

00346

10
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

BIOCOMPATIBILIDAD DEL ZINALCO Y SUS
COMPONENTES "IN VITRO"

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A :
ROBERTO BENITO PALMA CORTES

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA CRISTINA PIÑA BARBA

MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
PALLA DE ORIGEN

2744/15



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.

Dedico este trabajo a:

Mis Padres:

***Santiago Palma Ramírez
Juana Cortés Carapia***

Con mucho cariño y agradecimiento por darme la vida, por su paciencia y sus enseñanzas.

A mis hermanos:

***David
Meli
Gabriel***

Por su apoyo y comprensión.

A mi novia María Luisa por su amor y apoyo en todo momento.

A mis amigos:

***Dra. María Cristina Piña Barba
M. en C. Sara Melchor Castro
M. en C. Patricia Cerón
M. en C. Karina Torres***

Por sus valiosos consejos y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis: Dra. María Cristina Piña Barba por su valiosa dirección y por su dedicación a la ciencia de los biomateriales.

A la Química Nadia Munguía: por su valiosa ayuda técnica.

Al Sr. Eduardo Caballero Rodríguez: por su ayuda en la técnica fotográfica.

A D.G..A.P..A por su apoyo económico para la realización de esta tesis.

A mis sinodales:

Dra. Sandra Gómez Arroyo

M. en C. María de los Angeles Aguilar Santamaría

M. en C. Alicia Duran González

M. en C. Karina Torres Villaseñor

Dr. Gabriel Torres Villaseñor

Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez

Por su acertada revisión y críticas para la culminación del presente trabajo.



ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Resumen | |
| Introducción | 1 |
| El zinalco | 4 |
| Los iones metálicos en el metabolismo celular | 7 |
| Evaluación citotoxicidad | 22 |
| Evaluación de la genotoxicidad | 28 |
| Citotoxicidad y genotoxicidad de los iones metálicos | 35 |
| Zinalco como biomaterial | 44 |
| Objetivo e hipótesis | 44 |
| Metodología | 45 |
| Resultados y Discusión | 50 |
| Conclusiones | 66 |
| Referencias | 68 |
| Anexo 1 | 74 |

RESUMEN

El zinalco es una aleación de Zn, Al y Cu que se pretende utilizar como un material potencialmente biocompatible por lo cual es necesario que se lleven a cabo varias pruebas antes de utilizarlo como biomaterial. Para verificar que sus componentes no sean tóxicos, en este trabajo se investigó el efecto citotóxico y genotóxico del zinalco en cultivo de linfocitos humanos "in vitro", mediante el análisis del índice mitótico, intercambio de cromátidas hermanas (ICH), cinética de proliferación celular (CPC) y el índice de replicación (IR).

En los primeros cultivos, la aleación zinalco se utilizó en polvo de 4 μ m de diámetro a una concentración de 0, 5, 50, 200 y 500 μ g/ml de medio de cultivo, los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en el IM, en el ICH, en la CPC, e IR con respecto al testigo.

Antes de llevar a cabo los experimentos de agitación en presencia de polvo de zinalco, se realizó una prueba para ver si existía algún efecto de la agitación sobre los linfocitos durante su cultivo, para esto se realizaron dos tipos de cultivo, uno en condiciones de agitación constante y otro sin agitación, los resultados mostraron que no hay diferencias significativas en la frecuencia del IM, ICH, CPC e IR entre los cultivo agitados y los no agitados.

La disolución por agitación del metal se llevó a cabo para conocer qué tanto se corroía, en este caso también se empleó polvo de 4 μ m de diámetro a las concentraciones de: A) 25, B) 27.5, C) 30, D) 32.5 E) 37.5, F) 42.5 G) 50, H) 60, I) 75, J) 100, K) 150 y 0.00 μ g/ml de medio de cultivo, éstas se colocaron en agitación dos días antes y durante el cultivo, al final se midió la concentración de iones liberados al medio a través de la técnica de espectroscopia de absorción atómica (EAA), los resultados mostraron que no hay diferencias significativas en el IM, ICH, CPC e IR de los diferentes lote con respecto al lote testigo, excepto para las dos concentraciones más altas en las cuales no se produjo proliferación celular debido a que se elevó el pH del medio de cultivo.

Con la finalidad de simular una corrosión "in vitro" de la aleación, además para obtener concentraciones más altas de los iones de los metales que la componen, un cilindro

de zinalco de 1 cm de diámetro x 1cm de altura fue disuelto electroquímicamente en medio de cultivo celular RPMI 1640. Se midió la concentración de iones en el medio por EAA, obteniéndose las siguientes cantidades: iones zinc 2930 $\mu\text{g/l}$, Al 586 $\mu\text{g/l}$ y Cu 58 $\mu\text{g/l}$, de estas concentraciones se hicieron diluciones para llevar a cabo los cultivos. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas entre la frecuencia promedio del IM, ICH, CPC, e IR de las diferentes concentraciones con respecto al testigo excepto para la concentración mayor en la cual no hubo proliferación celular también debido a que se elevó el pH en el medio de cultivo.

En el trabajo se utilizó la combinación de los metales que forman la aleación zinalco (Zn, Al y Cu) los cuales pueden estar interactuando de diferentes formas, porque tienen diferentes características tanto de peso molecular como de electropositividad, siendo los más parecidos el cobre y el zinc.

Las concentraciones de estos no rebasan las consideradas como normales en sangre. La concentración de cobre es muy pequeña ya que es el metal que está en menor proporción, mientras la del Zn es la mayor por que es el componente principal del zinalco. De acuerdo con esto, los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que las concentraciones usadas, no provocaron problemas genotóxicos ni citotóxicos (excepto en la de mayor concentración en los experimentos de agitación y de disolución electroquímica) donde no hubo proliferación celular.

Por lo tanto, los resultados de la prueba de IM, ICH, CPC e IR con el Zinalco (78% en peso de Zn, 20% en peso de Al, 2% en peso de Cu) no se detectaron daños genotóxicos ni citotóxicos.

INTRODUCCIÓN

Un biomaterial es un producto requerido para ayudar en un tratamiento médico y tiene contacto con tejidos de los pacientes por un período de tiempo significativo para que la interacción entre el tejido y el material sea un factor importante en el tratamiento ¹.

El énfasis de la definición es sobre el tiempo de contacto entre el material y los tejidos del paciente, por eso hay que distinguir entre un biomaterial de algún otro material usado solo transitoriamente por un cirujano o médico, la definición excluye todos los que tiene contacto con los tejidos por un periodo de tiempo muy corto, pero incluye a todos los que tengan una interfase con los tejidos aunque estén más de unas horas en contacto con éstos (~24 horas). ¹

Algunas líneas dentro de los biomateriales se relacionan con sustancias usadas en medicina. Por ejemplo, éstos pueden ser distinguidos de las drogas y generalmente son excluidos de los productos farmacológicos, sin embargo existen pocas excepciones donde las áreas se sobreponen.

Habitualmente es aceptado que los biomateriales son productos sintéticos, hechos de metales, polímeros y cerámicas ². De nuevo esto es una afirmación amplia y es esencial distinguir entre este tipo de materiales y los trasplantes de órganos, ya que hay algunas áreas que se sobrelapan. Hay numerosos ejemplos de tejidos naturales y especialmente los de colágena, que son apropiados para la implantación. En ciertas situaciones, éstos se incluyen en la categoría general de biomateriales.

En general la definición de biomaterial abarca todos los materiales no vitales que son usados médicamente dentro, sobre o casi en todo el cuerpo y que están en contacto con tejidos diferentes a la epidermis.

Los aparatos o prótesis totalmente implantados constituyen la categoría más obvia de biomateriales. Entre éstos hay algunos usados en la boca para los tratamientos dentales y están localizados dentro del esmalte, en la dentina de la pulpa, o simplemente se dejan en la mucosa oral. De manera similar ciertos dispositivos anticonceptivos son colocados dentro del útero y los lentes de contacto en la córnea. Varios tipos de aparatos penetran la piel y

residen tanto fuera como adentro del cuerpo; otros son usados extracorporalmente en instrumentos de asistencia como oxigenadores y equipo de hemodiálisis.

La biocompatibilidad es el término usado para describir el estado de los acontecimientos cuando un biomaterial existe dentro del ambiente fisiológico, sin que éste afecte al cuerpo ¹. Hay, seguro, una variedad de grados de interacción y esta definición puede ser interpretada tan ampliamente como la de biomaterial. El término es interpretado en un sentido amplio y alguna interacción que se lleve a cabo es considerada como un factor potencialmente importante para biocompatibilidad ³.

Como ya se indicó hay dos amplios aspectos de la biocompatibilidad: los efectos sobre el material y los efectos sobre el tejido. Existe, mucha interrelación entre ello, por eso a menudo un efecto adverso sobre el material por los fluidos fisiológicos, provoca la liberación de partículas o sustancias solubles que pueden ser la causa de una respuesta desfavorable de los tejidos.

La biocompatibilidad es en gran parte debida al conjunto de interacciones químicas que se llevan a cabo entre el material y los fluidos corporales y la respuesta fisiológica a estas reacciones. Así, la biocompatibilidad de los materiales metálicos es controlada por su naturaleza química, o más precisamente por las interacciones electroquímicas que resultan de la liberación de iones metálicos, o en algunos casos, por partículas insolubles dentro del tejido y el potencial tóxico de éstas ⁴.

La forma física de los implantes es un factor muy importante en la biocompatibilidad. En el contexto de la carcinogénesis, por ejemplo, los materiales de los cuales se desprenden partículas influyen la susceptibilidad al cáncer e infecciones durante el tiempo que permanecen implantados ⁵. Las reacciones son dominadas por los eventos iniciales a nivel molecular y en la interfase material tejido, de modo que las propiedades de superficie de un biomaterial son todas importantes. Así por ejemplo, la naturaleza química de un material en el caso de los metales proporcionará ciertos tipos de óxido en su superficie que los protegerá de la corrosión (capa de pasivación) ⁴

En la biocompatibilidad de los metales, pueden intervenir muchos factores entre ellos las reacciones anódica y catódica en el proceso de corrosión que involucra el

movimiento de electrones, por lo cual será fundamental el estado eléctrico de un implante metálico ¹.

El potencial tóxico de los iones metálicos es importante para la biocompatibilidad de los metales implantados, ya que éstos liberan una cantidad de ellos que puede ser en mayor o menor grado dañina ⁵. Se sabe que cuando estos iones son liberados por implantes ortopédicos pueden afectar el buen funcionamiento de algunas actividades biológicas. También es conocido que cualquier material a altas dosis puede ser nocivo para el organismo, en particular cuando se trata de iones metálicos ^{3,6}.

La corrosión de los implantes metálicos es el principal causante de la liberación de iones, los cuales se concentran en el tejido alrededor del implante o pueden dirigirse a la circulación sistémica ^{6,7}.

Los tejidos humanos contienen pequeñas cantidades de varios metales que son esenciales para ciertos procesos fisiológicos y, si los metales implantados rebasan la concentración local, sus iones pueden ejercer un efecto tóxico. A menudo esta toxicidad es producida por la interferencia de procesos enzimáticos, ya que el control homeostático de estos metales se puede saturar y es difícil eliminarlos, provocando una alta concentración; además trae como consecuencia competencia entre los metales esenciales y algunos elevan su concentración, produciendo cambios en la polaridad de la membrana celular y por lo tanto un desajuste fisiológico que lleva a la muerte de la célula (citotoxicidad). Por otro lado, otros iones metálicos pueden cruzar la membrana nuclear llegando hasta la molécula de ADN, trayendo como resultado un desequilibrio en su replicación y transcripción, generando células o tejidos con algún defecto a nivel genético (genotoxicidad) ⁸.

Se sabe que muchos iones metálicos liberados de implantes ortopédicos, pueden afectar algunas actividades biológicas, como las funciones del sistema inmune o procesos en los cuales están involucrados los ácidos nucleicos que, generalmente requieren de la participación de iones metálicos para llevar a cabo la duplicación del ADN y ARN. Estos son esenciales para las funciones biológicas a una concentración, pero pueden ser dañinos en otras concentraciones ^{6,9}.

EL ZINALCO

El zinalco (aleación de 76-82% Zn - 18-23% Al - 1-5% Cu) fue desarrollado por el Dr. Gabriel Torres durante la década de los setentas y surge como resultado de varios años de investigación ¹⁰.

Las investigaciones sobre zinalco se iniciaron alrededor de 1973 en el Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM (IIMUNAM). Tenían por fin contribuir al conocimiento del zinc y del cobre, materias primas nacionales con las que se realiza la aleación. Los estudios básicos de esta aleación se mantuvieron con fondos del IIMUNAM hasta 1979, año en que el Instituto recibió recursos provenientes de la Organización de los Estados Americanos (OEA) para el desarrollo de aleaciones basadas en zinc que pudieran usarse en sustitución del aluminio, del cual México carece y tiene que importar. Los fondos que alcanzaron los 80 mil dólares por año, permitieron avanzar rápidamente. En 1980 se expusieron los primeros resultados en un congreso sobre materiales y energía en Reston Virginia EU, en el que se pudo apreciar que la idea de la nueva aleación era novedosa y que no había sido explotada hasta ahora. El proyecto prosiguió y para 1983 se tenía un diseño del material que reunía las propiedades adecuadas para competir con el aluminio ¹¹.

De acuerdo a las propiedades físicas del zinalco (ver tabla 1) esta aleación tiene un intervalo de punto de fusión bastante amplio que va de 421 °C a 480 °C, lo que permite inyectar el material en los moldes en un estado cuasilíquido (en forma de líquido) ¹². También esta aleación funde casi con el doble de rapidez que el aluminio y tres veces más pronto que el bronce. La densidad de la aleación la coloca en una posición intermedia entre el acero y el aluminio, su coeficiente de expansión térmica es muy similar al del aluminio. El bajo punto de fusión del zinalco, en comparación con el aluminio, latón y bronce permite ahorros considerables de energía, ya que éste requiere de 150 wh/kg mientras que un mismo volumen de aluminio requiere de 400 wh/kg.

Tabla 1. Propiedades Físicas del zinalco

| | |
|----------------------------------|--|
| <i>Temperatura de fusión</i> | <i>421 a 481 °C</i> |
| <i>Densidad</i> | <i>5.4 g/c.c.</i> |
| <i>Módulo elástico</i> | <i>110-130 G Pa</i> |
| <i>Conductividad eléctrica</i> | <i>37 %</i> |
| <i>Conductividad térmica</i> | <i>37 %</i> |
| <i>Coefficiente de expansión</i> | <i>25 $\mu\text{m}/\text{mm k}$</i> |
| <i>Color</i> | <i>blanco grisáceo</i> |

El estudio de esta aleación como biomaterial ha sido de gran interés debido a las características físicas que presenta como son la alta resistencia mecánica y a la corrosión debido a la capa de óxido que se forma en su superficie, en la tabla 2 se muestra una comparación de las propiedades mecánicas del zinalco, el huso de fémur humano y diferentes aleaciones usadas como biomateriales, ¹³.

Tabla 2. Propiedades mecánicas del hueso, zinalco y otras aleaciones de uso ortopédico

| Material | Cedencia En compresión | Esfuerzo máximo a la tensión | Límite a la fatiga 107 cycles | Modulo de fractura | Elongación |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------|------------|
| | N/mm ² | N/mm ² | N/mm ² | GN/m ² | (%) |
| Fémur humano | 350 | 139 | - | 17 | 2.3-3.4 |
| Zinalco de fundición | 350 | 410 | - | 100 | 30-35 |
| Co-Cr-Mo de fundición | 515 | 725 | 300 | - | - |
| 316 LVM templado | 242 | 553 | 283 | 220 | 10 |
| Co-Ni-Cr-Mo templado | 310 | 898 | 340 | - | - |
| Co-Ni-Cr-Fe-Mo templado | 276 | 600 | - | - | - |
| Ti6Al-V templado | 829 | 898 | - | - | - |

El zinalco usado para las pruebas de biocompatibilidad tiene 78 % de zinc, 20 % de aluminio y 2% de cobre sus características lo hacen apto para la elaboración de una amplia gama de productos mediante procesos convencionales de transformación, incluso biomateriales ¹².

La aleación zinalco ha sido sometida a pruebas biológicas, tanto "in vitro" en cultivos celulares como "in vivo" implantándolo en animales como ratas y perros. En las primeras, la aleación zinalco se sometió a una prueba de citotoxicidad en linfocitos humanos y los resultados no mostraron efectos tóxicos, ya que el índice mitótico en

presencia de las diferentes concentraciones de polvo de la aleación (5, 50, 200 µg/ml) fue similar al de los linfocitos que no tenían polvo de zinalco¹⁴.

También se han llevado a cabo pruebas de genotoxicidad en larvas de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, a las que se les administró en su alimento polvo de zinalco, los resultados no mostraron efecto genotóxico en éstas¹⁵.

En otros estudios “in vivo” realizados con ratas, la aleación fue implantada y se evaluó daño en los tejidos alrededor de los implantes a diferentes tiempos, para observar si existía algún rechazo; los resultados mostraron que el implante fue tolerado y no hubo síntomas de rechazo^{16, 17}.

LOS IONES METÁLICOS EN EL METABOLISMO CELULAR

El zinc

El zinc es un ion muy pequeño, tiene un radio de 0.65 Å una carga electroquímica de dos, se une a los aniones como carboxilatos y fosfatos aún si en el medio existen otras especies. Los iones metálicos tienen alta afinidad por los electrones, el zinc difiere del Mg^{2+} y Ca^{2+} ya que su afinidad electrónica es mucho más grande. Es considerado como un ácido fuerte de Lewis, por lo cual pueden unirse fuertemente a donadores, como por ejemplo tiolatos y aminas.

Es el mejor catión bivalente disponible para las funciones biológicas, debido a que éstas requieren de reorganización de átomos y reacciones rápidas, estos eventos pueden ser llevados a cabo más fácilmente por el zinc ¹⁸. Cuando se une a una enzima favorece su actividad catalítica permitiendo unión al sustrato más rápido (en el caso de enzimas digestivas); también tiene una gran carga localizada y alta afinidad electrónica y es, por consiguiente, un buen enlazante de grupos. Por esta razón las enzimas con zinc pueden ser usadas para unir sustratos con una selectividad mayor o menor, esto es de gran importancia en los dedos de zinc que interaccionan con el ADN.

Dentro de los cationes bivalentes el zinc se parece mucho al calcio, tiene las propiedades requeridas para regular o controlar iones uniéndose e intercambiándose rápidamente, sus funciones son paralelas ya que ambos son controlados tanto dentro como fuera de la célula. Se encuentra a una concentración más baja que el calcio pero se une más fuertemente a proteínas y puede por lo tanto, ser usado como un control homeostático en muchos sistemas de reacciones, es simultáneamente utilizado como un catalizador o controlador ¹⁹.

El ion zinc tiene las siguientes características: Es el catalizador más frecuente en el citoplasma debido a que las enzimas que contienen zinc están involucradas en una gran variedad de reacciones enzimáticas como degradación, transportación, maduración de otras proteínas y síntesis de nucleótidos. Las enzimas digestivas de zinc son muy activas fuera de las células o en vesículas por ejemplo en el caso de la regeneración de la piel.

El papel estructural del zinc se extiende desde los microfilamentos hasta la organización de cromosomas. El uso de este metal en las funciones reguladoras del ADN esta confinado a los eucariontes²⁰, se encuentra ampliamente distribuido dentro de los compartimentos celulares donde podría ser un vínculo entre muchos controles y reguladores del metabolismo.

Los diferentes usos del zinc en el espacio biológico y sus posibles vías de ingreso y expulsión en la célula se muestran en la figura 1, las cuales al parecer son reguladas por diferentes proteínas que utilizan este metal para su función o para algunas funciones metabólicas.

Disponibilidad y concentración de iones de zinc libres

Los sistemas biológicos son consumidores de energía. La economía energética es tal vez el factor que más determina cuáles de los elementos disponibles sean empleados por los sistemas biológicos. El zinc está parcialmente libre aún en agua marina y es considerado entre los elementos traza de mayor disponibilidad, aún más que el cobre, hierro, cobalto o cadmio. La concentración relativa de los iones zinc dentro de la gran variedad de células varía en condiciones normales desde casi 10^{-9} M en el citoplasma de muchas de ellas hasta casi 10^{-3} M en algunas vesículas. Se puede establecer que existe un mecanismo de bombeo para mover los elementos en los compartimentos y las concentraciones elevadas de Zn se ponen en movimiento tal vez junto con el calcio ya que se han encontrado evidencias de que se regulan mutuamente (ver Figura 2)²¹.

Estas bombas, requieren unión selectiva al zinc. En los fluidos extracelulares, este metal puede ser bombeado adecuadamente hasta un nivel más bajo que el intracelular 10^{-9} M pero, debido a que puede ser liberado de vesículas, el nivel puede ser muy elevado localmente por corto tiempo¹⁸. En realidad, las concentraciones de zinc son altas en una variedad de vesículas de terminales nerviosas del cerebro y en particular en las fibras Mossy del hipocampo. No se conoce por que el zinc está presente en este lugar, pero una interesante posibilidad es que su liberación sobre estimula ayudando a la producción de memoria por un periodo largo²².

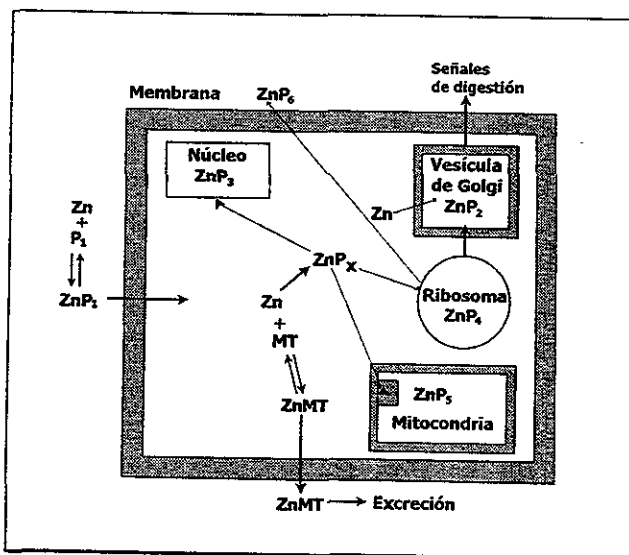


Figura 1. Esquema de las diversas vías de entrada y salida del ion zinc ¹⁸.

Tipos de proteínas asociadas con zinc

Las enzimas son proteínas que tienen sitios activos, generalmente su estructura se apoya en la forma β -plegada, la rigidez de estas estructuras ayuda a mantener la especificidad de unión y la direccionalidad de ataque por centros ácido-base o redox. La estabilidad del plegamiento también previene intercambios de iones metálicos de una proteína a otra.

Hoy en día debido a los análisis de estructura cristalina de las proteínas, se sabe que las enzimas con zinc están basadas en grandes extensiones de β -plegada excepto por una o dos proteínas. La fuerza del plegamiento de esta estructura genera geometrías particulares en el sitio activo del ion metálico en estas enzimas ²³.

El pliegue impone una geometría espacial al metal, la tensión en una enzima que contiene cobre en vez de zinc crea una geometría rómbica, mientras la que tiene zinc es un tetraedro convencional. Por lo tanto el zinc es un componente de estabilización ¹⁸ (ver tabla 3).

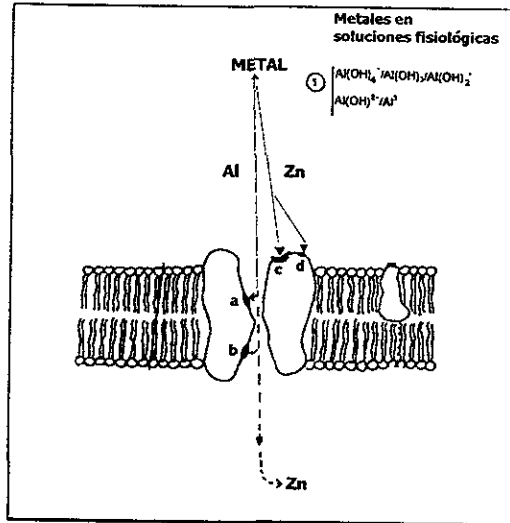


Figura 2. Muestra las diferentes interacciones que pueden llevar a cabo los iones zinc y aluminio en una bomba de calcio; en los puntos a y b el zinc se une al calcio para dejar pasarlo o en su defecto pasar el propio zinc, el aluminio puede bloquear estas interacciones e incluso desestabilizar la membrana y las proteínas de membrana puntos c y d ²².

Tabla 3. Principales pliegues de algunas proteínas que contienen zinc ¹⁸

| β-plegado | | α-plegado | |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------|
| Insulina, Zn Å | Anhidrasa carbónica, Zn. | Carboxipeptidasa, Å | Metalotioneina Ø, |
| S-100, Zn, Ca | | Zn. | Cu, Zn, Cd. |
| Fosfolipasa c, Zn Å | Superoxidodismutasa, Zn, Cu. Å | Apartato transcarbamilasa, Zn. | σ-factor IIIA, Zn |
| | | Alcohol dehidrogenasa, Zn. | |
| | | β-lactamasa, Zn | |

*El sitio activo esta siempre asociado íntimamente con β-plegada.

Å Entrecruzamiento por el ion metálico o puentes disulfuro S-S.

Ø Plegamiento solo con iones metálicos unidos.

Cuando los grupos de enzimas atacan, el zinc puede tener una movilidad local considerable en el sitio activo, a diferencia de las proteínas que transfieren electrones, la relajación de la estructura local permite un mejor encendido y apagado de las reacciones de substratos y productos, para que el flujo de la reacción sea fácil ²⁴.

Gracias a los datos cristalográficos, se sabe que los metales en los sitios activos actúan como agentes de entrecruzamiento de grupos tioles, usualmente cuatro, el zinc generalmente se puede unir a los grupos tioles de dos histidinas y dos cisteínas dando una combinación de cuatro ligandos. Esto es un doble entrecruzamiento o nudo y es encontrado en proteínas intracelulares, por ejemplo alcohol deshidrogenasa. El entrecruzamiento puede ser en parte, un reemplazamiento para los puentes disulfuro (S-S) ya que estos son inestables por la reducción¹⁸. En este caso el zinc unido (entrecruzado) controla la cantidad de proteína en la célula al estabilizarla de modo que permanece sin hidrolizar. Hasta aquí, todo el zinc tiene una unión fuerte con una constante de unión $\geq 10^9 M^{-1}$. En los complejos de la insulina, el zinc es entrecruzado a esta proteína helicoidal en dos diferentes formas, cada una a través de cadenas laterales de histidinas²⁴.

Las proteínas descritas hasta aquí son altamente selectivas al zinc, pero esto no es verdad para las metalotioneínas las cuales son una especie de recogedor de iones metálicos pesados y la estructura de la proteína se adapta por sí misma al ion metálico en particular en la ausencia de estos la proteína tienen un enrollamiento al azar. Las metalotioneínas, las cuales solo se unen al zinc, cadmio o cobre formando una serie de vueltas hasta atrapar los iones metálicos en dos tipos de unidades M_4 y M_3 respectivamente formadas por un tetraedro regular, tioles y donadores^{25, 26}.

El análisis de las proteínas que no tienen actividad enzimática llevan a cabo un papel regulador de ciertas estructuras como por ejemplo el ADN, en especial el de las proteínas llamadas dedos de zinc, las cuales han sido encontradas en eucariontes, en la tabla 4 se muestran algunas funciones de este tipo de proteínas que contienen zinc. Algunas de estas proteínas se unen a sitios promotores del ADN pero otras son parte de enzimas críticas y parece que tienen un papel estructural o de control, estas se unen a los grupos fosfatos de los nucleótidos que forman el ADN. El zinc está en asas repetidas de proteínas de algunos 30 aminoácidos, cuando la proteína esta libre del ADN, los dedos no están bien estructurados y el zinc es rápidamente expuesto^{27, 28} (ver figura 3).

El ADN unido a los dedos de zinc presenta compuesto de residuos juntos en secuencias, el cual probablemente altera los pliegues localmente y es requerido como un control²⁷.

Tabla 4. Proteínas dedos de zinc ¹⁸

| | |
|---|---|
| Muchas unidas a Regiones promotoras de ADN | Receptoras de hormonas (Steroles, tiroxinas etc.) |
| Aspartato transcarbamilasa | Síntesis de bases nucleotídicas |
| Kinasa C | Señalamiento crítico sobre todo el ciclo celular |

Existen otras enzimas que tienen uno o más iones metálicos con diferentes funciones como la fosfatasa alcalina en hueso, o las proteínas degradadoras de colágena en el tejido conjuntivo y piel, la 5' nucleotidasa y la fosfolipasa C, la primera requiere de dos iones de zinc y uno de magnesio, la segunda dos iones de zinc y la última de tres iones de zinc ^{18, 21}

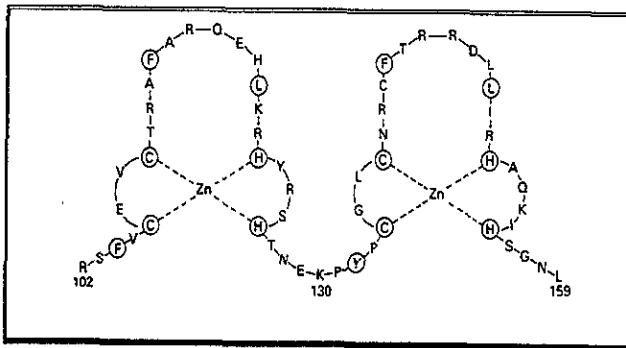


Figura 3. Representación esquemática de la proteína dedos de zinc ¹⁸

El zinc es probablemente uno de los principales iones reguladores del metabolismo celular, debido a la naturaleza de su molécula y a la forma en que actúa dentro de los dedos de zinc, ya que al estar unido al ADN tiene ciertas propiedades, que hacen que éstas proteínas logren un enlace estable y una dinámica apropiada con el ADN. Esto también se

logra en las proteínas que llevan a cabo la síntesis de aminoácidos, nucleótidos y del grupo hemo las cuales también tienen zinc ²⁷.

El papel regulador del zinc intracelular depende de la concentración de sus iones, ya que es necesario para poder unirse a las proteínas, por ejemplo en los factores de transcripción los cuales requieren de por lo menos 10 átomos de zinc y, dependiendo de la unión, desactivan o activan, este papel regulador incluso también se da en las proteínas que se unen en las regiones promotoras del ADN (ver tabla 5) ²⁴.

Los dedos de zinc llevan a cabo otra función muy importante, se asocian a hormonas relacionadas con los procesos del desarrollo (tiroxinas y hormonas esteroideas), por eso una carencia de zinc afecta el crecimiento y la salud de varios tejidos (tejido óseo, conjuntivo, reproductor, sistema inmune, etc.) ^{24, 29}.

La concentración de los iones Zn^{2+} es de gran valor en la homeostasis, debido a que el control de ésta depende en gran medida del poder de la concentración de los iones metálicos, además de que la cantidad del zinc, así como, la del cobre y cadmio, son reguladas por las proteínas llamadas metalotioneinas, estas se pliegan de diferente forma de acuerdo al metal al que se unen. Reconocen en especial a estos tres metales, cuentan con dos series de receptores para cobre y zinc y uno para cadmio ^{25, 26}.

Lo anterior da la pauta para considerar al zinc como control o controlador, como se menciona anteriormente las metalotioneinas actúan en presencia de una concentración alta de iones metálicos, esto quiere decir que la presencia elevada de zinc provoca la síntesis de esta proteína, así como de los dedos de zinc. Esto ocurre al determinar la constante de unión de iones zinc a las proteínas. Como se observa en la figura 4, el zinc se une a una proteína en un estado inicial en que existe un determinado plegamiento (F1) y que puede ser reversible. En la segunda etapa, donde la proteína ya tiene anclado el ion, el plegamiento es más fuerte e irreversible (F2), esto sucede con la metalotioneinas, dedos de zinc y la aspartato transcarbamilasa que controla la síntesis de las bases para la síntesis de ADN ¹⁸.

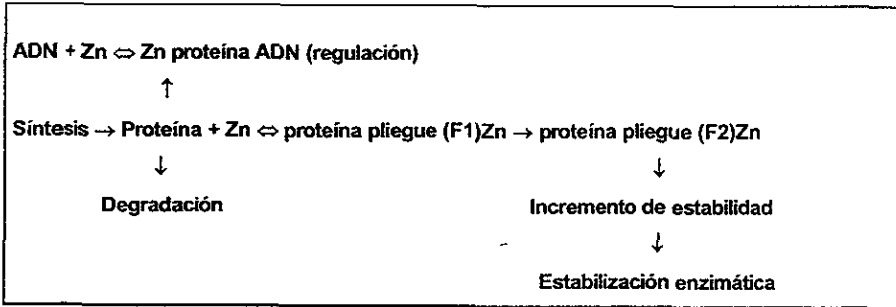


Figura 4. Diferentes etapas que pasa el zinc para unirse a una proteína ²⁸.

Con el descubrimiento del zinc en los factores de transcripción, su papel en el núcleo de proteínas cromosómicas (durante el proceso de la división), en la transcriptasa reversa y en las ADN y ARN polimerasa, se observa que determina las velocidades de reacción de estas proteínas comprobándose su alto valor biológico en las enzimas que requieren velocidades de reacción rápidas ^{18, 25}.

El zinc debido a su característica de ácido de Lewis puede unirse a los enlaces fosfodiéster estabilizando a la molécula de ADN (ver figura 5), además también se asocia a grupos polisacárido y péptido ⁹. En estas últimas es importante para que las proteínas peptidasas de zinc puedan ligarse a las hormonas péptido que destruyen o degradan encefalinas y otras hormonas dentro del cerebro, especialmente en la región del hipocampo ²².

Son importantes las funciones intracelulares como las extracelulares llevadas a cabo por hormonas para la fisiología de todo el organismo (control homeostático) vía conexión al ADN, en especial todas aquellas que requieren unirse a proteínas que contienen los dedos de zinc, los cuales conectan las hormonas al ADN, en la figura 6 se observan diferentes tipos de proteínas en las cuales el zinc actúa como control y regulador ¹⁸.

El zinc también es usado en la síntesis de ácidos nucleicos, en la enzima aspartato transcarbamilasa, poniendo en evidencia que este metal está involucrado en pasos fundamentales en la síntesis biológica de los polímeros como el ADN.

Los dedos de zinc tipo C2H2 contienen un complejo de dos pares de cisteínas con un ion zinc, actúan como enlazadores de ácidos y al parecer representan las más amplias proteínas moduladoras involucradas en el reconocimiento de los ácidos nucleicos³⁰.

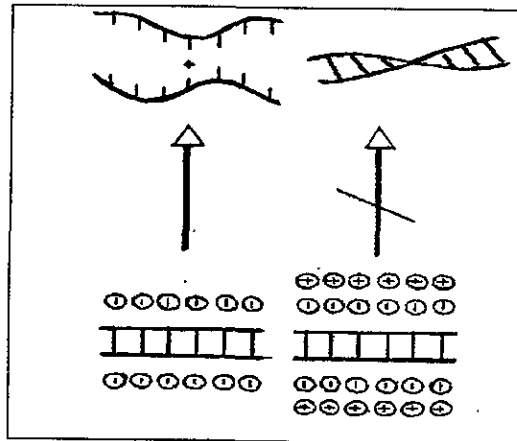


Figura 5. Estabilización del ADN por cargas metálicas positivas que se unen a los grupos fosfato⁹.

Estudios de la interacción de proteínas con el ADN por medio de cristalografía de rayos X, selección genética y métodos computarizados han ayudado en el entendimiento de como las proteínas reconocen sitios específicos sobre la doble hebra de ADN y como se unen las proteínas que regulan la expresión génica²⁷.

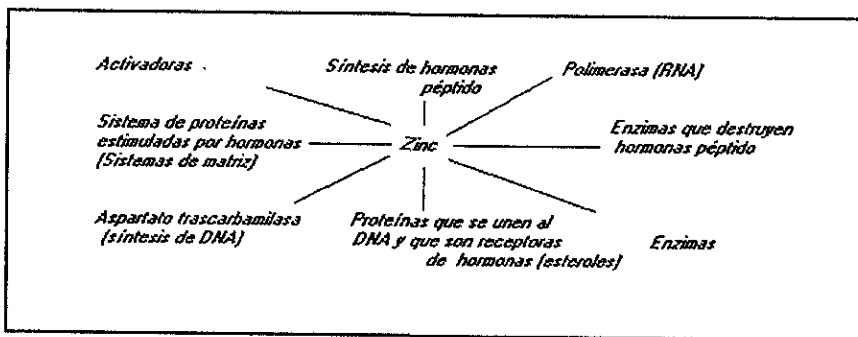


Figura 6. Tipos de proteínas donde participa el ion zinc¹⁸.

Los dominios de los dedos de zinc contienen 30 aminoácidos, estos son otras de las llaves para asociarse al ADN y son encontrados en una amplia familia de proteínas reguladoras en eucariontes ²⁷.

Con la resolución de la estructura de los dedos de zinc y su relación con el ADN se encontró que contenía tres dedos de zinc, esta estructura reveló que cada dedo hace su primer contacto con tres pares de bases en un subsitio del ADN. También se dilucidó la estructura del complejo que contenía cinco dedos de zinc en el gen humano de glioblastoma. Esta estructura confirma la naturaleza modular del zinc en las interacciones de éstos con el ADN, pero también revela que las variaciones en el acoplamiento de los dedos pueden permitir diferentes contactos con las bases, ya que están organizados de forma modular y tienen aún desarrollo para reconocer diversas series de secuencias del ADN ^{27, 31}.

Los genes de la familia de los dedos de zinc codifican proteínas que contienen unidades repetidas con una secuencia "consensus" característica. Cada unidad plegada alrededor de un ion zinc coordinado tetraédricamente por dos cisteínas o por dos pares de cisteínas e histidinas. Los genes de los dedos de zinc (DZN) representan una de las más grande y diversas familias de genes encontrados en el genoma humano que codifican reguladores transcripcionales los cuales se cree que juegan un papel en el desarrollo y diferenciación celular. Por lo tanto algún problema en las mutaciones de estas proteínas pueden provocar diversas enfermedades como transformaciones neoplásticas, rearrreglos cromosomales, anomalías en la transcripción etc. ^{32, 33}.

Velocidades de intercambio del zinc

Las velocidades de intercambio de los iones metálicos de los complejos de las proteínas, no son una característica intrínseca de la fuerza de unión de su ion metálico, pero son dependientes de la energía de plegamiento de la proteína. En el caso del zinc es muy conocido que muchas enzimas que contienen a este metal puedan ser separadas de las células sin una pérdida significativa del ion metálico, esto puede ser debido a la presencia de al menos 10^{-10} M de zinc libre en solución, pero también se han encontrado proteínas en las

cuales el zinc tarda mucho en intercambiarse, sobre todo en enzimas con estructura β -plegada/hélice (ver tabla 5).

Tabla 5. Velocidades de intercambio de proteínas con zinc ¹⁸

| | | | |
|--------------------|-------------------------------|-----|------|
| Carboxipeptidasa | N ₂ O ₃ | 8.0 | 24 |
| Fosfatasa alcalina | | | |
| sitio A | N ₂ O ₃ | 8.0 | 84 |
| sitio B | N ₁ O ₃ | 8.0 | 24 |
| Proteína gen 32 | S ₂ N | 7.8 | 12 |
| Galactosidasa 4 | S ₄ | 7.8 | 1-2 |
| | S ₄ | 7.8 | 1 |
| | S ₄ | 7.8 | 0.75 |
| Metalotioneina | S ₄ | 7.0 | -1 |
| Dedos de Zinc | S ₂ H ₂ | 7.3 | -10 |

El zinc como un grupo catalítico en enzimas

En química orgánica e inorgánica el ion zinc es considerado como un buen aceptor de electrones o ácido de Lewis, con sus grupos polarizados se une y aumenta el poder de ataque sobre una base o incrementa la probabilidad de ataque sobre el grupo unido al actuar como un ácido. Un ejemplo de este primer caso es la unión a la molécula de agua con la cual llega a tener una unión efectiva con los grupos OH⁻ a un pH, que generalmente es de 9, como en el siguiente modelo: $Zn^{2+} (H_2O) \rightarrow Zn^{2+}(OH^-) + H^+$ ³⁴, lo cual significa que el zinc como ácido puede localizar y atrapar a los iones hidróxido (base), los cuales posiblemente puedan atacar otras moléculas biológicas. Esta reacción se lleva a cabo a pH ^{35, 36}

Enfermedades producidas por deficiencia o exceso de zinc

Este elemento es importante en la curación de heridas. También funciona como un antioxidante. Apresura la curación de úlcera péptica y quemaduras. La dosis diaria recomendada es de 100 mg ^{37, 38}.

Una deficiencia de zinc provoca anorexia; depresión del crecimiento; inmadurez sexual; hipogonadismo, lesiones en la piel, hiperqueratosis, depresión de la respuesta inmune, acrodermatitis enteropática; efectos teratogénicos. Como se ha mencionado las enzimas que contienen zinc están involucradas en la regeneración de la piel, en la expresión génica, en la recepción de hormonas, etc.^{37, 38, 39}. El zinc es relativamente tóxico, a altas dosis puede ser letal. El nivel normal del zinc en la sangre es de 7 mg/ml (0.1 M) y es considerado tóxico cuando esta entre 150 a 600 mg/ml (2.24-9.17 M)^{1, 39, 40}.

El cobre

La principal característica del cobre dentro de las reacciones bioquímicas, es que es uno de los iones divalentes que se unen mejor a moléculas orgánicas debido a su afinidad electrónica, tiene un radio aproximado de 0.65 Å¹⁸.

El uso más común del cobre es la transferencia de electrones, especialmente asociado a enzimas oxidantes. Estos sistemas de transporte de electrones están formados por pequeñas proteínas que transfieren electrones a los centros de reacción⁴¹, algunas de las proteínas de este tipo se enlistan en la tabla 6. El cobre también participa en muchas funciones bioquímicas sobre todo en el exterior de las células, por ejemplo en la finalización del tejido conjuntivo entrecruzando proteínas (ver tabla 7). Este metal está involucrado en la producción de algunas hormonas, acarreador de O₂, metabolismo de N/O⁴¹.

Tabla 6. Substratos de las enzimas que contienen cobre¹⁸

| | |
|--------------------------------|---|
| Oxidasa simples | O₂ más fenoles, aminos, ascorbato, iones ferrosos, etc. |
| Citocromo oxidasa | O₂ más citocromos c, a y a3. |
| Enzimas óxido nitrógeno | NO, NO₂⁻, N₂O + agentes que oxidan y reducen. |
| Oxidasa especiales | O₂ + proteínas o polisacáridos para entrecruzar. |

Transporte y homeostasis

La deficiencia de cobre provoca un tejido conectivo muy frágil y participa en el entrecruzamiento de las proteínas del tejido conjuntivo.

El transporte del cobre que entra a circulación sanguínea es controlado por la albúmina, la cual distribuye el cobre hacia el hígado, en este sitio se une a cuatro donadores nitrogenados uno de los cuales es un péptido ionizado, por esta razón el hígado es la fuente principal de muchas oxidasas que circulan en la sangre ¹⁸.

Dentro de la célula el cobre es mantenido a muy bajos niveles en el citoplasma, el exceso es manejado por ligandos especiales: las metalotioneinas (MT), las cuales se pueden unir a 7 átomos de cobre en un complejo tiol y, a diferencia del zinc, el complejo Cu-MT puede ser excretado a través de vesículas, mientras el complejo de Zn-MT puede permanecer como amortiguador en el citoplasma. Al igual que el zinc, el cobre también regula la producción de la MT como ya se explicó anteriormente. La constante de unión de la metalotioneina al cobre es muy alta de modo que el cobre no exceda una concentración de 10^{-15} M en las células ⁴².

Velocidades de intercambio del cobre

Las velocidades de intercambio del cobre son generalmente muy bajas debido a su fuerza de unión a los ligandos, del orden de 10^{15} M, además éste se encuentra concentrado principalmente a nivel extracelular, en las proteínas transportadoras de electrones en la superficie externa de la membrana citoplásmica y es difícil que se pueda intercambiar. El cobre se une en general fuertemente dentro de una proteína, que por lo regular β -plegada; por lo tanto el intercambio es inhibido por la fuerza del plegamiento de la proteína, excepto para la metalotioneina en la cual el intercambio es rápido ¹⁸.

Tabla 7. Enzimas de matriz externa que contienen cobre ^{18, 41}.

| <i>Enzima</i> | <i>Actividad</i> |
|----------------------|---|
| | Oxidación |
| Lisin oxidasa | Entrecruzamiento de colágena y elastina. |
| Lactasa | Entrecruzamiento vía fenoles |
| Feno oxidasa | Entrecruzamiento vía fenoles |
| Amino oxidasa | Remueve aminas |

Enfermedades producidas por deficiencia y exceso de cobre

Importancia: Necesario para la absorción de hierro, ayuda a oxidar a la vitamina C, trabaja también en conjunto con ésta para producir a la elastina, principal componente de las fibras musculares de todo el cuerpo, ayuda a la formación de eritrocitos; ayuda a la creación y mantenimiento del hueso.

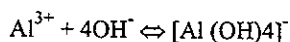
La deficiencia de cobre provoca en general: debilidad, deterioro de la respiración, inflamación de la piel, anemia, ataxia, producción defectuosa de melanina y queratinización, daños en la estructura de la piel, todo esto debido a que el cobre participa en las enzimas oxidantes involucradas en la síntesis del grupo hemo, y en el entrecruzamiento de la elastina y la colágena en el tejido conjuntivo ¹⁸.

Por el contrario un exceso provoca necrosis del hígado, enfermedad de Wilson e hipertensión, esto debido a que el hígado es el receptor principal del cobre ⁴⁰. Su nivel normal en la sangre de humanos es de 1.01 mg/ml (0.015 M) y es considerado tóxico cuando se rebasan los 250 mg/ml (3.93M). La dosis diaria recomendada en la dieta es de 0.5 a 0.6 mg ^{1, 18, 40}.

El Aluminio

El aluminio es considerado un elemento no esencial. Al parecer la única función de éste se encuentra en el metabolismo de la acción de la succinil deshidrogenasa y en la Y-aminolevulnato dehidrasa (involucrada en la síntesis de porfirinas) ⁴⁰.

Químicamente los altos estados de oxidación de los elementos pesados son a menudo anfotéricos, una propiedad que generalmente es ilustrada con este elemento en el estado trivalente y asociado con el cambio químico de metal a no metal ^{18, 22}.



En la reacción anterior el aluminio puede actuar como catión o anión, apareciendo como Al^{3+} en iones complejos con muchos donadores orgánicos dependiendo del pH. Existe la posibilidad de que el Al^{3+} o el $[\text{AlOH}]^{2+}$, pueda ocupar varios sitios del Mg^{2+} en varias clases de células. Esto ocurre en los sitios de la fosforilación de las tubulinas, algunos creen que esto es la causa de la enfermedad del sistema nervioso llamada Alzheimer, pero evidencias recientes no apoyan esto. Más bien la enfermedad se da por cuestiones genéticas.

Se conoce poco del aluminio ya que al no ser un elemento esencial puede interferir con procesos bioquímicos “in vivo” interaccionando con moléculas que contienen fosfatos. Por lo se controla, para evitar que entre a los sistemas biológicos, aunque existe la posibilidad de que esto no suceda. La toxicidad se presenta solo a altas dosis. Además la asociación del aluminio con la enfermedad de Alzheimer es más bien, debido a un defecto genético preexistente en la barrera macroencefálica que deja pasar preferencialmente este metal ¹⁸.

La forma iónica del aluminio tiene una alta afinidad por el ADN, ARN y muchos mononucleótidos ⁴³. Un exceso de Al^{3+} puede elevar la probabilidad de que éste interaccione con los grupos fosfatos del ADN o ARN y con el entrecruzamiento de proteínas. Se puede esperar que los cambios en la fosforilación de las proteínas produzcan tubulina aberrante.

La absorción y distribución del aluminio es lenta y se va acumulando principalmente en hueso y en células reticuloendoteliales. El nivel normal de aluminio en la sangre es de 0.39 mg/ml (0.014 M) se considera tóxico cuando alcanza una concentración de 5g/ml (0.18 M). La dosis recomendada en la dieta diaria es de 2.45 mg/ml ^{1, 18, 40}.

EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD (ÍNDICE MITÓTICO Y CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN CELULAR)

Ciclo celular

Una célula eucarionte no puede dividirse en dos y estas a su vez en cuatro, etc. al menos que lleve a cabo dos procesos alternos: duplicar su genoma (ADN) en la fase S (fase de síntesis) del ciclo celular y dividir en dos este genoma durante la mitosis (fase M). El periodo entre M y S es llamado G1; y entre S y M es G2 ^{44, 45}.

Así, el ciclo celular consiste de:

G1= crecimiento y preparación de los cromosomas para la replicación, S= síntesis de ADN (y centriolos), G2= preparación para la mitosis y M= mitosis

Control del ciclo celular

El paso de una célula a través del ciclo celular es controlado por proteínas en el citoplasma. Las principales en células animales son: Las ciclinas, de las cuales hay tres grupos: ciclinas G1, ciclinas de fase S y ciclinas de fase M. Su nivel en la célula se incrementa o decrece de acuerdo al estado del ciclo celular. Existen otras proteínas llamadas ciclinas dependientes de kinasas (CDKs) donde también hay tres grupos: CDKs de G1, CDKs de fase S y CDKs de fase M. Su nivel en la célula permanece muy estable, pero cada una puede unirse a una ciclina apropiada (de las cuales fluctúan su nivel) para ser activadas añaden grupos fosfato a una variedad de sustratos de proteínas que controlan el proceso del ciclo celular. Existen además los complejos promotores de anafase (APC) y otras enzimas proteolíticas, las APC degradan ciclinas mitóticas ⁴⁶.

Pasos del ciclo celular

Un incremento del nivel de la ciclina G1 indica a la célula que se prepare para la división de los cromosomas (replicación), mientras un aumento en los niveles de los

promotores de la fase S preparan a la célula para duplicar su ADN y sus centriolos. Al tiempo que continua la replicación del ADN, una de las ciclinas compartida por las CDKs de la fase G1 y S (ciclina E) son destruidas y comienza a incrementarse el nivel de las ciclinas mitóticas llegando a su máximo en G2⁴⁷ (ver figura 7).

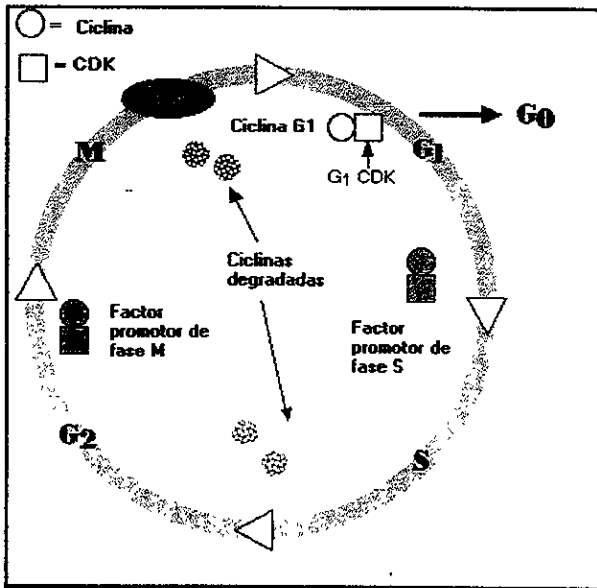


Figura 7. Regulación del ciclo celular⁴⁵.

Transcurrida la fase G2 el factor promotor de fase M (el complejo de ciclinas mitóticas con las CDKs de fase M) inician el rompimiento de la envoltura nuclear y el ensamble del huso mitótico en la profase, la condensación de los cromosomas en la metafase celular dentro de la etapa de mitosis (M), en este punto, los factores de promotores de fase M activan al complejo promotor de la anafase, el cual separa a las cromátidas hermanas en la placa metafásica y destruye las ciclinas de la fase M, además enciende la síntesis de las ciclinas G1 para el siguiente ciclo celular^{46, 47}. Muchas veces una célula puede dejar el ciclo, temporal o permanentemente, existe este ciclo en G1 y es llamado G0. Una célula en G0 es a menudo llamada quiescente, con frecuencia las células en G0 son nombradas diferenciadas y nunca entran de nuevo al ciclo celular pero llevan a cabo sus

funciones normales dentro del organismo hasta que mueran. Para otras células G0 puede ser continuación para reentrar en el ciclo celular. Muchos de los linfocitos en la sangre humana están en G0, sin embargo, con una apropiada estimulación “in vitro” pueden ser activadas e ingresar al ciclo (en G1) y seguir las diferentes etapas, las cuales se pueden llevar a cabo varias veces ^{45, 47, 48}.

Replicación del ADN

Antes de que una célula pueda dividirse, debe duplicar su ADN. En eucariontes esto ocurre durante la fase S y se llevan a cabo los siguientes pasos: una porción de la doble hélice es desenrollada por una helicasa, una molécula de ADN polimerasa se une a una hebra del ADN y comienza a moverse en dirección 3' a 5', usándola como molde para ensamblar una hebra principal o conductora de nucleótidos que reforman la doble hélice ⁴⁸, debido a que la síntesis del ADN solo puede ocurrir 5' a 3', una segunda ADN polimerasa es empleada para unirse a la otra hebra patrón que lleva la dirección contraria 3' a 5' (la hebra retrasada), esta polimerasa sintetiza segmentos discontinuos de polinucleótidos (llamados fragmentos de Okasaki). Otras enzimas como la ligasa pegan estos fragmentos (ver figura 8) ^{44, 45}.

Velocidad de la replicación

El promedio de pares de nucleótidos que contiene el cromosoma humano es de 150×10^6 los cuales son copiados a una velocidad de 50 nucleótidos por segundo, este proceso podría tomar un mes pero debido a la característica de que el genoma humano tiene muchos orígenes de replicación se lleva a cabo aproximadamente en una hora. La replicación comienza al principio de la fase S donde solamente existen algunos orígenes de replicación y estos van incrementándose conforme avanza la fase. Los diferentes orígenes de replicación también son llamados replicones o burbujas de replicación las cuales a medida que avanzan

se encuentran unas con otras y se fusionan formando finalmente dos moléculas de ADN de doble hélice (ver figura 9) ^{45, 49}.

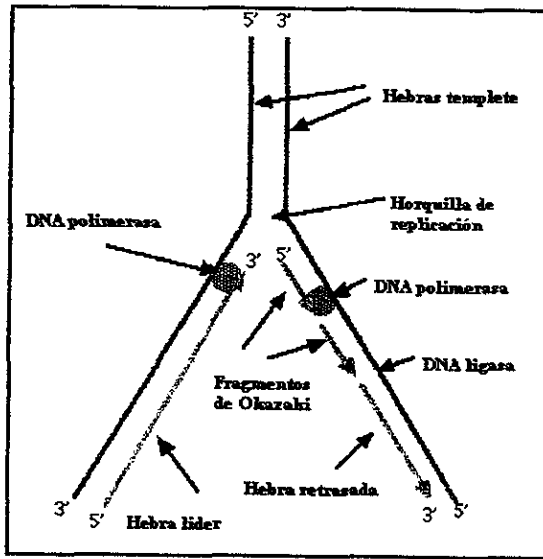


Figura 8 Horquilla de replicación durante la fase S, esta es la zona donde se generan los ICH ⁴⁵.

Mitosis

Cuando una célula eucarionte se divide en dos, cada célula hija o progenitora puede recibir una serie completa de genes (para células diploides, esto significa 2 genomas completos, $2n$), también recibe un par de centriolos, algunas mitocondrias y algunos ribosomas, más una porción de retículo endoplásmico y tal vez otros organelos esto a veces no requiere de gran precisión, pero para asegurarse que cada célula obtenga dos series de genes iguales requiere de ésta, debido a la gran cantidad de ADN compactado en los cromosomas, el cual se tiene que replicar sin errores para no crear daño. Esto lo resuelve la célula condensando los cromosomas en estructuras compactas y distribuir esta igualmente entre las dos células hijas. Estas tareas son acompañadas por la mitosis que es el proceso

que distribuye uno de cada cromosoma duplicado a cada célula hija, es conveniente considerar al proceso en 4 fases (Profase, metafase, anafase y telofase) ^{44, 45, 48}.

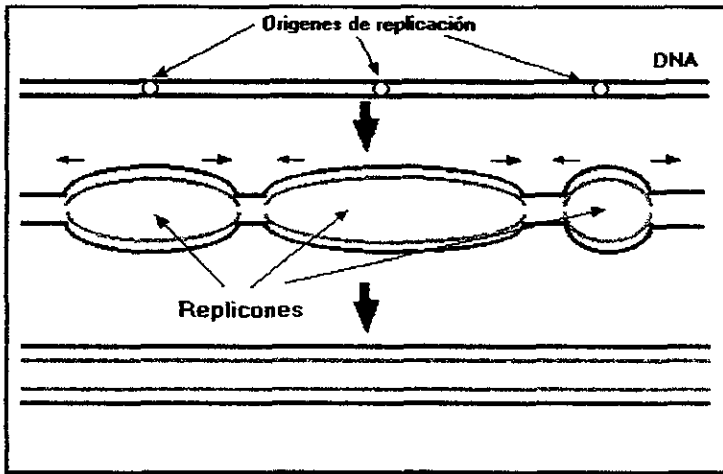


Figura 9. Se muestran zonas de replicones que es la forma que utiliza el ADN para replicarse más rápido y son zonas de probable generación de ICH ⁴⁵.

Control del ciclo celular

Existen genes que codifican componentes para los puntos de control del ciclo celular, los cuales son posiciones que aseguran el orden de los eventos en el ciclo celular e integran la reparación del ADN con la progresión del ciclo. La realización del ciclo celular requiere de la coordinación de una variedad de síntesis, ensambles, movimientos de macromoléculas ⁵⁰.

Los cromosomas deben ser replicados, condensados, segregados y descondensados. El huso polar debe ser duplicado, separado y migrar a los lados puestos del núcleo. La coordinación de estos procesos complejos se piensa que son llevados a cabo por una serie de cambios (transiciones de fase) en las ciclinas dependientes de kinasa (CDKs) ⁵¹. La forma activa de las CDKs son complejos de al menos dos proteínas, una kinasa y una ciclina y a

menudo contienen otras proteínas que todavía no se comprenden con exactitud su función. Estos complejos sufren cambio en los componentes de kinasa y ciclina que se cree que manejan el ciclo de un estado a otro. De acuerdo a esto el estado del ciclo celular es determinado por la constelación de proteínas activadas o desactivadas por fosforilación como resultado de la actividad de las CDKs durante este estado ^{46, 51}.

El paso de un estado a otro del ciclo celular es regulado fuertemente por la abundancia de los controles que actúan sobre la transcripción de los genes de ciclinas, la degradación de proteína ciclinas y la modificación de las subunidades de kinasa por fosforilación. Un número de curvas de reacción positivas y negativas contribuyen al avance del ciclo celular. Los controles negativos sobre el progreso del ciclo celular son ejercidos durante el desarrollo, diferenciación, senescencia y muerte celular. Estos controles juegan un importante papel en la prevención de tumores. En muchos casos, el arresto de la proliferación celular toma lugar bajo circunstancias en las cuales la integridad del genoma ha sido dañada y falla el arresto de la proliferación liberando células con un alto grado de inestabilidad de su genoma que a la larga pueden producir cáncer ⁴⁶. Como se ha determinado el ciclo celular involucra muchos factores en los cuales puede ser dañado y para determinarlo indirectamente, además de la prueba de micronúcleos, aberraciones cromosómicas e ICH, existe la medición del índice de replicación y mitótico, la cinética de proliferación celular, los cuales pueden ser medidos simultáneamente con la prueba de ICH, ya que gracias a su técnica de tinción se puede detectar células que han llevado a cabo uno, dos o hasta tres ciclos de replicación y al mismo tiempo hacer el conteo de células en interfase o mitosis.

Las pruebas a la que son sometidos los materiales que se pretenden usar como biomateriales deben proporcionar un mejor entendimiento de la interfase entre lo biológico y el biomaterial (hospedero-implante) generalmente evaluando daño celular ⁵², esto se evalúa por medio del índice mitótico y la cinética de proliferación celular o índice de replicación celular.

EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD (ICH)

En las sociedades actuales, los seres humanos estamos expuestos a una gran cantidad de agentes físicos y químicos que potencialmente pueden interactuar con su ADN provocando mutaciones, es decir, cambios estructurales o numéricos en esta molécula. Si estas alteraciones se producen en células germinales y existe la posibilidad de que la descendencia de los individuos afectados manifieste anomalías hereditarias. Por otro lado, si las células afectadas son las somáticas es probable que las personas directamente expuestas desarrollen algún tipo de cáncer.

Las evidencias más directas para detectar agentes mutagénicos y/o carcinogénicos provienen de estudios epidemiológicos. Sin embargo, este tipo de investigaciones son muy costosas y los resultados que se obtienen son retrospectivos, ya que, se observan solamente después de que las poblaciones han estado en contacto con un agente determinado. Por esto desde hace algunos años se han buscado sistemas biológicos que, "in vivo" o "in vitro", sean capaces de predecir el potencial mutagénico y/o carcinogénico de agentes físicos o químicos a los cuales los seres humanos están expuestos accidental, ocupacional o terapéuticamente ⁴³. Los métodos citogenéticos para identificar la acción de agentes químicos sobre los cromosomas pueden involucrar la medición de alteraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas (ICH) o micronúcleos.

Para detectar los efectos genotóxicos provocados por la gran variedad de mutágenos tanto físicos como químicos con los cuales interactúa el hombre y evaluar el riesgo que representan para la salud de éste, se han desarrollado diversos sistemas de prueba que incluyen bacterias, hongos, plantas y animales. Uno de los más útiles para determinar el efecto tanto "in vivo" como "in vitro" es el cultivo de células humanas y de éstos, el de linfocitos de sangre periférica es uno de los más usados, debido a que tiene ventajas como la obtención de poblaciones numerosas ⁵³. Además son células esenciales en la fisiología del sistema inmune. Una característica común para la mayoría de los linfocitos es la activación, la cual es necesaria para que lleven a cabo su proliferación ya que estos permanecen en estado G₀ sin dividirse, por consiguiente si tiene alguna lesión o daño en su ADN este permanece por días e incluso más tiempo ¹⁰. La sangre periférica humana

contiene una fracción grande de linfocitos (aproximadamente $1- 4.5 \times 10^3/\text{mm}^3$). Son células mononucleadas con una estructura y un número estable de cromosomas, fácilmente pueden ser estimulados para que proliferen al agregar al medio de cultivo un agente mitogénico apropiado como por ejemplo: la fitohematoglutina⁵⁴. El tiempo del ciclo celular de los linfocitos es similar entre diferentes individuos, además de ser fácilmente obtenidos. Por todas estas razones, la prueba con linfocitos proporciona un buen modelo experimental para analizar el posible daño celular y genético inducido por un agente dado^{54, 55}.

El intercambio de cromátidas hermanas (ICH) ha resultado ser una prueba de genotoxicidad rápida y sensible, puesto que se induce con concentraciones hasta diez veces menores que las requeridas para producir alteraciones cromosómicas y ofrece un método adecuado para la detección de los mutágenos ambientales^{56, 57}. En la tabla 8 se muestran las ventajas y desventajas de este método. El ICH puede ser estudiado tanto “in vitro” como “in vivo”, para detectar daño cromosómico inducido por concentraciones bajas de agentes químicos, la cual revela la inducción de alteraciones en el ADN o en la cinética de proliferación celular. Esta prueba es usada como un indicador de posibles efectos o daños mutagénicos; fácilmente detectable cuando es incorporado un análogo de la timidina la 5-bromodesoxiuridina (BrdU) en el ADN⁵⁸. La técnica de ICH basada en el empleo de la bromodesoxiuridina permite identificar inequívocamente los cambios en las cromátidas hermanas en metafase que han tenido dos ciclos de replicación del ADN en la presencia de esta substancia. En varios laboratorios se ha demostrado que los ICH, son indicadores sensibles y reproducibles del daño al ADN provocado por agentes químicos o físicos⁵⁹.

Significado Biológico de los ICH

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

que es durante o inmediatamente después de que se ha formado la horquilla de replicación cuando se lleva el intercambio de doble banda entre las cadenas de ADN ⁶⁰.

Tabla 8. Las ventajas y desventajas de usar la prueba de ICH

| Desventajas | |
|--|--|
| a) Es excelente para detectar agentes que producen aductos en el ADN. | a) Poco sensible para mutágenos que inducen rupturas dobles |
| b) Es mucho más sensible para determinar mutágenos químicos que el método basado en el análisis de aberraciones cromosómicas. | b) El desconocimiento de su significado biológico. |
| c) Hay ensayos tanto "in vivo" como "in vitro" para evidenciar tanto mutágenos directos como indirectos, es decir, que requieran o no de activación metabólica. | c) El desconocimiento de la correlación de ICH con el número de lesiones. |
| d) Es un método relativamente rápido. | d) El efecto sinérgico o aditivo que puede tener la BrdU respecto al mutágeno. |
| e) Los sistemas "in vivo" permiten el análisis en tejidos diversos incluyendo células germinales. | |
| f) Existen sistemas en organismos diversos incluyendo plantas y animales no mamíferos, los cuales pueden ser usados como monitores ambientales de agentes genotóxicos. | |
| g) Este ensayo puede ser usado en poblaciones humanas. | |
| h) Existen pocos falsos positivos. | |

Si bien, aún no se conoce el significado biológico de los ICH, el hecho de que se hayan visto en las células de todos los organismos estudiados, sugiere que estos son un fenómeno común y fundamental en las células ⁶¹. Puede ser posible que el fenómeno de los ICH sea la consecuencia de un proceso que permite a la célula dividirse, aún en presencia de lesiones en su ADN; de ser así puede existir alguna correlación entre el fenómeno y la mutación ⁶².

La replicación y segregación del ADN es semiconservadora y cada cromosoma eucariótico está compuesto por un dúplex sencillo de ADN. En consecuencia, la incorporación de la BrdU en el ADN es exitosa y esta se va incorporando cada vez más conforme pasan más ciclos de replicación y se puede observar al microscopio óptico usando las técnicas de coloración apropiada en esta caso la técnica que se utiliza es la de fluorescencia más Giemsa (FPG) ⁶³. Cuando se emplea Giemsa para teñir cromosomas que estuvieron en contacto con BrdU se ve una débil diferenciación entre las cromátidas hermanas. Además el contraste con Giemsa, se incrementa más si la tinción con este colorante es precedida por 33258 Hoeschst, el cual ofrece una imagen óptica que se desvanece con rapidez y obliga a

la observación reiterada, seguida posteriormente de iluminación con luz UV por distintos periodos ya que produce una reacción de fotólisis en el ADN doblemente sustituido con BrdU⁶³. La BrdU afecta el decaimiento de los fluorocromos por lo menos cinco veces, ésta aumenta la afinidad de unión del colorante con el ADN. Las cromátidas menos substituidas (o sin substituir) se colorean fuertemente en comparación con las más substituidas, esto se observa cuando las células han pasado por un ciclo de replicación donde los cromosomas en ambas cromátidas están unifilarmente substituidas, por el contrario cuando pasan dos ciclos los cromosomas se encuentran con una cromátida unifilarmente substituida y la otra bifilarmente, observándose la heteropícnosis (tinción diferencial), para un tercer ciclo se encuentran cromosomas parecidos a los de segundo ciclo, pero además se ven otros totalmente substituidos, tal como se ve en las fotografías obtenidas en este trabajo (ver figuras 10, 11, 12). Mientras que en la figura 13 se muestra la forma en la que se produce un ICH en los cromosomas.

Desde el descubrimiento de los ICH se han propuesto varias hipótesis para explicar los mecanismos de su formación, el más aceptado hasta el momento está explicado en la hipótesis propuesta por Painter⁶⁴. Este modelo se basa en la posibilidad de que los rompimientos de doble hebra de ADN ocurran frecuentemente en las conexiones de zonas de duplicación o replicones adyacentes durante la replicación⁶⁵ (ver figura 8 y 9). Este principio está apoyado por la evidencia de que ciertas enzimas, las topoisomerasas, inducen y reúnen fragmentos rotos. Agentes como la mitomicina-C (MMC), el benzo (a) pireno y la luz ultravioleta inhiben la síntesis de ADN, por bloqueo de la elongación de la cadena y sus efectos se encuentran en varios estadios de la duplicación, de modo que estos agentes, que reducen la velocidad de desplazamiento de la horquilla de replicación (ver figura 8), pueden generar una disposición en donde existan cuatro extremos libres (dos nacientes y dos paternos) de un grupo de replicones completamente duplicados. Éstos pueden estar opuestos a los dos extremos libres (ambos paternos) del replicón adyacente que se encuentra parcialmente duplicado⁶⁴.

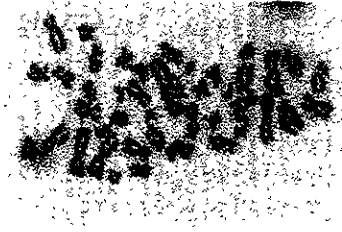


Figura 7. Metafase de primer ciclo, ambas cromátidas están unifilarmente substituidas y por eso se tiñen fuertemente

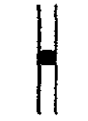


Figura 8. Metafase de segundo ciclo, se observa perfectamente la heteroploicosis ya que una de las cromátidas está doblemente sustituida, la cual se observa con una tinción más débil, las flechas indican algunos intercambios.



Figura 9. Metafase de tercer ciclo, aquí se observan cromosomas que tienen ambas cromátidas bifilarmente substituidas.

NORMAL



CON INTERCAMBIOS

Primer ciclo de replicación en presencia de 5-BrdU



G1
S



G2

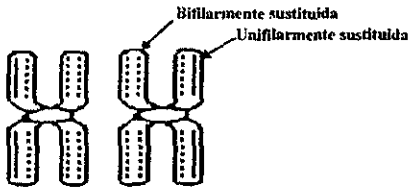


M

Segundo ciclo de replicación en presencia de 5-BrdU



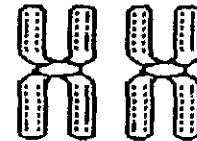
G1
S



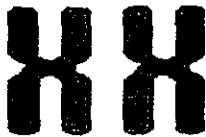
Bifilarmente sustituida

Unifilarmente sustituida

G2



Intercambio intersticial



M

Intercambio distal



Figura 13. Mecanismo de la producción del ICH durante el ciclo celular y la replicación del DNA, durante dos ciclos de división en presencia de 5-BrdU.

Esto conduce a la conexión entre grupos de replicones en los cuales un segmento duplicado se encuentra al lado de un segmento no duplicado. Se sugiere que los rompimientos de la doble hebra de ADN en estas conexiones son formados y reunidos por la acción de las topoisomerasas I y II que existen en las células de mamíferos ⁶⁵.

Ocasionalmente, en lugar de una reunión normal, el rompimiento es sellado por la reunión de hebras hijas de una molécula replicada a la molécula no replicada (ver figura 14). Por lo tanto, el ICH es iniciado cuando las hebras hijas nacientes de un grupo de replicones duplicados se combina con hebras paternas de un grupo parcialmente duplicado y el ICH se termina de crear cuando estos últimos grupos completan la duplicación. Este intercambio requiere de un solo evento: el rompimiento de la doble hebra; esto es consistente con los datos que sugieren que la formación de los ICH es una función lineal con la dosis del agente ^{56, 62}.

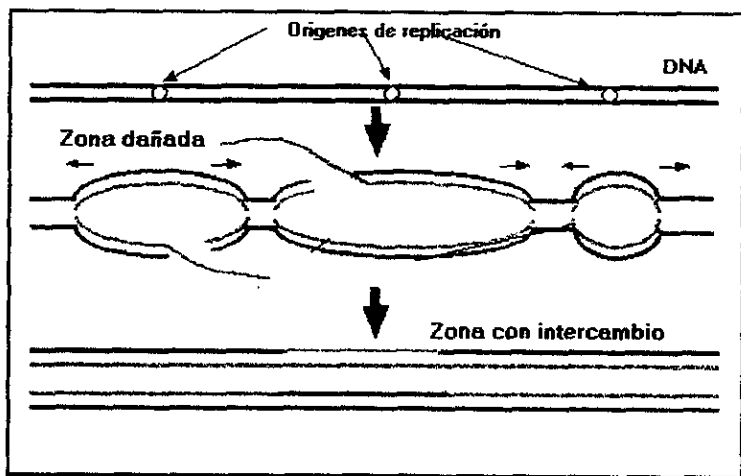


Figura 14. Forma en que probablemente se produce un ICH cuando existe un daño en el ADN ⁴⁵.

CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE LOS IONES METÁLICOS.

El modo de acción de los metales a nivel celular es diverso. Pueden afectar el sistema de membranas, cambiando la permeabilidad de la membrana celular o mitocondrial, lo cual puede perturbar el mecanismo energético de la célula, decrecer la estabilidad de la membrana lisosómica, lo cual dañaría la función celular al liberar las hidrolasas ácidas. A escala molecular, los metales pueden interactuar con proteínas provocando su desnaturalización, precipitación, efectos alostéricos o afectar en la síntesis de éstas.

Alternativamente los metales pueden unirse a los ácidos nucleicos y alterar la conformación nucleoproteica: ambas actividades pueden afectar la división celular y la estructura y comportamiento del aparato genético ^{9,21,29}.

Los efectos citotóxicos de los metales han recibido y siguen recibiendo considerable atención debido a que algunos de éstos se han identificado como carcinogénicos y teratogénicos. Los metales que causan daños genotóxicos son a menudo carcinogénicos.

La acción sobre el ciclo celular y la inducción de anormalidades cromosómicas forman importantes criterios para la identificación de daño en sistemas genéticos ⁶⁶. Las alteraciones en la división celular pueden llevar a un incremento en la mitosis, una acción mitogénica o más frecuentemente una reducción en la frecuencia de división ²⁹. También esto está relacionado con un efecto sobre el huso mitótico, provocando que se retrase la división o un desbalance en la separación de los cromosomas. Los cambios en los cromosomas pueden involucrar alteraciones en el número de ellos, en su estructura o en ambos. Los agentes que causan rompimientos o intercambios de segmentos de cromosomas son llamados clastogénicos.

Los efectos clastogénicos de los metales pueden ser modificados por factores externos, como la nutrición, presencia de otros metales o otras sustancias químicas tóxicas en el medio ambiente. La actividad clastogénica también es alterada grandemente, cuando se usan combinaciones con otros metales, ya que pueden provocar efectos antagónicos, sinérgicos, aditivos, depresivos, etc. ⁶⁷.

Los daños sobre los cromosomas pueden o no ser directos debido a la interacción con el ADN o no, pero pueden crear condiciones que favorezcan el daño mitótico. Los

metales pueden interactuar con los ligandos de azufre en el citoplasma y cambiar la viscosidad del plasma, provocando anomalías como daño en el huso mitótico. Los metales también pueden formar complejos quelantes con grupos cíclicos u otros metales.

De acuerdo a algunos datos disponibles sobre los efectos clastógenicos de los metales y sus compuestos sobre los organismos superiores, se indican algunas tendencias generales, por ejemplo: la exposición a dosis crónicas o subcrónicas decrece el índice mitótico e incrementa el número de aberraciones cromosómicas, estos efectos son directamente proporcionales a la dosis y a la duración del tratamiento, además afectan como agentes S dependientes ⁶⁷. Los efectos dependen de ciertos factores, incluyendo el modo y vehículo de administración, la forma de administración, el sistema de prueba usado, la velocidad de desintoxicación, distribución y retención en los diferentes tejidos, interacción con sustancias endógenas o externas al organismo, así como el modo de acción con las macromoléculas biológicas ^{67, 66}.

En los mamíferos, la actividad clastogénica de los metales dentro de cada grupo de la tabla periódica es directamente proporcional al incremento del peso atómico, electropositividad y solubilidad de los cationes metálicos en agua y lípidos. El efecto dañino de los metales sobre los organismos vivos puede ser observado en el ámbito histológico, celular y subcelular, o a escala molecular y son modificados por un número de factores variables, incluyendo el estado de salud del organismo ⁶⁷.

Acercas del control homeostático para los distintos metales zinc y cobre se sabe que su concentración es controlada por las metalotioneinas que son proteínas que tienen sitios específicos para unir zinc y cobre, de esta forma son expulsados de la célula ^{18, 26}. En el caso del cobre este debe ser eliminado fuera de la célula ya que, no es común en el interior de estas y en caso de entrar hasta el núcleo puede provocar desórdenes en la replicación del ADN al unirse a los puentes de hidrógeno que constituyen los nucleótidos ⁹. Para el caso de zinc este puede tener varias vías una es que sea tomado por las metalotioneinas y que permanezca en el interior celular para que se utilice en alguna función o puede ser expulsado a través de vesículas si este rebasa la concentración permitida ¹⁸. Para el caso del aluminio la concentración normal como se observa en la tabla 18, es más baja que para el

cobre y el zinc, esto debido a que no está involucrado en ninguna vía metabólica y no es un elemento esencial, además de que su velocidad de absorción es muy lenta, su única función se encuentra en el metabolismo de la acción de la succinil deshidrogenasa y en la γ -aminolevulinato deshidrasa (involucrada en la síntesis de porfirinas) ⁴⁰.

Se han descrito resultados contradictorios acerca del daño provocado por el zinc, aluminio y cobre tres metales que son importantes analizar debido a que la aleación utilizada en este trabajo esta compuesta por estos tres.

Por ejemplo se ha demostrado que el ion zinc induce proliferación de linfocitos T de ratón, al estimularlos entrar al ciclo celular a una concentración de 100 μM (0.1×10^{-3} M), a la cual se ha demostrado que recuperan su crecimiento y longevidad. Esto es debido a que los linfocitos tienen un sitio receptor de zinc en una proteína de membrana llamada Thy-1.2+ y probablemente existen varias de estas en humanos ²⁹. Por otra parte también en la literatura se encuentran datos en los cuales se describe que el zinc a una concentración de 0.03 mg/ml (0.461×10^{-3} M) en cultivo de linfocitos humanos induce huecos cromatídicos, rompimientos y decrece el índice mitótico de manera dosis dependiente ⁶⁷.

El acetato de zinc (7.0-21.0 $\mu\text{g/ml}$) induce aberraciones cromosómicas y poliploidía en linfocitos humanos expuestos durante la fase G_0 . El cloruro de zinc fue tóxico para el cultivo de linfocitos humanos a una concentración de 3×10^{-3} M. Asimismo fueron reportados cromosomas dicéntricos a bajas concentraciones (3×10^{-5} M) de ZnCl_2 agregadas al tiempo cero, permaneciendo durante todo el tiempo de cultivo ⁶⁷. Con respecto al ion zinc, se menciona que en cultivo de linfocitos humanos a una concentración de 0.03 mg/ml (4.16×10^{-4}) puede formar huecos cromatídicos, rompimientos y decrece el índice mitótico de manera dosis dependiente.

En las aberraciones numéricas está involucrada la perturbación en el huso, indicando la estrecha afinidad del metal a los grupos tiol, ya que el zinc es el metal más efectivo para despolimerizar ARN. Los iones zinc pueden romper las uniones fosfodiéster, además de ser selectivo, ya que se une a las uniones fosfodiéster de los nucleótidos de citocina y uracilo, esta especificidad tiene una aplicación en la determinación de la secuencia nucleotídica, ya que tanto la ARN polimerasa y la ADN polimerasa son metaloenzimas que requieren de

zinc y si este es substituido por otro, causa un error en la incorporaci3n de las bases tanto de desoxiribonucleotidos como de ribonucleotidos⁹.

Con respecto al Aluminio se ha encontrado que en c3lulas linfoides el cloruro de aluminio a una concentraci3n de 4.8×10^{-3} M inhibe la sntesis del ADN en linfocitos de ni1os⁶⁸. En estudios con sulfato de aluminio en linfocitos humanos se encontr3 que a una concentraci3n de 20 $\mu\text{g/ml}$ de medio provoca un incremento significativo del ndice de replicaci3n, ICH, aberraciones cromos3micas y micron3cleos comprob3ndose que tiene una alta afinidad por el ADN y ARN⁴³.

Por otra parte del aluminio se menciona que es un metal que forma complejos coordinados y sales. Sin embargo, sus sales experimentan hidr3lisis en agua y fluidos biol3gicos, previniendo su completa absorci3n a trav3s de membranas biol3gicas¹⁸.

La poca informaci3n acerca del aluminio, en cuanto citotoxicidad se ha descrito en estudios del cerebro donde reduce la corriente en los canales de calcio pero no en las bombas sodio potasio de neuronas²².

Una administraci3n oral cr3nica de sulfato de aluminio y sus complejos con potasio y sulfato f3rrico inducen da1o en el huso mit3tico "in vivo" en ratones⁶⁷. In vivo se ha encontrado que el aluminio ingerido por ratas a dosis de 0.2 a 0.8 mM/peso se elimina v3a bilis y se puede concentrar en tejidos suaves de las ratas⁶⁹.

Se sabe que los iones met3licos se pegan a la superficie del ADN en los grupos fosfatos provocando una estabilizaci3n de la doble h3lice, este fen3meno se debe a que los grupos fosfato proporcionan una carga negativa a la superficie del ADN y al unirse los iones positivos neutralizan su carga dando como resultado una estabilizaci3n de 3ste, tambi3n pueden unirse a las bases nitrogenadas compitiendo en las uniones de puente de hidr3geno ocasionando problemas durante la replicaci3n del ADN como es en el caso del cobre¹⁹ (ver figura 15).

El cobre es un agente mutag3nico potencial ya que provoca una deficiente sntesis de ADN "in vitro". En la forma de sulfato el cobre induce desintegraci3n de la cromatina y decremento del ndice mit3tico⁷⁰.

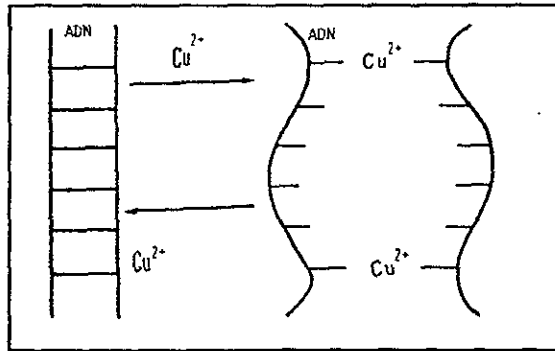


Figura 15. Ilustra la forma de como interaccionan los iones cobre sobre el ADN ⁹.

Dentro del área de los biomateriales la citotoxicidad y genotoxicidad toma como parámetros a la composición química y el tamaño de las partículas metálicas, ya que éstas influyen el tipo de respuesta que van a provocar en un tejido, y sobre todo el tamaño de partícula puede ser el causante de cáncer, muerte o irritación celular alrededor de los tejidos donde son implantados los metales que forman parte de una prótesis ⁷¹. Además cuando los fragmentos están en contacto con fluidos corporales o soluciones similares de acuerdo al tipo de ion metálico estos reaccionarán y sufrirán corrosión o formarán en su superficie una capa de pasivación, que impedirá que este siga disolviéndose ⁴. Una tamaño de polvo metálico menor a $1\mu\text{m}$ puede provocar más daño celular que uno mayor ⁷². Hoy en día se conoce que los tejidos y fluidos alrededor de los implantes pueden contener una cantidad significativa tanto de partículas y iones, las primeras han sido implicadas en el desarrollo de inflamación crónica, reabsorción ósea, infección y neoplasia ^{72, 73, 74}.

Las mejores aleaciones que se utilizan hoy en día en implantes aunque tengan propiedades mecánicas excelentes y alto grado de biocompatibilidad, debido al proceso de corrosión y desgaste hace que estas liberen pequeñas partículas (entre $0.1\text{-}5\mu\text{m}$) y iones solubles que permanecen en el cuerpo, esto ha preocupado por la posibilidad de una gran exposición a los productos de la degradación por un largo periodo de tiempo, ya que se sabe que numerosos metales han mostrado ser carcinogénicos y citotóxicos ^{67, 72, 74}.

En uno de los primeros estudios que se llevaron a cabo con partículas Pappas *et al.*⁷¹ describe trabajos en que se probaron partículas de zinc, cobre, vanadio y aluminio de 4 - 0.01 μm en cultivo de fibroblastos de conejo y en una línea celular de carcinoma humano (KB) a concentraciones de 3.3, 33 y 330 $\mu\text{g/ml}$, y se encontró que sobre las partículas de aluminio y vanadio el crecimiento es satisfactorio, en cambio sobre las de zinc hubo un 60 % de inhibición del crecimiento de ambos tipos celulares y el cobre lo inhibe completamente.

En un estudio más reciente de Doran *et al.*⁷⁴ investigó y comparó la capacidad de los metales más comúnmente usados en implantes ortopédicos para inducir toxicidad y neoplasia en una línea celular de fibroblastos de ratón. Fueron probados ocho metales (cobalto, cromo, níquel, hierro, molibdeno, aluminio, vanadio y titanio) y sus aleaciones (acero inoxidable, cobalto-cromo y titanio-aluminio-vanadio), tanto en forma de partículas menores a 25 μm a una concentración de 5 a 500 $\mu\text{g/ml}$ y sales solubles (cloruros) a 1 a 500 $\mu\text{g/ml}$. Las sales metálicas provocaron más transformación que las partículas debido a que las células tienen una velocidad de fagocitosis para las sales más alta que para las partículas metálicas, las sales menos tóxicas fueron las de titanio y aluminio, ya que solo a concentraciones altas (500 $\mu\text{g/ml}$) produjeron daño. Con respecto a las partículas las menos tóxicas fueron también de los mismos metales incluso a concentraciones altas de 500 $\mu\text{g/ml}$.

Por otra parte, los metales que son implantados en el cuerpo son afectados por el medio fisiológico de éste, por lo cual el proceso de corrosión es el que más causa liberación de iones^{1,4}. Los iones metálicos liberados de los implantes pueden ser diseminados a nodos linfáticos locales y regionales o también a sitios más distantes. Estos representan una reserva potencial de iones solubles, los cuales pueden ser liberados localmente o en la circulación sistémica. Las complicaciones potenciales de estos iones metálicos pueden incluir toxicidad, reacciones alérgicas, desordenes neurológicos y enfermedades metabólicas del hueso.

Muchas veces algunos iones metálicos en medio acuoso forman hidróxidos dependiendo de su concentración y del pH. Para el caso del Zn(OH) es formado a partir de Zn^{+2} en solución acuosa, la reacción se puede llevar a cabo aproximadamente entre un pH

de 7-9.5, su acumulación eleva el pH de la solución acuosa, esto puede pasar con otros metales como el Fe^{2+} , Al^{3+} y Cu^{2+} , con la única diferencia de que el Zn(OH) es neutro eléctricamente, mientras que las de los demás no ³⁶. Como se sabe todos los hidróxidos u óxidos existen en soluciones acuosas y pueden sufrir hidrólisis y formar cationes, aniones o especies neutras, de este fenómeno depende la absorción de metales esenciales a nivel fisiológico ⁷⁵.

La absorción de Zn^{2+} a pH 7 se puede dar ya que es un punto de equilibrio donde se pueden formar varias especies, si se incrementa el pH este zinc formará Zn(OH) y precipitará en la solución. Se puede decir que a pH 7 la concentraciones de Zn^{2+} esta en equilibrio con la del Zn(OH)_2 y este puede ser cambiado drásticamente al cambiar la temperatura o el pH del medio (ver figura 16) ³⁶.

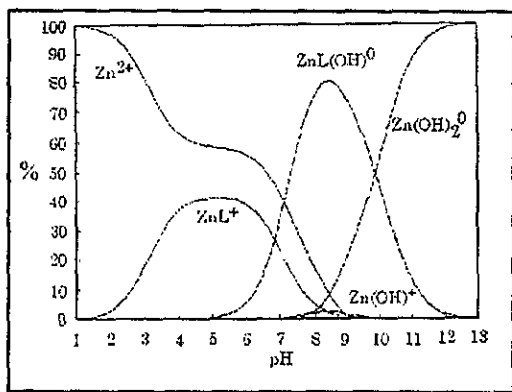


Figura 16. Distribución de especies iónicas de zinc en un sistema de ácido glucónico, en esta figura se puede observar que los iones Zn^{2+} están disponibles en diferentes cantidades dependiendo del pH. Existe una fracción de estos a pH fisiológico, rebasando este las especies que se forman son hidróxidos de zinc. ³⁵

El modo de exposición de un metal, ya sea en solución acuosa de iones, como hidróxido, sales o como placa metálica, provoca diferentes respuestas celulares, esto debido a que la variedad de reacciones es muy grande a escala molecular y es importante tener en cuenta las formas en que se utiliza un metal ⁷⁵.

En un trabajo se expusieron cultivos de osteoblastos (cepa ROS) a los elementos que forman a la aleación titanio-aluminio-vanadio tanto como iones como sales (cloruros) a concentraciones subtóxicas y tóxicas (195-3120 $\mu\text{M/l}$ de medio), los resultados mencionan que el aluminio no reprimió la expresión del ARN mensajero de la fosfatasa alcalina y tiene poca citotoxicidad comparada con el titanio y el vanadio ⁷⁶.

En el trabajo de Maurer *et al.* sometió a osteoblastos y fibroblastos a diferentes modos de exposición a diferentes metales (Ti, Cu, AL, Zn), como soluciones de iones, como óxidos y como placa metálica. Los resultados en osteoblastos con las soluciones de metales disueltos electroquímicamente no presentaron inhibición del crecimiento por parte del Al (4 μM), Ti (0.2 μM), con respecto a los óxidos de Al_2O_3 y TiO_2 , tampoco mostraron inhibición del crecimiento de estas células. Con respecto a los osteoblastos cultivados sobre placas metálicas de Cu^{++} , Zn^{++} , Al^{+++} y Ti^{++} , solo las placas de zinc y cobre inhibieron totalmente el crecimiento de estas células, el titanio y aluminio solo débilmente. Con respecto a los fibroblastos estos fueron sembrados sobre placas metálicas de Cu^{++} y Ti^{++} , y se observó que el cobre inhibió el crecimiento de estas células ⁷⁵.

En estudios "in vivo" en ratas a las cuales se les implantó placas de la aleación zinalco de aproximadamente 1 cm de diámetro por 1 mm de altura tanto subcutánea como intramuscularmente durante 120 días se encontró que los niveles en sangre de los metales que componen esta aleación no varió con respecto al testigo el cual no fue implantado. La concentración máxima de los metales que componen el zinalco fue determinada por medio de EAA y se obtuvieron las siguientes cantidades: el zinc fue de 5.94, aluminio 0.18 y del cobre 1.23 $\mu\text{g/ml}$ ⁷⁷.

Los datos encontrados en cuanto a concentración normales y mínimas tóxicas de los iones Zn, Al, y Cu en sangre humana se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Valores de Concentraciones normales y tóxicas de Zn, Al y Cu en sangre humana ^{1, 18, 40}

| Elemento | Concentración Normal | Concentración mínima tóxica |
|----------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Zn | 7 mg/ml (1×10^{-1} M) | 150 mg/ml (2.29 M). |
| Al | 0.39 mg/ml (1.45×10^{-2} M) | 500 mg/ml (1.85 M). |
| Cu | 1.01 mg/ml (1.59×10^{-2} M) | 250 mg/ml (3.9×10^{-1} M) |

ZINALCO COMO BIOMATERIAL

El proyecto de zinalco como biomaterial lleva seis años de investigación; los estudios de tipo biológico realizados hasta ahora con esta aleación no han concluido y se sigue investigando acerca de las respuestas celulares al interaccionar con este material. Esto ha reunido varias áreas del conocimiento como la física, la química, la biología celular y molecular, la medicina e ingeniería porque el área de biomateriales es multidisciplinaria.

El zinalco se ha sometido a pruebas "in vivo" a través de implantaciones en rata, pruebas de citotoxicidad y pruebas de genotoxicidad empleando larvas de *Drosophila melanogaster* y cultivos de linfocitos humanos. En este trabajo se realizaron pruebas de citotoxicidad y un ensayo de genotoxicidad en linfocitos humanos "in vitro" que, junto con los llevados a cabo por Aguilar *et al.*¹⁴, serán de gran utilidad para el conocimiento de la biocompatibilidad "in vitro" de la aleación zinalco.

OBJETIVO: El objetivo del trabajo fue determinar el posible efecto citotóxico y genotóxico de la aleación zinalco y sus productos de corrosión a través del índice mitótico, la frecuencia de ICH, la cinética de proliferación celular y el índice de replicación.

HIPOTESIS: Si el zinalco y lo productos de corrosión son biocompatibles se espera que los valores promedio de los biomarcadores seleccionados en los cultivos expuestos a la aleación no difieran significativamente de los testigo.

METODOLOGÍA

CULTIVO DE LINFOCITOS.

Se obtuvo sangre venosa periférica con una jeringa previamente heparinizada; a cada tubo de cultivo (Nunc) estéril se le agregó 4 ml de medio RPMI 1640 con L-glutamina (GIBCO) esterilizado por filtración a través de una membrana millipore de 0.45µm, 100 µl de fitohematoglutinina (GIBCO) para estimular la división de los linfocitos y 8 gotas de sangre periférica; los cultivos se incubaron a 37 °C

A las 24 horas, a todos los cultivos se les adicionó 5µg/ml bromodesoxiuridina (BrdU) (Sigma) que es un análogo de la timina a una concentración de 6.5×10^{-6} M. Una hora antes de la cosecha, se agregó a los cultivos 100 µl de colchicina para detener a las células en metafase. Después de 72 horas de incubación, los cultivos fueron centrifugados a 1000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y se les agregó una solución hipotónica de KCl 0.075 M a 37 °C y se reincubaron durante 25 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo se centrifugaron otra vez y se fijaron con metanol-ácido acético 3:1 (Baker, Merck).

Para hacer las laminillas los portaobjetos se lavaron y desengrasaron, se colocaron en un frasco con alcohol y se guardaron en el congelador por 24 horas. Posteriormente sobre cada uno se dejaron caer por lo menos 4 gotas de la suspensión de células desde una altura aproximada de 1 metro; se expusieron al calor de la flama de un mechero y se secaron mediante una corriente de aire.

Tinción diferencial

La técnica de tinción diferencial que se utilizó fue la de fluorescencia más Giemsa⁵⁴ que consistió en colocar las laminillas con metafases durante 40 minutos, en total oscuridad, en una solución del fluorocromo Hoechst 33258(Sigma)-agua destilada (1:9); después se sometieron a la radiación de una lámpara de luz ultravioleta (luz negra) durante 1 hr, previo tratamiento con solución amortiguadora de citratos de sodio salino(CSS; Merck) y se les aplicó un cubreobjetos. Luego se sumergieron en CSS por una hora a 60 ° C. Finalmente fueron teñidas con colorante Giemsa (Merck) diluido (1:10) en amortiguador de Sorensen (pH 6.8) y se observaron al microscopio óptico para obtener los registros.

Biomarcadores.

Para determinar el IM se analizaron 1000 células por lote y se evaluó como sigue:

$$IM = \frac{\text{número de metafases}}{\text{número total de células (1000)}}$$

Para obtener la frecuencia promedio de intercambios por mitosis se observaron 25 metafases de segunda división en cada lote y los ICH intersticiales o dobles se cuantificaron como dos eventos y los terminales o sencillos como un sólo evento.

También se revisaron 100 metafases consecutivas por concentración y se clasificaron como metafase de 1º, 2º y 3º ciclo de acuerdo con el patrón de tinción que presentaron, con este procedimiento se determinó la cinética de proliferación celular (CPC).

El índice de replicación (IR) se calculó para determinar el progreso del ciclo celular usando la fórmula reportada por Tice *et al.*⁷⁸

$$\text{Índice de replicación} = \frac{1 (M1) + 2 (M2) + 3 (M3)}{100}$$

Donde:

1, 2 y 3 = corresponden al número de ciclos de división celular.

M1 = metafases de primer ciclo

M2 = metafases de segundo ciclo

M4 = metafases de tercer ciclo

100 = número de células en metafase contadas.

POLVO DE ZINALCO

El polvo de zinalco fundido, de aproximadamente 4 µm de diámetro en promedio, fue producido al cortar un cilindro de esta aleación con una sierra de diamante para evitar la contaminación con algún otro metal; el tamaño de las partículas fue medido con ayuda de un microscopio de barrido (Leica). El polvo fue esterilizado en seco a 150 °C.

CULTIVO DE LINFOCITOS EXPUESTOS A POLVO DE ZINALCO SIN AGITACIÓN

Esta prueba se realizó para determinar el efecto del polvo de zinalco sobre los cultivos linfocitos humanos utilizando una concentración más alta y un tiempo de

exposición mayor (72 horas) que los probados previamente por Aguilar *et al.*¹⁴ Se empleó sangre venosa de un sólo donador masculino, de 30 años de edad y se prepararon 2 cultivos por cada concentración a probar: 5, 50, 200 y 500 µg de polvo de zinalco/ml de medio RPMI 1640; el polvo de zinalco se agregó al tiempo cero. Al lote testigo no se le añadió zinalco. Se realizaron dos repeticiones de este experimento con 15 días de diferencia.

CULTIVO DE LINFOCITOS SIN ZINALCO Y CON AGITACIÓN

Con estos cultivos se determinó si la agitación afectaba la frecuencia promedio de los biomarcadores en linfocitos y el pH del medio; para ello se formaron dos lotes, uno en condiciones de agitación y otro sin agitación, con dos cultivos de linfocitos cada uno. El experimento se repitió 2 veces con una diferencia de 15 días. Se cultivó sangre del mismo donador de la prueba anterior.

CULTIVO DE LINFOCITOS EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ZINALCO, CON AGITACIÓN

Para simular "in vitro" un proceso de corrosión o dilución provocado por los fluidos corporales, los cultivos de linfocitos en presencia de polvo de zinalco se incubaron a 37 °C con agitación constante. Una vez comprobado que la agitación no afectaba a los cultivos de linfocitos se llevaron a cabo los experimentos de corrosión de polvo de zinalco por agitación. Se cultivó sangre del mismo donador de los otros experimentos, preparándose 6 cultivos por cada concentración de zinalco a probar: A) 25, B) 27.5, C) 30, D) 32.5 E) 37.5, F) 42.5 G) 50, H) 60, I) 75, J) 100, K) 150 y 0.00 µg/ml de medio RPMI 1640. Estas suspensiones permanecieron en agitación desde dos días antes del cultivo para que el zinalco, en contacto con el medio de cultivo, se disolviera o corroyera; se sembraron entonces los linfocitos y se mantuvieron en agitación durante 72 horas a 37 °C. Los 6 cultivos del lote testigo, sin zinalco, también permanecieron en agitación.

Al final del tiempo de cultivo, 3 tubos de cada lote se emplearon en los análisis de espectroscopía de absorción atómica (EAA). Este análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Química de la UNAM. para determinar las concentraciones de iones de zinc, aluminio y cobre presentes en el medio de cultivo. A los

otros tres cultivos de cada lote se les midió el pH y se procedió a cosecharlos. Todo este experimento se repitió dos veces con una diferencia de 30 días.

DISOLUCIÓN ELECTROQUÍMICA DE UN CÍLINDRO DE ZINALCO.

Para obtener una mayor concentración de iones libres en el medio de cultivo que con la prueba de agitación así como para simular una disolución o corrosión “in vitro” más agresiva de la aleación, se utilizó la técnica de disolución electroquímica⁶. Se colocó un cilindro de zinalco de 1 cm de diámetro por 1 cm de altura en un electrodo de trabajo, mismo que se introdujo en un matraz de polarización conteniendo un litro de medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO) que, en este caso se utilizó como medio de corrosión (MC). El cilindro se sometió a un voltaje de -2 a +1 V, a una velocidad de barrido de 20mV/min, por medio de un potencioestato galvanostato (VIMAR) hasta observar la pasivación del material, es decir, hasta que el material se cubriera con una capa de óxido que impidiera que se siguiera corroyendo. Los datos obtenidos con esta disolución se procesaron con el programa Xtalk y fueron graficados para obtener la curva de corrosión que se muestra en el anexo 1.

Una vez concluida la disolución electroquímica del material, el medio de corrosión (MC) se filtró a través de una membrana de 0.22 μm (Millipore) y se almacenó en recipientes de vidrio estériles de 100 ml que se mantuvieron en refrigeración.

En una muestra de 30 ml del medio utilizado para la disolución electroquímica y 30 ml de medio fresco (MF) se determinó a través de EAA, la concentración de iones zinc, aluminio y cobre presentes en ellos, esto se realizó también en el laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Química de la UNAM los datos se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Concentración de iones determinada por EAA después de disolver una placa de zinalco por medio de un potencióstato - galvanostato en medio de cultivo RPMI 1640

| Ion | Concentración en ($\mu\text{g/l}$) | |
|----------|--------------------------------------|------|
| | MC | MF |
| Zinc | 293 | 130 |
| Aluminio | 586 | 0.00 |
| Cobre | 58 | 0.00 |

Al conocerse la concentración de iones en ambos medios, se realizaron 8 diluciones entre ambos, para obtener así, diferentes cantidades de iones libres (ver tabla 11) y determinar sus efectos sobre los cultivos de linfocitos.

Tabla 11. Diluciones del medio con iones (Zn, Al y Cu) ajustadas a 4 ml.

| Cultivo | ml de MC | ml de MF |
|---------|----------|----------|
| A | 4.0 | 0 |
| B | 3.5 | 0.5 |
| C | 3.0 | 1.0 |
| D | 2.5 | 1.5 |
| E | 2.0 | 2.0 |
| F | 1.5 | 2.5 |
| G | 1.0 | 3.0 |
| H | 0.5 | 3.5 |
| T* | 0 | 4.0 |

*Testigo

En este caso se trabajó con muestras de sangre de 3 diferentes donadores jóvenes de edad promedio de 28 años, dos del sexo masculino y uno del sexo femenino. En estos experimentos también se registró el pH al final del cultivo en todos los lotes.

Análisis estadístico.

Con objeto de ir discutiendo los resultados obtenidos, al mismo tiempo de presentarlos, debe mencionarse que, para el índice mitótico (IM) y el intercambio de cromátidas hermanas (ICH) se escogió la prueba estadística de Tukey (REF) para poder analizar la diferencia entre los valores obtenidos.

Para la cinética de proliferación celular (CPC) e índice de replicación (IR) se aplicó la prueba de χ^2 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CULTIVOS DE LINFOCITOS EXPUESTOS A POLVO DE ZINALCO, SIN AGITACIÓN.

En la tabla 11, se muestran los valores promedio del IM de los cultivos de un donador, tratados con diferentes concentraciones de polvo de zinalco: 0, 5, 50, 200 y 500 $\mu\text{g/ml}$, sin agitación del medio.

Este promedio se obtuvo, para cada lote, con los datos de las dos repeticiones del experimento lo que implica 20 cultivos en total. Los valores se encuentran en el intervalo de 0.039-0.047 correspondientes a los lotes de 5, 500 y 50 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Las diferentes concentraciones de polvo de zinalco usadas en los cultivos no alteraron al IM con respecto al testigo, cuyo IM fue de 0.040; con las concentraciones de 50 y 200 $\mu\text{g/ml}$ se registraron los IM más altos, 0.047 y 0.044 respectivamente, sin que la diferencia fuera notable.

Al aplicar la prueba estadística de Tukey se obtuvo, con una $P > 0.05$, que no existe una diferencia significativa entre los IM de ninguno de los lotes de este experimento. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Aguilar *et al.* (datos no publicados), pese a que en este trabajo se utilizó una concentración mayor, de 500 $\mu\text{g/ml}$, y un tiempo de exposición más largo, de 72 horas. No se observó una respuesta citotóxica ni genotóxica debida a las partículas de zinalco.

En la tabla 12, se presenta la frecuencia promedio de ICH por célula para estos mismos cultivos; los valores más altos son los del testigo con 4.40 ICH/célula, mientras que la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ es la que registra menor frecuencia 2.60. Las diferencias que se observaron fueron significativas entre las concentraciones de 50, 200 y 500 μg y el testigo (Tukey, $P < 0.05$). También resultó significativa la diferencia entre las concentraciones de 5 y 50 μg , las cuales tuvieron un promedio de ICH de 3.8 y 2.6 respectivamente. Esto quiere decir que la concentración que aparentemente es menos tóxica es la de 50 μg , ya que provocó menor cantidad de ICH incluso que la concentración más baja.

El hecho de encontrar una frecuencia de daño más alta en el testigo que en las distintas concentraciones de polvo de zinalco se puede deber a que las partículas de zinalco

estén liberando, en pequeñas cantidades, iones de zinc principalmente; se sabe que éstos estabilizan y regulan al DNA y al RNA cuando se unen a los grupos fosfato de los nucleótidos de citosina y uracilo evitando posibles rupturas o deficiencias durante su síntesis^{9, 31}, además el zinc se requiere para el funcionamiento óptimo de la ADN polimerasa y la ARN polimerasa, y también es necesario para pasar por las diversas etapas del ciclo celular^{9, 18, 28, 31, 81}. Con base en esto, es probable que en los lotes experimentales con polvo de zinalco, el ion zinc este estabilizando a la molécula de ADN, evitando algún daño en esta.

Con respecto a la cinética de proliferación celular (CPC) de estos mismos cultivos, se observaron más metafases de segundo ciclo, que de primero y tercero en todos los lotes; lo que se esperaba teóricamente, es que hubiera un 25 % de las primeras, un 50 % de las segundas y un 25 % de las terceras. En este trabajo se presentó un 20 % de primeras, un 70 % de segundas y menos de un 6 % de terceras en todos los lotes. Aparentemente esto indicaría un retraso en la cinética de proliferación, pero incluso esta misma CPC se presentó en el lote testigo. El IR por consiguiente estuvo en el intervalo de 1.81-1.88 siendo el menor el correspondiente al testigo y lote tratado con 500 µg/ml. Los valores de la CPC y del IR se muestran en la Tabla 12.

Las variaciones observadas en la CPC e IR no fueron estadísticamente significativas al aplicar la prueba de χ^2 ($P > 0.05$).

Por lo tanto las diferentes concentraciones de polvo de zinalco utilizadas no afectan la proliferación celular, tampoco existe citotoxicidad ni genotoxicidad bajo las condiciones probadas en estos experimentos.

CULTIVOS DE LINFOCITOS SIN ZINALCO Y CON AGITACIÓN.

Estos cultivos se llevaron a cabo para determinar si la agitación constante ocasiona algún cambio en los biomarcadores. Se observó que el IM bajo estas condiciones fue más alto, 0.057, que para los cultivos no agitados, 0.043, aunque estadísticamente las diferencias no fueron significativas (Tukey, $P > 0.05$) como puede verse en la Tabla 13. La medición

del pH al final del de cada cultivo mostró que la agitación no hace variar este parámetro con respecto a los no agitados. Por lo tanto se comprueba que la agitación no afecta la división celular, es decir no se observa citotoxicidad ni tampoco altera la acidez / basicidad del medio.

La frecuencia promedio de ICH de estos cultivos se encuentra en el intervalo de 3.72 y 3.60, como se aprecia en la Tabla 14; la primera corresponde a los cultivos en los cuales no hubo agitación mientras que la última se determinó en los cultivos agitados. Las diferencias no fueron significativas (Tukey, $P > 0.05$), por lo que en este caso es posible afirmar que la agitación no produjo daño en el material genético de las células en cultivo.

Respecto a los valores de la CPC; se observa que hubo un mayor número de metafases de segundo ciclo que de primero y tercero, que es lo que se esperaba. Los valores del IR para los lotes que estuvieron en agitación fue de 1.93, mientras que, para los que no se agitaron fue de 2.01. Todos estos resultados no presentaron diferencias estadísticamente significativas (χ^2 , $P > 0.05$), lo que implica que la agitación no afecta la replicación celular (Tabla 14).

La medición del pH se llevó a cabo para verificar que la agitación no hubiera provocado fluctuaciones de este parámetro en el medio de cultivo ya que el pH fisiológico de éste es importante para el metabolismo celular, sobre todo para mantener estable la osmolaridad de las células. Además, el pH puede modificarse dependiendo de las concentraciones, de las sustancias esenciales utilizadas en el medio, de la temperatura, de la cantidad de oxígeno disuelto, etc.^{35, 36}. El pH no varió en ninguno de los lotes; esto indica que la agitación afectó este parámetro.

CULTIVOS DE LINFOCITOS TRATADOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE POLVO DE ZINALCO, CON AGITACIÓN.

Estos cultivos, en contraste con los anteriores, estuvieron sometidos a agitación con el polvo de zinalco en las diversas concentraciones probadas.

En la tabla 15, se muestran las concentraciones de Zn, Al y Cu, determinados por espectrofotometría de absorción atómica (EAA), encontradas en los medios de cultivo al

término de la exposición (120 h). En todos los casos se determinaron iones Zn, Al y Cu, lo que prueba que la aleación se corroe en el medio RPMI 1640 bajo las condiciones de agitación.

Es importante señalar que en el medio del lote testigo (sin zinalco), sólo se detectaron iones Zn debido a que es un complemento mineral en medios de cultivo celulares porque juega un papel importante en el metabolismo celular ^{54,55}.

En la Tabla 16, se presentan los valores de IM obtenidos de las dos repeticiones de los 12 lotes distintos; no se observan grandes variaciones en este biomarcador, el testigo junto con las concentraciones D y E tuvieron los IM más altos 0.043, 0.042 y 0.041 respectivamente, mientras que el más bajo fue de 0.032 que corresponde al lote F. Esta última difiere significativamente del testigo y con respecto a las concentraciones D y E (Tukey, $P < 0.05$). Los cultivos A, B, C, G; H e I no tuvieron diferencias significativas con respecto al testigo ni a los lotes D, E, F, excepto para las concentraciones J y K donde no hubo proliferación celular debido al incremento del pH.

Es convenientemente señalar que las concentraciones de los iones Zn, Al y Cu obtenidas por este método, son menores que de las reportadas como normales en la sangre, y que no llegan a las concentraciones mínimas tóxicas (ver Tabla 9), lo cual hace suponer que los iones que más se requieren, como es el caso del zinc, son aprovechados por parte de las células para llevar a cabo sus funciones. En general no se registraron variaciones notables en el IM, sin embargo la concentración F difiere significativamente del testigo y con las concentraciones D y E, lo cual implica una posible susceptibilidad por parte del donador a esta concentración. Otra explicación es que el ion zinc de alguna manera esté siendo anulado por los demás iones presentes en el medio impidiendo que participe en el ciclo celular, disminuyendo así el IM; como ya explicamos anteriormente el ion Zn es de gran utilidad durante las diversas etapas del ciclo celular incluyendo la mitosis. Podemos decir que las concentraciones utilizadas no fueron citotóxicas

En cuanto a la frecuencia de ICH de estos mismos cultivos se observa, en la Tabla 17, que la concentración F tuvo el promedio ICH por célula más alto 4.40, el más bajo correspondió a la D con 2.84. Ninguna concentración varió de modo significativo con relación al testigo, sólo las concentraciones D y F tuvieron cambios de manera significativa entre ellas mismas (Tukey, $P < 0.05$).

Hay que recordar que en todas las concentraciones se encuentran presentes iones de Zn, Al y Cu, y que las interacciones de uno o varios metales en un mismo sistema son complejas y también que la actividad clastogénica o mitostática se altera cuando se usan combinaciones de metales, ya que pueden provocar efectos antagónicos, sinérgicos, aditivos, depresores, etc.⁶⁷. Tal vez, en la concentración F se incrementa el daño, debido a un fenómeno sinérgico de alguno de los metales presentes, que haya entrado en contacto con el ADN o bien que, para esta concentración, resultan susceptibles las células del donador.

En lo que se refiere a la CPC e IR de los cultivos con agitación y polvo de zinalco, se observó que hubo más metafases de segundo ciclo en todos los cultivos, más del 70 %; esto se reflejó en el IR el cual estuvo entre 1.80-1.98. Estadísticamente no se obtuvieron diferencias significativas al aplicar la prueba de χ^2 ($P > 0.05$).

En los lotes expuestos a las concentraciones más altas (J y K) no se pudieron registrar los biomarcadores porque no hubo proliferación celular debido a la elevación del pH del medio de cultivo provocado por los productos de la corrosión del zinalco. Como observamos en la Tabla 16, en todos los tratamientos con zinalco hubo iones disueltos en el medio de cultivo, lo cual sugiere que el zinalco se corroe y que de alguna forma, en las concentraciones más altas los iones reaccionaron con el medio, produciendo una elevación del pH.

El medio de cultivo RPMI 1640 como todos tiene un indicador colorido de pH, que normalmente no cambia, pero en nuestro caso se detectaron modificaciones en los lotes con las concentraciones más altas de iones, por eso se consideró conveniente medir el pH al finalizar el tiempo de cultivo en todos los lotes para compararlo; se registraron valores de pH hasta de 7.87 y 7.90 correspondientes a los cultivos del grupo J y K, respectivamente; más aún se observaron en el fondo de los tubos de cultivo de estas concentraciones precipitados blancos, provocados por las especies de hidróxidos que se forman de Zn y Al cuando la aleación se corroe en un medio fisiológico⁸⁰, ya que éstos se unen a los OH⁻ del medio acuoso incrementando el pH^{34, 35, 36}. Esto puede explicarse porque el zinc actúa como ácido de Lewis y es muy afín a los OH⁻ del agua, mientras que el aluminio se comporta como una molécula anfotérica y forma varias especies de acuerdo al pH del

medio. El aumento de este parámetro provocó que no hubiera proliferación de los cultivos a las concentraciones más altas, por que se sabe que el pH óptimo para la mayoría de las células humanas es de 7-7.4 y es esencial para el equilibrio metabólico de las mismas. ^{18 35}

36

Otra de las razones por la cual el pH se pudo haber elevado en los lotes J y K, es que en experimentos realizados con líquidos fisiológicos a un pH entre 7-7.4 conteniendo iones zinc, se encontró que este intervalo de pH es un punto de equilibrio donde la concentración del ion Zn^{++} están en equilibrio con la del hidróxido de zinc $Zn(OH)_2$ y este punto puede ser cambiado drásticamente al variar la temperatura o el pH del medio (ver figura 16), si existe un cambio se formará hidróxido de zinc principalmente debido a la afinidad del Zn^{++} por los OH^- , éste precipitará y el pH tenderá a básico ^{35, 36}. Este fenómeno puede explicar lo que sucedió en nuestros cultivos que tuvieron las concentraciones más altas de iones disueltos por la presencia de precipitados blancos en el fondo de los frascos de cultivo.

DISOLUCIÓN ELECTROQUÍMICA DE UN CILINDRO DE ZINALCO

Se consideró el medio de cultivo RPMI-1640, como medio de corrosión (MC) para atacar electroquímicamente al zinalco y obtener una concentración de iones de Zn, Al y Cu, mayor que la lograda en los experimentos de agitación; cabe aclarar que en el medio fresco (MF) o testigo se encontraron iones de Zn únicamente. En Tabla 18 se muestran las concentraciones de los iones Zn, Al y Cu de soluciones llevadas a cabo con el medio de corrosión y el medio fresco.

El IM para cada uno de los experimentos con tres donadores llevados a cabo con las soluciones de zinalco disuelto electroquímicamente, se muestran en la Tabla 19. En el caso del donador 1 se observó que el IM no tuvo variaciones importantes en los diversos lotes; el intervalo fue entre 0.032-0.039 y estadísticamente las diferencias entre ellos no fueron significativas (Tukey $P>0.05$).

En el donador 2, en esta misma tabla, se advierte que los valores promedio del IM arrojaron los siguientes resultados: los valores más altos registrados fueron para los lotes D

y C con 0.042 y 0.041 respectivamente, siendo el menor de 0.032 correspondiente a la concentración D. Se encontraron diferencias significativas con la prueba de rangos múltiples de Tukey entre los IM de las concentraciones E y C y la D ($P < 0.05$). Entre las demás concentraciones no las hubo. Las diferencias significativas observadas se pueden deber a una susceptibilidad individual a los iones de Zn, Al y Cu, que también se han encontrado en otros trabajos Aguilar *et al.* (datos no publicados), Ostrosky⁸², Betancour *et al.*⁸³.

En cuanto al donador 3, en la misma tabla 19, las variaciones de los valores observados para el IM, no fueron importantes entre las distintas concentraciones y el testigo. El valor más alto fue el de la concentración A con 0.036, el más bajo fue el de B y E ambas con 0.032, el valor en el testigo fue intermedio, de 0.034. Al aplicar la prueba de rangos múltiples de Tukey las diferencias no fueron significativas ($P > 0.05$).

En general el IM promedio de los tres donadores no cambió de manera significativa en las diversas concentraciones y no hubo diferencias significativas (Tukey, $P > 0.05$). Estos datos indican que las concentraciones de iones obtenidos de la disolución electroquímica del zinc no producen daño a nivel celular excepto en la concentración más alta, H, en la cual no hubo proliferación debido, de nuevo, a un incremento en el pH.

En la Tabla 20 se muestra la frecuencia de ICH de los tres donadores. Se observa que para el donador 1, los valores de ICH se encuentran en el rango de 3.48 a 2.68, en particular el del testigo fue de 3.32, no se observaron variaciones importantes y, por lo tanto, no hubo significancia (Tukey, $P > 0.05$).

La frecuencia promedio de ICH para el donador 2, no presentó variaciones entre los lotes, el valor más alto fue 3.52 y el menor 2.72, estas observaciones tampoco fueron estadísticamente significativas (Tukey, $P > 0.05$).

Las diferencias entre las frecuencias promedio de los ICH para el donador 3, no fueron trascendentes, el intervalo estuvo entre 2.72-3.48 y el valor del testigo fue de 2.92. De nuevo, las diferencias no fueron significativas (Tukey, $P > 0.05$).

El ICH promedio de los tres donadores en los distintos lotes, mostró que no hubo cambio notables entre ellos, excepto para el lote con la concentración más alta, H, en la cual no se pudieron registrar los ICH, debido al incremento del pH en el medio que impidió la proliferación. En general, no hubo diferencias significativas (Tukey, $P > 0.05$) lo que

indica que las concentraciones aplicadas no provocaron genotoxicidad a los linfocitos de ninguno de los tres donadores.

La CPC y el IR promedio de los tres donadores se muestran en la tabla 21; en general para la CPC se observaron mayor cantidad de metafases de segundo ciclo, más del 70 % en todos los lotes, excepto para el H, por las razones señaladas en párrafos anteriores. Con respecto al IR, en los tres donadores y para todos los lotes estuvo siempre cercano a dos. Las diferencias observadas en la CPC e IR no fueron significativas χ^2 ($P > 0.05$). Podemos afirmar que las concentraciones utilizadas no producen daño en la cinética celular, excepto la más alta.

Para la concentración más elevada (H) no se pudieron registrar los biomarcadores en los cultivos de los tres donadores debido al incremento del pH ya que inhibió la proliferación celular. El incremento de este parámetro, como ya explicamos anteriormente, está indicando que a ciertas concentraciones y a factores físicos, éste puede cambiar las características del medio de cultivo.

Las condiciones a las cuales fue sometido el cilindro de zinc en la disolución electroquímica (variación del voltaje principalmente), difícilmente se presentarían en el cuerpo humano ya que son cambios muy drásticos que en el organismo no se presentan regularmente.

También hay que tomar en cuenta que existe un control homeostático, principalmente para el Zn y el Cu por parte de las metalotioneínas que son específicas para estos dos metales, estas proteínas atrapan y expulsan al Cu del citoplasma, mientras que el Zn puede ser expulsado o retenido, si ocurre lo último, éste puede ser utilizado en algunas vías metabólicas (ver Figura 1). Este control es eficiente siempre y cuando las concentraciones no rebasen la cantidad tóxica, que hagan que este sistema se sature, mientras esto no suceda los metales presentes son atrapados eficientemente de manera que no lleguen hasta el ADN o puedan perturbar el metabolismo celular, provocar daños en el ciclo celular o genético ^{18,26} de hecho en este trabajo las concentraciones de los iones metálicos del zinc estuvieron por debajo de la cantidad normal en la sangre, con lo cual se puede asegurar que el sistema de metalotioneínas en los linfocitos funcionó eficazmente, por lo cual no se observó citotoxicidad ni genotoxicidad.

En general con los resultados de este trabajo se puede afirmar que el zinalco no resultó perjudicial para los cultivos de linfocitos humanos; por lo tanto se puede decir que bajo las condiciones del experimento es biocompatible. Sin embargo, para estudios posteriores con esta aleación; es necesario considerar las especies que se forman debido a su corrosión, el estado de oxidación de éstas y los cambios fisicoquímicos que producen en el medio donde la aleación es colocada, ya que como se observó para las concentraciones más altas en este estudio, al elevarse el pH provocaron que no hubiera replicación celular, si esto lo extrapolamos a un estudio "in vivo" donde el zinalco es implantado puede provocar rechazo o inflamación.

Cualquier liberación de un metal, ya sea en forma de partícula o iones solubles en los tejidos alrededor de un implante debe ser tomada en cuenta, de acuerdo a: 1) el nivel normal del metal en el tejido, 2) de que forma actúa el control homeostático ante la liberación del metal y 3) comparar la citotoxicidad "in vitro" con una toxicidad "in vivo".³

La presente investigación sobre la biocompatibilidad del zinalco difiere de otros estudio con diferentes sistemas de prueba, Pappas *et al.*⁷¹ probó partículas de zinc, aluminio y cobre de 4 - 0.01 μm en cultivos de fibroblastos de conejo a 3.3, 33 y 330 $\mu\text{g/ml}$, sobre las partículas de aluminio la replicación fue satisfactoria en todas las concentraciones, con las de zinc hubo un 60 % de inhibición y el cobre suprimió completamente la proliferación. En otro reporte Doran *et al.*⁷⁴ en fibroblastos humanos probó aluminio en forma de partículas con una tamaño < 25 μm a 5 a 500 $\mu\text{g/ml}$, las cuales no fueron tóxicas.

La aleación zinalco tiene como componente principal al zinc con 78 %, en segundo lugar el aluminio con 20 % y en tercero el cobre con 2% en peso. En esta investigación a pesar de utilizar la concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ de partículas de 4 μm , no encontramos un efecto sobre la proliferación de los linfocitos, ni daño citotóxico ni genotóxico.

Sharma y Talukder⁶⁷, mencionan que si se utilizan varios metales a la vez en un sistema de prueba pueden competir entre sí, provocando inhibición del efecto de un metal o al contrario incrementar su acción (sinergismo). Es probable que el presente trabajo alguno de estos fenómenos se este dando, posiblemente provocando inhibición entre Zn, Al y Cu, evitando se unan con las macromoléculas

Estos mismos autores encuentran datos en los cuales se describe que el polvo de zinc a 0.03 mg/ml (0.461×10^{-3} M) en cultivo de linfocitos humanos induce huecos cromatídicos, rompimientos e ICH y decrece el índice mitótico de manera dosis dependiente. En nuestro trabajo esta concentración no se alcanzó ni se rebasó, tanto en los experimentos de agitación como en los de la disolución electroquímica del zinalco, no se observó decremento en el IM, CPC e IR de manera dosis dependiente, tampoco se notó aumento en la frecuencia promedio de los ICH.

En cuanto a los iones metálicos Léonard ⁶⁶ menciona que están involucrados en el daño celular y genético, perturban el huso durante la mitosis, debido a la afinidad por los grupos tiol, como es el caso del ion aluminio, mientras que los iones zinc en exceso despolimerizan ARN pero en concentraciones óptimas se unen a las proteínas llamadas dedos de zinc, las cuales son selectivas y se enlazan a los grupos fosfato de los nucleótidos de citosina y uracilo estabilizando la secuencia nucleotídica en el ADN, también ayudan a que la ARN polimerasa y la ADN polimerasa funcionen en óptimas condiciones. En este caso no se detectó daño causado por los iones de los metales que constituyen el zinalco reflejado en el decremento o incremento de los biomarcadores.

Eichhorn et al. ⁹ y Prediki ²⁸ mencionan que si el zinc es substituido por otro metal en los dedos de zinc o en la ADN y ARN polimerasa, causa error en la incorporación de las bases tanto de desoxiribonucleótidos como de ribonucleótidos, provocando errores en la replicación del ADN y transcripción del ARN. Como se ha mencionado en el sistema que utilizamos tenemos presente a los tres metales Zn Al y Cu que forman al zinalco, si los dos últimos hubieran substituido al Zn en las mencionadas proteínas, se hubiera observado mayor cantidad de ICH, o un decremento en el IM, CPC o IR al ser afectado el RNA mensajero de diversas proteínas, o incluso muerte celular.

Por otra lado Sideris ⁷⁰ afirma que el cobre es un agente mutagénico potencial ya que induce una síntesis deficiente de ADN "in vitro", provocando desintegración de la cromatina y decremento del índice mitótico. Podemos decir que las concentraciones que se obtuvieron de cobre en este trabajo son muy pequeñas, de hecho en el zinalco es el metal que tiene el porcentaje más reducido (2%), tampoco alcanza, ni rebasa las concentraciones reportadas como normales en sangre (ver Tabla 9).

Lin *et al.*⁷⁶ sometió a osteoblastos (cepa ROS) al ion aluminio a concentraciones subtóxicas y tóxicas (195-3120 $\mu\text{M/l}$) encontró que no reprimen la expresión del ARN mensajero de la fosfatasa alcalina y tiene poca citotoxicidad. Maurer *et al.*⁷⁵ muestran que el ion aluminio (4 μM), no inhibe el crecimiento de osteoblastos y fibroblastos. Estos resultados en otros sistemas demuestran que el aluminio no produce daño, lo que corroboran los datos obtenidos en este experimento donde tampoco encontramos daño con las cantidades de iones de este metal en los linfocitos humanos.

El hecho de no encontrar daño citotóxico, ni genotóxico con las concentraciones usadas en este trabajo, tanto de polvos como de iones obtenidos de la aleación zinalco con el método de disolución por agitación y de la disolución electroquímica del zinalco, se puede deber a que las concentraciones máximas alcanzadas con estos métodos, no rebasan las reportadas como normales en la sangre^{1, 18, 40} (ver Tabla 9).

Tabla 11. Índice mitótico (IM) ± error estándar (EE), obtenidos de los tratamientos con polvo de zinalco en linfocitos humanos

| Concentración (µg/ml) | IM ± E.E. |
|-----------------------|---------------|
| Testigo 0.0 | 0.040 ± 0.003 |
| 5 | 0.039 ± 0.003 |
| 50 | 0.047 ± 0.003 |
| 200 | 0.044 ± 0.004 |
| 500 | 0.039 ± 0.006 |

No hubo diferencias significativas (Tukey, $P > 0.05$)

Tabla 12 Intercambio de cromátidas hermanas (ICH), cinética de proliferación celular (CPC) e índice de replicación (IR) obtenidos de los tratamientos con polvo de zinalco en linfocitos humanos

| Concentración (µg/ml) | ICH X ± E.E. | CPC # Metafases | | | IR |
|-----------------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|------|
| | | 1 ^a | 2 ^a | 3 ^a | |
| Testigo 0.0 | 4.40 ± 0.37 * | 21 | 77 | 2 | 1.81 |
| 5 | 3.80 ± 0.32 ♦ | 22 | 74 | 4 | 1.82 |
| 50 | 2.60 ± 0.20 * ♦ | 23 | 73 | 4 | 1.81 |
| 200 | 3.20 ± 0.20 * | 20 | 78 | 2 | 1.82 |
| 500 | 3.28 ± 0.19 * | 18 | 76 | 6 | 1.88 |

* Diferencias significativas del testigo y los experimentales (Tukey, $P > 0.05$).

♦ Diferencias significativas entre los experimentales (Tukey, $P > 0.05$)

No hubo diferencias significativas (χ^2 , $P > 0.05$)

Tabla 13. Índice mitótico (IM), obtenido de los tratamientos con y sin agitación en linfocitos humanos sin polvo de zinalco.

| Lote | IM ± E.E. |
|---------------|---------------|
| Sin agitación | 0.043 ± 0.002 |
| Con agitación | 0.059 ± 0.003 |

No hubo diferencias significativas (Tukey, $P > 0.05$)

Tabla 14. Intercambio de cromátidas hermanas (ICH), cinética de proliferación celular (CPC) e índice de replicación (IR) obtenidos de los tratamientos con y sin agitación en linfocitos humanos

| Lote | ICH X ± E.E. | CPC # Metafases | | | IR |
|---------------|--------------|-----------------|----------------|----------------|------|
| | | 1 ^a | 2 ^a | 3 ^a | |
| Sin agitación | 3.72 ± 0.30 | 22 | 67 | 15 | 2.01 |
| Con agitación | 3.60 ± 0.24 | 18 | 71 | 11 | 1.93 |

No hubo diferencias significativas (Tukey, $P > 0.05$).

No hubo diferencias significativas (χ^2 , $P > 0.05$)

Tabla 15. Concentración promedio de iones metálicos determinados por medio de EAA, obtenidos del zinalco disuelto por agitación en medio de cultivo RPMI 1640 durante 120 hr

| mg/ml de polvo de zinalco sometidos a disolución | Concentración 10 ⁻⁵ M | | |
|--|----------------------------------|-------|--------|
| | Zn | Al | Cu |
| Testigo 0.0 | 0.198 | 0.00 | 0.00 |
| A) 25.0 | 0.289 | 0.370 | 0.0157 |
| B) 27.5 | 0.350 | 0.426 | 0.0173 |
| C) 30.0 | 0.731 | 0.455 | 0.0188 |
| D) 32.5 | 0.822 | 0.511 | 0.0204 |
| E) 37.5 | 0.838 | 0.522 | 0.0220 |
| F) 42.5 | 0.853 | 0.530 | 0.0223 |
| G) 50.0 | 0.990 | 0.593 | 0.0251 |
| H) 60.0 | 1.158 | 0.704 | 0.0283 |
| I) 75.0 | 1.401 | 0.852 | 0.0346 |
| J) 100 | 1.670 | 1.037 | 0.0424 |
| K) 150 | 2.810 | 1.740 | 0.0755 |

Tabla 16. Índice mitótico (IM), obtenido de los tratamientos con polvo de zinalco en linfocitos humanos con agitación constante

| Concentración | IM ± E.E. |
|---------------|-------------------------------|
| Testigo | 0.043 ± 0.002 * |
| A) | 0.040 ± 0.002 |
| B) | 0.040 ± 0.006 |
| C) | 0.039 ± 0.004 |
| D) | 0.042 ± 0.005 ♦ |
| E) | 0.041 ± 0.002 ♦ |
| F) | 0.032 ± 0.002 * ♦ |
| G) | 0.040 ± 0.003 |
| H) | 0.039 ± 0.002 |
| I) | 0.038 ± 0.003 |
| J) | No hubo proliferación celular |
| K) | No hubo proliferación celular |

* Diferencias significativas entre el testigo y los experimentales (Tukey, P > 0.05)

♦ Diferencias significativas entre los experimentales (Tukey, P > 0.05)

Tabla 17. Intercambio de cromátidas hermanas (ICH), cinética de proliferación celular (CPC) e índice de replicación (IR) obtenidos de los tratamientos con polvo de zinalco en linfocitos humanos con agitación constante

| Concentración | ICH X ± E.E. | CPC # Metafases | | | IR |
|---------------|-------------------------------|--------------------|----|----|------|
| | | 1ª | 2ª | 3ª | |
| Testigo | 3.83 ± 0.33 | 18 | 73 | 9 | 1.91 |
| A) | 3.20 ± 0.35 | 14 | 74 | 12 | 1.98 |
| B) | 3.28 ± 0.29 | 17 | 70 | 13 | 1.96 |
| C) | 3.20 ± 0.21 | 16 | 75 | 9 | 1.93 |
| D) | 2.84 ± 0.26 ♦ | 18 | 72 | 10 | 1.92 |
| E) | 3.92 ± 0.32 | 17 | 71 | 12 | 1.95 |
| F) | 4.40 ± 0.37 ♦ | 15 | 72 | 13 | 1.98 |
| G) | 3.44 ± 0.41 | 19 | 69 | 12 | 1.93 |
| H) | 3.84 ± 0.35 | 23 | 68 | 9 | 1.80 |
| I) | 3.88 ± 0.24 | 22 | 68 | 10 | 1.88 |
| J) | No hubo proliferación celular | | | | |
| K) | No hubo proliferación celular | | | | |

♦ Diferencias significativas entre los experimentales (Tukey, $P > 0.05$)

No hubo diferencias significativas (X^2 , $P > 0.05$)

Tabla 18. Concentración de iones de las diluciones realizadas con el medio utilizado en la disolución electroquímica del zinalco.

| Concentración | Concentración 10^{-5} M | | |
|---------------|---------------------------|------|-------|
| | Zn | Al | Cu |
| Testigo | 0.198 | 0 | 0 |
| A) | 3.19 | 2.23 | 0.083 |
| B) | 3.21 | 2.24 | 0.084 |
| C) | 3.50 | 2.45 | 0.092 |
| D) | 3.67 | 2.58 | 0.096 |
| E) | 3.76 | 2.63 | 0.101 |
| F) | 3.82 | 2.67 | 0.100 |
| G) | 4.29 | 3.00 | 0.113 |
| H) | 4.48 | 3.16 | 0.118 |

Tabla 19. Índice mitótico (IM), de linfocitos humanos obtenido de los tratamientos con zincalco disuelto electroquímicamente (Donador 1, 2 y 3).

| Concentración | IM Donador 1 | IM Donador 2 | IM Donador 3 | X IM ± E.E. |
|---------------|-------------------------------|------------------|---------------|----------------|
| Testigo | 0.039 ± 0.001 | 0.038 ± 0.001 | 0.034 ± 0.002 | 0.037 ± 0.0011 |
| A) | 0.036 ± 0.004 | 0.035 ± 0.002 | 0.036 ± 0.003 | 0.035 ± 0.0014 |
| B) | 0.032 ± 0.002 | 0.036 ± 0.002 | 0.032 ± 0.001 | 0.033 ± 0.0011 |
| C) | 0.038 ± 0.003 | 0.041 ± 0.001 ♦ | 0.034 ± 0.003 | 0.037 ± 0.0017 |
| D) | 0.036 ± 0.003 | 0.032 ± 0.002 ♦ | 0.033 ± 0.001 | 0.033 ± 0.0012 |
| E) | 0.039 ± 0.001 | 0.042 ± 0.0001 ♦ | 0.032 ± 0.002 | 0.037 ± 0.0019 |
| F) | 0.034 ± 0.002 | 0.039 ± 0.004 | 0.033 ± 0.003 | 0.035 ± 0.0018 |
| G) | 0.037 ± 0.002 | 0.037 ± 0.004 | 0.031 ± 0.001 | 0.035 ± 0.0017 |
| H) | No hubo proliferación celular | | | |

♦ Diferencias significativas entre los experimentales (Tukey, P > 0.05)

Tabla 20. Intercambio de cromátidas hermanas (ICH), de linfocitos humanos obtenidos de los tratamientos con zincalco disuelto electroquímicamente (Donador 1, 2 y 3).

| Concentración | ICH Donador 1 | ICH Donador 2 | ICH Donador 3 | X ICH ± E.E. |
|---------------|-------------------------------|---------------|---------------|-----------------|
| Testigo | 3.32 ± 0.24 | 3.52 ± 0.32 | 2.92 ± 0.31 | 3.25 ± 0.17 |
| A) | 2.72 ± 0.20 | 2.96 ± 0.34 | 3.08 ± 0.34 | 2.92 ± 0.17 |
| B) | 2.80 ± 0.21 | 3.20 ± 0.37 | 2.72 ± 0.33 | 2.90 ± 0.18 |
| C) | 3.04 ± 0.22 | 3.28 ± 0.34 | 3.40 ± 0.35 | 3.24 ± 0.17 |
| D) | 3.08 ± 0.23 | 2.96 ± 0.35 | 3.32 ± 0.33 | 3.12 ± 0.17 |
| E) | 2.68 ± 0.23 | 3.00 ± 0.31 | 3.16 ± 0.29 | 2.94 ± 0.16 |
| F) | 2.96 ± 0.25 | 2.72 ± 0.35 | 3.48 ± 0.32 | 3.05 ± 0.18 |
| G) | 3.48 ± 0.21 | 3.16 ± 0.32 | 3.24 ± 0.36 | 3.29 ± 0.17 |
| H) | No hubo proliferación celular | | | |

No hubo diferencias significativas (Tukey, P > 0.05)

Tabla 21. Cinética de proliferación celular (CPC) e índice de replicación (IR), de linfocitos humanos obtenidos de los tratamientos con zinc disuelto electroquímicamente (Donador 1, 2 y 3).

| Concentración | Donador 1 | | | | Donador 2 | | | | Donador 3 | | | |
|---------------|-------------------------------|----|---|------|-------------|----|----|------|-------------|----|---|------|
| | CPC | | | IR | CPC | | | IR | CPC | | | IR |
| | # Metafases | | | | # Metafases | | | | # Metafases | | | |
| 1* | 2* | 3* | | 1* | 2* | 3* | | 1* | 2* | 3* | | |
| Testigo | 13 | 80 | 7 | 1.94 | 15 | 81 | 4 | 1.89 | 17 | 77 | 6 | 1.89 |
| A) | 18 | 76 | 6 | 1.88 | 18 | 80 | 2 | 1.84 | 20 | 78 | 2 | 1.82 |
| B) | 15 | 79 | 6 | 1.91 | 16 | 76 | 8 | 1.82 | 15 | 76 | 9 | 1.94 |
| C) | 11 | 84 | 5 | 1.94 | 15 | 76 | 9 | 1.94 | 16 | 78 | 6 | 1.90 |
| D) | 20 | 74 | 6 | 1.86 | 18 | 71 | 11 | 1.93 | 20 | 76 | 4 | 1.84 |
| E) | 19 | 76 | 5 | 1.86 | 17 | 73 | 10 | 1.93 | 22 | 75 | 3 | 1.81 |
| F) | 16 | 78 | 6 | 1.90 | 22 | 74 | 4 | 1.82 | 18 | 77 | 5 | 1.82 |
| G) | 14 | 81 | 5 | 1.91 | 20 | 72 | 8 | 1.80 | 17 | 76 | 7 | 1.90 |
| H) | No hubo proliferación celular | | | | | | | | | | | |

No hubo diferencias significativas (χ^2 , $P > 0.05$)

COCLUSIONES

1. Las concentraciones de polvo de zinc sin agitación y el tiempo de exposición utilizados no provocaron variaciones en la frecuencia de los biomarcadores.
2. La agitación de los cultivos no afectó a los linfocitos, ni provocó citotoxicidad o genotoxicidad.
3. La agitación hizo que el polvo de zinc se corroyera.
4. Los cultivos de linfocitos con agitación constante y expuestos a los productos de corrosión del polvo de zinc, no sufrieron daño citotóxico ni genotóxico, a excepción de las dos concentraciones más altas donde no hubo proliferación celular debido al incremento del pH del medio.
5. Las concentraciones de iones Zn, Al, y Cu obtenidas por el método de disolución electroquímica fue más alta que las del método de agitación, pero tampoco causaron citotoxicidad, ni genotoxicidad, excepto en la concentración mas alta donde se incremento también el pH del medio y no hubo proliferación celular.
6. Las cantidades de iones logrados por medio del método de agitación y la disolución electroquímica no rebasan las descritas como normales en la sangre humana.
7. Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que con las concentraciones usadas tanto de partículas como de iones de la aleación zinc(78% en peso de Zn, 20% en peso de Al, 2% en peso de Cu), no se detectaron daños genotóxicos ni citotóxicos en linfocitos humanos bajo las condiciones de este trabajo, y se puede afirmar que esta aleación es biocompatible (excepto en las concentraciones mayores de los experimentos con agitación y disolución electroquímica donde no hubo proliferación celular).

8. Para estudios posteriores con esta aleación; es necesario considerar las especies que se forman debido a su corrosión, el estado de oxidación de éstas y que cambios físicoquímicos producen en el medio donde la aleación es colocada, ya que como se observó para las concentraciones más altas en este estudio, al elevarse el pH provocaron que no hubiera replicación celular, si esto lo extrapolamos a un estudio "in vivo" donde el zinalco es implantado puede provocar rechazo o inflamación.

REFERENCIAS

1. Williams D.F., Toxicology of implanted metals. En: *Fundamental aspects of biocompatibility. Vol. I*, Ed. CRC, Boca Raton USA, pp. 45-61. 1981
2. Watson J.T. Biomaterials and medical implant science: Present and future perspectives *J. Biomed. Res.* 32, 143-147. 1996
3. Kawahara H. *Biological requirement for biomaterials*. Proceeding of the International Simposium on Biomaterial, Taipei, Taiwan, pp. 15-37. 1985
4. Pillar M.R. Manufacturing processes metals : The processing and properties of metal implants, En: *Metal and Ceramics Biomaterials*. Vol. I, CRC Press, USA, pp. 79-105. 1984
5. Williams D.F. Blood Physiology and Biochemistry: Hemostasis and Trombosis, en: *Blood Compatibility*, Vol I, D.F. Williams (Ed). CRC Press Inc. Boca Ratón, USA, pp. 6-7. 1987
6. Bravo I., Sousa S.R., Carvalho G.S., Barbosa M. Metal electrochemical dissolved in human serum inhibit T lymphocyte function. En: *Advanced in Biomaterials*, 10, Elsevier. pp.7-11. 1992.
7. Jerome, K. Fundamental aspects of the corrosion of metallic implants, En: *corrosion and degradation of implant materials*. Ed. Syrett And Acharya. American Society for Testing Materials, USA. pp.107-127. 1979.
8. Hayes W. *Principles and Methods of Toxicology*. Raven Press. USA, pp. 223-272. 1984
9. Eichhorn G.L., Berger N., Butzow J., Heim C., Pitha Y., Tarien E. Some effects of metal ions structure and function of nucleic acids. En: *Metals ions in biological systems. Estudios of some biochemical and eviromental problems*. Sanat K.D.(Ed), Plenum Press. NuevaYork, pp. 43-64.1973.
10. Negrete J., Valdés L., Torres G. Microstructure and mechanical properties of Zn-Al alloys at room temperature.. *Metalurgical Transactions* 14 A, 1931-34. 1983
11. Torres V.G. Microestructura y propiedades mecánicas del Zinalco. *Ciencia* 39, 103-111, 1988
12. Torres V. G., Negrete J., Valdés L. Propiedades y usos del Zinalco. *Rev. Mex. Fis.* 33, 489-501. 1985
13. Pérez N., Piña M., Olivera A., Luna del Villar J., Izquierdo P. Palma B., Torres K., Torres G. Estudio Preliminar de la Biocompatibilidad de la Aleación Zinalco. *Vet. Mex* 27, 325-329, 1996

14. Aguilar M.A., Pomar I., Partida G., Fernández A., Piña C. Non cytotoxic effect of zinalco™ "in vitro". *10th European Conference on Biomaterials Davos*, Suiza, Septiembre 8-11. 1993.
15. Ramirez V. P., Guzmán R.J., Martínez O.A., Piña B.C. Genotoxicity valuation of zinalco in *Drosophila melanogaster*. *3rd International Conference on Zn-AL Alloys*, D.F. México, Marzo 29-31. 1994.
16. Piña C., Torres G., Fortul T., Casaubon T., Pérez N., Saldívar L. Zinalco™ as potencial biomaterial. *10th European Conference on Biomaterials Davos*, Switzerland, September 8-11, 1993.
17. Piña B.C., Torres V.K., Palma C.R., Torres V.G., Baños L., Pérez N., Izquierdo P., Olivera A., Munguía N. Evaluación de la respuesta tisular a implantes de Zinalco, *Ciencia* 46, 524-523, 1995.
18. Frausto Da Silva, J.J, Williams, R.J, *The Biological Chemistry of the Elements*, Claredon Press Oxford, p. 561. 1991
19. Berg J. Potencial metal-binding domains in nucleic binding proteins. *Science* 225, 485-493. 1986
20. Pan T., Coleman J.E. Zinc cluster regulatory protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 20, 77-81. 1990
21. Singel, H. *Metal ions in biological systems, Zinc and its role in biology and nutrition*. Vol. 15. Ed. Marcel Dekker, USA, pp. 135-145. 1983
22. Büsselberg, D. Calcium channels as target sites of heavy metals. *Toxicol. Lett.* 82/83, 255-261. 1995
23. Vallee, B. L., Auld, D.S. Zinc enzymes and protein. *Biochemistry* 29, 564-59. 1990
24. Spiro, T. G. Metal ions in biology, En: *Metal enzymes*. Vol. 5 Ed. Wiley-Interscience, USA, pp. 68-89. 1983
25. Dixon N.E., Sargeson A.M. Metal ion roles in metalloenzymes. En: *Zinc enzymes* Vol. 1. Wiley-Interscience, USA, pp. 54-67. 1983
26. Kägi J.H., Kojima Y. Metallothionein II. *Experientia Suppl.* 52, 123-129. 1988
27. Greisman H.A., Pabo C.O. A General strategy for selecting high-affinity zinc finger proteins for diverse DNA target Sites. *Science* 275, 657-661. 1997
28. Prediki P.F., Sarkar B. Effect of replacement of "Zinc Finger" zinc on estrogen receptor DNA interactions, *J. Biol. Chem* 256, 5842-5846. 1992

29. Warner L. G, Lawrence A. D. Cell surface and cell cycle analysis of metal-induced murine T cell proliferation. *Eur. J. Immunol.* **16**, 1337-1342. 1986.
30. Franze A.M., Archidiacono N., Rocchi M., Marino M., Grimaldi G. 'Isolation and expression analysis of a human zinc finger gene (ZNF41) located on the short arm of the X-chromosome. *Genomics* **7**, 728-736. 1991.
31. Rebar E.J., Greisman H.A. and Pabo C.O. Phage display methods for selecting zinc finger proteins with novel DNA-binding specificities. *Methods In Enzymology* **267**, 129-149. 1996.
32. Aubry M., Marineau C., Zhang F. R., Zahed L., Figlewicz D., Delattre O., Thomas G., De Jong P., Julien J. P., Rouleau G. A. Cloning of six new genes with zinc finger motifs mapping to short and long arms of human acrocentric chromosomes 22 (p and q11.2). *Genomics* **13**, 641-648. 1992
33. Aubry M., Demczuk S., Desmaze C., Aikem M., Aurias A., Julien J. P., Rouleau G. A. Isolation of a zinc finger gene consistently deleted in DiGeorge syndrome. *Hum. Mol. Gene.* **2**,1583-1587. 1993
34. Buckingham, D.A. Hydrolysis by metal hydroxide complex. En: *Biological aspects of inorganic chemistry*, Vol. 37. Wiley Interscience, USA, pp. 141-97. 1976.
35. Baes, F.C., Memer, E.R. The hydrolysis of cations. John Wiley and Sons, USA, pp. 430. 1976.
36. Wegmüller F. Physicooptive behavior of zinc-aquo- hydroxide. *J. Colloid Interf. Sci.* **116**, 312-332. 1987
37. Jin L., Murakami T.H., Janjua N.A., Hori Y. The effects of zinc oxide and diethyldithiocarbamate on the mitotic index of epidermal basal cells of mouse skin. *Acta Medi. Okayama* **48**, 231-236. 1994.
38. Friel K.J., Andrews L.W., Simmons S.B., Miller V.L., Longerich P.H. Zinc absorption in premature infants : comparison of two isotopic methods. *Clin. Nut.* **63**, 342-3427. 1996.
39. Marotta A., Todisco N., Ditoro A. Zinc content of lymphomonocytes in obese children. *Nutrition Res.* **15**, 1411-1415, 1995
40. Emsley J., *The elements*, Oxford University Press, Oxford UK, 3rd edition, pp. 14-15, 56-57, 218-219, 1997.
41. Zuberbühler D. A. Kinetics and mechanisms of Cu/O₂ reactions. En: *Bioinorganic chemistry of copper*. Kenneth D. y Tyeklár, Z. (Eds), Chapman and Hall. USA. pp. 264-276. 1993.

42. Winge D.R., Dameron C.T., George G.N., Pickering I.J., Dance I.G. Cuprous-thiolate polymetallic clusters in biology. Kenneth D. and Tyeklár Z. (Eds), Chapman y Hall. USA, pp. 110-123. 1993.
43. Kumar R. A., Talkuder G., Sharma A. Effects of aluminium sulphate on human leucocytes chromosomes in vitro. *Mutat. Res.* **244**, 179-183. 1990
44. Alberts, B., Bray D. Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. *Molecular Biology of the Cell*. Third Edition, Garland Publishing, Inc., USA, pp. 863-946. 1994
45. Kimball, W, J. Biology. 6ª Ed. W.C.Brown Publishers. Dubeque Iowa, pp. 67-80. 1998
46. Hartwell, L. H., Michael, B. K. Cell Cycle and Cancer. *Science*. **266**, 1821-1828. 1994
47. Murray A. W. Creative Bloks: Cell-Cycle Checkpoints and feedback controls. *Nature* **359**, 599-603. 1992.
48. Russel J.P. *Genetics*. 3ª Edición, Ed. Harper Collins Publishers, USA. pp 12-24. 1992
49. Draeta, G. Cell cycle control in eukaryotes: molecular mechanisms of cdc2. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 378-83. 1990
50. Kirschner M. The cell cycle then and now. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 281-285. 1992
51. Lewin B. Driving the cell cycle: M phase kinase, its partners, and Substrates. *Cell* **61**, 743-752. 1990
52. Watson J.T. Biomaterials and medical implant science : Present and future perspectives. *J. Biomed. Res.* **32**, 143-147. 1996
53. Evans H. J., O'Riordan M.L. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen test. *Mutat. Res.* **31**, 135-148. 1975
54. Sharp J.A. *Introducción al cultivo de los tejidos animales*. Ed. Omega, Barcelona España, p. 57. 1989
55. Freshney R. I. *Culture of animal cells a manual of basic techniques*, Ed Alan R. Liss, Inc. New York, USA, pp. 287-307. 1994
56. Perry P. y Evans H. J. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature (Lond.)* **258**, 121-125. 1975
57. Zurkov V. S., Yakovenko K.N. The culture of lymphocytes as a test subje for evaluation of mutagenic activity of chemicals. *Mutat. Res.* **41**, 108-112. 1976
58. Hansteen I. L. SCE as Monitor of Industrial and Enviromental Toxins. En: *Sister Chromatid Exchange*. Sandberg A. A. (Ed.). Nueva York, pp. 675-69. 1982

59. Schenider E., Nakanishi Y., Lewis J., Sternberg H., Simultaneous examination of sister chromatid exchanges and cell replication kinetics in tumor and normal cells in vivo. *Cancer Res.* **41**, 4973-4975. 1981
60. Wolf S., Bodycote J., Painter R.B. Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster by UV irradiation of diferent stages of cell cycle : the necessity for cell to pass through S. *Mutat. Res.* **25**, 73-81. 1974
61. Tice R. R., Chaillet J., Schneider E. L. Demonstration of espontaneous sister chromatid eschange "in vivo". *Exp. Cell. Res.* **102**, 426- 428. 1976
62. Carrano, A. V., Thompson L. H. Sister chromatid eschange and gene mutation. *Cytogent. Cell. Genet.* **33**, 57-61.1982
63. Perry P. and Wolf S. New Giemsa method for diferential staining of sister chromatids. *Nature* **251**, 156-158. 1974
64. Painter R. B. A replication model for sister chromatid exchange. *Mutat. Res.* **70**, 337-341. 1980
65. Liu L.F., Liu C.C., Alberts B.A. Type II DNA topoisomerasa enzymes which unknot DNA molecule via reversible double strand break. *Cell.* **19**, 697. 1980
66. Léonard A. Mechanims in metal genotoxicity: the significance of in vitro approaches. *Mutat. Res.* **198**, 321-326. 1988
67. Sharma A., Talukder G. Effects of metals on chromosomes of higher organisms. *Environ. Mutagen.* **9**: 191-226. 1987
68. Nordlind, K. Further studies on ability of different metal salts to influence the DNA synthesis of humna limphoid cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **79**, 83-85. 1986
69. Sutherland J. E., Radzanowski G. M., Greger J.L. Bile is an importan route of elimination of ingested aluminum by conscious male Sprague-Dawley rats. *Toxicology* **109**, 101-109. 1996
70. Sideris E.G., Petraki M., Kalfas C. Cu²⁺ as an enviromental mutagenic agent. *Abstract presented at 10th Meeting Mutat. Res.* **85**: 303. 1981
71. Pappas M.A., Cohen J. Toxicity of metal particles in tissue culture. *Jour. Bone Joint Surgery* **56B**, 626-642. 1971
72. Silver H.F. *Biomaterials, medical devices and tissue engineering.* Chapman and Hall. USA, pp.1-44. 1994

73. Granchi D., Verri E., Ciapetti G., Savarino L., Cenni E., Gori A., Pizoferrato A. Effects of chromium extract on cytokine release by mononuclear cells. *Biomaterials* **19**, 283-291. 1998
74. Doran A., Law F. C., Allen M. J., Rushton N. Neoplastic transformation of cells by soluble but not particulate forms of metals used in orthopaedic implants. *Biomaterials* **19**, 751-759. 1998
75. Maurer A. M., Le V. D., Steinemann S. G., Guenther H., Bille J. Surface chemistry and cell reactions. *Helvetica Physica Acta* **80**, 800-803. 1992
76. Lin S.Z., Wataha C. J., Hanks C. T. Effects of metals ions on osteoblast-like cell metabolism and differentiation. *J. Biomed. Mat. Res.* **34**, 26-37. 1997
77. Piña C., Torres C.K., Guzmán J. Preliminary study of connective tissue response to zinc and stainless steel 316 L implants after 120 days. *J. Mat. Sci. Mat. Med.* **9**, 93-97. 1998
78. Tice R., Schenider E., Rary J. The utilization of bromodeoxyuridine incorporation into DNA for the analysis of cellular kinetics. *Exp. Cell. Res.* **102**, 232-236. 1976
79. Salazar. A.M., Herrera L.A. Daño genético inducido por agentes físicos y químicos. *Rev. Fac. Med. UNAM* **35**, 72-83. 1992
80. Genescá J., Uruchurtu J. Corrosion resistance of zinc alloy in sodium chloride solution. In *Advances in Science, Technology and Applications of Zn-Al Alloys*. P 215-218. Edited Torres, G., Zhua Y and C.Piña. UNAM, México. 1994
81. Nriagu J.O., Phillips J.L., Kindred M.K. *Zinc in environment, part II: Health effects*. Wiley, Inc, USA, pp. 199-213. 1980
82. Ostrosky, W.P. El índice mitótico y la cinética de proliferación linfocitaria en el monitoreo biológico. *Gaceta Médica de México*, **130**, 432-437. 1994
83. Betancourt M., Ortiz R., González C., Pérez P., Cortés L., Rodríguez L., Villaseñor L. Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single gel electrophoresis/comet assay. *Mutat. Res.* **331**, 65-67. 1995

ANEXO 1

Curva de corrosión de la aleación Zinalco en medio RPMI 1640.

