



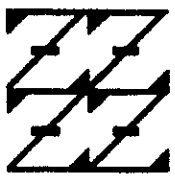
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

EVALUACION DEL EFECTO CITOTOXICO Y GENOTOXICO DEL FLUORURO DE POTASIO SOBRE LOS CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
XOCHITL C. HERNANDEZ VELEZ

U N A M
FES
ZARAGOZA



DIRECTOR DE TESIS: DR. MARIO A. ALTAMIRANO LOZANO

MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

260597



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MIS PADRES:

Clementina y Pedro

**Por el cariño y el apoyo que
me han dado en todo momento.**

A MIS HERMANOS:

Angeles

Gerardo

Marcos

Monica

**Por todos aquellos momentos que
hemos compartido en armonía y unión.**

A Juan Carlos:

**Por el amor, el apoyo y la confianza
que siempre ha depositado en mí.**

**Agradezco al Dr. Mario Altamirano Lozano
por sus valiosos consejos y apoyo
en la elaboración de este trabajo.**

A los miembros del jurado:

**M. en IBSH Elia Roldán Reyes
M. en B.E. Enrique Mendieta Márquez
Q.B.P. Francisco Alvarado Pérez
Biol. Jorge Hernández Montes**

**Por las sugerencias y los comentarios
que hicieron posible un mejor trabajo.**

Esta tesis se llevó a cabo en el laboratorio de Citogenética, Mutagenésis y Toxicología Reproductiva. Bioterio Campo II, FES-Zaragoza, bajo la supervisión del Dr. Mario Altamirano Lozano y contó con el apoyo de la DGAPA proyecto IN-202593.



INDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Posibles manifestaciones de daño al material genético	1
Genética toxicológica	3
El linfocito como sistema de prueba	4
Intercambio de cromátidas hermanas	8
Aberraciones cromosómicas	12
Asociación de satélites	13
Electroforesis de células individuales	19
Características generales del flúor	21
Fuentes de flúor	22
El metabolismo del flúor	29
Toxicología del flúor	32

JUSTIFICACIÓN	37
---------------------	----

HIPÓTESIS	39
-----------------	----

OBJETIVOS	40
-----------------	----

MATERIAL Y MÉTODOS	42
--------------------------	----

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
------------------------------	----

CONCLUSIONES	90
--------------------	----

COMENTARIOS FINALES	92
---------------------------	----

REFERENCIAS	93
-------------------	----

ANEXOS

RESUMEN

El flúor (F) es el décimo tercer elemento más abundante en la corteza terrestre y por lo tanto el hombre está expuesto a este elemento de manera natural (alimentos, agua, aire, suelo) y artificial (insecticidas, fertilizantes, emisiones industriales, productos dentales, etc.). Algunos estudios sugieren que el F podría provocar citotoxicidad o genotoxicidad en concentraciones entre 10-300 $\mu\text{g/ml}$.

En el presente trabajo se estudió el efecto del fluoruro de potasio (KF; 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g/ml}$) sobre el índice mitótico (IM), índice de replicación (IR), intercambio de cromátidas hermanas (ICH), aberraciones cromosómicas (AS) y electroforesis de células individuales (SCG) en cultivos de linfocitos humanos.

Los resultados obtenidos muestran que el KF disminuyó el IM de manera significativa en las concentraciones de 40 y 80 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 y 48 horas de exposición, sin embargo, no modificó el índice de replicación y sólo aumentó la frecuencia de ICH's en la dosis más alta utilizada.

Cuando se analizaron las AC se observó que el total de células con aberración y el total de aberraciones por célula en la concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$ se incrementaron con respecto al

testigo. Mientras que también hubo diferencias al incrementarse el porcentaje de fragmentos cromatídicos en las concentraciones de 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con respecto al testigo. En la concentración de 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se observó una disminución no significativa de aberraciones en los parámetros anteriormente descritos.

Al cuantificar las AS, se observó que el KF no modificó ninguno de los parámetros evaluados.

En la prueba de la viabilidad mediante SCG no se detectó alteración en ninguna de las dosis empleadas con KF, de igual forma sucedió con la migración del ADN en donde se registro un alto número de células con poco daño. Sin embargo, se presentaron diferencias significativas en las células sin daño en las dosis de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en comparación con el testigo; así como también en todas las concentraciones de KF se aumentó el porcentaje de células con daño medio y alto (con excepción de la dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en la categoría de alto daño).

En resumen, los resultados obtenidos indican que el KF es un agente que no fue capaz de alterar la velocidad de replicación de las células ni la frecuencia de AS. Sin embargo, tiende a ser citotóxico provocando la muerte celular a elevadas concentraciones, además de ser un agente clastógeno S-dependiente a bajas concentraciones.

INTRODUCCIÓN

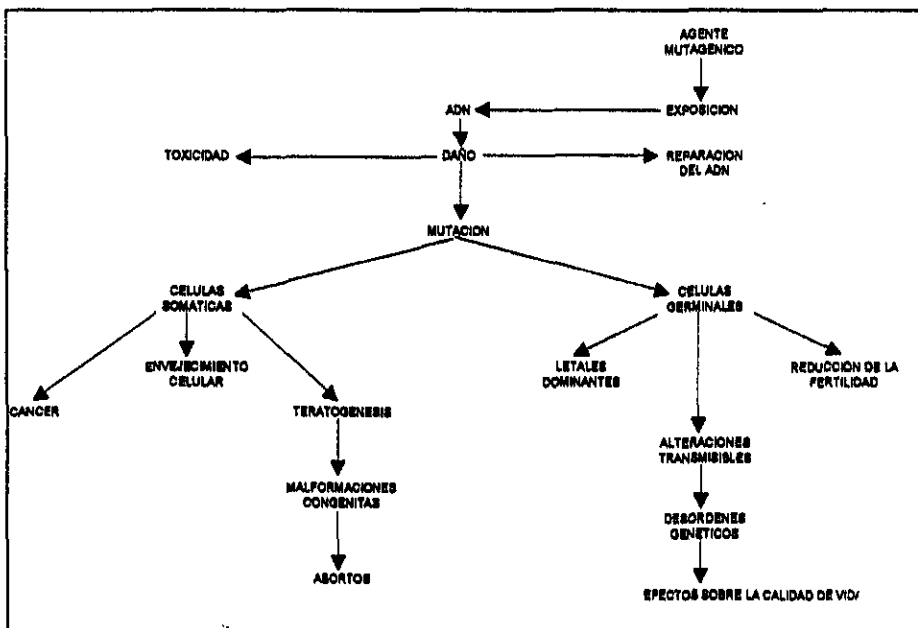
POSIBLES MANIFESTACIONES DE DAÑO AL MATERIAL GENÉTICO

Cuando un individuo se expone a algún agente (físico, químico o biológico) que es mutagénico o que puede ser biotransformado a una especie mutágena dentro del individuo expuesto, estos agentes pueden interactuar con varios constituyentes celulares, incluyendo macromoléculas vitales, como el ácido desoxirribonucleico (ADN), molécula en la que se encuentra codificada la información genética de todos los seres vivos. Un cambio o mutación producida al ADN podrá tener consecuencias para la especie y/o para el organismo (Brusick, 1987; Rodríguez, 1994).

Las mutaciones pueden producirse en las células germinales o en las células somáticas. En el primer caso se puede provocar un incremento en la incidencia de abortos espontáneos, enfermedades genéticas transmisibles, alteraciones cromosómicas no transmisibles (mutaciones letales dominantes), malformaciones congénitas, infertilidad y esterilidad y por lo tanto crear la desestabilidad de las futuras generaciones (Hoffman, 1982; Brusick, 1987; Altamirano, 1992) (Figura 1). Las clases de daño

genotóxico, así como su distribución entre las células y su potencial mutagénico dependen de la naturaleza reactiva del compuesto (o sus metabolitos intermedios); además de su distribución farmacodinámica a través del cuerpo, del tipo de célula así como también de los sistemas de reparación que responden al daño y de la etapa proliferativa de la célula dañada (Hoffman, 1982; Brusick, 1987).

Figura 1.- Posibles manifestaciones de efectos mutacionales en el hombre



Aún cuando los efectos sobre las células somáticas que no se transmiten genéticamente, esto no significa que el daño genético no

contribuya al desarrollo de enfermedades humanas tales como el envejecimiento celular, cáncer o malformaciones congénitas así como una gran variedad de efectos adversos que afectan la calidad de vida del individuo (Hoffman, 1982; Brusick, 1987).

GENÉTICA TOXICOLÓGICA

La Genética Toxicológica surge debido a la preocupación de conocer cuáles son los agentes ambientales que pueden causar daño genético al hombre o producir un efecto adverso a la salud humana (Hoffman, 1982). Es por esto que la Genética Toxicológica se define como el estudio sistemático de los efectos de los agentes físicos, químicos y biológicos presentes en el ambiente sobre el sistema genético de los organismos, así como las consecuencias para el futuro de las especies (Prival, 1980; Moutschen, 1985).

Durante la evolución de esta disciplina científica, más de 200 sistemas de prueba tanto *in vitro* como *in vivo* se han desarrollado y dividido en cuatro grupos dependiendo del nivel de detección del daño genético:

Grupo I: Son todas aquellas pruebas que detectan el posible daño al ADN a nivel molecular, proporcionan información suficiente para clasificar a los agentes como mutágenos potenciales.

contribuya al desarrollo de enfermedades humanas tales como el envejecimiento celular, cáncer o malformaciones congénitas así como una gran variedad de efectos adversos que afectan la calidad de vida del individuo (Hoffman, 1982; Brusick, 1987).

GENÉTICA TOXICOLÓGICA

La Genética Toxicológica surge debido a la preocupación de conocer cuáles son los agentes ambientales que pueden causar daño genético al hombre o producir un efecto adverso a la salud humana (Hoffman, 1982). Es por esto que la Genética Toxicológica se define como el estudio sistemático de los efectos de los agentes físicos, químicos y biológicos presentes en el ambiente sobre el sistema genético de los organismos, así como las consecuencias para el futuro de las especies (Prival, 1980; Moutschen, 1985).

Durante la evolución de esta disciplina científica, más de 200 sistemas de prueba tanto *in vitro* como *in vivo* se han desarrollado y dividido en cuatro grupos dependiendo del nivel de detección del daño genético:

Grupo I: Son todas aquellas pruebas que detectan el posible daño al ADN a nivel molecular, proporcionan información suficiente para clasificar a los agentes como mutágenos potenciales.

Grupo II: Incluye las pruebas que detectan mutaciones a nivel celular, ya sea de una forma directa o indirecta, mediante el empleo de microorganismos, plantas superiores, células en cultivo o mamíferos completos, lo que permite tener un mayor poder de resolución.

Grupo III: Son todos aquellos sistemas que permiten establecer los efectos directos de los agentes mutagénicos sobre los cromosomas.

Grupo IV: Recopila una serie de ensayos a largo plazo, que hacen evidente el efecto de los agentes sobre la descendencia de los organismos tratados.

Estos sistemas abarcan desde organismos unicelulares simples hasta organismos multicelulares complejos e incluyen sistemas que identifican genotoxicidad en células somáticas y en células germinales (Moutschen, 1985; Casciano, 1990).

EL LINFOCITO COMO SISTEMA DE PRUEBA

El linfocito de humanos es un sistema de prueba que pertenece al grupo III de los sistemas anteriormente descritos. Este grupo está designado para estimar el daño cromosómico inducido por agentes químicos (Moutschen, 1985).

Grupo II: Incluye las pruebas que detectan mutaciones a nivel celular, ya sea de una forma directa o indirecta, mediante el empleo de microorganismos, plantas superiores, células en cultivo o mamíferos completos, lo que permite tener un mayor poder de resolución.

Grupo III: Son todos aquellos sistemas que permiten establecer los efectos directos de los agentes mutagénicos sobre los cromosomas.

Grupo IV: Recopila una serie de ensayos a largo plazo, que hacen evidente el efecto de los agentes sobre la descendencia de los organismos tratados.

Estos sistemas abarcan desde organismos unicelulares simples hasta organismos multicelulares complejos e incluyen sistemas que identifican genotoxicidad en células somáticas y en células germinales (Moutschen, 1985; Casciano, 1990).

EL LINFOCITO COMO SISTEMA DE PRUEBA

El linfocito de humanos es un sistema de prueba que pertenece al grupo III de los sistemas anteriormente descritos. Este grupo está designado para estimar el daño cromosómico inducido por agentes químicos (Moutschen, 1985).

Las células linfáticas del cuerpo humano consisten en cerca del 90% de linfocitos que se localizan principalmente en el bazo, ganglios linfáticos y otros tejidos linfáticos organizados y solamente un 2% se encuentran en la sangre circulante (Obe *et al.*, 1975). Tomando como base su actividad inmunológica predominante, se pueden definir dos clases principales de linfocitos: las células T, que son las principales responsables de las reacciones inmunitarias mediadas por células (reacción celular) y los linfocitos B que tienen la capacidad de sintetizar inmunoglobulinas y que por sí mismos son precursores de las células plasmáticas (reacción humoral).

De las dos clases, las células T son las que predominan en la circulación periférica comprendiendo entre un 60 a 80% del total de las células circulantes; mientras que los linfocitos B comprenden sólo entre el 5-10%. El porcentaje restante está compuesto por células null o linfocitos nulos (Celis, 1983; Boggs y Winkelstein, 1985). Todos estos linfocitos tienen un origen común, el cual es una célula indiferenciada, multipotencial, la célula germinal de la médula ósea (Celis, 1983).

Los límites normales de linfocitos en sangre venosa se encuentran entre 1,500-4,000 cél/ml aunque estos números varían dependiendo de la edad del individuo (Boggs y Winkelstein, 1985).

Los linfocitos de sangre periférica se han utilizado ampliamente para el análisis de aberraciones cromosómicas, asociaciones de satélites, intercambios de cromátidas hermanas, mutaciones puntuales, células en proliferación (Ostrosky *et al.*, 1987; Herrera *et al.*, 1991), índice mitótico, endorreduplicación, micronúcleos (Li y Loretz, 1990) y recientemente en la electroforesis de células individuales para la detección de rupturas de hebras del ADN (Fairbairn *et al.*, 1995). Estas células son indicadores extremadamente sensibles para detectar anomalías cromosómicas inducidas *in vivo* e *in vitro*; lo cual ofrece facilidad para marcar evidencias morfológicas de daño al material genético (Evans y O'Riordan, 1974). Es por ello, que los linfocitos presentan las siguientes ventajas como sistema de prueba:

- Son fáciles de cultivar y casi todas sus actividades funcionales pueden simularse *in vitro* (Boggs y Winkelstein, 1985).
- Fácil disponibilidad de una gran cantidad de células humanas: cada ml de sangre proporciona aproximadamente $1-3 \times 10^6$ linfocitos (Evans y O'Riordan, 1974).

- Los linfocitos se distribuyen a través del cuerpo, circulan en todos los tejidos y tienen una proporción de vida larga (2-4 años), permitiendo la detección de efectos mutagénicos en el hombre (Evans y O' Riordan, 1974; Obe *et al.*, 1975; Boggs y Winkelstein, 1985).
- Son capaces de proliferar *in vitro* bajo condiciones experimentales estrictamente controladas y mediante la presencia de un estímulo exógeno, como un mitógeno tal como la fitohemaglutinina (Slacik y Obe, 1976; Preston, 1982; Boggs y Winkelstein, 1985).
- Tanto en la sangre como en los tejidos periféricos los linfocitos, tienen una población de células sincronizadas en la misma fase G_0 o G_1 de la interfase mitótica (Evans y O' Riordan, 1974; Preston, 1982).
- Debido a que los linfocitos son poblaciones sincronizadas, es posible tratar a las células en las diferentes etapas del ciclo celular (G_1 , S o G_2) (Preston *et al.*, 1987).

INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS

Una técnica citogenética de amplio uso debido a su alta sensibilidad y relativa simplicidad es el Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH's) (Brusick, 1987). Este fenómeno fue descrito originalmente por Taylor en 1958 quien encontró que si a los cromosomas se les permitía la replicación una vez en la presencia de timidina tritiada (TH^3) y posteriormente en la ausencia del isótopo autorradiográfico, se observaba que sólo una cromátida de cada cromosoma se marcaba como resultado de la replicación semiconservativa del ADN (Perry y Thomson, 1984).

Los ICH's involucran la ruptura de segmentos simétricos y equivalentes entre las cromátidas de un mismo cromosoma con posterior intercambio y reparación sin pérdida de ADN ni cambios detectables en la morfología cromosómica (Latt, 1974; Mudry *et al.*, 1981; Dean y Danford, 1984). La frecuencia de ICH's se pueden incrementar mediante una gran variedad de agentes físicos y químicos, es así como se ha encontrado que la incorporación de la timidina tritiada, los rayos X, la luz ultravioleta (UV), los agentes alquilantes o los compuestos químicos (mutágenos-carcinogénos),

pueden alterar la incidencia de este evento (Vogel y Bauknecht, 1976) aún en concentraciones de 10 a 100 veces más bajas que las utilizadas para la inducción de aberraciones cromosómicas (Wolff, 1977).

Los ICH's no son un evento letal y varios estudios no han podido demostrar alguna relación con citotoxicidad. El hecho de que los intercambios sean más compatibles con la supervivencia de la célula guió a Wolff (1977) a sugerir una posible relación con mutación. Sin embargo, la naturaleza de la lesión inicial y el mecanismo de formación de los ICH's aún se desconoce (Hartmann *et al.*, 1995). Los mecanismos propuestos para explicar la técnica de tinción diferencial y la formación de ICH's se encuentran en la Figura 2.

El análisis de intercambio de cromátidas hermanas llegó a ser posible siguiendo el desarrollo de técnicas de tinción simple que diferenciaron a las cromátidas hermanas. Su análisis se puede aplicar a cualquier célula que se esté replicando o pueda ser estimulada a dividirse (Perry y Thomson, 1984). La técnica para este análisis se basa en la incorporación de la bromodesoxiuridina (BrdU que es una base análoga de la timidina) al ADN.

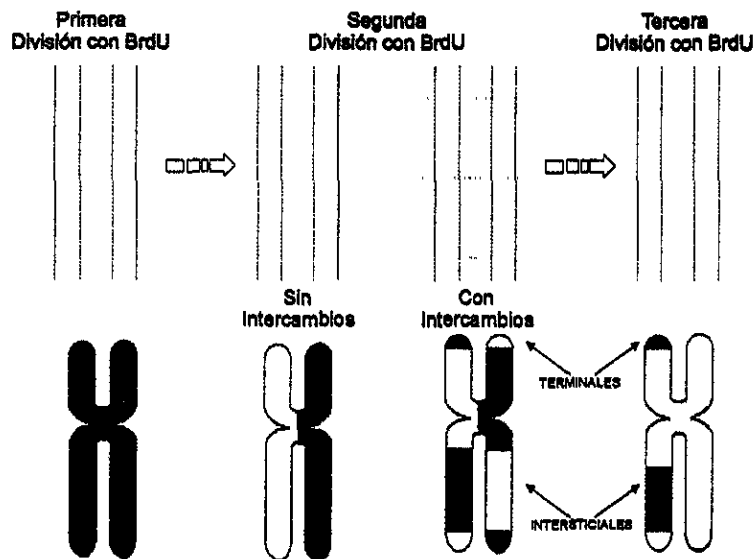


Figura 2.- Mecanismo de formación de los intercambios de cromátidas hermanas en cromosomas que han incorporado bromodesoxiuridina por dos ciclos de replicación. Los intercambios intersticiales se contabilizan como dos eventos y los terminales como un evento.

Para lograr esto, las células deben estar en presencia de la BrdU durante dos ciclos continuos de replicación de ADN, de tal manera que las cromátidas se pueden diferenciar con el tratamiento con el colorante Hoechst 33258 y exponiéndolas a una fuente de luz ultravioleta y luz negra con su posterior tinción con Giemsa (Perry y Evans, 1975; Wolff, 1977, Perry y Thomson, 1984). Cuando se producen los ICH's un cambio en la intensidad de la tinción se puede observar en ambas cromátidas; una coloración oscura en una cromátida con un cambio recíproco en la otra cromátida tornándose de color claro. A estos cromosomas en

segunda división también se les conoce como cromosomas en arlequín (WHO, 1985).

Además, el principio de marcaje diferencial de cromátidas hermanas permite el estudio de la cinética de ciclo celular (CCC), tiempo de proliferación linfocítica (TPL) e índice de replicación (IR) de tal manera que se puede identificar el número de veces que se ha dividido una célula. Es así que las células en primera metafase tienen las cromátidas teñidas uniformemente de color oscuro; mientras que las células en segunda metafase se observan como los cromosomas de arlequín (Perry y Evans, 1975; WHO, 1985) y las células en tercera división o subsecuentes presentan una tinción mezclada, con cromosomas con ambas cromátidas pálidas, con porciones de cromátidas oscuras y lo que resta pálido (Crossen y Morgan, 1977; Roldán, 1992). El análisis de la frecuencia de células en metafase las cuales se han replicado por una (I), dos (II), tres (III) o más generaciones proporciona información valiosa sobre los efectos citostáticos o citotóxicos de agentes químicos (Ivett y Tice, 1982).

ABERRACIONES CROMOSÓMICAS

El daño producido al ADN generalmente se divide en dos grandes categorías: (1) Efectos visibles detectables a través del análisis citogenético de los cromosomas (macrolesiones) y (2) Cambios no visibles (microlesiones) que ocurren a nivel de los nucleótidos (Graedel *et al.*, 1986; Brusick, 1987).

Las macrolesiones pueden ser de dos tipos:

a) Cambios numéricos en el genoma, dentro de los cuales se incluyen a las aneuploidías que involucran la pérdida o ganancia de un cromosoma y las euploidías en donde se presentan juegos extras de cromosomas en una célula. Estas variaciones pueden ser el resultado de varios mecanismos, tales como la no-disyunción de los cromosomas, la división del citoplasma, así como de la fusión de células o endorreplicación (Dean y Danford, 1984; Brusick, 1987).

b) Cambios en la estructura de cromosomas individuales, dentro de los cuales se encuentran a las deleciones que son la pérdida de una porción de un cromosoma, duplicaciones que involucran la inserción de una copia adicional de una porción del cromosoma, inversiones

que se presentan cuando el orden de los genes en un cromosoma son invertidos en una área y por último translocaciones que involucran la transferencia de un segmento de cromosoma de una posición a otra (Searle, 1986; Graedel *et al.*, 1986; Li y Lorentz, 1990).

Por otra parte, las aberraciones estructurales también se pueden clasificar como cromosómicas y cromatídicas. En el primer caso, los rompimientos afectan a las dos cromátidas, mientras que en las aberraciones de tipo cromatídico el rompimiento es en una cromátida. Cada grupo cuenta con diferentes tipos de aberraciones tal y como se muestra en la Figura 3 (Dean y Danford, 1984).

ASOCIACIÓN DE SATÉLITES

En las células humanas en metafase, los cromosomas acrocéntricos de los grupos D y G pueden frecuentemente ser observados asociados o unidos por sus satélites alineados uno con otro en gran proximidad. A esta relación se le conoce como Asociación de Satélites (AS) y se sabe que es el resultado de la participación de los cromosomas acrocéntricos en la formación de los nucleólos, a través de la acción de sus Regiones Organizadoras

que se presentan cuando el orden de los genes en un cromosoma son invertidos en una área y por último translocaciones que involucran la transferencia de un segmento de cromosoma de una posición a otra (Searle, 1986; Graedel *et al.*, 1986; Li y Lorentz, 1990).

Por otra parte, las aberraciones estructurales también se pueden clasificar como cromosómicas y cromatídicas. En el primer caso, los rompimientos afectan a las dos cromátidas, mientras que en las aberraciones de tipo cromatídico el rompimiento es en una cromátida. Cada grupo cuenta con diferentes tipos de aberraciones tal y como se muestra en la Figura 3 (Dean y Danford, 1984).

ASOCIACIÓN DE SATÉLITES

En las células humanas en metafase, los cromosomas acrocéntricos de los grupos D y G pueden frecuentemente ser observados asociados o unidos por sus satélites alineados uno con otro en gran proximidad. A esta relación se le conoce como Asociación de Satélites (AS) y se sabe que es el resultado de la participación de los cromosomas acrocéntricos en la formación de los nucleólos, a través de la acción de sus Regiones Organizadoras

FIGURA 3. CLASIFICACION DE LAS ABERRACIONES CROMOSOMICAS ESTRUCTURALES

TIPO DE ABERRACION	FIGURA	DESCRIPCION
I. Tipo Cromosómico		
(1) Gap (G) o lesión acromática		Involucra ambas cromátidas de un cromosoma en loci idénticos. La región cromosómica distal del gap esta alineada con la región proximal. La región no teñida no es más grande que el diámetro de una cromátida.
(2) Rompimiento cromosómico o deleción terminal		Involucra solo un cromosoma y como en todas las aberraciones de este tipo se producen en la etapa G1 o G0.
(3) Intercambio		Involucra 2 o más lesiones en el mismo o diferentes cromosoma(s). De un intercambio entre dos cromosomas en G1. El fragmento es parte del y no debe cuantificarse como un evento independiente.
(a) Entre cromosomas; C/C (dos centromeros) intercambio		El fragmento es parte del intercambio y no debe cuantificarse como un evento independiente. Un fragmento se debe localizar en cada anillo (o dicéntrico) y los fragmentos restantes se clasifican como deleciones de isococus.
(b) Dentro de un cromosoma; C/C		Dicéntrico + Fragmento
(i) Entre brazos		La parte céntrica de este intercambio a veces no puede identificarse. Pequeños anillos acéntricos son llamados "double minutes" o deleciones intersticiales.
(ii) Dentro de un brazo		
	Anillo acéntrico	
II. Tipo Cromatídico		
(1) Gap (G)		Usualmente involucra solo una cromátida de cada cromosoma excepto para los rompimientos isocromatídicos. La región no teñida no debe ser mayor que el diámetro de una cromátida. La región no teñida debe ser mayor que el diámetro de una cromátida.
(2) Rompimiento cromatídico o deleción		El fragmento casi siempre permanece asociado con el cromosoma de origen.
	Fragmento alineado	
	Fragmento desplazado	

(3) Fragmento isocromático o deleción



Muestra una reunión completa de las cromátidas hermanas por su extremo roto.



Unión incompleta (No-unión, Nu) otra proximal (P) o distal (d). Los fragmentos podrían estar alineados o desplazados. Cuando el tipo de reunión no se puede identificar, los fragmentos referidos como deleciones de isolocus.

**(4) Intercambio
(a) Entre cromosomas
(i) Asimétrica**



Producción de un fragmento y también una cromátida dicéntrica si hay una reunión completa. Algunas veces se definen como cuatriradios.

(ii) Simétricas



No produce una cromátida dicéntrica o un fragmento a menos que la reunión sea incompleta.

**(b) Dentro de un cromosoma
(i) Entre brazos**



Asimétrico

Producción de fragmento



Simétrico

No produce fragmentos si la unión es incompleta.

(ii) Dentro de un brazo



Minuta o deleción Intersticial

Frecuentes restos asociados con el cromosoma de origen.

(c) Isocromático/intercambio cromático



Triradial dicéntrico

Producción de fragmento



Triradial monocéntrico

No se forman fragmentos si la unión es incompleta.

Nucleolares (NOR) (Miller *et al.*, 1977; Houghton, 1979; Sigmud *et al.*, 1979).

Ferguson-Smith (1964) sugirió que las AS son causadas por la formación de un nucleólo por más de una NOR que presentan los cromosomas (D y G) y que la posición de estos cromosomas se mantiene en la siguiente metafase. Ahora generalmente se acepta que el mecanismo por lo cual lleva a los acrocéntricos a unirse en asociación, ocurre en la telofase cuando un número de nucleólos se fusionan para formar un nucleólo típico, observado en la interfase (Houghton, 1979).

La mayoría de las anormalidades cromosómicas en niños recién nacidos son conocidas por involucrar a los cromosomas acrocéntricos. Estas pueden producir aneuploidías causadas por la no-disyunción, rearrreglos estructurales tales como translocaciones y variaciones estructurales menores (Henderson, 1973; Houghton, 1979). Se ha propuesto que la fusión de los nucleólos para formar un solo nucleólo grande, mantenga a los acrocéntricos juntos en asociación durante la división mitótica y meiótica y esto guíe a un riesgo incrementado de la no-disyunción. El mecanismo de proximidad de los satélites asociados incrementa el riesgo de rompimiento de los cromosomas. Si los rompimientos ocurren en

más de un cromosoma satelitado, el hecho de que las regiones del centrómero estén ayudando en la proximidad, puede predisponer hacia translocaciones (Houghton, 1979).

CRITERIOS DE ASOCIACIÓN DE SATÉLITES

Los criterios de Zang y Back (1968) se han utilizado para evaluar los modelos de asociación de satélites (Figura 4: a, b, c y d respectivamente). Dos o más cromosomas acrocéntricos se consideran asociados si cumplen las siguientes reglas: (a) Si la distancia entre los centrómeros de los cromosomas (D o G) no excede de la longitud de los brazos largos de los cromosomas del grupo G en la metafase observada, (b) Si los brazos cortos de los cromosomas asociados se conectan mediante un hilo visible y claro (fibras de intersatélite o nucleoproteína de tipo B), entonces las distancias grandes se aceptan, (c) Las distancias mayores, arriba de la longitud de los brazos largos de los cromosomas del grupo D, se aceptan cuando la asociación del compañero esté orientada exactamente sobre el mismo eje longitudinal y (d) Si la orientación de los brazos cortos de un cromosoma acrocéntrico adicional es directa hacia la asociación principal y no se queda por abajo de la

"línea del centrómero" de cualquiera de los cromosomas participantes dentro de la asociación de satélites. Se define la línea del centrómero como la línea que lo cruza y es perpendicular al eje longitudinal.

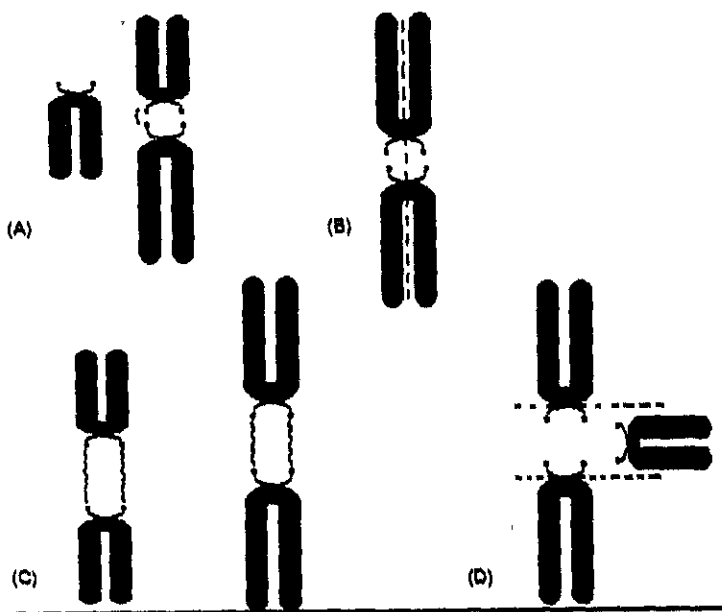


Figura 4.- Criterios para la evaluación de las asociaciones de satélites según Zang y Baok (1966)

ELECTROFORESIS DE CÉLULAS INDIVIDUALES (SCG)

El ensayo Cometa, también llamado Electroforesis de Células Individuales (SCG) o Electroforesis de Microgel (MGE) se introdujo por primera vez por Östling y Johanson (1984), como una técnica microelectroforética para la observación directa de células individuales (Fairbairn *et al.*, 1995). El ensayo cometa combina la simplicidad de técnicas bioquímicas para detectar rompimientos al ADN de una sola cadena (bajo condiciones alcalinas), de dos cadenas (bajo condiciones neutras), sitios álcali-lábiles y entrecruzamientos (Tice *et al.*, 1990).

Las ventajas de la técnica de SCG incluye: (1) Su sensibilidad y rapidez para detectar daño al ADN, (2) Se realiza en poco tiempo y su costo es mucho más barato con respecto a las técnicas citogenéticas convencionales, (3) El uso de muestras extremadamente pequeñas (menor a 10,000 células), (4) Puede aplicarse a cualquier tejido, células aisladas y cultivos, permitiendo utilizar muestras frescas o congeladas, (5) Se utiliza tanto *in vitro* como *in vivo* para investigar daño al ADN y reparación inducido por agentes en una gran variedad de células de mamíferos, (6) Habilidad para evaluar daño y reparación en células proliferativas y

no proliferativas, (7) Detecta diferencias intercelulares y por último (8) Permite diferentes tipos de análisis estadísticos (Tice *et al.*, 1990; Hartmann *et al.*, 1994 y Fairbairn *et al.*, 1995).

Durante la metodología de electroforésis unicelular, las células se resuspenden en un gel de fina agarosa sobre un portaobjetos esmerilado, posteriormente las membranas celulares son lisadas por medio de una solución de detergentes con una concentración alta de sales a un pH de 10; después las laminillas se sumergen en una solución amortiguadora (pH 14) donde son sujetas a un tiempo denominado de desenrollamiento del ADN y luego se someten a electroforesis por un tiempo relativamente corto bajo condiciones alcalinas en donde la corriente eléctrica atrae la carga del ADN de tal manera que lo relaja y lo rompe en fragmentos que migran posteriormente hacia el ánodo (-). Las imágenes resultantes se denominan "cometas" por su apariencia y se miden para determinar la migración del daño al ADN (Tice *et al.*, 1990; Fairbairn *et al.*, 1995).

La prueba en general, tiene aplicaciones potenciales en ensayos de radiación biológica, reparación por incisión al ADN, entrecruzamientos del ADN, daño oxidativo, apoptosis y Genética Toxicológica. En lo que se refiere a ésta última, el objetivo

principal de los ensayos de genotoxicidad a corto plazo incluyen daño al ADN, mutaciones puntuales y aberraciones cromosómicas. La gran sensibilidad del ensayo cometa y su habilidad para cuantificar daño genético en células individuales lo han destinado a convertirse en una herramienta de predicción de genotoxicidad rápida de compuestos de interés. Este sistema puede proporcionar información acerca de genotoxicidad directa, así como también da información sobre la capacidad de un compuesto para alterar la reparación, lo cual puede ser tan perjudicial como el de inducir un daño directo (Fairbairn *et al.*, 1995).

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL FLÚOR

PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS: El Flúor (F) es un elemento halógeno no metálico que pertenece al grupo VII de la Tabla Periódica. Con número atómico 9; peso atómico 18.99840, valencia=1; no tiene isótopos estables y es el agente oxidante más potente (Irving y Lewis, 1993). Es el elemento más electronegativo de todos los elementos químicos, por lo tanto nunca se encuentra libre en su forma natural elemental (Murray, 1986; Kats, *et al.*, 1991). Es liberado en fase de gas, siendo un elemento muy reactivo, se

principal de los ensayos de genotoxicidad a corto plazo incluyen daño al ADN, mutaciones puntuales y aberraciones cromosómicas. La gran sensibilidad del ensayo cometa y su habilidad para cuantificar daño genético en células individuales lo han destinado a convertirse en una herramienta de predicción de genotoxicidad rápida de compuestos de interés. Este sistema puede proporcionar información acerca de genotoxicidad directa, así como también da información sobre la capacidad de un compuesto para alterar la reparación, lo cual puede ser tan perjudicial como el de inducir un daño directo (Fairbairn *et al.*, 1995).

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL FLÚOR

PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS: El Flúor (F) es un elemento halógeno no metálico que pertenece al grupo VII de la Tabla Periódica. Con número atómico 9; peso atómico 18.99840, valencia=1; no tiene isótopos estables y es el agente oxidante más potente (Irving y Lewis, 1993). Es el elemento más electronegativo de todos los elementos químicos, por lo tanto nunca se encuentra libre en su forma natural elemental (Murray, 1986; Kats, *et al.*, 1991). Es liberado en fase de gas, siendo un elemento muy reactivo, se

combina con otros átomos y moléculas para formar fluoruros con todos los elementos excepto con helio, neón y argón (Zakrzewski, 1991; Irving y Lewis, 1993).

USOS: El F es utilizado en síntesis orgánicas. Se utiliza en la producción de fluoruros metálicos y otros fluoruros, en la producción de fluoro-carbonos, es constituyente activo de compuestos de fluoración del agua potable (ácido fluosilícico, silicofluoruro sódico y fluoruro de sodio), las sales de F son usadas en la prevención de caries dental (pastas y otros productos dentríficos), así como para raticidas e insecticidas. El fluoruro de hidrógeno es útil en las industrias del petróleo, semiconductores y grabado de vidrio. La criolita (fluoruro sódico de aluminio) se utiliza en la reducción del aluminio y en muchos procesos industriales. El fluoruro de metil sulfonilo se usa como fumigante (Dreisbach y William, 1988; Irving y Lewis, 1993).

FUENTES DE FLÚOR

El F se encuentra distribuido universalmente en el ambiente. Se presenta de forma natural (en agua, suelo, aire, alimentos y

tejidos) y artificial (productos dentales) (Thomson *et al.*, 1985; Navia *et al.*, 1988; Crespi *et al.*, 1990) (Tabla 1).

Tabla 1.- Exposición del humano al flúor

FUENTE DE FLUOR	NIÑOS (1-12 AÑOS)	ADULTOS	NATURALEZA DE LA EXPOSICION
Agua			
Fuorada (> 1 ppm)	0.5-1.1 mg/día	0.61-3.2 mg/día	Ingestión
No fluorada (< 0.4 ppm)	0.2-0.4 mg/día	0.03-0.75 mg/día	Ingestión
Dieta			
Areas fluoradas	0.03-0.56 mg/día	0.33-2.7 mg/día	Ingestión
Areas no fluoradas	No hay datos	0.16-1.0 mg/día	Ingestión
Aire			
Area industrial	0.01-0.04 mg/día	0.01-0.06 mg/día	Inhalación
Exposición ocupacional severa	No hay datos	10-25 mg/día	Ingestión e Inhalación
Dentífricos y enjuages bucales	0.04-1.2 mg/día	0.25 mg/día	Ingestión
Geles fluorados para tratamientos (agudo)	10-25 mg/tratamiento	10-25 mg/tratamiento	Ingestión
Terapia para osteoporosis		0.5 mg/kg/día	Ingestión

Li *et al.*, 1988

SUELO: El F es el décimo tercer elemento químico en orden de abundancia representando aproximadamente el 0.065% de la

corteza terrestre. En las rocas y suelo, el F puede presentarse en forma combinada con una amplia variedad de minerales, incluyendo fluorspatita (CaF_2), criolita, apatita, mica, hornblenda y un gran número de pegmatitas tales como topaz y turmalina (Murray, 1986; Li, *et al.*, 1988). Sus minerales más abundantes son la fluorapatita, la criolita y el espato flúor (España, México y Sudáfrica) (Irving y Lewis, 1993). Su mineral más importante es el fluorspatita que es en la actualidad la principal fuente industrial de flúor. Las rocas volcánicas e hipabisal, así como también los depósitos de sal de origen marino, contienen cantidades significantes de F de hasta 2.5 g/kg (Murray, 1986; Kats, *et al.*, 1991).

La disponibilidad de los iones F libres en el suelo se determina por la solubilidad natural de los compuestos de flúor, la acidez del suelo, la presencia de otros minerales o compuestos químicos y la cantidad de agua presente. Las concentraciones de F se incrementan con la profundidad del suelo; en las áreas de montañas altas, el contenido de F es relativamente bajo. Debido a la constante erosión de las montañas, el F se remueve y como los otros halógenos, se transfiere a la altiplanicie más baja o al mar vía ríos o arroyos.

AGUA: Debido a la presencia universal de F en la corteza terrestre, todas las aguas contienen F en concentraciones variables. El agua marina contiene cantidades significantes que van desde 0.8 a 1.4 mg/kg. Las aguas con alto contenido de F se encuentran en la base de las altas montañas y en las áreas con depósitos geológicos de origen marino (Murray, 1986).

AIRE: Después de los compuestos de nitrógeno y sulfuro, los compuestos de flúor se encuentran entre los tres contaminantes principales del aire. Ellos se originan por el procesamiento del acero, quema de carbón, aluminio, uso de fertilizantes de fosfato (Stern, 1986), emisión de gases en áreas de actividad volcánica, efluentes industriales gaseosos y polvos de suelos que contienen F (Murray, 1986; Whitford, 1989). Los gases orgánicos e inorgánicos de flúor contenidos en la tropósfera se encuentran presentes en concentraciones de 1 y 0.1-0.4 ppm respectivamente. Se estima que en lugares altamente industriales las emisiones son de aproximadamente 1.8 millones de toneladas de flúor por año (Stern, 1986). El contenido de F en el aire de áreas industriales puede alcanzar niveles tan altos de hasta 1.4 mg de F por m³, mientras que en las proximidades de estas áreas los niveles de F son de 0.2 mg

por m^3 en el aire y en regiones no industriales se han registrado concentraciones de 0.05 a $1.90 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de F (Murray, 1986). El fluoruro de hidrógeno (HF) es el gas inorgánico más comúnmente encontrado en la atmósfera y es rápidamente absorbido por los pulmones (Stern, 1986). A pesar de esto, la cantidad de flúor presente en la atmósfera por lo común es sumamente pequeña en proporción con la cantidad ingerida en los alimentos y en el agua de consumo (Kats *et al.*, 1991)

AGUA DE CONSUMO: El flúor contenido en el agua para beber es comúnmente la contribución más grande de F al día, la cual depende de la concentración de este elemento en el agua, la edad de la persona, las condiciones de clima y los hábitos alimenticios (Murray, 1986).

ALIMENTOS: El consumo de F de la mayoría de las personas es de origen dietético, y los alimentos son la segunda fuente de contribución de F. En los adultos es de 0.67 a 1.125 mg por día dependiendo de la concentración de F en el agua que se utiliza en la preparación de los alimentos (Navia *et al.*, 1988 y Whitford, 1989). En 1983 Taves analizó las concentraciones de F en algunos

alimentos como se muestra en la tabla 2. Aunque no existe una dosis de consumo diario de F, se sugiere que la cantidad óptima oscila de 0.05 a 0.07 mg de F por kilogramo de peso corporal. Autores como Murray (1986) han reportado, que el consumo diario de F puede variar de 0.2 mg de F por día en infantes a 5 mg de F por día en los adultos.

Tabla 2.- Concentraciones de flúor en los alimentos

ALIMENTOS	CONCENTRACIONES DE F (ppm)	
	PROMEDIO	RANGO
Productos lácteos	0.25	0.02-0.82
Carne, pescado y aves	0.22	0.04-0.51
Granos y cereales	0.42	0.08-2.01
Papas	0.49	0.21-0.84
Hojas vegetales y comestibles	0.27	0.08-0.70
Legumbres	0.53	0.49-0.57
Raíces	0.38	0.27-0.48
Frutas	0.06	0.02-0.08
Aceites y mantecas	0.25	0.02-0.44
Azúcar y derivados	0.28	0.02-0.78
Bebidas	0.76	0.02-2.74
No clasificables	0.59	0.29-0.87

TAVES (1983)

PREVENCIÓN DE CARIES: El uso múltiple del F en la elaboración de productos dentales es creciente en una gran variedad de sistemas, incluyendo enjuagues bucales (225-900 ppm), suplementos pediátricos, soluciones tópicas, pastas dentales (1000-5000 ppm) y geles restaurativos (12,300 ppm); además, dicho elemento se

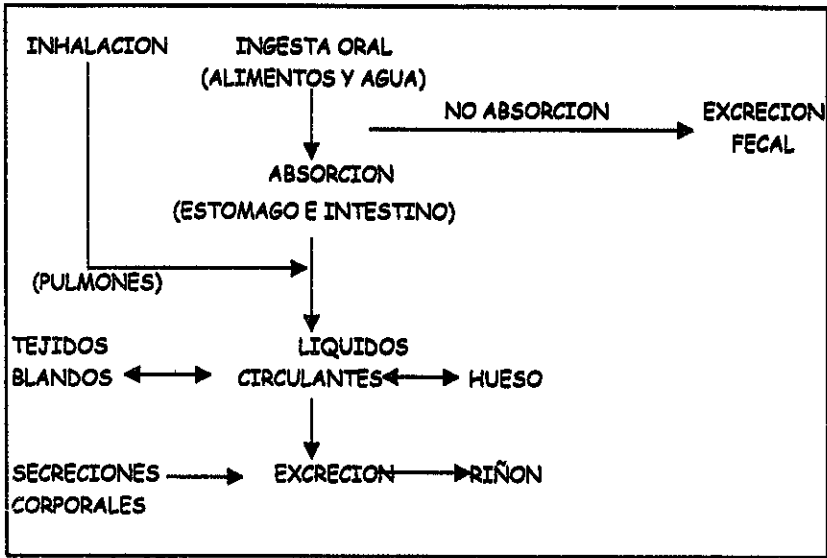
combina como agente medicinal y anestésico bucal (Tsutsui *et al.*, 1984b; Li *et al.*, 1988). Su eficacia cariostática ha sido bien documentada y numerosos estudios indican que en una concentración de 1 ppm en el agua, el F es benéfico para la prevención de caries dental. Se estima que en 1984 más de 260 millones de personas en el mundo estaban viviendo en comunidades con agua fluorada de manera artificial o natural (Li *et al.*, 1987). Actualmente más de la mitad de la población americana consume natural o artificialmente agua fluorada y se están haciendo esfuerzos para incrementar esta proporción (Li *et al.*, 1988).

TEJIDOS: El F forma parte de los oligoelementos los cuales constituyen el 0.01% de la masa del cuerpo humano. Tiene un nivel normal de concentración en cada compartimento del organismo de 5-20 $\mu\text{g/l}$ (0.26-1.05 $\mu\text{mol/l}$). El F se concentra en el cuerpo en tejidos mineralizados como son los huesos y los dientes. La dosis tóxica de este elemento la cual produce síntomas de envenenamiento después de su ingesta por semanas y meses consecutivos es de >6mg (>0.32 mmol). Puede causar daño a la actividad amieloblástica, fluorosis, irritación de piel, ojos y membranas mucosas (Navia *et al.*, 1988).

EL METABOLISMO DEL FLÚOR

Comúnmente, el flúor se absorbe con facilidad mediante transporte pasivo y entra a los flúidos del cuerpo pasando por los pulmones o el tracto gastrointestinal, principalmente por el estómago (Figura 5). Este elemento puede ser liberado dentro del cuerpo a causa de la biotransformación del F contenido en moléculas orgánicas de bajo peso molecular (menos de 3000 daltones), tales como anestésicos volátiles como el metoxiflurano, halotano o enflurano, entre otros. Varios factores pueden afectar la absorción del F como la inanición y la grasa en la dieta incrementando la absorción, mientras que altas concentraciones de calcio, fósforo, magnesio y aluminio afectan la absorción del flúor a diferentes grados. El plasma se considera como el "Compartimiento Central" porque es este flúido desde el cual y dentro del cual el ion debe pasar para su distribución y eliminación (Navia *et al.*, 1988; Whitford, 1989). Bajo condiciones favorables, cerca del 90% del F ingestado se absorbe en el estómago. Típicamente, alrededor de un 10 a un 15 % del fluoruro ingerido permanece sin ser absorbido y es excretado vía las heces (Kats *et al.*, 1991).

Figura 5.- Destino metabólico del flúor en los humanos



Kats *et al.*, 1991.

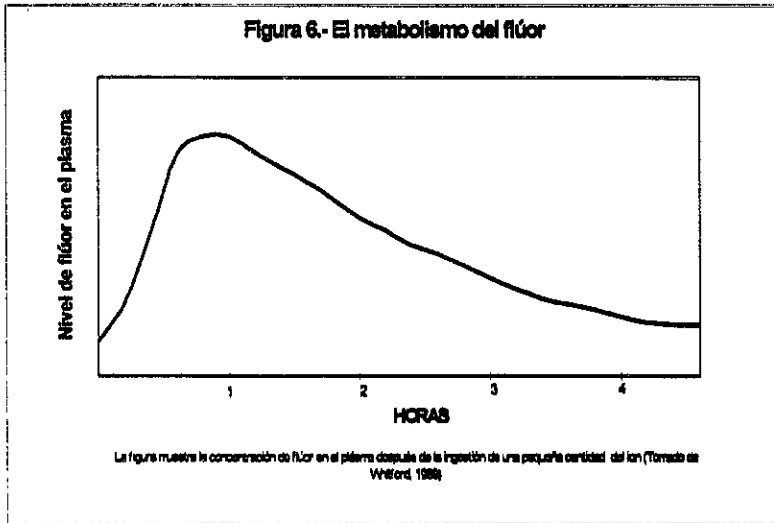
A largo plazo en la estructura corporal, el flúor se libera durante el curso normal de la remodelación del hueso (Whitford, 1989). El fluoruro absorbido aparece en bajas concentraciones (alrededor de 0.15 ppm, o menos) en los líquidos circulantes del organismo, en los que está en equilibrio con los distintos tejidos blandos. El F presente en los líquidos orgánicos circulantes se deposita en los tejidos duros o es excretado por la orina. La excreción urinaria del F depende de la forma química de este elemento así como de la cantidad, la duración de la exposición, el

estatus de salud y la edad del individuo (Murray, 1986; Navia *et al.*, 1988; Whitford, 1989; Kats, *et al.*, 1991).

La figura 6 muestra un perfil típico de las concentraciones de F en el plasma durante la ingestión de una cantidad mínima. Minutos después de la ingestión se incrementan los niveles de F en el plasma. Esto indica que el ion se absorbe con facilidad por el estómago, un hecho que distingue al F de los otros halógenos y otras sustancias (Whitford, 1989). La máxima concentración de F en el plasma se alcanza a los 30-60 minutos después de la ingestión. El metabolismo se completa usualmente en 24 hrs. En los adultos (mínimo crecimiento esquelético) quizás el 10% del F ingerido se puede depositar en los huesos. Mientras que en los niños, más del 50% puede ser depositado en los huesos (Pader, 1988; Kats *et al.*, 1991).

El incremento en los niveles de plasma después de la ingestión se atenúa debido a la distribución de los fluidos intersticiales e intracelulares la entrada a los tejidos calcificados y la excreción renal. Después que el volumen de la dosis se ha absorbido, los niveles en el plasma muestran una rápida disminución debido a la continua entrada a huesos y por la excreción. Durante este período

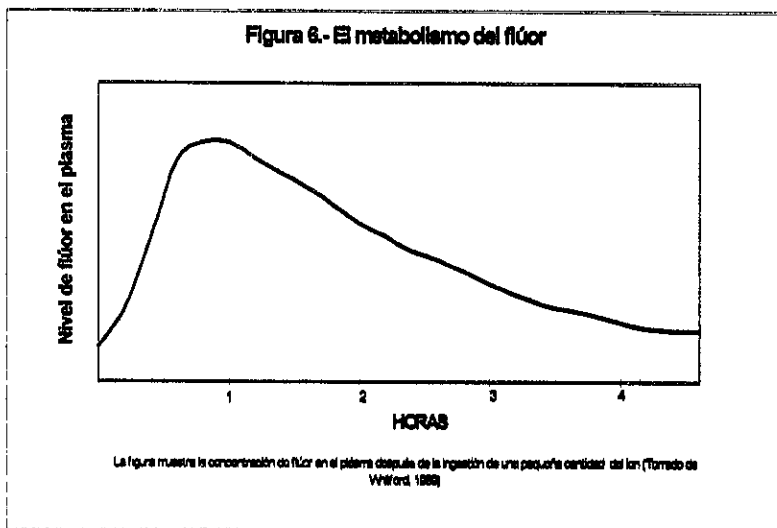
los niveles de F de los tejidos blandos declinan en paralelo con la curva del plasma (Whitford, 1989).



TOXICOLOGÍA DEL FLÚOR

El incremento de la exposición de la población a dicho elemento ha despertado el interés por conocer su toxicidad particularmente la interacción con el material genético. Numerosos estudios han investigado el efecto genotóxico del flúor en una gran variedad de sistemas, incluyendo plantas, bacterias, moscas de

los niveles de F de los tejidos blandos declinan en paralelo con la curva del plasma (Whitford, 1989).



TOXICOLOGÍA DEL FLÚOR

El incremento de la exposición de la población a dicho elemento ha despertado el interés por conocer su toxicidad particularmente la interacción con el material genético. Numerosos estudios han investigado el efecto genotóxico del flúor en una gran variedad de sistemas, incluyendo plantas, bacterias, moscas de

fruta, animales y células humanas. Desafortunadamente, la información sobre este tema es limitada y los resultados son conflictivos (Li *et al.*, 1989).

Los primeros estudios sobre el efecto del potencial genotóxico del flúor se realizaron en plantas. En 1957, Kihlman no encontró evidencia de que el F produjera rompimientos o intercambios cromosómicos en frijol. Sin embargo, algunos estudios han mostrado que este elemento es genotóxico en *Allium spp*, *Vicia faba* y *Hordeum vulgare* induciendo daño cromosómico.

El fluoruro de sodio (NaF) y el monofluorofosfato de sodio (NaFPO₃) no fueron mutagénicos en *Salmonella typhimurium*, pero el fluoruro de estaño (SnF₂) sí lo fue en este mismo sistema. En *Bacillus subtilis* el NaF resultó negativo, pero en otros experimentos fue positivo, al igual que el fluoruro de potasio (KF).

A partir de los años 70's, la mayoría de los estudios con respecto al efecto genotóxico del F se realizaron en células de mamíferos tanto *in vitro* como *in vivo*. En 1974, Jagiello y Lin estudiaron al NaF como un mutágeno potencial empleando ovocitos de ratón en concentraciones de 100 y 200 ppm y en ovocitos de ovejas con 10 y 25 ppm, no causando ningún cambio cromosómico, por lo que se sugirió que el F podría tener un efecto menor en

ovocitos en maduración meiótica y que la sensibilidad celular varía entre las diferentes especies.

Aunque existe desacuerdo en la literatura en cuanto a la capacidad del F para producir aberraciones cromosómicas en cultivos de células humanas y de roedores, hay evidencias de que la exposición de F incrementa las aberraciones cromosómicas en ambos sistemas de prueba. El NaF y el KF dan resultados positivos en linfoma de ratón L5178 YTK+/- en dosis de 100-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Cole *et al.*, 1986; Caspary *et al.*, 1987).

La evidencia más dramática del potencial de mutagenicidad del F se obtuvo a partir de la investigación *in vivo* dirigida por Mohamed y Chandler (1977) en donde grupos de 8 ratones se usaron para el experimento. A todos los animales se les proporcionó una dieta baja en F y cada grupo recibió agua para beber que contenía 0, 1, 5, 10, 50, 100 o 200 ppm de NaF. Después de 3 y 6 semanas, cuatro ratones de cada grupo se sacrificaron y se examinaron los cromosomas de la médula ósea y células de testículos. Los datos mostraron que cuando se comparó el grupo control con los tratamientos, el número de aberraciones cromosómicas se incrementaron significativamente en todos los animales que recibieron agua fluorada. Los autores concluyeron que

el flúor, podría ser mutagénico aún en concentraciones de 0.45 ppm (1 ppm NaF).

Contradictoriamente a las observaciones de Mohamed y Chandler, se encuentran los resultados de las investigaciones de Kram *et al* (1978) y Martín *et al* (1979). Los datos de estos estudios mostraron que durante el tiempo de vida de ratones, el consumo de 50 ppm de F no causa daño cromosómico detectable en médula ósea o en células testiculares de ratón.

En 1985, Thomson *et al* publicaron los resultados que concentraciones de F de 2-60 veces mayores a las utilizadas en la fluoración de agua (1 ppm) no causaban incremento significativo en la frecuencia de aberraciones cromosómicas o intercambio de cromátidas hermanas. Los autores concluyeron que no hubo evidencia de que el F indujera alteraciones cromosómicas o interacción con el ADN.

En el año de 1993, Zeiger *et al* realizaron una revisión bibliográfica en cuanto al potencial genotóxico del F, encontrando de manera general que el F no es un agente mutagénico en sistemas bacteriales, pero que produce aberraciones cromosómicas y mutaciones genéticas en cultivos de células de mamíferos.

Aunque hay desacuerdo en la literatura concerniente a la habilidad del F para inducir aberraciones cromosómicas en cultivos celulares de humanos y de roedores, la evidencia guía a la conclusión de que la exposición al F resulta el incremento de aberraciones cromosómicas en estos sistemas de prueba. El NaF indujo principalmente huecos (gaps) cromatídicos y rompimientos cromatídicos, indicando que en roedores las células están respondiendo en la etapa G_2 del ciclo celular. En contraste estudios con células humanas sincronizadas indicaron que la fase S fue la más sensible. Si el F tiene un efecto específico en el ciclo celular, esto podría ser discutido por medio de las diferencias en los tratamientos celulares y la forma de cosecha, lo cual guía a resultados conflictivos como consecuencia de las diferencias que existen de un protocolo a otro (Zeiger *et al.*, 1993).

De manera general, existen tres diferentes puntos de vista acerca del flúor: 1) El flúor no tiene efectos genotóxicos (Kram *et al.*, 1978; Martin *et al.*, 1979; Thomson *et al.*, 1985 y Li *et al.*, 1987); 2) El flúor es un agente mutagénico y tiene efectos citogenéticos que causan daño al ADN y a los cromosomas (Mohamed y Chandler, 1977; Tsutsui *et al.*, 1984b); o 3) El flúor tiene efectos sinérgicos o antagónicos con ciertos mutágenos conocidos (Slacik y Obe, 1976).

JUSTIFICACIÓN

Los compuestos de flúor juegan un papel importante en la vida de la población, debido a la presencia universal de este elemento en el agua, suelo o aire, y no es sorprendente que los individuos se expongan a diferentes concentraciones de flúor a través de alimentos, agua para beber, emisiones industriales, productos dentales y otras fuentes. A pesar de que se han realizado una gran cantidad de estudios en diversos sistemas de prueba (bacterias, plantas, moscas de la fruta, animales y células humanas) con el fin de conocer los efectos mutagénicos que este elemento pueda provocar al ser humano, aún no se ha evaluado de manera definitiva el potencial toxicológico que el F pueda producir.

Desafortunadamente la información proporcionada sobre su potencial toxicológico es limitada y contradictoria, llegando a considerar al flúor como: (1) Un elemento sin efecto genotóxico, (2) Como un agente mutagénico, y (3) Con efectos sinérgicos o antagónicos con algunos mutágenos conocidos.

Es por estas razones que en el presente trabajo se estudió el efecto citotóxico y genotóxico de un compuesto de flúor (fluoruro

de potasio; KF) sobre los cromosomas de linfocitos humanos tratados *in vitro*, empleando diferentes parámetros para evaluar su citotoxicidad y su genotoxicidad.

HIPÓTESIS

Los daños a la salud ocasionados por diversos agentes químicos han sido punto de controversia, tal es el caso del flúor que es un elemento del cual no se tiene claro el efecto citotóxico y mutagénico que puede provocar a los seres vivos. Por tal motivo si aplicamos fluoruro de potasio (KF) en diferentes concentraciones (10, 20, 40 u 80 $\mu\text{g/ml}$) a cultivos de linfocitos humanos, dicho compuesto podrá causar alteraciones sobre la división celular o interactuar con moléculas vitales como el ADN.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto del fluoruro de potasio (KF) sobre la división celular y la estructura de los cromosomas de linfocitos humanos tratados *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- ✦ Cuantificar el Índice Mitótico (IM) en cultivos de linfocitos humanos tratados con fluoruro de potasio.
- ✦ Evaluar el efecto del fluoruro de potasio sobre el Índice de Replicación (IR).
- ✦ Cuantificar el efecto del fluoruro de potasio sobre la frecuencia de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH).

- ♣ Determinar el tipo y la frecuencia de Aberraciones Cromosómicas (AC) en cultivos de linfocitos humanos expuestos a fluoruro de potasio.
- ♣ Evaluar el efecto del fluoruro de potasio sobre la frecuencia de Asociación de Satélites (AS) en cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro*.
- ♣ Cuantificar la frecuencia de rompimientos de cadena sencilla de ADN y los sitios álcali-lábiles inducidos por el fluoruro de potasio en linfocitos humanos, mediante la técnica de Electroforesis de Células Individuales (SCGE).

MATERIAL Y MÉTODOS

A donadores varones sanos se les extrajeron 5 ml de sangre periférica con una jeringa heparinizada. Posteriormente se agregó a cada tubo de cultivo 4.25 ml de medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co. St. Louis MO., USA) suplementado con 0.25 ml de fitohemaglutinina (Sigma) como mitógeno y 8 gotas de sangre (0.5 ml), incubándose a 37° C, durante 48 ó 72 horas; dependiendo de la técnica a seguir. Para la observación de aberraciones cromosómicas y asociación de satélites los cultivos se mantuvieron durante a 48 horas, mientras que para evaluar el intercambio de cromátidas hermanas los cultivos se incubaron durante 72 horas (Dean y Danford, 1984; Altamirano, 1992; Roldán, 1992). En todos los casos cada experimento se realizó por duplicado.

I. ABERRACIONES CROMOSÓMICAS Y ASOCIACIÓN DE SATÉLITES

Para el análisis de aberraciones cromosómicas y asociación de satélites, después de 24 horas de iniciados los cultivos se adicionó a cada tubo fluoruro de potasio (Sigma), en concentraciones de 10, 20, 40 u 80 $\mu\text{g/ml}$ de cultivo (solución final con una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ KF), los cuales se disolvieron en agua bidestilada y se

esterilizaron por filtración empleando membranas Millipore de 0.45 μ . A las 46 horas se agregaron 4 μ g/ml de colchicina (Gibco, USA), dejándolos en incubación hasta completar las 48 horas. La cosecha se realizó centrifugando las células a 1000 r.p.m. (400 g) durante 5 minutos y sometiendo el botón celular a un choque hipotónico con cloruro de potasio (KCl) 0.075M, durante 25 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, las células se fijaron con metanol-ácido acético (3:1) tres veces por tiempos de 5, 10 y 15 minutos respectivamente, (Altamirano, 1992; Roldán, 1992) para finalmente realizar las preparaciones por goteo, dejándolas secar al aire para posteriormente tefirlas con Giemsa (Sigma, Méx.: 1:30 en agua corriente).

Se observaron 200 metafases al microscopio para determinar el número y tipo de aberraciones cromosómicas, así como las asociaciones de satélites, mientras que para la cuantificación del índice mitótico (IM) se observaron 1000 células por cultivo para determinar el porcentaje de células en división, mediante la siguiente fórmula (Dean y Danford, 1984):

$$IM = \frac{\text{No. de células en división}}{\text{No. de células totales}} \times 100$$

II. INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS

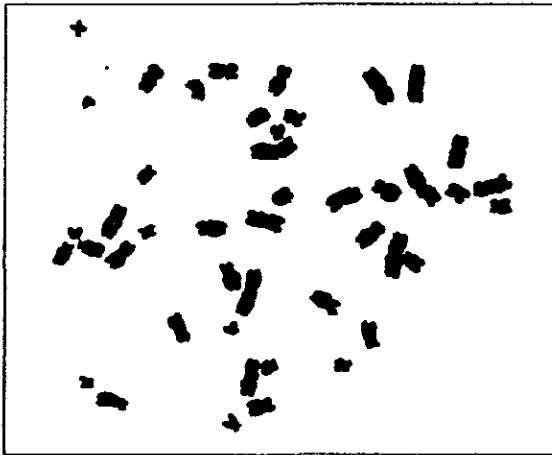
Para el estudio de los ICH's en los cultivos de linfocitos humanos, a las 24 horas de iniciados los cultivos se agregaron a cada tubo 5 $\mu\text{g/ml}$ de una solución de 5-bromodesoxiuridina (5-BrdU; Sigma) (Crossen y Morgan; 1977) y el tratamiento de fluoruro de potasio en concentraciones de 10, 20, 40 u 80 $\mu\text{g/ml}$ de cultivo. A las 70 horas de cultivo se agregaron 4 $\mu\text{g/ml}$ de colchicina a cada tubo. Posteriormente a las 72 horas se realizó la cosecha y la preparación de laminillas siguiendo la misma técnica empleada para aberraciones cromosómicas. Por último, a las preparaciones se les aplicó la técnica de tinción diferencial de Intercambio de Cromátidas Hermanas, la cual consistió en teñir las preparaciones con una solución de Hoechst-33258 (Sigma, 0.05 $\mu\text{g/ml}$) durante 20 minutos en la oscuridad; después las preparaciones se lavaron con agua corriente y se irradiaron con luz ultravioleta (UV) y luz negra por 20 minutos sumergiéndolas en una solución salina citrato 2XSSC (citrato de sodio 0.03M y cloruro de sodio 0.3M), para después enjuagarlas con agua corriente; posteriormente se dejaron en baño María durante 20 minutos a 60°

C en solución 2XSSC. En seguida las preparaciones se lavaron y tñieron con una solución Giemsa (Perry y Wolff, 1974; Mudry *et al.*, 1981; Roldán, 1992).

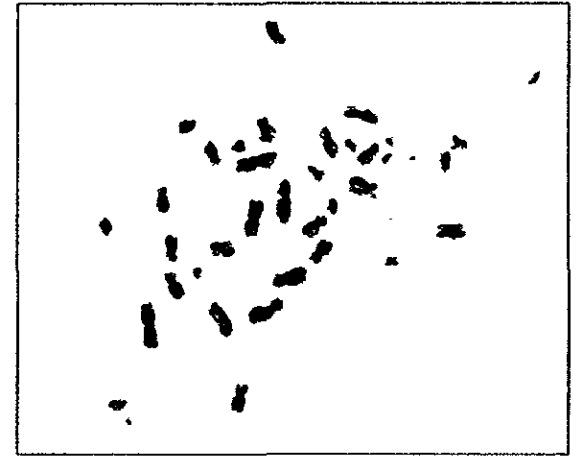
La frecuencia de ICH 's se obtuvo observando 100 células por cultivo en metafase del segundo ciclo de división celular cuantificando el número y tipo de intercambios (terminales e intersticiales como resultado de uno y dos intercambios respectivamente; Figura 2) (Altamirano, 1992). La determinación del Índice de Replicación (IR) se realizó contabilizando al azar 100 células en metafase por cultivo determinando el porcentaje de células de primera, segunda, tercera ó sucesivas divisiones (Figura 7; a, b y c respectivamente). El IR se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IR} = \frac{1 (M_I) + 2 (M_{II}) + 3 (M_{III})}{100}$$

en donde: I, II y III son las proporciones de células en primera, segunda y tercera o siguientes divisiones (Lazutka; 1991; Rojas *et al.*, 1992).



(a)



(b)



(c)

Figura 7.- Metafases en primera (a), Segunda (b) y tercera o sucesivas divisiones (c).

III. ELECTROFORESIS DE CÉLULAS INDIVIDUALES

Para este experimento y a diferencia de las técnicas anteriormente mencionadas, los tratamientos a las células sanguíneas se realizaron de la siguiente manera: Se utilizaron tubos de microcentrífuga a los cuales se les agregaron 190 μl de medio de cultivo RPMI + 10 μl de KF, 180 μl de medio RPMI + 20 μl de KF, 160 μl de medio de cultivo RPMI + 40 μl de KF ó 120 μl de medio RPMI + 80 μl de KF, obteniéndose un volumen final de 200 μl (en todos los casos la concentración final de KF fue de 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g/ml}$). Posteriormente se les adicionaron 40 μl de sangre periférica y se incubaron a 37°C durante 2 horas. Una vez transcurrido este tiempo se centrifugaron a 4000 r.p.m. (1600 g) durante 2 minutos obteniendo así el botón celular. En este caso se contó con un testigo positivo (peróxido de hidrógeno) y un testigo negativo.

En todos los casos se utilizaron tubos por triplicado, ocupando un tubo y su duplicado para la electroforesis y el tubo restante para las pruebas de viabilidad. El experimento se repitió tres veces.

A) PREPARACIÓN DE LAMINILLAS

Una vez obtenido el botón celular se realizaron las preparaciones en portaobjetos completamente esmerilados a los cuales se les agregó 200 μl de agarosa regular (Sigma Chemical CO. St. Louis) al 0.5% (previamente preparada) cubriéndolas inmediatamente con un cubreobjetos para posteriormente refrigerarlas a 4° C durante 3 minutos hasta que la agarosa solidificara. Después se removió el cubreobjetos y se les agregó 85 μl de una mezcla que contenía 75 μl de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma Chemical CO. St. Louis) al 0.5% + 10 μl del botón celular, cubriéndolas nuevamente con el mismo cubreobjetos para refrigerarlas durante 5 minutos a 4°C hasta su total solidificación. Transcurrido este tiempo se removió el cubreobjetos cuidadosamente y se les agregó una tercer capa de agarosa (80 μl) de bajo punto de fusión al 0.5%, colocándoles inmediatamente un cubreobjetos limpio y refrigerándolas a 4°C, durante 5 minutos. Una vez solidificadas se les retiró el cubreobjeto y las laminillas se sumergieron en una solución de lisis (2.5M NaCl , 100mM EDTA, 10mM Tris, 1% lauril sarcosinato de sodio y NaOH; pH 10) a 4°C y

manteniéndolas en refrigeración por lo menos durante 1 hora (Hartmann *et al.*, 1994).

B) ELECTROFORESIS DE LAMINILLAS

Transcurrido el período de lisis, las laminillas se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal (previamente inmersa en hielo) y se les agregó el amortiguador de electroforesis (300 mM NaOH, 1 mM EDTA; pH 13) de modo que las laminillas quedaran bien cubiertas dejándolas durante 20 minutos, permitiendo así el desenrollamiento del ADN y la expresión de sitios álcali-lábiles. Posteriormente, las condiciones empleadas para la electroforesis fueron de 25 volts y 300 miliamperes por 20 minutos. Transcurrido este tiempo se les hicieron tres lavados a las laminillas con amortiguador neutralizante (0.4M Tris; pH 7.5), dejándolas reposar durante 5 minutos después de cada lavado, escurriéndoles del exceso de amortiguador para posteriormente teñirlas con 50 μ l de bromuro de etidio (20 μ g/ml) (Sigma Chemical CO. St. Louis) y colocándoles un cubreobjetos. Por último, las laminillas se guardaron en una cámara húmeda y se refrigeraron

hasta su observación (antes de 48 horas) en el microscopio de fluorescencia (Tice *et al.*, 1990 y Hartmann *et al.*, 1994).

C) OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO

La observación en el microscopio de fluorescencia se realizó utilizando un filtro de excitación de 515-560 nm con un aumento de 40 X contando un total de 50 células por laminilla, incluyendo el número de núcleos evaluables "cometas", núcleos difusos "nubes" y núcleos intactos "sin daño". También se midió con la ayuda de un ocular graduado el diámetro de los núcleos y la longitud de las colas de los cometas (ADN dañado y con diferente migración).

III. PRUEBAS DE VIABILIDAD

Se colocaron 20 μ l del botón celular en tubos de microcentrífuga y se agregaron a cada tubo 5 μ l de una solución de colorantes (5-6 diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) y Bromuro de Etidio (BrE) en una concentración final de 0.125 μ g/ μ l y 0.025 μ g/ μ l respectivamente) en una proporción 1:1. Posteriormente, se dejaron las células reposando durante 5

minutos a 37 °C. Una vez transcurrido este tiempo se centrifugaron a 4000 r.p.m. durante 3 minutos y se les retiró el sobrenadante para agregar 1 ml de medio de cultivo RPMI-1640 y después resuspender con el vortex. Se repitió la centrifugación a 4000 r.p.m. durante 3 minutos y se desechó el sobrenadante. Luego se resuspendió el botón celular en 30 μ l de medio de cultivo y se les agregaron 10 μ l de esta muestra en un portaobjetos colocándoles, posteriormente un cubreobjetos. Por último las células se observaron en el microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación de 515-560 nm contabilizando 200 células por tratamiento. Las evaluaciones se realizaron tomando el número de células viables (fluorescencia verde) y el número de células muertas (fluorescencia roja) (Strauss, 1991).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la evaluación del porcentaje del índice mitótico, el análisis estadístico aplicado fue la prueba de diferencia de proporciones (Z; $P < 0.05$ valores críticos para ensayos de dos colas); para el intercambio de cromátidas hermanas la prueba utilizada fue la "t" de Student (con $P < 0.05$), mientras que para asociación de

satélites (número de asociaciones por célula, número de células por asociación, tipos de asociación, números de cromosomas por asociación y proporción de cromosomas del grupo D y G), aberraciones cromosómicas y la electroforesis de células individuales se empleó el análisis estadístico de Ji cuadrada ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los efectos ocasionados por diferentes agentes (tanto físicos como químicos) sobre la división celular y la inducción de anomalías cromosómicas en modelos biológicos han sido criterios importantes para la identificación de daño sobre los sistemas genéticos de los organismos (Sharma y Talukder, 1987).

Desde hace tiempo los linfocitos humanos de sangre periférica se han utilizado en aquellos estudios que permiten analizar alteraciones tanto genotóxicas como citotóxicas (Obe *et al.*, 1975; Preston, 1982; Watt y Stephen, 1986; Strauss, 1991). Los efectos genotóxicos pueden ser el resultado de la interacción directa de agentes químicos con el ADN a través de enlaces covalentes o intercalación, mediante la producción de rompimientos de la cadena de ADN, cambios estructurales en los cromosomas o la inducción de mutaciones génicas. Los cambios también pueden ser a través de mecanismos indirectos los que incluyen la interferencia con los procesos de replicación y reparación del ADN, así como cambios sobre enzimas, membranas, proteínas estructurales y lisosomas (Scott *et al.*, 1991).

Por su lado, la citotoxicidad se manifiesta en forma de muerte celular o mediante otros eventos que no están asociados con la letalidad celular, como lo es la inhibición en el crecimiento, el retraso en el ciclo celular, la reducción en el índice mitótico (IM) y cambios metabólicos (Scott *et al.*, 1991). Las alteraciones sobre la división celular pueden provocar un incremento en la mitosis (acción mitogénica), o más frecuentemente, la reducción en la frecuencia de división (efecto citostático) (Sharma y Talukder, 1987).

MARCADORES BIOLÓGICOS DE CITOTOXICIDAD

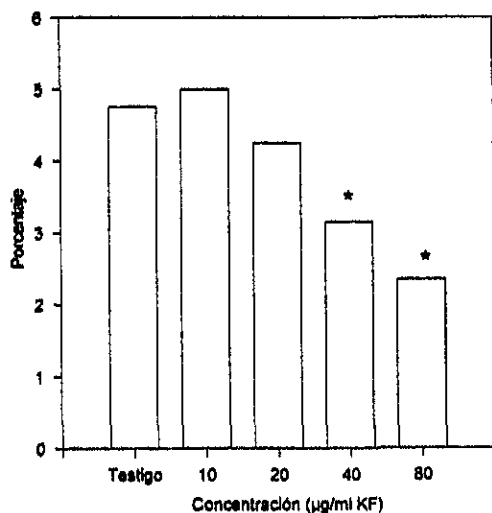
Pocos son los trabajos en donde se postulan al índice mitótico, a la cinética de proliferación celular, al tiempo de proliferación linfocítica, al índice de replicación y a la viabilidad celular como indicadores biológicos de citotoxicidad y citostaticidad (Morimoto *et al.*, 1985; Herrera *et al.*, 1991; Lazutka, 1991; Rojas *et al.*, 1992), sin embargo estos han mostrado ser indicadores sensibles para la detección del daño inducido por agentes químicos.

1) Índice Mitótico (IM)

Los resultados obtenidos en el presente trabajo al tratar cultivos de linfocitos por 48 horas, con fluoruro de potasio (KF),

muestran que el índice mitótico (número de células en mitosis expresado como un porcentaje del número total de células cuantificadas) (Evans *et al.*, 1957) en las concentraciones de 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ no se modificó; sin embargo en las concentraciones de 40 y 80 $\mu\text{g/ml}$ de KF hubo una disminución significativa de este parámetro de 3.15 y 2.35% respectivamente con una $P < 0.05$ en comparación con el testigo que tuvo un valor de 4.76 %; (Figura 8).

Figura 8.- Efecto del KF sobre el índice mitótico en cultivos de linfocitos humanos a las 48 horas

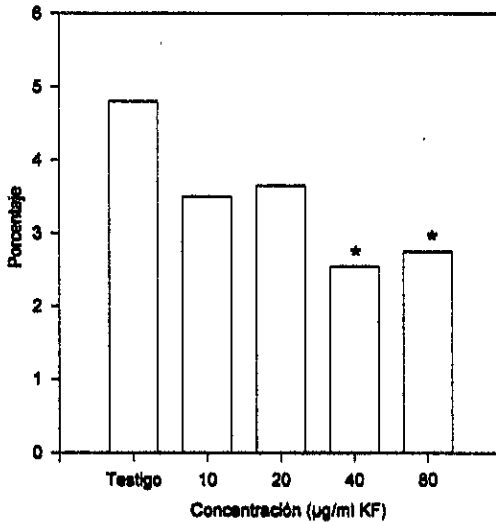


* $P < 0.05$ con prueba de "Z"

Cuando se aplicó el KF a los cultivos de 72 horas, se observó el mismo comportamiento, no se presentó alteración en el IM en las dosis de 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de KF, y hubo una disminución en las

concentraciones de 40 $\mu\text{g/ml}$ (2.55%) y 80 $\mu\text{g/ml}$ (2.75%) con respecto al testigo que fue de 4.8% con una $P < 0.05$ (Figura 9).

Figura 9. - Efecto del KF sobre el índice mitótico en cultivos de linfocitos humanos a las 72 horas



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

Los datos reportados en el presente estudio concuerdan con la mayoría de los trabajos realizados por diferentes autores; tal es el caso de Tsutsui *et al* (1984c), quienes reportaron la citotoxicidad del NaF en cultivos de fibroblastos humanos (células JHU-1) la cual se determinó por muerte celular mediante la disminución en la habilidad de formación de la colonia, presentándose un comportamiento lineal conforme aumentaba la

dosis de NaF (50-150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o el tiempo de exposición a este compuesto (1-24 horas). Este mismo autor (Tsutsui *et al.*, 1995) encontró que al utilizar el mismo sistema de prueba pero en concentraciones de 1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 1-3 semanas, no se indujo disminución en el número celular, ni tampoco retraso mitótico. Ambos reportes concuerdan con la presente investigación ya que no se observó disminución significativa del índice mitótico en la concentración de 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de KF pero éste disminuyó significativamente en las dosis más altas (40 y 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

De igual forma Thomson *et al* (1985) reportaron que la presencia de células con cromosomas totalmente pulverizados es un reflejo de citotoxicidad generalizada del NaF y KF que resulta en la muerte celular en dosis muy altas, sugiriendo la posibilidad de que el F podría, indirectamente y en la misma forma que cualquier otro veneno que ataque proteínas, producir daño cromosómico en dosis muy altas por la interferencia con los sistemas enzimáticos celulares.

Khalil y Da'dara (1994), reportaron que altas concentraciones de F provocaban una reducción significativa en la sobrevivencia de las células y una alteración del índice mitótico en los cultivos de células de médula ósea de rata. Un año después, este mismo autor trabajando con el mismo sistema, observó la ausencia de figuras

mitóticas en las dosis más altas de NaF y KF (42.85-428.5 µg/ml) (Khalil, 1995).

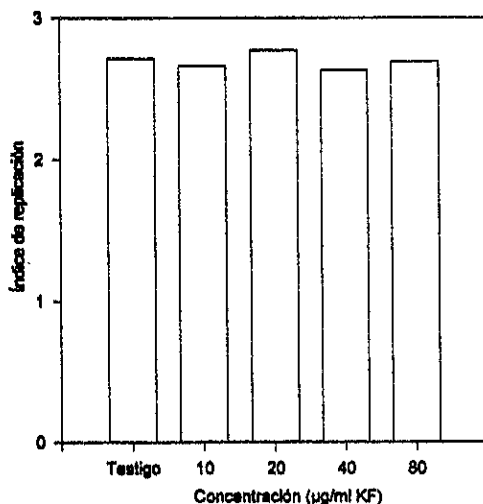
2) Índice de Replicación (IR)

La determinación de parámetros citotóxicos es muy amplio en los estudios que involucran el análisis de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH's), por el hecho de que después de la tinción diferencial de las cromátidas hermanas mediante la incorporación de 5-bromodesoxiuridina (BrdU) al ADN, la historia replicativa de las células individuales en metafase se puede identificar fácilmente. Es por esto que para el análisis de la cinética de ciclo celular (CCC), del índice de replicación (IR) y del tiempo de proliferación linfocítica (TPL) es necesario utilizar la tinción diferencial (Perry y Evans, 1975; Herrera *et al.*, 1991; Lazutka, 1991; Rojas *et al.*, 1992).

Esta técnica ha permitido en la actualidad conocer algunos cambios en la proliferación celular inducida por diversos agentes y factores tanto *in vitro* como *in vivo* (Latt, 1974; Perry y Evans, 1975; Mudry *et al.*, 1981; WHO, 1985; Lazutka, 1991). En la figura 10 se muestra que el índice de replicación (IR) no se alteró en ninguna de las concentraciones utilizadas (10, 20, 40 y 80 µg/ml de

KF), presentando valores de 2.66, 2.77, 2.63 y 2.69 respectivamente en comparación con el testigo (2.72). En el presente trabajo se considera que el KF no altera la velocidad de replicación de las células ni tampoco modifica el tiempo para que una población de células puedan dividirse.

Figura 10.- Efecto del KF sobre el índice de replicación en cultivos de linfocitos humanos



El KF no alteró el IR, sin embargo disminuyó el IM. La disminución del IM es usualmente una consecuencia de la reducción en la velocidad de proliferación celular (retraso mitótico); sin embargo, el hecho de que el índice de replicación no se modificara, refleja la pérdida de la capacidad proliferativa de las células o la muerte celular (Scott *et al.*, 1991).

La capacidad de proliferación celular puede perderse en aquellas células que muestran una fragmentación excesiva y en algunos tipos celulares, la pérdida de un sólo fragmento de cromosoma tiene altas probabilidades de causar muerte celular (Scott y Roberts, 1987). Algunos autores concuerdan que la exposición al KF y NaF producen inhibición en la capacidad de proliferación celular así como la muerte de las células al utilizar sistemas tanto *in vivo* como *in vitro* tales como fibroblastos humanos (Tsutsui *et al.*, 1984c; Hayashi y Tsutsui, 1993), linfocitos humanos (Thomson *et al.*, 1985), células CHO y en células CHBM (Li *et al.*, 1987).

Se ha reportado que en ratones expuestos a concentraciones de <0.5 ppm o 50 ppm de NaF el porcentaje de células de médula ósea las cuales se replicaron una, dos o tres veces no se alteró y por lo tanto tampoco su IR (Kram *et al.*, 1978), mientras que Li *et al.* (1987) en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* reportaron que en cultivos de células de ovario de hámster Chino (CHO) en concentraciones de 0-270 µg/ml NaF y en células de médula ósea de hámsters Chino (CHBM) en dosis de 0.1-130 mg NaF/kg se registró una inhibición del ciclo celular y la muerte de las células con el incremento en las concentraciones de NaF. Contradictoriamente este mismo autor mostró que la exposición

crónica (1-75 ppm) de NaF en el agua para beber no causó efecto significativo alguno en la proliferación celular en CHBM (Li *et al.*, 1989). Tampoco causó retraso mitótico en fibroblastos humanos a una concentración de 10 µg/ml durante tres semanas (Tsutsui *et al.*, 1995).

Se sabe que los fluoruros actúan como venenos celulares directos, interfiriendo con el metabolismo del calcio y los mecanismos enzimáticos (Dreisbach y William, 1988); además el flúor puede reaccionar con cationes divalentes en la célula (Mg, fosfato, etc.), por lo que esta interacción ocasiona desórdenes en los procesos celulares tales como la diferenciación celular o el metabolismo energético conduciendo en muchos casos a la muerte celular (Zeiger *et al.*, 1993).

Algunas veces la capacidad de algunos agentes químicos de interferir con la proliferación celular se ha estudiado de manera paralela a la búsqueda de actividad genotóxica. Esto ha guiado a encontrar algunas correlaciones entre ambos fenómenos como es el hecho que aquellos agentes que inducen daño cromosómico severo producen también una reducción en la velocidad de proliferación celular (Morimoto *et al.*, 1985). Algunas de las drogas que muestran una clara inhibición del índice mitótico y la cinética de proliferación linfocítica relacionada a la dosis son la Mitomicina C y el Cis-

Platino, drogas conocidas como citostáticas (Morimoto *et al.*, 1985; Herrera *et al.*, 1991; Rojas *et al.*, 1992).

MARCADORES BIOLÓGICOS DE GENOTOXICIDAD

1) Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH's)

Los intercambios de cromátidas hermanas son transposiciones simétricas y equivalentes en el mismo locus entre las cromátidas del mismo cromosoma y que no provocan alteración de la morfología cromosómica (Perry y Evans, 1975; Morales, 1988). Los ICH's son indicadores muy sensibles para ciertas clases de daño genotóxico (WHO, 1985; Morales, 1988; Morales *et al.*, 1995; Tucker y Preston, 1996). Aunque dicha frecuencia varía entre los individuos, también existen diferentes factores que la pueden afectar, como es la exposición previa a agentes quimioterapéuticos, rayos X, luz ultravioleta, agentes alquilantes, una gran variedad de químicos mutágenos-carcinógenos o defectos genéticos tales como aquéllos vistos en el síndrome de Bloom (Perry y Evans, 1975; Wolff, 1977; Morimoto *et al.*, 1985; Morales y Cruz, 1996).

Numerosos estudios han reportado una relación directa entre la mutagenicidad de varias sustancias y su efecto en el incremento

de la incidencia de ICH's (Perry y Evans, 1975; Vogel y Bauknecht, 1976; Wolff, 1977) y aunque el significado biológico de los ICH's no ha sido establecido existen hipótesis que tratan de explicar su función celular y el proceso molecular que los origina. Hay modelos en los que se relaciona el tipo de evento generador con agentes que dañan o alteran el ADN (Painter, 1980; Cleaver, 1981), agentes que inhiben la síntesis del ADN (Ishii y Bender, 1980; Nishi *et al.*, 1982) y los eventos espontáneos (Ishii y Bender, 1980; Rainaldi y Mariani, 1982; Morales *et al.*, 1990).

Según Stetka (1979), los modelos propuestos para explicar el origen de los ICH's deben tener las siguientes consideraciones: los ICH's son inducidos por la mayoría de los agentes que son mutágenos y carcinógenos pero no pueden correlacionarse de forma cuantitativa; la célula debe pasar por la etapa de síntesis (Wolff *et al.*, 1974; Shafer, 1977) ya que es el momento en que las zonas homólogas de las cadenas nacientes del ADN se encuentran más unidas permitiendo que se lleve a cabo el intercambio de manera simétrica, lo cual significa un menor costo de energía a la célula. Debido a esto, es posible que las lesiones del ADN no reparadas antes de la etapa de síntesis causen los ICH's (Morales *et al.*, 1995).

Los modelos de inducción de ICH's a través de lesiones en el ADN se pueden dividir en dos grupos: Uno que propone que los ICH's se inducen mediante lesiones discretas y ocurren en el sitio o cerca del sitio en que la lesión se localiza (Shafer, 1977; Ishii y Bender, 1980; Morales *et al.*, 1990), y otro que sugiere que los ICH's son causados por varias lesiones y el sitio de ocurrencia no está relacionado a una lesión específica (Painter, 1980; Cleaver, 1981; Dufrain y Garrand, 1981).

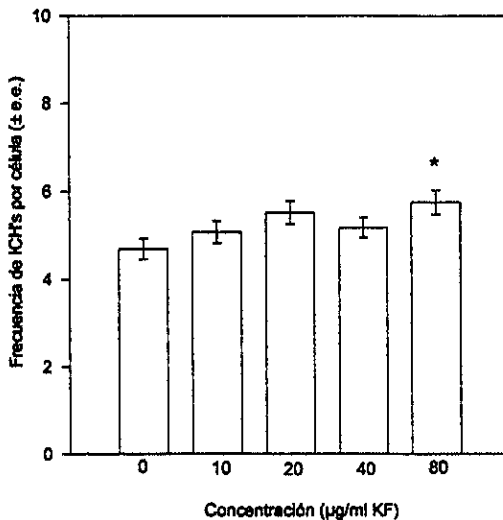
Actualmente al menos hay dos posibilidades de interacción entre los agentes mutágenos en la inducción de ICH's. La primera, es la interacción de lesiones causadas por estos agentes durante la síntesis de ADN (Painter, 1980); y la otra es la interacción de mutágenos con sistemas que eliminan el daño al ADN (Samson y Schwartz, 1980).

Es posible que el fenómeno de los ICH's sea la consecuencia de un proceso que permite a la célula dividirse, aún en presencia de lesiones en su ADN, por lo tanto puede haber una correlación entre el fenómeno de ICH y la mutación, dado que las lesiones persistentes aumentan la probabilidad de este último fenómeno en el ADN (Morales, 1988).

Al cuantificar la frecuencia de ICH's por la exposición al KF, se encontró que dicho compuesto no modificó la frecuencia de

intercambio de cromátidas hermanas (Figura 11) en las concentraciones de 10, 20, y 40 $\mu\text{g/ml}$ de KF (5.06 ± 2.58 , 5.5 ± 2.59 y 5.16 ± 2.29 respectivamente); sin embargo en la concentración más alta (80 $\mu\text{g/ml}$ de KF) el número de ICH's por metafase fue de 5.75 ± 2.74 , valor que resultó estadísticamente significativo ($P < 0.05$) con respecto al testigo (4.68 ± 2.33), por lo que desde el punto de vista biológico se puede considerar que el KF es un débil inductor de ICH's.

Figura 11.- Frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en cultivos de linfocitos humanos tratados con KF



* $P < 0.05$ con prueba de "t" de Student

Los resultados presentados concuerdan con el punto de vista de Siviková y Dianovský (1995) quienes no observaron incremento significativo en la frecuencia de ICH's en linfocitos de oveja

expuestos a 0.75 g de F durante un año; sin embargo, tuvo efecto positivo en la inducción de ICH's en dosis de 1.5 g/animal en comparación a los controles ($P < 0.05$) aplicándole la prueba "t" de Student. Únicamente se observaron pequeñas diferencias en el valor promedio de ICH's/Cél entre ambos grupos experimentales (9.17 y 9.28 ICH/Cél, respectivamente), a pesar de que para la concentración de 1.5 la diferencia fue estadísticamente significativa se concluyó que ésta condición era insuficiente para constituir un riesgo genético.

Con respecto a esto, Khalil (1995) menciona que la prueba de ICH's es generalmente, pero no necesariamente un parámetro más sensible que las aberraciones cromosómicas. Por lo tanto, la inducción de ICH's no es una evidencia suficiente para clasificar a un agente como mutagénico, pero puede formar parte de cualquier programa de evaluación de mutágenos como un complemento para otros sistemas de ensayos (Perry y Evans, 1975; Perry y Thomson, 1984; Tucker y Preston, 1996). Por lo tanto, otro de los criterios tomados en cuenta para considerar que un compuesto altere a dicha frecuencia es el doblaje de ésta con respecto al testigo, lo cual en ninguna de las concentraciones utilizadas sucede.

Algunas investigaciones realizadas por diferentes autores donde las concentraciones utilizadas son similares o sobrepasan a

las del presente estudio dan resultados parecidos o totalmente contradictorios lo cual, probablemente se deba a las diferencias entre los protocolos utilizados; por ejemplo, en estudios realizados con ratones que permanecieron durante siete generaciones expuestos a una dieta que contenía 50.4 $\mu\text{g/ml}$ NaF se observó que en las células de médula ósea no hubo incremento en la frecuencia de ICH's (Kram *et al.*, 1978).

Li *et al* (1987) no encontraron incremento alguno en la frecuencia de ICH's en células CHBM tratadas con dosis que variaban desde 0.1 hasta 130 mg/kg de NaF, ni en cultivos de células CHO tratadas con F en concentraciones mayores a 100 ppm de F. Posteriormente, examinaron la exposición crónica del NaF en el agua para beber sobre la frecuencia de ICH's en las células CHBM en concentraciones de 1-75 ppm. Los resultados indicaron que la exposición crónica no tuvo efectos sobre la frecuencia de ICH's (Li *et al.*, 1989).

En los estudios realizados un factor que al parecer ha influido en los resultados son los análisis a doble ciego (sin previo conocimiento del tratamiento) (Perry y Thomson, 1984) como se realizó en el presente estudio, ya que es esencial, que las pruebas como el análisis de ICH's, tengan un análisis subjetivo. La revisión de los reportes que cuantifican los ICH's han indicado que los

investigadores quienes reportan resultados negativos utilizaron sistemas a doble ciego en los tratamientos aplicados (Kram *et al.*, 1978 y Thomson *et al.*, 1985), mientras que de manera contradictoria, otros autores que no utilizaron dicho sistema, fueron Tsutsui *et al.* (1984a) quienes reportaron que los ICH's se inducen en células de embrión de hámster Sirio (SHE) tratadas con 20-80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sin fracción S9 y He *et al.* (1983) en células de venado rojo con 12.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de NaF.

En los estudios *in vivo* el incremento en la frecuencia basal de ICH's así como las diferencias individuales de ICH's encontrados en los controles y en los grupos experimentales podría ser causado por diversos factores como el genotipo, metabolismo y la habilidad individual para reparar el ADN (Rojas *et al.*, 1992), mientras que, en los sistemas *in vitro* la influencia de los componentes del medio, la fotoactivación por luz y la capacidad limitada para la activación metabólica de algunos agentes químicos, entre otros, son factores que influyen en la frecuencia basal de ICH's. Sin embargo, las ventajas de los sistemas *in vitro* es la utilización de diferentes tipos celulares, además de ser una técnica simple y relativamente rápida.

En el presente estudio el KF solo alteró la frecuencia de ICH's en la dosis más alta probada. Desde el punto de vista genotóxico no

se considera que la diferencia de aproximadamente un intercambio sea evidencia suficiente para decir que el KF incrementa de forma severa los rompimientos de las hebras (dos dobles hélices) de ADN dando como resultado la formación de ICH's, por lo que este compuesto se puede clasificar como un genotóxico débil (Roldán y Altamirano, 1990).

2) Aberraciones Cromosómicas (AC)

La cuantificación de aberraciones cromosómicas es uno de los parámetros de vital importancia para conocer el efecto genotóxico causado por la exposición a agentes químicos. En la tabla 3 se muestran los valores de las aberraciones cromosómicas encontradas en los cultivos de linfocitos humanos tratados con KF.

En lo que se refiere al número total de células con aberración y al número total de aberraciones cromosómicas por célula, en las dosis de 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ de KF no se encontraron aumentos diferentes, mientras que en la concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$ se incrementó el porcentaje (de 7 y 8.5 % respectivamente en comparación con 2.33% del testigo; $P < 0.005$ para ambos casos), notando una disminución en la concentración de 80 $\mu\text{g/ml}$ de KF. Este comportamiento puede deberse a que la dosis de 40 $\mu\text{g/ml}$ aún

no es suficientemente citotóxica, por lo que podemos cuantificar un gran número de aberraciones cromosómicas, pero en la concentración de 80 µg/ml la dosis ya fue lo suficientemente alta para provocar la muerte o impedir la división celular (disminución del índice mitótico) de las células por lo que las aberraciones cromosómicas no pueden ser evaluadas.

**Tabla 3.- Aberraciones cromosómicas inducidas por el KF
en linfocitos humanos en cultivo**

Tratamiento (µg/ml)	Total de cél/ac (%)	Total de ac/cél (%)	Fragmentos (%)		Figuras Radiadas (%)	Huecos (%)	
			Sencillos	Dobles		Sencillos	Dobles
Testigo	7/300 (2.33)	7/300 (2.33)	5/300 (1.66)	0/300 (0.0)	0/300 (0.0)	2/300 (0.66)	0/300 (0.0)
10	8/200 (4.0)	9/200 (4.5)	7/200 (3.5)	0/200 (0.0)	1/200 (0.5)	1/200 (0.5)	0/200 (0.0)
20	8/200 (4.0)	10/200 (5.0)	9/200 (4.5)*	0/200 (0.0)	1/200 (0.5)	0/200 (0.0)	0/200 (0.0)
40	14/200 (7.0)*	17/200 (8.5)*	12/200 (6)*	1/200 (0.5)	0/200 (0.0)	2/200 (1.0)	2/200 (1.0)
80	6/200 (3.0)	6/200 (3.0)	2/200 (1.0)	1/200 (0.5)	0/200 (0.0)	3/200 (1.5)	0/200 (0.0)

ac, aberraciones cromosómicas.

*Valores significativamente diferentes con respecto al testigo (P<0.050 con Prueba de Ji cuadrada).

Cuando se realizó el análisis por tipo de aberración, el porcentaje de fragmentos sencillos (cromatídicos) fue el único parámetro en donde se registró un aumento significativo en las

dosis de 20 $\mu\text{g/ml}$ (4.5%) y 40 $\mu\text{g/ml}$ (6%) con una $P < 0.05$ en comparación con el testigo que tuvo un valor del 1.6%. Mientras que en la concentración más alta de 80 $\mu\text{g/ml}$ disminuyen el número de fragmentos sencillos al 1% lo cual podría también explicarse por la muerte de las células dañadas. En lo que respecta a los rompimientos dobles, figuras radiadas y gaps (huecos) sencillos y dobles no se observaron incrementos significativos en ninguna de las concentraciones utilizadas.

La disminución en las frecuencias de aberraciones cromosómicas en algunos trabajos se ha explicado por varios mecanismos: muerte celular, dilución de las lesiones a través de la división de precursores o células tronco, o la reparación del ADN (Kligerman, *et al.*, 1988), por lo que el hecho de que en la concentración de 80 $\mu\text{g/ml}$ de KF disminuya el número de fragmentos cromatídicos puede deberse a la muerte celular.

Autores como Tsutsui *et al* (1995) encontraron que bajas concentraciones de F durante un largo período no incrementaron la frecuencia de aberraciones cromosómicas en cultivos de fibroblastos diploides de humanos (rango de 1-10 $\mu\text{g/ml}$ NaF, durante 1-3 semanas), y que el F no debe ser clastogénico cuando se expone a bajos niveles, equivalentes a aquellas comunidades con suministros de agua. Un comportamiento similar al ocurrido en este

estudio fue el observado por Scott (1985) quien reportó la inducción de gaps y rompimientos en cultivo de fibroblastos después de 48 horas de exposición al NaF en concentraciones mayores a 10 $\mu\text{g/ml}$, mientras que Kishi y Tonomura (1984) encontraron un incremento de aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos humanos cuando las concentraciones de NaF alcanzaron 42 $\mu\text{g/ml}$, mientras que, cuando se emplearon dosis mayores de 252 $\mu\text{g/ml}$, el número de aberraciones cromosómicas comenzó a disminuir sugiriéndose que este comportamiento se debía a la toxicidad del F.

Las aberraciones cromosómicas inducidas por el KF podrían ser consecuencia de un mecanismo indirecto que altera procesos enzimáticos necesarios en la síntesis y reparación del ADN (Aaderma *et al.*, 1989; Zeiger *et al.*, 1993).

Algunas investigaciones han mostrado que las aberraciones cromosómicas se incrementan en dosis de 25-100 μg de NaF/ml en células CHO, encontrando que la etapa de G_2 es la más sensible para la inducción de daño cromosómico por el NaF (Aardema *et al.*, 1989), aunque estudios elaborados por Hayashi y Tsutsui (1993) reportaron la dependencia del ciclo celular en la inducción de clastogénesis del NaF, ya que al utilizar fibroblastos diploides humanos sincronizados, estos autores reportaron una inducción

significativa de aberraciones únicamente cuando las células eran tratadas en la fase S, pero no en las células en G_1 o G_2 .

Estos resultados concuerdan con lo encontrado en el presente trabajo, ya que los agentes S-dependientes al ser aplicados desde el inicio del ciclo celular producen aberraciones de tipo cromatídico.

Khalil (1995) investigó los efectos genotóxicos de fluoruros inorgánicos mediante el tratamiento de varias concentraciones de KF y NaF (0.1-100 μ M) en cultivos de células de médula ósea de rata durante diferentes tiempos (12, 24 y 36 horas) cuantificando de esta manera las células con aberraciones así como el número de rompimientos por célula. Los resultados indicaron que ambas formas de fluoruros fueron débiles mutágenos. La especificidad del ion F en la inducción de aberraciones cromosómicas se observó por el comportamiento casi equivalente del NaF y KF.

Caspary *et al* (1987) encontraron que el NaF y el KF dieron respuesta tóxica y mutagénica en linfoma de ratón L5178Y TK+/- en un rango de concentraciones de 300-600 μ g/ml. La concentración mutagénica más baja del KF fue de 400-500 μ g/ml y el NaF llegó a ser mutagénico en una concentración muy similar de 300-500 μ g/ml. Los resultados obtenidos en ambos estudios concuerdan en que la respuesta mutagénica no parece estar

dependiendo de los cambios en el catión (Na, K⁺ y H⁺) , así que el ion F fue el responsable del incremento en la frecuencia de mutación.

En células embrionarias de hámster, la exposición a concentraciones de NaF de 75 y 125 ppm provocó un incremento significativo de aberraciones cromosómicas (Tsutsui *et al.*, 1984b). El mismo investigador reportó que fibroblastos diploides humanos tratados con 20-50 ppm de NaF mostraron un incremento significativo en aberraciones cromosómicas, concluyendo así que el NaF causa daño al ADN y por lo tanto, puede ser potencialmente dañino para los humanos (Li *et al.*, 1988), mientras que Thomson *et al.* (1985) no encontraron evidencias, de que el F induzca aberraciones cromosómicas lo cual se reflejaría en la interacción de este ión con el ADN celular.

En resumen, la presencia de rompimientos sencillos (cromatídicos) en las concentraciones de 20 y 40 µg/ml indica que el efecto del KF provocó rompimientos en una cadena del ADN, además de tener actividad clastógena en bajas concentraciones y citotóxica en dosis altas.

Drescher y Suttie (1972) mostraron con HeLa y células L de ratón que la concentración intracelular del ion F se aproxima a 30-40% de la concentración aplicada en el tratamiento; esta

proporción no se afectó por la duración del tratamiento (1-2 horas) o la concentración de F (10-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Por lo tanto, las concentraciones extracelulares de 300-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de la sal de F en el estudio de Caspary *et al* (1987) sugerirían que la concentración intracelular encontrada sería de 100-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, la cual es más que suficiente para inhibir o estimular una variedad de enzimas *in vitro*.

En base a lo anterior si consideramos que sólo un 30 a 40 % de las concentraciones empleadas (10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de KF) se encontrarían en realidad intracelularmente, el rango de concentraciones serían de 3.5-28 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de KF dosis a las cuales se puede iniciar ya un posible efecto a nivel celular o de ADN.

El hecho de que el KF no haya elevado considerablemente la frecuencia de ICH's pero sí algunos tipos de aberraciones indica que los ICH's y las aberraciones estructurales se producen mediante mecanismos diferentes y por lo tanto reflejan diferentes tipos de daño al ADN (Hedner *et al.*, 1982). Por ejemplo, los agentes que producen rompimientos severos en los cromosomas, tales como los rayos X, tienen poco o ningún efecto sobre la frecuencia de ICH's (Perry y Evans, 1975). También, entre los pacientes con desórdenes cromosómicos hereditarios tales como ataxia telangiectasia, síndrome de Bloom y anemia de Fanconi, los cuales están caracterizados por un marcado incremento en la

frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas, los pacientes con síndrome de Bloom son los únicos que tienen un incremento de ICH's, mientras que los pacientes con ataxia telangiectasia y anemia de Fanconi tienen una frecuencia normal (Hedner *et al.*, 1982).

En una revisión de 21 estudios con grupos de personas expuestas a agentes químicos (Brögger, 1982) se compararon las aberraciones cromosómicas y los ICH's, mostrando que el método de ICH's generalmente es menos efectivo para dar a conocer daño genético en relación con las aberraciones cromosómicas. El hecho que el análisis de aberraciones se encontrara negativo y la prueba de ICH's fuera positiva no se observó en ninguno de los casos estudiados. Por lo tanto, estos estudios son contradictorios con respecto a los reportes de la mayoría de los estudios realizados *in vitro*, donde los ICH's se han evaluado por ser un método más sensible de daño al ADN.

3) Asociación de Satélites (AS)

La alta incidencia de aberraciones encontradas en los 10 autosomas acrocéntricos en el hombre se atribuye a la región organizadora nucleolar (NOR) localizada en los brazos cortos.

Dichas NOR frecuentemente se localizan cerca una de la otra, a lo que se le llamó asociación de satélites (Miller *et al.*, 1977; Gani, 1978; Sigmund *et al.*, 1979). La NOR es una región cromosómica con la cual el nucleólo se asocia y que es la responsable de su formación. La identificación del organizador nucleolar como centro o sitio del ADN ribosómico (ADNr) comprobó la idea de que el nucleólo es el sitio de síntesis del ARNr (Bicudo, 1982).

Las regiones de asociación de satélites de los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22 han recibido mucha atención debido a que la alta incidencia de asociaciones podrían estar involucradas en las causas de anomalías cromosómicas en el hombre. La participación de los acrocéntricos en las AS podrían causar cierta vulnerabilidad a la no-disyunción produciendo trisomías de tipo D y G así como también intercambio de ADN y rearrreglos (translocaciones) (Hansson, 1970; Henderson, 1973; Houghton, 1979). Rosenkranz y Fleck (1969) reportaron a cuatro familias en donde había casos de Síndrome de Down por translocación y tanto los afectados como sus parientes tenían una alta incidencia de asociación de satélites.

La frecuencia de asociación de los cromosomas acrocéntricos se puede alterar como consecuencia de la edad, condiciones de cultivo, estado hormonal, factores genéticos, etc. así como por la exposición a diversos agentes químicos. En el último caso, dicho

fenómeno ha sido poco utilizado como un indicador de daño al material genético (Kirsch *et al.*, 1978), aunque en la actualidad está tomando fuerza nuevamente (Roldán y Altamirano, 1990; Leonard y Gerber, 1994; Zhong *et al.*, 1994), ya que estos agentes pueden provocar alteraciones tanto en el número como en el tipo de asociación, conllevando a la producción de aneuploidías y rearrreglos cromosómicos.

En la tabla 4 se presenta el número de asociaciones (0-4) de los cromosomas acrocéntricos por célula; los resultados muestran que en ninguno de los tratamientos el KF modificó los parámetros analizados con respecto al testigo.

Tabla 4.- Frecuencia de asociación de satélites en cultivos de linfocitos humanos tratados con KF

Tratamiento ($\mu\text{g/ml}$)	No. de asociaciones por célula (%)				
	0	1	2	3	4
Testigo	63/300 (21.0)	136/300 (45.0)	89/300 (29.0)	12/300 (4.0)	0/300 (0.0)
10	67/200 (33.0)	89/200 (44.0)	38/200 (19.0)	4/200 (2.0)	2/200 (1.0)
20	54/200 (27.0)	93/200 (46.5)	45/200 (22.5)	7/200 (3.5)	1/200 (0.5)
40	60/200 (30.0)	73/200 (36.5)	57/200 (28.5)	9/200 (4.5)	1/200 (0.5)
80	39/200 (19.0)	89/200 (44.5)	62/200 (31.0)	8/200 (4.0)	2/200 (1.0)

En cuanto al número de cromosomas involucrados en asociación (2 a 5 acrocéntricos), el total de asociaciones y el total de células con asociación de satélites, tampoco se presentaron diferencias significativas (Tabla 5); de igual forma sucedió en la distribución de las posibles combinaciones de cromosomas acrocéntricos asociados (Tabla 6) y en la proporción de cromosomas del grupo D y G (Tabla 7).

Tabla 5.- Asociaciones de satélites con 2 o más cromosomas acrocéntricos tratados con KF en linfocitos humanos en cultivo.

Tratamiento ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	No. de cromosomas en asociación (%)				Total de a.s/cél	Total de cél/a.s (%)
	2	3	4	5		
Testigo	273/350 (78.0)	65/350 (19.0)	12/350 (3.0)	0/350 (0.0)	350/300 (1.16)	237/300 (79.0)
10	152/185 (82.0)	27/185 (15.0)	4/185 (2.0)	2/185 (1.0)	185/200 (0.92)	133/200 (66.5)
20	176/208 (85.0)	29/208 (14.0)	3/208 (1.0)	0/208 (0.0)	208/200 (1.04)	146/200 (73.0)
40	181/214 (85.0)	26/214 (12.0)	5/214 (2.0)	2/214 (0.9)	214/200 (1.07)	140/200 (70.0)
80	193/245 (78.7)	41/245 (16.7)	9/245 (3.7)	2/245 (0.8)	245/200 (1.22)	161/200 (80.5)

En cuanto a la proporción de cromosomas del grupo D y G se espera que los cromosomas D participen con más frecuencia en las asociaciones que los del grupo G debido a su

ocurrencia numérica (6 o 60 % de los cromosomas del grupo D, contra 4 o 40 % de los cromosomas del grupo G).

Tabla 6.- Distribución de combinaciones de cromosomas acrocéntricos D o G con asociación en linfocitos humanos tratados con fluoruro de potasio

Combinaciones	TRATAMIENTOS ($\mu\text{g/ml}$)				
	Testigo	10	20	40	80
DD	63 (18.0 %)	37 (20.0 %)	46 (22.0 %)	35 (16.0 %)	44 (18.0 %)
DG	148 (42.0 %)	89 (48.0 %)	92 (44.2 %)	106 (49.5 %)	122 (49.8 %)
GG	62 (17.7 %)	26 (14.0 %)	38 (18.3 %)	40 (18.7 %)	27 (11.0 %)
DDD	10 (2.9 %)	4 (2.2 %)	4 (1.9 %)	3 (1.4 %)	1 (0.41 %)
DDG	30 (8.6 %)	20 (10.8 %)	10 (4.8 %)	9 (4.20 %)	17 (6.9 %)
DGG	21 (6.0 %)	2 (1.08 %)	13 (6.25 %)	13 (6.07 %)	21 (8.57 %)
GGG	4 (1.14%)	1 (0.54 %)	2 (0.96 %)	1 (0.47 %)	2 (0.82 %)
DDDD	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)	1 (0.48 %)	1 (0.47 %)	0 (0.0 %)
DDDG	2 (0.57 %)	2 (1.08 %)	0 (0.0 %)	1 (0.47 %)	1 (0.41 %)
DDGG	8 (2.28 %)	0 (0.0 %)	2 (0.96 %)	2 (0.93 %)	7 (2.86 %)
DGGG	2 (0.57 %)	2 (1.08 %)	0 (0.0 %)	1 (0.47 %)	1 (0.41 %)
GGGG	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)
DDDDG	0 (0.0 %)	1 (0.54 %)	0 (0.0 %)	1 (0.47 %)	1 (0.41 %)
DDGGG	0 (0.0 %)	1 (0.54 %)	0 (0.0 %)	1 (0.47 %)	1 (0.41 %)
TOTAL	380	188	208	214	248

El hecho de que este comportamiento no se presentara puede deberse a otros factores como lo son: la edad, la

variación individual de los donadores en cuanto al metabolismo o diferente susceptibilidad de las subpoblaciones de linfocitos (Zang y Back, 1968; Henderson, 1973; Rojas *et al.*, 1992).

Tabla 7. Efecto del KF sobre la proporción de cromosomas acrocéntricos asociados en linfocitos humanos en cultivo

Tratamiento µg/ml	Total de crom. asoc.	Proporción		N
		D	G	
Testigo	789	51%	49%	300
10	411	55.96%	44.04%	200
20	451	55.5%	47.45%	200
40	470	49.57%	50.43%	200
80	555	52.43%	47.57%	200

Pocos son los trabajos reportados en donde la frecuencia de asociación se altere por la exposición a agentes químicos y físicos. En ciertos pacientes bajo terapia con litio, se incrementó la incidencia de asociación de satélites (Sharma y Talukder, 1987). También, se ha reportado que poblaciones expuestas a mutágenos ambientales, tales como el acetato de fenilmercurio, plomo y en el acetato de depo-medroxiprogesterona, hubo una disminución significativa en la frecuencia de asociación (disociación). Los

resultados sugirieron que las actividades de síntesis del ARNr de los organizadores nucleolares en acrocéntricos humanos se modificaron por algunos de estos mutágenos probados. Dicha modificación pudo producirse mediante daño directo sobre el ADN o por un efecto mutagénico indirecto por las moléculas del huso y/o modificaciones sobre vía enzimática (Kirsch *et al.*, 1978).

El pentóxido de vanadio, carbonato de litio, cloruro de estaño y cloruro de manganeso, son algunos ejemplos más de compuestos que sí aumentan la frecuencia de asociación en linfocitos humanos tratados *in vitro* (Roldán, 1988; Altamirano, 1992; Sierra, 1995).

Los trabajos realizados para investigar los efectos del F sobre la frecuencia de asociación de satélites han sido escasos y poco concluyentes. Rapoport (1956) en un estudio que realizó al norte del centro de los Estados Unidos encontró una relación positiva en la incidencia de síndrome de Down (usualmente asociado con trisomía 21, como consecuencia de la no-disyunción) con el consumo de agua fluorada. Posteriormente se confirmaron estos descubrimientos en un estudio similar dirigido dentro de la misma zona geográfica. Estos estudios se han criticado porque no evaluaron adecuadamente los efectos de la edad materna y además porque la estimación de los antecedentes y la incidencia de síndrome de Down fue baja (Zeiger *et al.*, 1993).

Estudios posteriores en los Estados Unidos no pudieron demostrar diferencias en la incidencia de síndrome de Down como una consecuencia de la fluoración de agua para beber. Erickson (1980) mostró que no hubo diferencias en la proporción de otros defectos comunes al nacimiento en áreas de los Estados Unidos que consumían agua fluorada y no fluorada.

4) Electroforesis de Células Individuales (SCG) o Ensayo Cometa

Actualmente se ha incrementado el interés por buscar nuevos marcadores biológicos que proporcionen una medida de actividad biológica por la exposición a agentes mutágenos. Los métodos citogenéticos proporcionan información concerniente al daño inducido a nivel de células individuales, pero usualmente se limitan a las células en proliferación y particularmente a linfocitos en circulación; mientras que las técnicas bioquímicas evalúan casi cualquier población celular pero la información acerca de la distribución o persistencia del daño entre las células individuales no está disponible (Doerjer *et al.* 1988).

El ensayo cometa debido a la gran sensibilidad que posee para identificar rompimientos de cadena sencilla de ADN y sitios alcalilábiles, se ha convertido en una prueba confiable y de amplia

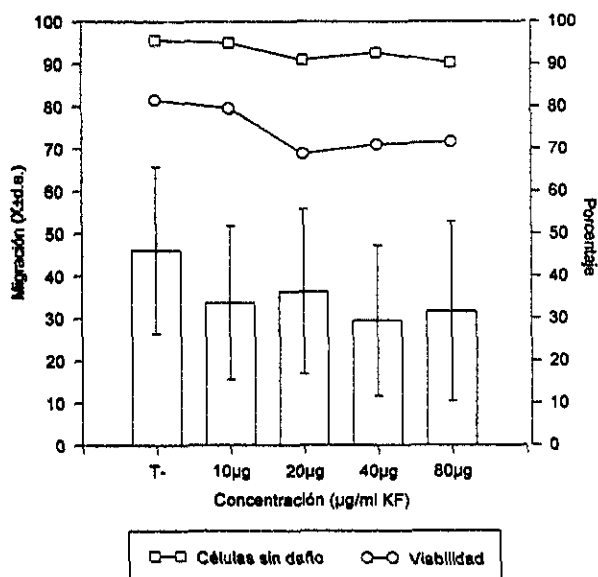
utilización en los últimos años. Esta prueba requiere sólo de un pequeño número de células y los resultados se pueden obtener en poco tiempo. Es por esto que se ha utilizado exitosamente en una gran variedad de células eucariotas (Betti *et al.*, 1994; Hartmann *et al.*, 1994; Fairbairn, *et al.*, 1995; Altamirano *et al.*, 1996).

Varios estudios han demostrado que la electroforesis de células individuales es capaz de detectar un amplio espectro de agentes mutagénicos (Fairbairn *et al.*, 1995). Es una prueba de diagnóstico potencial para la evaluación del daño inducido por radiación, agentes químicos, quimioterapias así como para algunos síndromes con defectos en la reparación por excisión, tal como el Xeroderma Pigmentoso (Ostling *et al.*, 1987; Betti *et al.*, 1994; Hartmann *et al.*, 1994).

En el presente estudio se evaluó la citotoxicidad y la genotoxicidad mediante la previa exposición al KF. Para el primer parámetro, se cuantificó el número de células viables (viabilidad celular); mientras que para genotoxicidad, se observaron células que presentaran rompimientos en la cadena de ADN y sitios alcalilábiles; dichas alteraciones llegan a ser aparentes debido a que el ADN migrado indica el grado o cantidad de daño, que sufre el material genético (Singh *et al.*, 1989).

Los resultados obtenidos muestran que la viabilidad no se alteró en ninguna de las dosis aplicadas con respecto al testigo negativo (81.55% para el testigo, 79.6% para 10 $\mu\text{g/ml}$, 68.87% para 20 $\mu\text{g/ml}$, 71% para 40 $\mu\text{g/ml}$ y 71.7 % para 80 $\mu\text{g/ml}$, Figura 12), a pesar de que se puede observar una ligera tendencia a disminuir, lo cual concuerda con el comportamiento observado en el índice mitótico.

Figura 12.- Células sin daño, viabilidad celular y promedio de migración en linfocitos tratados con KF



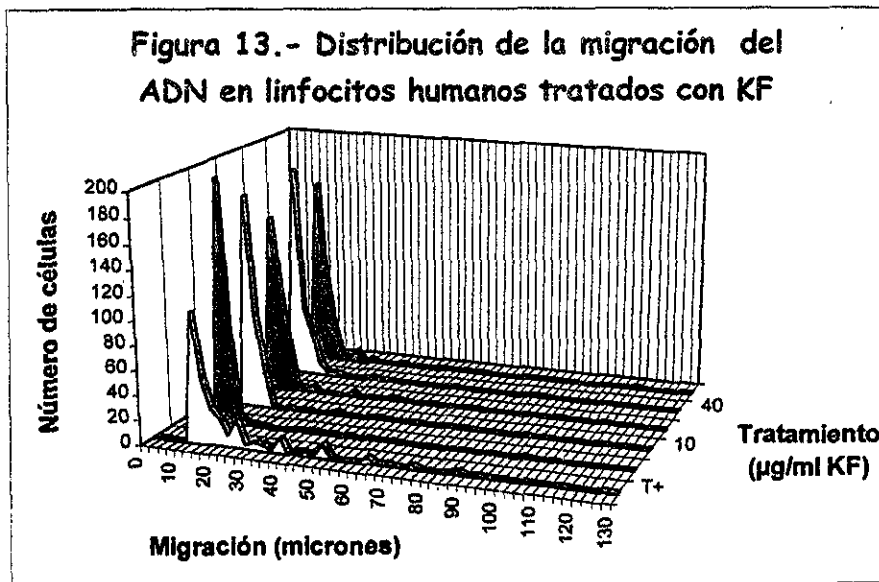
Los valores significativos en la disminución del índice mitótico probablemente fueron consecuencia del tiempo de exposición al KF (24 y 48 horas) el cual fue suficiente para reflejar daño mediante la muerte celular, mientras que en el ensayo cometa la exposición de dos horas disminuyó la viabilidad aunque no de manera significativa. Estos resultados son otro indicio de que el F tiende a ser citotóxico a concentraciones elevadas.

En la figura 12 se muestran también los porcentajes de células sin daño y las medias de migración de las células con daño, obtenidas en las diferentes concentraciones con KF. Los valores registrados no muestran diferencias significativas con respecto al testigo negativo.

En cuanto a la distribución de migración en las células expuestas a KF (Figura 13), se encontró que tanto el testigo negativo como los tratamientos presentaron un alto número de células sin daño o con poca migración las cuales se encuentran en un rango de 0 a 16.8 micrones, sin que se observaran efectos positivos debido a los tratamientos.

Para evaluar la magnitud del daño causado al ADN las células analizadas se clasificaron en base a la longitud de migración celular (propuesta por Anderson *et al.*, 1994 y por Altamirano *et al.*, 1996)

en cinco grupos: sin daño (0-14.7 micrones), bajo daño (14.8-16.8 micrones), daño medio (16.9-19.6 micrones), daño alto (19.7-27.3 micrones) y daño total (mayor a 27.4 micrones).



La tabla 8 muestra los resultados obtenidos observándose que el KF (20 µg/ml), presentó diferencias significativas en las células sin daño (49.3 %) en comparación con el testigo que fue de 66.3 %, mientras que en todas las concentraciones de KF se incrementó el porcentaje de células con daño medio y alto, ($P < 0.05$ con excepción de la dosis de 10 µg/ml en la categoría de alto daño). Los valores obtenidos en las células que presentaron medio y alto daño fueron

de 11.6 y 1.3 % para 10 µg/ml, 13.3 y 4.3 para 20 µg/ml, 12.6 y 6 % para 40 µg/ml y 12.0 y 6.3% para 80 µg/ml respectivamente en comparación con el testigo negativo (3 y 1.3 % respectivamente).

A pesar de que se registraron valores significativos en las células con daño medio y alto, debido a la producción de rompimientos de cadena sencilla y la expresión de sitios álcil-lábiles, los otros parámetros no se modificaron lo cual podría deberse a factores intrínsecos de la misma metodología, por lo que puede considerar que el KF no es genotóxico en este ensayo.

Tabla 8.- Efecto del KF sobre los linfocitos humanos mediante electroforesis de células individuales

Tratamiento (µg/ml)	Sin daño (5.0 %)	GRADO DE DAÑO EN LAS CELULAS				N
		Bajo (5-20 %)	Medio (21-40 %)	Alto (41-95%)	Total (95.0 %)	
T+	105 (35.0)	53 (17.6)	30 (10.0)	51 (17.0)	61 (20.3)	300
T-	199 (66.3)	77 (25.6)	9 (3.0)	4 (1.3)	11 (3.6)	300
10	176 (58.6)	78 (26.0)	35 (11.6)*	4 (1.3)	7 (2.3)	300
20	148 (49.3)*	86 (28.6)	40 (13.3)*	13 (4.3)*	13 (4.3)	300
40	179 (59.6)	59 (19.6)	38 (12.6)*	18 (6.0)*	6 (2.0)	300
80	157 (52.3)	79 (26.3)	36 (12.0)*	19 (6.3)*	9 (3.0)	300

*Valores significativamente diferentes con respecto al testigo (P<0.05 con prueba de Ji cuadrada).

El ensayo cometa es una prueba muy sensible de genotoxicidad para diferentes compuestos que dañan al ADN. Esta

sensibilidad parece depender de los tipos de lesiones primarias inducidas al ADN (Speit y Hartmann; 1995). Algunos agentes químicos los cuales han dado resultados positivos con esta misma técnica de evaluación fueron N-metil-N'-nitro-N-n, trosoguanidina, el benzo[a] pireno y la ciclofosfamida en cultivos de sangre humana con activación S9; sin embargo agentes que han mostrado ser clastógenos efectivos como la mitomicina-C o algunos otros que producen enlaces cruzados en el ADN, disminuyen la migración del ADN, esto es son negativos en esta prueba (Lasne *et al.*, 1990; Barber y Fantel, 1993; Pfuhler y Wolf, 1996).

El arsenito de sodio, el sulfato de cadmio, el pentóxido de vanadio y muchos otros compuestos son ejemplos de agentes químicos que inducen de manera efectiva daño al ADN y que puede ser medido por esta técnica (Hartmann y Speit, 1994; Altamirano *et al.*, 1996); desafortunadamente en el caso del flúor no existe ningún reporte empleando esta metodología.

CONCLUSIONES

El KF es un compuesto con efecto citotóxico reflejado por la muerte celular, lo cual pudo ser comprobado por la disminución en la viabilidad celular evaluada en el Ensayo Cometa.

Se descarta la posibilidad de que la disminución del IM producida por el KF pueda ser provocada por una alteración en la velocidad de replicación de las células ya que el índice de replicación no fue alterado.

El KF no afectó la frecuencia de asociación de satélites lo cual indica que probablemente la síntesis de ARNr y por lo tanto la síntesis de proteínas no se alteraron.

Los tratamientos realizados con el KF desde la fase G₁ produjeron rompimientos de tipo cromatídico, por lo que podemos concluir que este compuesto es un clastógeno S-dependiente.

Uno de los principales efectos del flúor es la inhibición de enzimas que intervienen en la síntesis de ADN y de la reparación

del mismo, por lo que las aberraciones cromosómicas producidas por este compuesto pudieron ser originadas por un efecto indirecto.

Aunque se ha reportado que el ensayo cometa es una prueba sensible para identificar rompimientos de una cadena de ADN y sitios álcali-lábiles, el KF no aumentó la migración de ADN de las células mediante esta prueba.

COMENTARIOS FINALES

La exposición del humano al flúor en el agua para beber así como los niveles en la mayoría de los dentífricos son más bajos que los eventos ocurridos *in vitro*, por lo tanto la exposición por dichas fuentes se pueden considerar como seguras. Sin embargo, hay una tendencia hacia incrementar la exposición al flúor sobre todo en aquellos lugares donde existe contaminación por dicho elemento, lo cual puede provocar un aumento en los niveles de F en el plasma y por lo tanto reducir el margen de seguridad para los efectos citotóxicos y genotóxicos potenciales en el humano.

Como una perspectiva a largo plazo se sugiere realizar un estudio *in vivo* tomando como base las concentraciones de flúor encontradas en aquellas poblaciones que sufren de contaminación (natural o antropogénica), empleando varias pruebas para evaluar citotoxicidad y genotoxicidad.

REFERENCIAS

- ◆ Aardema, M.J., D.P. Gibson y R.A. LeBoeuf. (1989) Sodium Fluoride-Induced Chromosome Aberrations in Different Stages of the Cell Cycle: A Proposed Mechanism. *Mutat. Res.* 223:191-203.
- ◆ Altamirano, L.M. (1992) Efectos Mutagénicos y Alteraciones del Ciclo Celular Reproductivo del Ratón Producidos por Pentóxido de Vanadio. Tesis Doctoral. UNAM, México.
- ◆ Altamirano, L.M; L.B. Alvarez, F.A. Basurto, M. Valverde y E. Rojas. (1996) Reprotoxic and Genotoxic Studies of Vanadium Pentoxide in Male Mice. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis.* 16:7-17.
- ◆ Anderson, D; T.W. Yu, B.J. Phillips y P. Schmezer. (1994) The Effect of Varios Antioxidants and Other Modifying Agents on Oxygen-Radical-Generated DNA Damage in Human Lymphocytes in the Comet Assay. *Mutat. Res.* 307:261-271.
- ◆ Barber C.V. y A.G. Fantel. (1993) The Role of Oxygenation in Embryotoxic Mechanims of Three Bio reducible Agents. *Teratology.* 47:209-223.
- ◆ Betti, C; T. Davini, L. Giannessi, N. Loprieno y R. Barale. (1994) Microgel Electrophoresis Assay (Comet Test) and SCE Analysis in Human Lymphocytes from 100 Normal Subjects. *Mutat. Res.* 307:323-333.

- ◆ Bicudo, C.H.E.M. (1982) Regulacao da Atividade Organizadora Nucleolar em *Drosophila*. *Ciencia e Cultura*. 34(4):465-469.
- ◆ Boggs, D.R y A. Winkelstein. (1985) El Leucocito. Ed. Manual Moderno. México. pp:74-97.
- ◆ Brögger, A. (1982) In Sister Chromatid Exchange. Ed. Alan Liss Inc. New York. pp:655-673.
- ◆ Brusick, D. (1987) Principles of Genetic Toxicology. 2a. Ed. Plenum Press. New York. pp:33-60.
- ◆ Casciano, D.A. (1990) Introduction: Historical Perspectives of Genetic Toxicology. En: Genetic Toxicology. CRC Press Inc. Boston. pp: 1-5, 68-73.
- ◆ Caspary, W.J; B. Myhr, L. Bowers, D. McGregor, C. Riach y A. Brown. (1987) Mutagenic Activity of Fluorides in Mouse Lymphoma Cells. *Mutat. Res* 187:165-180.
- ◆ Celis, F.E. (1983) Inmunología. En: La Biología Contemporánea. UNAM. México. pp:172-182.
- ◆ Cleaver, J.E. (1981) Correlations Between Sister Chromatid Exchange Frequencies and Replicon Size. *Exp. Cell Res.* 136:27-30.
- ◆ Cole, J; W.J. Muriel y B.A. Bridges (1986) The Mutagenicity of Sodium Fluoride to L5178Y (wild-type and TK+/-3.7.2c) Mouse Lymphoma Cells. *Mutagenesis*. 1:157-167.

- ◆ Crespi, C.L; G.M. Seixas, T. Turner y B.W. Penman. (1990) Sodium Fluoride is a Less Efficient Human Cell Mutagen at Low Concentrations. *Environ. Mol. Mutag.* 15:71-77.
- ◆ Crossen, P.E y W.F. Morgan. (1977) Analysis of Human Lymphocytes Cell Cycle Time in Culture Measured by Sister Chromatid Differential Staining. *Exp. Cell Res.* 104:453-457.
- ◆ Dean, B; y N. Danford. (1984) Assays for the Detection of Chemically-Induce Chromosome Damage in Cultured Mammalian Cells. En: *Mutagenicity*. Venitty, S. y J.M. Parry (eds). IRL Press, Oxford England. pp :187-232.
- ◆ Doerjjer, G; U. Bucholz, K. Kreuzer y F. Oesch. (1988) Biomonitoring of DNA Damage by Alkaline Filter Elution. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 60:169-174.
- ◆ Dreisbach, R.H. y R.O. William. (1988) *Manual de Toxicología Clínica: Prevención, Diagnóstico y Tratamiento*. 6a. Ed. Manual Moderno. México. pp:201-204.
- ◆ Drescher, M. Y J.W. Suttie. (1972) Intracellular Fluoride in Cultured Mammalian Cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 139:228-230.
- ◆ Dufraim, R.J. y Garrand, T.J. (1981) The Influence of Incorporated Halogenated Analogues of Thymidine on the Sister Chromatid Exchange Frequency in Human Lymphocytes. *Mutat. Res.* 91:233-238.
- ◆ Erickson J.D. (1980) Down Syndrome, Water Fluoridation, and Maternal Age. *Teratology.* 21:177-180.

- ◆ Evans, H.J. y M.L. O'Riordan. (1974) Human Peripheral Blood Lymphocytes for the Analysis of Chromosome Aberrations in Mutagen Test. *Mutat Res.* 31:135-148.
- ◆ Evans, H.J; G.J. Neary y S.M. Tonkinson. (1957) The Use of Colchicine as an Indicator of Mitotic Rate in Broad Bean Root Meristems. *Jour. Genetics.* 55 (3): 487-502.
- ◆ Fairbairn, D.W; P.L Olive y K.L. O'Neill. (1995) The Comet Assays: A Comprehensive Review. *Mutat. Res.* 339:37-59.
- ◆ Ferguson-Smith. M.A. (1964) The Sites of Nucleolus Formation in Human Pachytene Chromosomes. *Cytogenetics.* 3:124-134.
- ◆ Gani, R. (1978) Nucleoli of Cultured Human Lymphocytes. *Hum. Genet.* 42:271-282.
- ◆ Graedel, T.E; D.T. Hawkins y L.D. Claxton. (1986) Atmospheric Compounds. Academic Press. New York. pp:32-40.
- ◆ Hansson, A. (1970) Differences in the Satellite Association Pattern in the Human Population. *Hereditas.* 66:21-30.
- ◆ Hartmann A. y G. Speit. (1994) Comparative Investigations of the Genotoxic Effects of Metals in the Single Cell Gel (SCG) Assay and the Sister Chromatid Exchanges (SCE) Test. *Environ. Mol. Mutag.* 23:299-305.
- ◆ Hartmann, A; U. Plappert, K. Raddatz, M.F. Grünert y G. Speit. (1994) Does Physical Activity Induce DNA Damage?. *Mutagenesis.* 9 (3):269-272.

- ◆ Hartmann, A; K. Herkommer, M. Glück y G. Speit. (1995) DNA-Damaging Effect of Cyclophosphamide on Human Blood Cells *in vivo* and *in vitro* Studied with The Single-Cell Gel Test (Comet Assay). *Environ. Mol. Mutag.* 25:180-187.
- ◆ Hayashi, N. y T. Tsutsui. (1993) Cell Cycle Dependence of Cytotoxicity and Clastogenicity Induced by Treatment of Synchronized Human Diploid Fibroblasts with Sodium Fluoride. *Mutat. Res.* 290:293-302.
- ◆ He, W; A. Liu, H. Bao, Y. Wang y W. Cao. (1983) Effect of Sodium Fluoride and Fluoroacetamide on Sister Chromatid Exchanges and Chromosomal Aberrations in Cultured Red Muntjac Cells. *Acta Sci. Circumst.* 3:94-100.
- ◆ Hedner, K; B. Högstedt, A.M. Kolnig, E.V Mark, B. Strömbeck y F. Mitelman. (1982) Relationship Between Sister Chromatid Exchanges and Structural Chromosome Aberrations in Lymphocytes of 100 Individuals. *Hereditas.* 97:232-245.
- ◆ Henderson, A.S. (1973) Ribosomal DNA Connectives Between Human Acrocentric Chromosomes. *Nature.* 245:95-97.
- ◆ Herrera, L.A; H. Tittelbach, E. Gebhart y P.W. Ostrosky. (1991) Changes in the Proliferation of Human Lymphocytes Induced by Several Cytostatic and Revealed by the Premature Chromosome Condensation Technique. *Mutat. Res.* 263:101-106.
- ◆ Hoffman, G.R. (1982) Overview of Genetic Toxicology. En: *Genetic Toxicology: An Agricultural Perspective.* Plenum Press. New York. pp:5-11.

- ◆ Houghton, A.L. (1979) Relationships Between Satellites Association and the Occurrence of Non-Disjunction in Man. *Mutat. Res.* 61:130-144.
- ◆ Irving, S.N. y R.J. Lewis. (1993) *Diccionario de Química: y de Productos Químicos.* Omega. Barcelona. pp:98-99.
- ◆ Ishii, Y. y M.A. Bender (1980) Effects of Inhibitors of DNA Synthesis on Spontaneous and Ultraviolet Light-Induced Sister-Chromatid Exchanges in Chinese Hamster Cells. *Mutat. Res.* 79:19-32.
- ◆ Ivett, J.L. y R.R. Tice. (1982) Average Generation Time: A New Method of Analysis and Quantitation of Cellular Proliferation Kinetics. *Environ. Mutagen.* 4:358.
- ◆ Jagiello, G. Y J.S. Lin. (1974) Sodium Fluoride as Potential Mutagen in Mammalian Eggs. *Arch. Environ. Health.* 29:230-235.
- ◆ Kats, S; J.L. McDonald y G.K. Stookey. (1991) *Odontología Preventiva en Acción.* 3a Ed. Panamericana. México.
- ◆ Khalil, A.M. (1995) Chromosome Aberrations in Cultured Rat Bone Marrow Cells Treated with Inorganic Fluorides. *Mutat. Res.* 343:67-74.
- ◆ Khalil, A.M. y A.A. Da'dara. (1994) The Genotoxic and Cytotoxic Activities of Inorganic Fluoride in Cultured Rat Bone Marrow Cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26:60-63.
- ◆ Kihlman, B.A. (1957) Experimentally Induced Chromosome Aberrations in Plants. The Production of Chromosome

Aberrations by Cyanide and Other Heavy Metal Complexing Agents. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3:363-380.

- ◆ Kligerman, A.D; M.F. Bryant, G.L. Erexson y J.R. Rabinowitz. (1988) Persistence of SCE-Inducing Lesions in Lymphocytes of Mice Exposed to Diaziquone. *Environ. Mol. Mutag.* 12:185-199.
- ◆ Kram, D; E.L. Schneider, L. Singer y G.R. Martin. (1978) The Effects of High and Low Fluoride Diets on the Frequencies of Sister Chromatid Exchanges. *Mutat. Res.* 57:51-55.
- ◆ Kirsch, V.M; L. Hens, L. Verschaeve, A. Alexander, M. Driesen, K. Poma y C. Susanne. (1978) Modification of Human Acrocentric Associations After *in vivo* Exposure to Environmental Mutagens. *Acta Anthropogenetica.* 2 (3):1-16.
- ◆ Kishi, K. y A. Tonomura. (1984) Cytogenetic Effects of Sodium Fluoride. *Mutat. Res.* 130:367.
- ◆ Lasne, C; L. Orfila y Y. Chouroulinkov. (1990) The Relationship between DNA-ALKali-Labile Sites and Carcinogenesis in Mammalian Cells. En: *Mechanisms of Environmental Mutagenesis-Carcinogenesis.* Ed. Plenum Press, New York. pp:183-198.
- ◆ Latt, S.A. (1974) Sister Chromatid Exchanges, Indices of Human Chromosome Damage and Repair: Detection by Fluorescence and Induction by Mitomycin-C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 71:3162-3166.
- ◆ Lazutka, J.R. (1991) Replication Index in Cultured Human Lymphocytes: Methods for Statistical Analysis and Possible Role in Genetic Toxicology. *Environ. Mol. Mutag.* 17:188-195.

- ◆ Leonard, A. y G.B. Gerber. (1994) Mutagenicity, Carcinogenicity and Teratogenicity of Vanadium Compounds. *Mutat. Res.* 317:81-88.
- ◆ Li, A.P. y J. Loretz. (1990) Assays for Genetic Toxicity. *En: Genetic Toxicology*. Ed. CRC Press Inc. Boston. pp:127-129.
- ◆ Li, Y; N.A. Heerema, A.J. Dunipace y G.K. Stookey. (1987) Genotoxic Effects of Fluoride Evaluated by Sister-Chromatid Exchange. *Mutat. Res.* 192:191-201.
- ◆ Li, Y; A.J. Dunipace y G.K. Stookey. (1988) Genotoxic Effects of Fluoride: A Controversial Issue. *Mutat. Res.* 195:127-136.
- ◆ Li, Y; W. Zhang, T.W. Noblitt, A.J. Dunipace y G.K. Stookey. (1989) Genotoxic Evaluation of Chronic Fluoride Exposure: Sister-Chromatid Exchange Study. *Mutat. Res.* 227:159-165.
- ◆ Martin, G.R; K.S. Brown, D.W. Matheson, H. Lebowitz, L. Singer y R. Ophang. (1979). Lack of Cytogenetic Effects in Mice or Mutations in *Salmonella* Receiving Sodium Fluoride. *Mutat. Res.* 66:159-167.
- ◆ Miller, D.A; R. Tantravahi, V.G. Dev y O.J. Miller. (1977) Frequency of Satellite Association of Human Chromosomes is Correlated with Amount of Ag-Staining of the Nucleolus Organizer Region. *Am. J. Hum. Genetic.* 29:490-502.
- ◆ Mohamed, A.H. y M. E. Chandler. (1977) Cytological Effects of Sodium Fluoride on Mice, of National Cancer Program, Part 2. Fluoridation of Public Drinking Water. pp:42-60.

- ◆ Morales, R.P. (1988) El Daño a la Información Genética y los Intercambios entre Cromátidas Hermanas. *Ciencia y Desarrollo*. 14:65-72.
- ◆ Morales, R.P. y V.L. Cruz (1996). *In vivo* Effect of Gamma Ray Pretreatment on Sister-Chromatid Exchange Induction By Mitomycin C in Murine Bone Marrow Cells. *Mutat. Res.* 367: 225-232.
- ◆ Morales, R.P; R.R. Rodríguez y T.K. Vallarino. (1990) Fate of DNA Lesions that Elicit Sister-Chromatic Exchanges. *Mutat. Res.* 232:77-88.
- ◆ Morales, R.P; V.L. Cruz, T.K. Vallarino y R.R. Rodriguez. (1995) Persistence During G_1 of Gamma Ray-or Mitomycin C-Induced Lesions Eliciting SCE in Murine Salivary Gland Cells *In Vivo*. *Somatic Cell and Molecular Genetics*. Vol(21)1:33-41.
- ◆ Morimoto, K; M. Sato-Mizuno y A. Koizumi. (1985) Sister-Chromatid Exchanges and Cell-Cycle Kinetics in Human Lymphocytes Cultures Exposed to Alkylating Mutagens: Apparent Deformity in Dose-Response Relationships. *Mutat. Res.* 152:187-196.
- ◆ Moutschen, J. (1985) Introduction to Genetic Toxicology. Ed. John Wiley & Sons. New York. pp:1-25.
- ◆ Mudry, D.M; V. Labal, M. Larripa Briux y S. Colilla. (1981) Utilidad del Método de Intercambio de Cromátidas Hermanas en la Detección de Posibles Agentes Mutagénicos. *Medicina*. 41:173-176.

- ◆ Murray, J.J. (1986). *Appropriate Use of Fluorides for Human Health*. (World Health Organization). Geneva. pp:3-27.
- ◆ Navia, J.M; L. Aponte-Merced y K. Punyasingh. (1988) *Fluoride Metabolism in Humans*. En: *Essential and Toxic Trace Elements in Human Health and Disease*. Vol 18. Ed. Alan R. Liss. Inc. New York. pp: 229-250.
- ◆ Nishi, Y; M.M. Hasegawa, N. Inui, S. Ikegami, M.A. Yamada. (1982) *Effect of Post Treatment with Aphidicolin-A Specific Inhibitor of DNA Polymerase α -on Sister Chromatid Exchange Induce by Ethyl Methanesulfonate*. *Mutat. Res.* 103:155-159.
- ◆ Obe, G; B. Beek y G. Dudin. (1975) *The Human Leukocyte Test System*. *Hum. Genet.* 28:205-302.
- ◆ Östling, O. y K.J. Johanson (1984) *Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123:291-298.
- ◆ Östling, O; K.J. Johanson, E. Blomquist, E. Hagelqvist. (1987) *DNA Damage in Clinical Radiation Therapy Studied by Microelectrophoresis in Single Tumor Cells*. *Acta Oncol.* 26:45-48.
- ◆ Ostrosky, W.P; R. Montero, C. Cortinas de Nava, R. Tice y R. Albertini. (1987) *The Use of Bromodeoxyuridine Labeling in the Human Lymphocyte HGPRT Somatic Mutation Assay*. *Mutat. Res.* 191:211-214.
- ◆ Pader, M. (1988) *Oral Hygiene Products and Practice*. Vol. 6. Ed. Marcel Dekker, Inc. USA. pp:406-409.

- ◆ Painter, R.B. (1980) A Replication Model for Sister-Chromatid Exchange. *Mutat. Res.* 70:337-341.
- ◆ Perry, P.E. y S. Wolff. (1974) New Giemsa Method for the Differential Staining of Sister Chromatids. *Nature.* 251:156-158.
- ◆ Perry, P.E. y H.J. Evans. (1975) Cytological Detection of Mutagen-Carcinogen Exposure and Sister Chromatid Exchange. *Nature.* (258) 13:121-125.
- ◆ Perry, P.E. y E.J. Thomson. (1984) The Methodology of Sister Chromatid Exchanges. En: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures.* Ed. Elsevier Sci. Pub. pp:495-527.
- ◆ Pfuhler, S. y H.U. Wolf. (1996) Detection of DNA-Crosslinking Agents with the Alkaline Comet Assay. *Environ. Mol. Mutag.* 27:196-201.
- ◆ Preston, R.J. (1982) Cytogenetic Studies in Animals. En: *Genetic Toxicology: An Agricultural Perspective.* Ed. Plenum Press. N.Y. pp: 379-386.
- ◆ Preston, R.J., J.R. San Sebastian y A.F. McFee. (1987) The *in vitro* Human Lymphocyte Assay for Assessing the Clastogenicity of Chemical Agents. *Mutat. Res.* 189:175-183.
- ◆ Prival, M.J. (1980) Genetic Toxicologic: Regulatory Aspects. *J. Environm. Pathol. Toxicol.* 3:99-111
- ◆ Rainaldi, R. y T. Mariani. (1982) The Distribution of Induced Sister-Chromatid Exchanges: A Tool for Identifying Agents Directly Interacting with DNA. *Mutat. Res.* 103:333-337.

- ◆ Rapoport, I. (1956) Contribution a l'etude de Mongolisme: Role Pathogenique de Fluor. Bull Acad. Med. 140:529-531.
- ◆ Rodríguez, A.R. (1994) Efectos Genéticos de la Contaminación Ambiental. Ciencia y Desarrollo. 732:49-50.
- ◆ Rojas, E; R. Montero, L. Herrera, M. Sordo, M.E. Gonsebatt, R. Rodríguez y P.W. Ostrosky. (1992) Are Mitotic Index and Lymphocyte Proliferation Kinetics Reproducible Endpoints in Genetic Toxicology Testing?. Mutat. Res. 282:283-286.
- ◆ Roldán, R.E. (1988) Inducción de Aberraciones Cromosómicas e Intercambio de Cromátidas Hermanas por Algunos Compuestos Metálicos en Cultivo de Linfocitos Humanos *in vitro*. Tesis de Licenciatura. UNAM, México.
- ◆ Roldán, R.E. (1992). Efecto Mutagénico y Teratogénico del Pentóxido de Vanadio. Tesis de Maestría. UNAM, México.
- ◆ Roldán, R.E. y M. Altamirano. (1990) Chromosomal Aberrations, Sister Chromatid Exchanges, Cell Cycle kinetics and Satellite Associations in Human Lymphocyte Cultures Exposed to Vanadium Pentoxide. Mutat. Res. 245:61-65.
- ◆ Rosenkranz, W. y S. Fleck. (1969) Die Bedeutung Der Assoziation Satellitenträger Chromosomen. Humangenetik. 7:9-21.
- ◆ Samson, L. y J.L. Schwartz. (1980) Evidence for and Adaptive DNA Repair Pathway in CHO and Human Skin Fibroblast Cell Lines. Nature. 287:861-863.

- ◆ Scott, D. (1985) Cytogenetic Effects of Sodium Fluoride in Cultured Fibroblasts Abstract 1-15. Fourth International Conference on Environmental Mutagens, Stockholm. June 24-28.
- ◆ Scott, D. y S.A. Roberts (1987) Extrapolation from in vitro Tests to Human Risk: Experience with Sodium Fluoride Clastogenicity. *Mutat. Res.* 189:47-58.
- ◆ Scott, D; S.M. Galloway, R.R. Marshall, M. Ishidate, D. Brusick, J. Ashby y B.C. Myhr. (1991) Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. *Mutat. Res.* 257:147-204.
- ◆ Searle, G.A. (1986). Chromosomal Mutations: The Genetic Approach. En: *Chemical Mutagens. Principles and Methods for their Detection*. Ed. Plenum Pres. Vol 10. New York. pp:129-150.
- ◆ Shafer, D.A. (1977) Alternate Replication Bypass Mechanisms for Sister Chromatid Exchanges Formation. *Progress and Topic in Cytogenetics*. Vol 2. Ed. Avery A. Sanberg. pp.67-98.
- ◆ Sharma, A. y G. Talukder. (1987) Effects of Metals on Chromosomes of Higher Organisms. *Environ. Mutagen.* 9:191-226.
- ◆ Sierra M.M. (1995) Estudio de la Inducción de Aberraciones Cromosómicas, Asociación de Satélites e Intercambio de Cromátidas Hermanas en Linfocitos Humanos *in vitro* Tratados con Carbonato de Litio. Tesis de Licenciatura. UNAM, México.
- ◆ Sigmund, J; H.G. Schwarzacher y A.V. Mikelsaar. (1979) Satellite Association Frequency and Number of Nucleoli Depend on Cell Cycle Duration and NOR-Activity. *Human. Genet.* 50:81-91.

- ◆ Singh N. P.; D.B. Danner, R.R. Tice, M.T. McCoy, G.D. Collins y E.L. Schneider. (1989) Abundant Alkali-Sensitive Sites in DNA of Human and Mouse Sperm. *Exp. Cell Res.* 184:461-470.
- ◆ Siviková, K. y J. Dianovský. (1995) Sister-Chromatid Exchanges After Exposure to Metal-Containing Emissions. *Mutat. Res.* 327:17-22.
- ◆ Slacik E.R. y G. Obe. (1976) The Effect of Sodium Fluoride on DNA Synthesis, Mitotic Indices and Chromosomal Aberrations in Human Leukocytes Treated with Trenimon *in vitro*. *Mutat. Res.* 37:253-266.
- ◆ Speit, G. y A. Hartmann. (1995) The Contribution of Excision Repair to the DNA Effects Seen in the Alkaline Single Cell Gel Test (Comet Assay). *Mutagenesis.* 10(6):555-559.
- ◆ Stern, A.C. (1986) Air Pollution. Ed. Academic Press. London. pp:183, 295-297.
- ◆ Stetka, D.G. Jr. (1979) Further Analysis of the Replication Bypass Model for Sister Chromatid Exchanges. *Hum. Genet.* 49:63-69.
- ◆ Strauss G.H.S. (1991) Non-Random Cell Killing in Cryopreservation: Implications for Performance of the Battery of Leukocytes Test (BLT), I. Toxic and Immunotoxic Effects. *Mutat Res.* 252:1-5.
- ◆ Taves, D.R. (1983) Dietary intake of Fluoride Ashed (total Fluoride) V. Unashed (Inorganic Fluoride) Analysis of Individual Foods. *Br. J. Nutr.* 49:295-301.

- ◆ Taylor, J.H. (1958) Sister Chromatid Exchanges in Tritium-Labeled Chromosomes. *Genetics*. 43:515-529.
- ◆ Thomson E.J; F.M. Kilanowski y P.E. Perry. (1985) The Effect of Fluoride on Chromosome Aberration and Sister-Chromatid Exchange Frequencies in Cultured Human Lymphocytes. *Mutat. Res.* 144:89-92.
- ◆ Tice, R.R; P.W. Andrews, O. Hirai y N.P. Singh. (1990) The Single Cell Gel (SCG) Assay: An Electrophoretic Technique for the Detection of DNA Damage in Individual Cells. En: *Biologically Reactive Intermediates, IV. Molecular and Cellular Effects and their Impact on Human Health*. Ed. Plenum Press. New York. pp.157-164.
- ◆ Tsutsui, T; N. Suzuki, M. Ohmori. (1984a) Sodium Fluoride-Induced Morphological and Neoplastic Transformation, Chromosome Aberration, Sister Chromatid Exchanges and Unscheduled DNA Synthesis in Cultured Syrian Hamster Embryo Cells. *Cancer Res.* 44:938-941.
- ◆ Tsutsui, T; K. Ide y H. Maizumi (1984b) Induction of Unscheduled DNA Synthesis in Cultured Human Oral Keratinocytes by Sodium Fluoride. *Mutat. Res.* 140:43-48.
- ◆ Tsutsui, T. y N. Suzuki, M. Ohmori. y H. Maizumi (1984c). Cytotoxicity, Chromosome Aberrations and Unscheduled DNA Synthesis in Cultured Human Diploid Fibroblasts Induced by Sodium Fluoride. *Mutat. Res.* 139:193-198.
- ◆ Tsutsui, T; Y. Tanaka, Y. Matsudo, A. Vehama, T. Someya, F. Hamaguchi, H. Yamamoto y M. Takahashi. (1995) No increases in

Chromosome Aberrations in Human Diploid Fibroblasts Following Exposure to Low Concentrations of Sodium Fluoride for Long Times. *Mutat. Res.* 335:15-20.

- ◆ **Tucker, J.D. y R.J. Preston. (1996) Chromosome Aberrations, Micronuclei, Aneuploidy, Sister Chromatid Exchanges and Cancer Risk Assessment. *Mutat. Res.* 365:147-159.**
- ◆ **Vogel, W. y T. Bauknecht. (1976) Differential Chromatid Staining by *in vivo* Treatment as a Mutagenicity Test System. *Nature.* 260:448-449.**
- ◆ **Watt, J.L. y G.S. Stephen. (1986) Human Cytogenetics. Ed. IRL PRES. Oxford, England. pp:38-50.**
- ◆ **Whitford, G.M. (1989) The Metabolism and Toxicity of Fluoride. Vol. 13. Ed. Kanger. San Francisco. pp:1-10**
- ◆ **WHO (1985) (World Health Organization) Guide to Short-Term Test for Detecting Mutagenic and Carcinogenic Chemicals. *Enviromental Health Criteria 51, Geneva.* pp:57-68.**
- ◆ **Wolff, S. (1977) Chromosome Effects Induced by Low Levels of Mutagens. En: *Research in Photobiology.* Ed. Plenum Pub. Corp. New York. pp:721-732.**
- ◆ **Wolff, S; J. Bodycote y R.B. Painter. (1974) Sister Chromatid Exchanges Produced in Chinese Hamster Cells by UV-Irradiation of Different Stages of the Cell Cycle: The Necessity for Cells to Pass Through S. *Mutat. Res.* 25:73-81.**
- ◆ **Zakrzewski, F.S. (1991) Principles of Enviromental Toxicology. Ed. ACS Professional Reference Book. USA. pp: 113.**

- ◆ Zang, K.D. y E. Back. (1968) Quantitative Studies on the Arrangement of Human Metaphase Chromosomes. *Cytogenetics*. 7:455-470.
- ◆ Zeiger, E; M.D.Shelby y K.L. Witt. (1993) Genetic Toxicity of Fluoride. *Environ. Mol. Mutag.* 21:309-318.
- ◆ Zhong, B.Z; Z.W. Gu, W.E. Wallace, W.Z. Whong y T. Ong. (1994) Genotoxicity of Vanadium Pentoxide in Chinese Hamster V79 Cells. *Mutat. Res.* 321:35-42.

ANEXOS

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

AGAROSAS

Agarosas de bajo punto de fusión (Sigma Chemical CO. St. Louis) al 0.5 % : Agarosa 125 mg/25 ml de solución amortiguadora de fosfatos libre de Ca^{++} y Mg^{++} (PBS; Sigma Chemical CO. St. Louis).

Agarosa de regular punto de fusión (Sigma Chemical CO. St. Louis) al 0.5% : Agarosa 125 mg/25 ml de PBS.

Para disolver ambas soluciones es necesario calentarlas ya sea con la ayuda de un microondas o manteniéndolas cerca del calor. Para su aplicación en los portaobjetos esmerilados se deben poner a baño María a $37^{\circ} C$ para evitar que solidifiquen.

SOLUCIÓN DE LISIS

Solución stock de lisis : Ingredientes para 1000 ml:

2.5 M NaCl (Merck, México)	146.4 g
100 mM EDTA (Sigma Chemical CO. St. Louis)	37.2 g

10 mM Tris (Sigma Chemical CO. St. Louis) 1.2 g
1% Sarcocinato (Sigma Chemical CO. St. Louis) 10.0 g

Agregar los ingredientes a 700 ml de agua desionizada (dH₂O) y agitar con una mosca. Ajustar a pH 10 con hidróxido de sodio (NaOH; Técnica Química, México) o con ácido clorhídrico (HCl; J.T. Baker, México) completando el volumen a 1 litro y homogenizando la mezcla hasta obtener el pH indicado.

Solución final de lisis: Agregar a una caja Coplin (con capacidad de 60 ml) 42.72 ml de solución stock de lisis, 0.48 ml de triton (Sigma Chemical CO. St. Louis) y 4.8 ml de Dimetilsulfoxido (DMSO; J.T. Baker, México). Refrigerar de 30-60 minutos previos a la adición de las laminillas.

AMORTIGUADOR PARA ELECTROFORESIS

Preparación de soluciones stock:

10 N NaOH (200 g/500 ml dH₂O)

200 mM EDTA (18.6125/250 ml dH₂O)

Preparar por separado y agitar.

El amortiguador para la electroforesis se prepara antes de cada corrida: mezclando 39 ml de la solución stock de NaOH + 6.5 ml de solución stock de EDTA completando con dH₂O hasta obtener un volumen final de 1300 ml (capacidad de la caja de electroforesis).

SOLUCIÓN NEUTRALIZANTE

Disolver 48.5 g de tris (0.4M) en dH₂O y ajustar el pH a 7.5 con HCl, hasta completar un volumen final de 1000 ml.

COLORANTE

Bromuro de etidio (BrEt; Sigma Chemical CO, St. Louis) (10X stock=20µg/ml) : Agregar 10 mg en 50 ml dH₂O. El bromuro 1X stock= mezclar 1 ml de solución stock 10X + 9 ml de dH₂O.

Ambas soluciones se deben mantener a temperatura ambiente y protegiéndolas de la luz.

TESTIGO POSITIVO

Solución stock: 300 µl de peróxido de hidrógeno (H₂O₂; J.T. Baker, México) + 700 µl de medio de cultivo RPMI-1640.

Tomar: 90 μ l de medio de cultivo + 10 μ l del botón celular + 50 μ l de solución stock de H₂O₂.

Colocarlo en la oscuridad durante 30 minutos y mantenerlo sumergido en un recipiente con agua fría. Transcurrido este tiempo centrifugar a 4000 r.p.m durante 2 minutos y hacerle un lavado para posteriormente continuar la misma técnica seguida para los tratamientos.

VIABILIDAD

Solución A: Bromuro de etidio (BrEt). Para la solución stock, disolver 50 mg BrEt en 1 ml de etanol al 100% y agregar 1 ml de esta solución a 49 ml de solución salina isotónica. Para la solución de trabajo, agregar 50 μ l de solución stock a 2 ml de solución salina isotónica (conc. final=0.025 μ g/ml) y protegerlo de la luz.

Solución B: 5-6 diaetato de carboxifluoresceína (CFDA; Sigma Chemical CO, St. Louis). Para la solución stock, disolver 3 mg de DACF en 1 ml de acetona. Para la solución de trabajo, agregar 84 μ l de solución stock a 2 ml de solución salina isotónica (Conc. final= 0.25 μ g/ml) y protegerla de la luz.

Solución C: Solución de trabajo. Combinar A y B en una proporción 1:1. Se puede guardar en refrigeración durante varios meses.