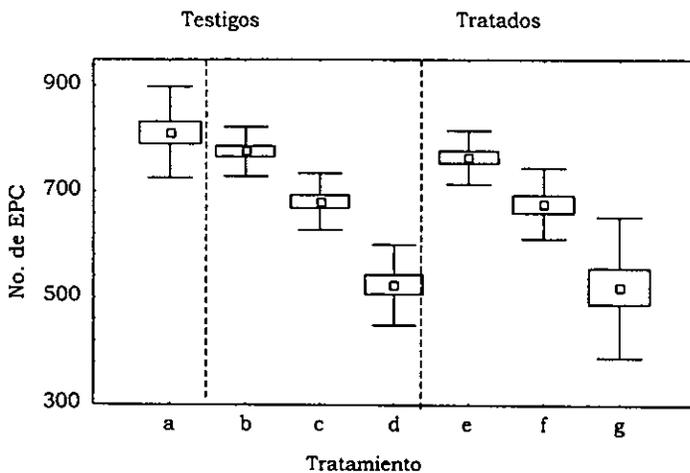
1.5 a 2 MN), a diferencia del cuadro 10 en donde se observó la mayor inducción a las 72 h.



**Figura 12 Incremento de EPMN en fetos tanto testigos como tratados a las 0, 24, 48 y 72 h posteriores al tratamiento con  $\text{CrO}_3$ .**

## **6. FRECUENCIA DE ERITROCITOS POLICROMÁTICOS EN LOS FETOS**

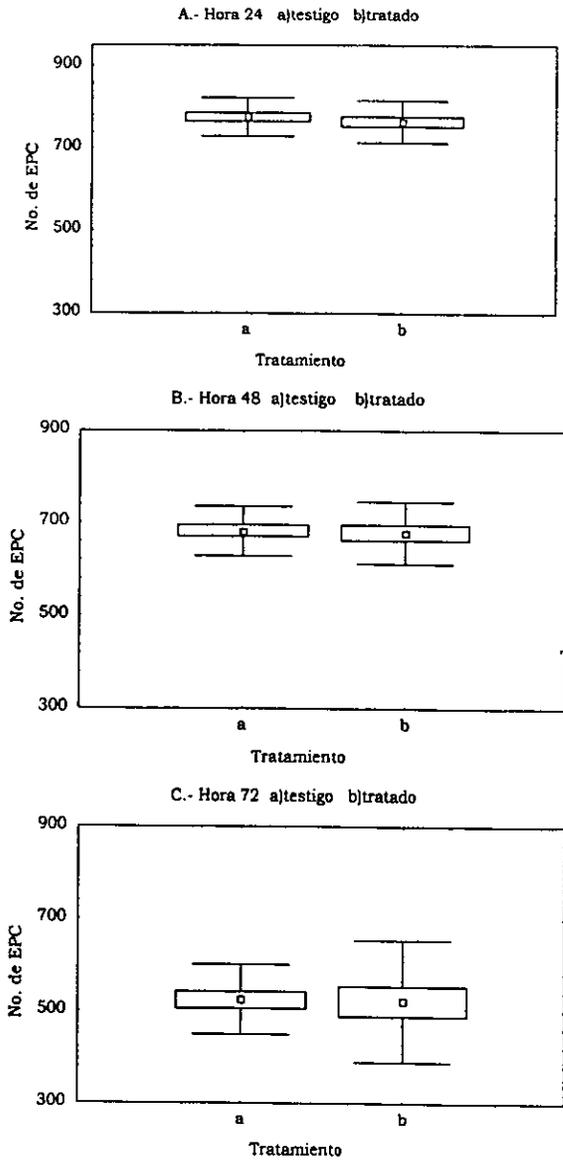
En la figura 13 se muestra el comportamiento de los datos individuales de las frecuencias de EPC, a los cuales se les realizó un análisis exploratorio de cajas con bigotes, en donde se puede observar que las cajas tienden a disminuir en todos los grupos conforme transcurre el día de gestación, lo cual nos indica que no hubo efecto por el tratamiento.



Testigos: a) 0 h testigo absoluto, b) 24 h, c) 48 h, d) 72 h postratamiento  
 Tratados e) 24 h, f) 48 h, g) 72 h postratamiento

**Figura 13.-Frecuencia de EPC de sangre periférica fetal de los grupos testigos y tratados.**

En la figura 14 se muestra el análisis de cajas con bigotes de la frecuencia del EPC en S.P. fetal, en donde se puede observar que al compararse los grupos por hora no existe desplazamiento de las cajas y los grupos tratados se comportan de manera similar a los testigos por lo que podemos decir que el tratamiento con cromo no presentó efecto sobre este parámetro.



**Figura 14.- Análisis exploratorio de cajas con bigotes de la frecuencia de EPC en sangre periférica fetal analizadas por hora en los diferentes días de sacrificio.**

En el cuadro 11 se muestran los promedios de la frecuencia de EPC en S.P. fetal analizados por grupo y por hora. En donde se observa que el EPC disminuye conforme transcurre el tiempo de gestación y no tanto por el efecto del tratamiento, ya que a las 72 h disminuye alrededor de 300 células con respecto a la h 0 tanto para el grupo tratado como para el testigo, a pesar de ser estadísticamente significativo.

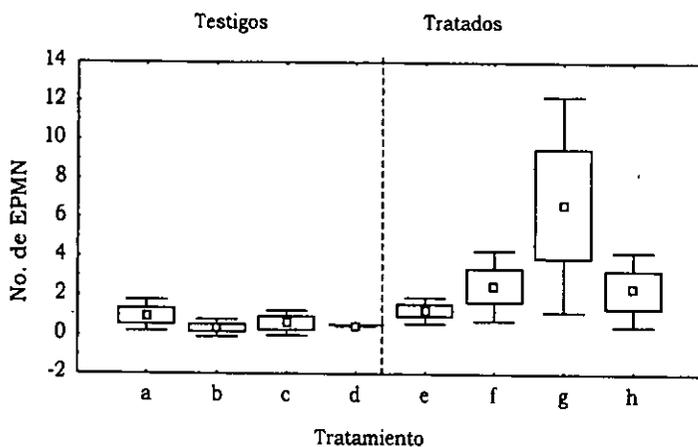
**Cuadro 11- Promedio de la frecuencia de EPC en sangre periférica fetal de los grupos testigos y tratados.**

<b>Dosis de CrO<sub>3</sub> (mg/kg)</b>	<b>No. Fetos</b>	<b>Hora</b>	<b>EPC/1000 células (<math>\bar{x} \pm de</math>)</b>
<b>0</b>	16	0	812.28 $\pm$ 73.90
	16	24	775.07 $\pm$ 36.47 <sup>a</sup>
	16	48	681.77 $\pm$ 35.32 <sup>a</sup>
	16	72	524.18 $\pm$ 75.48 <sup>a</sup>
<b>20</b>	16	0	812.28 $\pm$ 73.90
	16	24	765.53 $\pm$ 22.53 <sup>ab</sup>
	16	48	678.26 $\pm$ 52.11 <sup>ac</sup>
	16	72	521.31 $\pm$ 138.67 <sup>ad</sup>

a vs. testigo h 0  
b vs. testigo h 24  
c vs. testigo h 48  
d vs. testigo h 72

## 7. INDUCCIÓN DE ERITROCITOS POLICROMÁTICOS MICRONUCLEADOS EN LAS MADRES

En la figura 15 se muestra el comportamiento de los datos individuales, a los cuales se les aplicó un análisis exploratorio de cajas con bigotes, en donde se observa la variabilidad de la inducción de los EPMN en la S.P. materna. Se observa que para los grupos tratados el número de EPMN tiende a aumentar a partir de las 24 h, siendo mayor a las 48 h y posteriormente disminuye, en comparación con el grupo testigo, esto nos indica que se trata de dos poblaciones diferentes.



Testigos: a) 0 h, b) 24 h, c) 48 h, d) 72 h postratamiento  
Tratados: e) 0 h, f) 24 h, g) 48 h, h) 72 h postratamiento

**Figura 15.- Cajas con bigotes de la inducción de EPMN en sangre periférica materna de los grupos testigos y tratados.**

En el cuadro 12 se muestra la  $\bar{x}$  de la inducción de EPMN en S.P. materna tanto de los grupos testigos como tratados en donde se observa que la inducción de EPMN se presenta a partir de las 24 h siendo que la

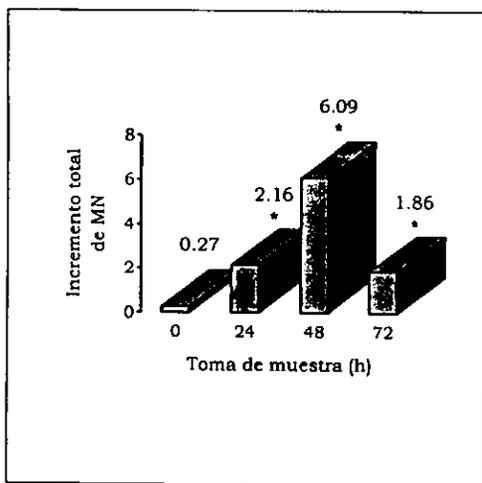
mayor inducción se presentó a las 48 h postratamiento, lo cual nos indica que a esta hora el CrO<sub>3</sub> posiblemente causa mayor daño en S.P. materna.

**Cuadro 12. Promedio de la inducción de EPMN en sangre periférica materna tanto de los grupos testigos como tratados.**

<b>Dosis de CrO<sub>3</sub> (mg/kg)</b>	<b>N</b>	<b>Hora postratamiento</b>	<b>EPMN/1000 células (<math>\bar{x} \pm de</math>)</b>
<b>0</b>	4	0	0.98 ± 0.79
	4	24	0.36 ± 0.45
	4	48	0.61 ± 0.63
	4	72	0.48 ± 0.03
<b>20</b>	4	0	1.25 ± 0.64
	4	24	2.52 ± 1.78 <sup>ab</sup>
	4	48	6.70 ± 5.52 <sup>ac</sup>
	4	72	2.34 ± 1.8 <sup>ad</sup>

a vs. testigo h 0  
b vs. testigo h 24  
c vs. testigo h 48  
d vs. testigo h 72

En la figura 16 se muestra que al calcular el NIF para los EPMN en S.P. materna se encontró que la inducción de EPMN comienza a incrementarse a partir de las 24 h siendo mayor a las 48 h postratamiento y posteriormente disminuye. Esto nos indica que posiblemente a la hora 48 el compuesto tiene un mayor efecto.

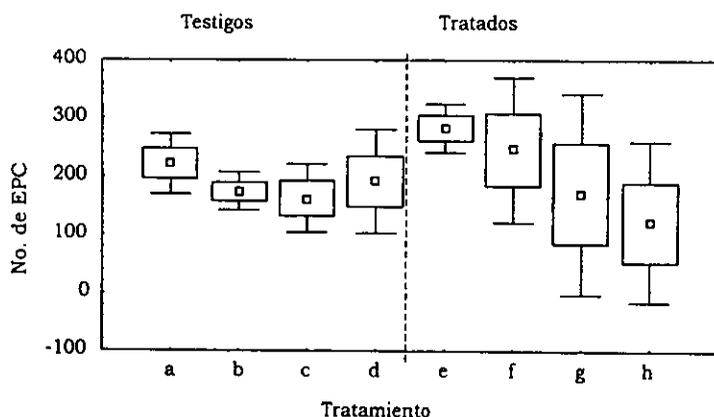


\* vs. testigo h 0

**Figura 16.- Incremento de EPMN en sangre periférica materna tratadas con 20 mg/kg de CrO<sub>3</sub>.**

## 8. FRECUENCIA DE ERITROCITOS POLICROMÁTICOS EN LAS MADRES

En la figura 17 se muestra el análisis de cajas con bigotes de los EPC en la S.P. de las hembras preñadas y sacrificadas a las 72 h, en donde se observa que las cajas de los grupos tratados (24, 48 y 72) se desplazan hacia abajo al compararlos con sus grupos testigo. Esto nos indica que probablemente el compuesto este inhibiendo estas células.



Testigos: a) 0 h, b) 24 h, c) 48 h, d) 72 h postratamiento  
 Tratados: e) 0 h, f) 24 h, g) 48 h, h) 72 h postratamiento

**Figura 17.- Cajas con bigotes de la frecuencia de EPC en sangre periférica materna.**

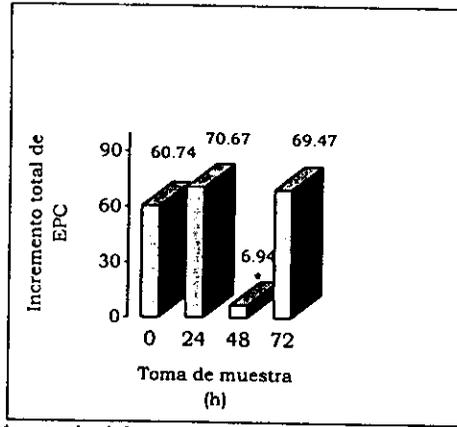
En el cuadro 13 se muestra en  $\bar{x} \pm de$  la frecuencia de EPC en la S.P. materna de los grupos testigos y tratados, en donde se observa que el número de EPC va disminuyendo conforme transcurre la toma de muestra al compararse con la hora 0, resultando estadísticamente significativo. Esto es evidencia de que probablemente el compuesto está inhibiendo la proliferación de estas células.

**Cuadro 13.- Promedio de la frecuencia de EPC en hembras preñadas tanto testigos como tratadas con 20 mg/kg de CrO<sub>3</sub>.**

<b>DOSIS DE CrO<sub>3</sub> (mg/kg)</b>	<b>N</b>	<b>Hora postratamiento</b>	<b>EPC/1000 células (<math>\bar{x} \pm de</math>)</b>
<b>0</b>	4	0	221.42 ± 51.16
	4	24	175.04 ± 32.33 <sup>a</sup>
	4	48	162.64 ± 58.34 <sup>a</sup>
	4	72	191.66 ± 88.35 <sup>a</sup>
<b>20</b>	4	0	282.16 ± 41.86
	4	24	245.71 ± 124.08 <sup>bc</sup>
	4	48	169.58 ± 171.73 <sup>bd</sup>
	4	72	122.19 ± 136.96 <sup>bc</sup>

a vs. testigo h 0  
b vs. tratado h 0  
c vs. testigo h 24  
d vs. testigo h 48  
e vs. testigo h 72

En la figura 18 se muestra que realizar el NIF de los EPC en la S.P. materna se observa que a las 48 h el compuesto administrado tuvo un efecto significativo ya que la frecuencia de EPC disminuyó en comparación con las demás h.



\* vs. testigo h 0

**Figura 18.- Incremento total de la frecuencia de EPC en sangre periférica materna del día 18 de gestación.**

## VIII. DISCUSIÓN

Al analizar los resultados se observó que en el ratón, la administración de 20 mg/kg de peso corporal de  $\text{CrO}_3$  en el día 15 de gestación induce daño genotóxico tanto en las madres como en sus crías; ya que el número de EPMN se incrementó significativamente a partir de las 24 h alcanzándose la máxima inducción a las 48 h.

El hecho que la administración de  $\text{CrO}_3$  haya incrementado la frecuencia basal de EPMN indica que este compuesto es capaz de inducir daño cromosómico tanto en la hembra gestante como en sus crías. Se ha propuesto que el Cr (VI) tiene la particularidad de atravesar fácilmente la membrana de los eritrocitos y es dentro de éstos donde se reduce a Cr (III), y posiblemente durante la reducción se induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales causan daño oxidativo al ADN lo que se traduce en daño genotóxico (Fernandes, *et al.* 1999 y 2000; Ueno *et al.*, 2000). Algunos estudios han mostrado que los productos de la reducción del Cr (VI), reaccionan con el peróxido de hidrógeno para generar radicales hidroxil y éstos actúan como iniciadores de los eventos primarios de la citotoxicidad del Cr (VI). Además estos radicales causan daño al ADN y producen peroxidación lipídica y efectos cancerígenos (Bagchi *et al.*, 1997).

Shi y Dalal (1992) representan por medio del ciclo de Haber-Weiss el mecanismo por el cual los compuestos de cromo (VI) son genotóxicos, ellos proponen que el  $\text{O}^{2-}$  puede reducir al Cr (VI) y generar Cr (V) el cual puede reaccionar con  $\text{H}_2\text{O}_2$  para producir  $\cdot\text{OH}$  y generar nuevamente el Cr (VI), lo que indica que es el radical  $\cdot\text{OH}$  el que juega un papel importante en la genotoxicidad de los compuestos de Cr (VI). Se ha mostrado que en la reducción del Cr(VI) a (V), Cr(V) a (IV) y Cr(III) a (II), se donan electrones, los cuales generan ROS dando como resultado daño al ADN, como ya ha sido mencionado (Ueno *et al.*, 2000).

Probablemente el daño genotóxico causado por el  $\text{CrO}_3$  tanto en la madre como en el feto sea el resultado del daño oxidativo generado por el proceso de reducción del Cr (VI). Así mismo se ha descrito que los compuestos del Cr pueden retrasar el ciclo celular de los eritroblastos maduros (Venitt y Parry, 1984), por lo que es posible que dicho efecto haya contribuido al incremento en el número de EPMN observado.

En nuestro estudio se observó que la inducción EPMN en madres es menor comparada con la de animales adultos no preñadas tratadas con la misma concentración de  $\text{CrO}_3$  (en los cuales se incrementan hasta 15 MN por 1000 EPC), lo que muestra que la disminución en el número de MN esta relacionada con la condición de preñez, probablemente este vinculado con los cambios en la homeostasis de las hembras preñadas, como son hormonales, la reserva de nutrientes, metabolismo, etc. (Kaufman *et al.*, 1999).

Otra posibilidad es estar la hembra preñada parte del agente pueda estar pasando a los fetos (daño trasplacentario), lo que traería como consecuencia una disminución de la concentración del compuesto en la sangre de la madre. Esto ya ha sido descrito por Ferm *et al.*, 1969; Danielsson *et al.*, 1982 y Trivedi *et al.*, 1989 los cuales observaron que algunos compuestos del cromo son capaces de atravesar la barrera placentaria.

Por otra parte al administrar un compuesto a las hembras preñadas éste es distribuido tanto en la madre como en el feto lo que hace que la concentración que llega al feto sea menor, aunque también se debe de considerar el tamaño del feto. Al respecto Danielsson *et al.*, (1982) evaluaron en hembras preñadas la concentración de compuestos de cromo que pasa hacia los fetos y encontraron que es muy baja (aproximadamente el 5 %) en relación a la administrada. Sin embargo en la sangre periférica

materna de los grupos tratados había hasta siete veces más de Cr (VI) que en los grupos controles (Trivedi *et al.*, 1989).

El tiempo en el cual se observó la mayor inducción de EPMN fue a las 48 h después de la administración del CrO<sub>3</sub>, esto concuerda con estudios previos en los que se empleó el mismo compuesto y dosis en hembras sin preñar (García-Rodríguez *et al.*, 1998; 2000; 2001), lo cual hace suponer que la gestación no modifica los tiempos de inducción de daño en los individuos adultos.

En cuanto a la frecuencia de EPC se observó que el CrO<sub>3</sub> altera en la madre pero no en sus crías, ya que al comparar los grupos tratados con el testigo sólo se encontró una disminución en las hembras gestantes, sin embargo al comparar las frecuencias de EPC de los fetos entre horas de los mismos grupos, se disminuye la frecuencia con respecto al día de gestación, lo que indica que este efecto se debe al desarrollo fetal y no al tratamiento.

La evaluación de la frecuencia de EPC en sangre periférica nos indica daño citotóxico (Venitt y Parry, 1984), sin embargo en diferentes estudios ha sido imposible concluir respecto a este parámetro debido a la variabilidad natural que presenta; ya que un compuesto puede inducir muerte celular por lo que sí disminuye la frecuencia de EPC; a su vez esta señal puede desencadenar proliferación acelerada de eritrocitos para compensar dicha muerte (Venitt y Parry, 1984; Krishna *et al.*, 2000).

En cuanto al efecto citotóxico de CrO<sub>3</sub> en tejido fetal, se observó que pese a que existió una gran variabilidad individual en la evaluación de la frecuencia de EPC, los resultados son consistentes y reproducibles, encontrándose que la disminución se debió a la etapa del desarrollo fetal (etapa de crecimiento) y no al tratamiento en sí, ya que durante el desarrollo embrio-fetal la división celular disminuye conforme se aumenta la edad (Cole *et al.*, 1983). El hecho que la frecuencia de EPC haya

disminuido tanto en los grupos testigo como en los tratados apoya esta interpretación.

Al comparar la frecuencia de EPC de las hembras preñadas con los evaluados por otros autores y por nosotros mismos en otros estudios, encontramos que la frecuencia de EPC de las hembras preñadas es mayor (aproximadamente 400 células) en comparación con la de las hembras sin preñar (García-Rodríguez *et al.*, 1998; 2000; 2001). En cuanto a la frecuencia de EPC en los fetos no hay trabajos previos.

Al analizar los fetos obtenidos de las hembras tratadas con el  $\text{CrO}_3$  se encontró un efecto sobre la velocidad del desarrollo, observado como párpados abiertos y falta de osificación en esternones (doble apariencia y disminución en los puntos de osificación) y extremidades (disminución de los puntos de osificación). Sin embargo el tipo y la frecuencia de las alteraciones nos hacen suponer que estas se deben a un efecto fetotóxico y no teratogénico, ya que se encontraron alteraciones a nivel de retraso en el desarrollo (párpados abiertos, falta de osificación en esternones y extremidades).

Existen algunos trabajos enfocados a explicar algunas alteraciones en el desarrollo embrionario y fetal como consecuencia de la toxicidad materna. Chahoud, *et al.* (1999) observaron algunos signos de toxicidad materna como son: disminución del peso corporal y del apetito, toxicidad en algunos órganos como el pulmón, el hígado, lo cual puede conducir a la muerte. Sin embargo también la inducción de alteraciones puede ser debida a toxicidad en el desarrollo embrionario como por ejemplo retardo en el crecimiento, inducción de alteraciones y malformaciones, además de embrioletalidad intrauterina (reabsorciones, aborto y muerte) (Kalter, 1983). En nuestro estudio no se observaron signos aparentes de toxicidad materna; salvo la disminución del peso corporal después de ser administrado el  $\text{CrO}_3$ , que no llegó a valores estadísticamente significativos

y como lo muestran nuestros resultados las hembras recuperaron su peso a los tres días después del tratamiento (observado en las hembras sacrificadas en el día 18 de gestación).

En nuestros resultados se observó una baja inducción de reabsorciones (3 reabsorciones a las 48 h) en comparación con otros estudios (de 7-9 reabsorciones) en los que se han probado compuestos de Cr (VI) en rata, ratón y hámster (Gale, 1974; 1978; Gale y Bunch 1979; Trivedi, *et al.*, 1989) pero esto es posiblemente debido al día de tratamiento, ya que la frecuencia de reabsorciones es más alta cuando el tratamiento se realiza en etapas tempranas de gestación y la frecuencia de éstas disminuyen cuando el tratamiento se realiza en etapas más avanzadas (Ferm, 1971), como lo es nuestro caso (día 15 de gestación).

Danielsson *et al.*, (1982) estudiaron los periodos de desarrollo prenatal del ratón y observaron que el organogénico comprende del día 8 al 11 de gestación; la gestación media entre los días 12 y 15 (maduración) y la gestación tardía del día 16 al 18 (crecimiento), siendo la más susceptible la etapa organogénica. En nuestro estudio la administración del  $\text{CrO}_3$  se realizó en la etapa de fetogénesis en donde los fetos están principalmente en crecimiento y no se esperaba una alta incidencia de malformaciones como lo muestran nuestros resultados.

Es interesante hacer notar que al administrar compuestos ya sea de Cr (III) ó de Cr (VI) a hembras preñadas, la concentración de éstos se incrementa en los fetos conforme transcurre la edad gestacional, éste fenómeno ha sido observado con varias sustancias y pueden ser debido a factores tales como el aumento en la permeabilidad placental, aumento en la unión del metal con el tejido fetal y/o por el desarrollo en el feto y para el caso particular de los compuestos del Cr también interviene en la unión con el hueso calcificado fetal, a partir del día 14 de gestación (Danielsson *et al.*, 1982).

En nuestro estudio pese a que la administración del  $\text{CrO}_3$  fue en el día 15 de gestación y se observó una disminución en la velocidad del desarrollo, no se observaron malformaciones. El tipo y frecuencia de las alteraciones que observamos están relacionadas con fetotoxicidad, además de que se ha observado que cuando se presentan éste tipo de alteraciones los fetos pueden recuperarse después del nacimiento bajo condiciones normales (Chahoud *et al.*, 1999). De igual manera a éste tipo de alteraciones además de asociárseles con daño teratogénico directo también se les ha asociado con un efecto secundario de la toxicidad materna, siempre y cuando existan pocas malformaciones y baja frecuencia (Khera 1984; Hood 1989).

El tipo de alteraciones esqueléticas que la administración del  $\text{CrO}_3$  indujo en los fetos fueron falta de osificación en esternesbras (doble apariencia y disminución en los puntos de osificación) y extremidades (disminución de los puntos de osificación). A las alteraciones esqueléticas se les ha descrito como un indicador de daño en el desarrollo embrionario y fetal tanto en ratas como en ratón, aunque los fetos no presenten malformaciones macroscópicas (Khera 1991).

Sin embargo Pálmer (1979) considera algunas alteraciones en la osificación, como anomalías esqueléticas menores entre las que se encuentra la presencia de costillas supernumerarias y la osificación de las esternesbras no son indicador de daño teratogénico, ya que no representan una malformación específica, esto es porque existe una fase transitoria de poca maduración esquelética durante el desarrollo y este efecto rápidamente desaparece con el crecimiento del ratón (Ronald 1989; Foulon *et al.*, 1999). En cuanto a las esternesbras se ha observado que el desarrollo incompleto resulta en asimetría de las mismas por lo que muchas alteraciones pueden ser atribuidas a un retardo de la velocidad de formación de los huesos. Se ha descrito que las esternesbras comienzan a

formarse en el ratón entre el día 13 y 14 de gestación y concluye entre el día 17 y 18 (Palmer, 1979). Con lo anterior podríamos pensar la frecuencia de costillas rudimentarias y la asimetría en esternebros que observamos en nuestros resultados, no se deben a un daño teratogénico, sino a la falta de desarrollo en los fetos, tal vez relacionado con toxicidad.

En la actualidad los estudios realizados con compuestos de Cr administrados durante la gestación, no han dado resultados concluyentes, y los estudios para evaluar daño genotóxico fetal prácticamente están iniciando, así como los de daño genotóxico materno, por lo que nuestros resultados contribuyen al estudio del entendimiento de los mecanismos y efectos de los compuestos del cromo en las hembras preñadas y sus crías, pese a que este tipo de estudios no es fácil abordarlos debido a la complejidad de los mismos ya que factores tales como la ruta de administración, la dosis y el tiempo de tratamiento modifican los resultados y de alguna manera implican realizar el tamizaje haciendo múltiples combinaciones con las diferentes variables (Scialli 1992).

Así entonces nuestros resultados indican que el  $\text{CrO}_3$  es un agente genotóxico tanto para las hembras preñadas como para sus crías y que induce algunas alteraciones en el desarrollo fetal tal vez relacionadas con fetotoxicidad.

## IX. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, podemos concluir que:

1.- En ratones hembras preñadas la administración de una sólo dosis de 20 mg/kg de  $\text{CrO}_3$ , en el día 15 de gestación induce daño genotóxico, ya que se incrementa la frecuencia de EPMN en sangre periférica a partir de las 24 y hasta las 72h posteriores al tratamiento.

2.- La máxima inducción de EPMN en sangre periférica materna se presentó a las 48 h posteriores al tratamiento.

3.- La administración de 20 mg/kg de  $\text{CrO}_3$  a hembras preñadas también induce daño genotóxico en los fetos, ya que se incrementó la frecuencia de EPMN en sangre periférica fetal a partir de las 24 y hasta las 72 h posteriores al tratamiento.

4.- La administración de  $\text{CrO}_3$  induce daño citotóxico en sangre periférica materna, ya que altera la frecuencia de EPC, a partir de las 24 y hasta las 72 h posteriores al tratamiento.

5.- La administración de  $\text{CrO}_3$  no induce daño citotóxico en sangre periférica fetal, ya que la frecuencia de EPC tanto del grupo testigo como del grupo tratado presenta un comportamiento similar.

6.- La disminución de la frecuencia de EPC observada entre horas de los mismos grupos es debida al desarrollo fetal y no al tratamiento.

7.- La administración de 20 mg/kg de  $\text{CrO}_3$  a las hembras preñadas en el día 15 de gestación causa alteraciones en relacionadas con la velocidad del desarrollo fetal como lo son; párpados abiertos y falta de osificación en esternones (doble apariencia y disminución en los puntos de osificación) y extremidades (disminución de los puntos de osificación).

## **X. COMENTARIOS FINALES**

1.- Dado el tipo y la frecuencia de las alteraciones observadas se puede decir que estas posiblemente son debidas a daño fetotóxico y no teratógeno.

2.- La variabilidad que se presentó en los resultados tanto para la evaluación de la inducción de EPMN como de la frecuencia de EPC, pudiera ser disminuida aumentando el número de células evaluadas, tal vez empleando un citómetro de flujo.

## XI. REFERENCIAS

**Albert**, L. A (1988) Curso básico de toxicología ambiental; 2ª ed., Ed. Limusa, México D.F, 311.

**Aliverti V.**, Bonanomi L., Giavini E., Leone V. y Mariani (1979) The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat; *Teratology* 20, 237-242.

**Bagchi**, D., Vuchetich, P.J, Bagchi, M., Hassoun E., Tran M. N., Tang L. y Stohs (1997) Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichomate (Chromium VI) and Cadmium Chloride (Cadmium II) to rats; *Free Radical Biology & Medicine*; 22 (3) 471-478.

**Bianchi**, V., Dal T. R., Debetto, P., Gino, L. A., Luciani, S., Majone F. y Tamino G. (1980) Mechanism of Chromium Toxicity in mamalian cell cultures; *Toxicology* 17, 219-224.

**Brooks**, A. L., Schimizu, R. W., Bemson, y Dautcher, J. S. (1984) The induction of sister chromatid exchanges by Environmental Pollutants: Relationship of SCE to other Measures of genetic damage, en: *Sister Chromatid Exchange*. (eds) Tice R. y Hollaender A., Plenum Publishing Corpotion, 150.

**Carson**, B. L., Ellis III y McCann, J. L. (1987) Toxicology and biological monitoring of metals in humans. Lewis Publishers, INC. p.p 68-74.

**Casarett**, P. A (1968) Radiation Biology, Atomic Energy Commision; Prentice-Hall, Inc. EUA, p.p.368.

**Cervantes**, C. y Moreno, S. R., (1999) Contaminación Ambiental por metales pesados; ed. AGT Editor ; México; p.p. 157.

**Chahoud**, I., Ligensa A., Dietzel, L. y Faqi, S. (1999) Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects; *Reproductive Toxicology* 13, 375-381.

**Clarkson**, W. T., Friberg, L., Nordberg, F. G. y Sager R. P. (1988) Biological Monitoring of Toxic Metals. Ed Plenum Press., New York. p.p. 369-382.

**Cole, R. J., Taylor, N., Cole, J. y Arlett, C. F (1979)** Transplacental effects of chemical mutagens detected by the micronucleus test. *Nature* 277.

**Cole, R. J., Taylor, N., Cole, J. y Arlett, C. F. (1981)** Short-term tests for transplacentally active carcinogens. *Mutation Res.* 80:141-157.

**Cole, R. J., Cole, J., Henderson, L., Taylor, N. A., Arlett, C. F. y Regan, T. (1983);** Short-term tests for transplacentally active carcinogens: A comparison of sister-chromatid exchange and the micronucleus test in mouse foetal liver erythroblasts; *Mutation Research* 113, 61-75.

**Danielsson, B., R., Hassoun, E y Dencker, L. (1982)** Embryotoxicity of Chromium: Distribution in pregnant mice and effects on embryonic cell *in vitro.*, *Arch Toxicol* 51, 233-245.

**Dawson A. B., (1926)** a note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. Citado en *caffeine and reduction of ossification in the rat: fact or artifact?*. *Mother, T. F (1988)* *Teratology* 37, 239-247.

**De Flora, S., Camoirano, A., Serra, D. y Bennicelli, C. (1989)** Genotoxicity and Metabolism of Chromium compounds; *Toxicological and Environmental Chemistry* 19, 153-160.

**De Flora, S., Bagnasco, M., Serra, D. y Zanicchi, P. (1990)** Genotoxicity of chromium compounds. A review; *Mutation Research* 238 99-172.

**De Serres, F. (1983)** *Chemical Mutagens principles and Methods for their Detection*; Ed. Plenum Press; New York; 8, 386.

**Ferm, V.H., Hanlon P. y Urban J. (1969)** The permeability of the hamster placenta to radioactive cadmium; *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 22, 107-113.

**Ferm, V. H. (1971)** Developmental malformations induced by cadmium. A study of time injections during embryogenesis; *Biol. Neonate*, 19, 101-107.

**Fernandes, M., Mota, M. I., Silva, L. M., Oliveira, R. C., Geraldés, G. C. y Alpoim, C. M. (1999)** Human Erythrocytes are Protected against Chromate-Induced Peroxidation; *Ecotoxicology and Environmental Safety* 43, 38-46.

**Fernandes, M., Geraldés, C., Oliveira, C. y Alpoim, M., (2000)** Chromate-induced human erythrocytes haemoglobin oxidation and peroxidation: influence of vitamin E, vitamin C, salicylate, deferoxamine and N-ethylmaleimide. *Toxicology Letters* 114, 237-243.

**Foulkes, E. C (1990)** Biological effects of heavy metals. CRC Press Vol. II, 36-44.

**Foulon, O., Girard, H., Pallen, C., Urtizberea, M., Repetto, L. y Blacker, A. (1999)** Induction of supernumerary ribs with sodium salicylate; *Reproductive Toxicology* 13, 369-374.

**Friberg, L y Nordberg, G. F. (1990)**, Handbook on the toxicology of metals, 2a. ed, Elsevier Science Publishers B. V. Vol.II, 185-205.

**Gale, T. F. (1974)** Effects of chromium on the hamster embryo. *Teratology*, 9, p. 1917 ( Abstract).

**Gale, T.F. (1978)** Embryotoxic effects of chromium trioxide in hamster *Environ. Res.*, 16: 101-109.

**Gale, T. F y Bunch, J. D. (1979)** The effect of the time of administration of chromium trioxide on the embryotoxic response in hamsters., *Teratology* 19, 81-86.

**García-Rodríguez M.C (1996)** Estudio de los efectos de la clorofilina sobre el desarrollo embrionario y fetal del ratón *in vivo*; Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias en Biología, UNAM, FES-Zaragoza.

**García-Rodríguez M.C, López Santiago V. y Altamirano Lozano M. A. (1998)** Estudio de la cinética de MN-PCE por CrO<sub>3</sub>, en sangre periférica de ratón, usando la técnica de naranja de acridina, *Genetics and Molecular Biology*, Noviembre 21 (3), 146.

**García-Rodríguez M.C, López Santiago V. y Altamirano Lozano M. A. (2000)** Effect of Chlorophyllin on the MN-PCE induction in peripheral

blood of mice exposed to chromium trioxide *in vivo*; Environmental and Molecular Mutagenesis Vol. 35, Supplement 31.

**García-Rodríguez M.C, López Santiago V. y Altamirano Lozano M. A** (2001) Effect of chlorophyllin on chromium trioxide induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood; en Prensa.

**Gillespie, J. R., Humphreys, A. D., Baird C. A. y Robinson A. E.,** (1990) Química; ed. Reverté; p.p. 1139.

**Gómez-Arrollo, S. y Villalobos-Pietrini, R.,** (1983) Chromosomal Alterations by some Chromium Salts, Cytología 48,185-193.

**Graedel, T.E., Hawkins, D.T y Claxton, L.D** (1986) Atmospheric Chemical Compounds, Sources, Occurrence and Bioassay; Academic Press, New York, 732.

**Hayashi, M., Morita, T., Kodama Y., Sofuni, T. y Ishidate M Jr.** (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, Mutation Research 245, 245-249.

**Hartwin, A.,** (1995) Current aspects in metal genotoxicity; Biometals 8, 3-11.

**Heddle, A. John, Hite, M., Kirkhart, M. K. y Salamone, F. M.** (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity, ed. Elsevier Science Publisher 83, 165-1110.

**Heddle, A. J., Cimino, M. C., Hayashi, Romagna, F., Shelby M.D., Tucker, J. D. y MacGregor, J. T** (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage; Environmental and Molecular Mutagenesis 18, 277-291.

**Hood, R.D.** (1989) Developmental Toxicology: risk assessment and the future, Van Nostrand Reinhold, Washington, E.U p. 277.

**Houge, C.J.R** (1984) The effect of common exposures on reproductive outcomes; Teratogen. Carcinogen. Mutagen. 4, 45-57.

**International Register of Potentially Toxic Chemicals (IRPTC)** (1985) United Nations Environment Programme.

**Kalter H.** (1983) Issues and reviews in teratology, ed. Plenum Press, New York, Vol. 1, 353.

**Kaufman M. H. y Bard J. B.,** (1999) The anatomical basis of mouse development; Ed. Academic Press 291.

**Khera, K. S.,** (1984) Maternal toxicity. A possible factor in fetal malformations in mice, *Teratology* 29, 411-416.

**Khera, K. S.,** (1991) Chemically induced alterations in maternal homeostasis and histology of conceptus: their etiologic significance un rat fetal anomalies. *Teratology* 44, 259-297.

**King, M. T. y Wild, D.** (1979) Transplacental Mutagenesis: The Micronucleus Test on Fetal Mouse Blood. *Hum. Genet* 51, 183-194.

**Krishna, G. y Hayashi, M.** (2000) *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation; *Mutation Research* 455,155-166.

**Levis, A. G. y Majone, F.,** (1981) Citotoxic and clastogenic effects of soluble and insoluble compounds containing hexavalent and trivalent chromium; *Br. J. Cancer* 44, 219-235.

**Li P.y Heflich A. R.** (1991) *Genetic Toxicology*, ed. CRC, Press Inc, 361.

**Liu, S. y Dixon, K.,** (1996) Induction of mutagenic DNA by Chromium (VI) and Glutathione, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 28: 71-79.

**Mendoza-Nuñez V. M** (2000) Daño al ADN en linfocitos de ancianos en ralización al estado nutricional y niveles sericos de antioxidantes totales; Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias, UNAM 36-40.

**Mertz, W.** (1969) Chromium Occurrence and Function in Biological Systems., *Physiological Reviews* vol. 49, No. 2.

**Miranda, H. J.** (1992); Estudio del comportamiento físico y químico del cromo en aguas profundas del municipio de Tultitlan, Estado de México; Tesis FES-ZARAGOZA UNAM;85

**Mirsalis, C., Jon, Hamilton, M. C. y Patierno, S.** (1996) Chromium (VI) at plausible Drinking water concentrations is not genotoxic in the *in vivo* bone marrow micronucleus or liver unscheduled DNA synthesis assay; *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2, 60-63.

**Newman, M.C., Mc. Intosh, A. W.** (1991) *Metal Ecotoxicology*; Ed. Lewis Publishers 395

**Nishio, A. y Uyeki E.** (1985) Inhibition of DNA synthesis by chromium compounds; *Journal of Toxicology and Environmental Health* 15, 237-244.

**Norseth, T.** (1981) The Carcinogenicity of Chromium; *Environmental Health Perspectives*; Vol. 40,121-130.

**Ortiz-Monasterio, P. F. y Cortinas de Nava C., Maffey, G. L.** (1987) Manejo de los desechos industriales peligrosos en México, Universo veintiuno, México.

**Palmer, A. K.**(1979) Sporadic malformations in laboratory animals and their influence on drug testing. En: *Drug and fetal development* (1972). Kingberg, A., Abramovici, A. Y Chemke(Eds).45-60.

**Pei-Shan, L. y Meng-Kai, L.,** (1997) Biphasic effects of chromium compounds on catecholamine secretion from bovine adrenal medullary cells; *Toxicology* 117, 45-53.

**Rojas, E., Herrera, L., Poirier L. y Ostrosky-Wegman, P.,** (1999) Are metals dietary carcinogens?; *Mutation Research* 443,157-181.

**Ronald, D.** (1989) *Developmental toxicology. Risk assessment and the future*; Ed. VNB; 279.

**Rutledge, J.,** (2000); *Preimplantation Teratology and the Placenta*; *Teratology* 61, 246-247.

**Schmid, W. y Ledebur, M. V.** (1973) The Micronucleus test methodological aspects mutation research. 19, 109-117.

**Scialli**, R. A., (1992) A clinical guide to reproductive and developmental toxicology; ed CRC Press;284.

**Staples**, R. E. y Schnell, V. L.,(1964) Refinements in rapid clearing technique in the KOH-alizarin red S method for fetal bone, Stain. Technol, 34, 61-3

**Shi**, X. y Dalal, N. S., (1992) The role of superoxide radical in chromium (VI)-generated hydroxyl radical: The Cr (VI) Haber-Weiss cycle, Biochemistry and Biophysics, Vol. 292 (1), 323-327

**Soo**, K. B., Myung, H.CH., Jung, K. H. (2000) Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, Mutation Research 469, 233-241.

**Tamino**, G., Peretta, L. y Levis, A.G (1981) Effects of trivalent and hexavalent chromium on the physicochemical properties of mammalian cell nucleic acids and synthetic polynucleotides; Chem. Biol. Interactions 37, 309-319.

**Taylor**, P. (1986) Practical Teratology; Ed. Academic Press Inc, Orlando Florida; 171.

**Trivedi**, B; Saxena, K. D.; Murthy,C. R. y Chandra, V. S (1989) Embryotoxicity and fetotoxicity of orally administered hexavalent Chromium In Mice; Reproductive Toxicology Vol. 3, 275-278.

**Tucker**, J. D. y Preston, R. J (1996). Chromosome aberration, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. Mutation Research 365, 147-159.

**Ueno**, S., Kashimoto, T., Susa, N., Furukawa, Y., Ishii, M., Yokoi, K., Yasuno, M., Sasaki F., Ueda, J., Nishimura, Y. y Sugiyama (2000) Detection of dichromate (VI)-induced DNA strand breaks and formation of paramagnetic chromium in multiple mouse organs, Toxicology and applied pharmacology, 56-62.

**Vega** G. S. y Reynaga O. (1990) Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales; Ed. Limusa; México D. F; 727.

**Venitt**, S. y Parry, J. M. (1984); Mutagenicity testing a practical approach; ed. Press Limited, 337.

**Villagómez, M. M.** (1981) Efectos producidos por el trióxido de cromo sobre los cromosomas de las células meristemáticas de la raíz de *Vicia Faba*, Tesis Facultad de Ciencias, Depto. de Biología, UNAM,.50.

**Vouk, V.** (1986) General chemistry of metals. En: Handbook on the toxicology of metals.(Eds) L. Fribrs,G.F.Elsevier. Cap.1

**Wells, G. P., Kim, M. P., Laposa, R. R., Nicol, J. C., Parman, T. y Winn, M. L.,** (1997) Oxidative damage in chemical teratogenesis; Mutation Research 396, 65-78.

**Wise, D., Beck, S., Beltrame, D., Beyer, B.,Chahoud, I., Clark, R., Druga, A., Feuston, M., Guittin, P., Henwood, S., Kimmel, C., Lindstrom, P., Palmer, A., Petrere, J., Solomon, H., Yasuda, M. y York, R.** (1997) Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (version1); Teratology 55, 249-292.