



300627

UNIVERSIDAD LA SALLE
ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

4
24

**ESTUDIO DEL DAÑO PRODUCIDO EN EL ADN POR
EXPOSICION A CLORURO DE MERCURIO EN UNA LINEA
CELULAR HEPATICA HUMANA**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A**

CECILIA MARGARITA GARCIA BAQUEDANO

DIRECTOR: Q.F.B. ENRIQUE CALDERON GARCIA

MEXICO, D.F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

*Su presencia amorosa a lo largo de mi camino me ha
llevado a encontrar la alegría de ser, de apreciar y
disfrutar de los regalos que le ha dado a mi vida.*

A mi abuelito

Pascual García Bustamante:

Con especial cariño porque a través de los años permanece presente por su sencillez, honestidad, entrega, disciplina... por todo lo que fue y nos compartió.

A mis Padres:

Por dedicar su vida para darle lo mejor a la mía, porque todo lo que son me lo han dado y porque lo que soy es por ustedes.

A Eduardo Deschamps:

Por formar parte esencial de mi vida, por tu constante interés, apoyo, respeto, comprensión, compañía, pero sobre todo por lo que hace tu amor en mí y por todo lo que soy junto a ti.

Con cariño a mi hermana Fabiola, a José Eduardo y especialmente a Brandon.

A Martha Saldaña:

Por todo lo que me transmitió y que me llevó a descubrir mi vida profesional. Por todo lo que significa para mí y por el gran cariño que le tengo.

A Lorena, Erika y Margarita:

De lo mejor de la Universidad fue cada momento compartido con ustedes, ahora todos esos recuerdos forman parte de lo mejor de mi vida.

A Tere, Areli, Sony y Lisis:

Por todo lo que hemos compartido, por su apoyo y sincera amistad.

A todos mis profesores de la carrera por sus enseñanzas y de manera especial a los que además de compartir sus conocimientos dejaron algo más en mi vida:

Araaceli Sánchez, Mariano Ramírez, Enrique Calderón, Jorge García, Betsabé Morales, Ma. Teresa Estrada, Elías García, Ma. de Jesús Ramírez, Martha Mustre, Gabriel Cuevas, Ohannes Bulbulian, Leticia Linares, Guadalupe Morales, Gerardo Múgica, José Luis González, Blanca Contreras.

Con gratitud a los de la UAM:

A la Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz:

Por la oportunidad que me brindó, por hacer posible este trabajo, por su apoyo, tiempo y disposición, por su interés en mi desarrollo profesional y en mi vida personal, por todo lo que aprendí de su persona y de la ciencia.

Al Dr. Miguel Betancourt por su apoyo, interés y amable trato.

A Lety, Vero, Ely, Paty, Claudia y Piedad, por compartir sus conocimientos, por sus enseñanzas, por su tiempo, paciencia y ayuda, por todas sus atenciones.

A Cristina, Edith y Leo, por lo que me enseñaron y por su disposición.

Al Dr. David Díaz por su tiempo y paciencia.

A Mari por sus detalles.

A Pedro y a Lupita por sus servicios.

LUGAR DE DESARROLLO

El presente estudio fue realizado bajo la asesoría de la Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz y del Dr. José Miguel Betancourt Rule, en el Laboratorio de Fisiología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana (Iztapalapa).

INDICE

CAPITULO	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1 Generalidades acerca de los metales	1
1.2 Mercurio	2
1.2.1 Generalidades	2
1.2.2 Usos	4
1.2.3 Fuentes de Contaminación y Exposición	5
1.2.4 Salud	7
1.2.5 Toxicidad y Toxicocinética	9
1.2.6 Agentes Quelantes y Protectores	12
1.2.7 Efecto a Nivel Celular	12
1.3 ADN	14
1.3.1 Generalidades	14
1.3.2 Genotoxicidad: Mutagénesis y Carcinogénesis	14
1.3.3 Reparación del ADN	16
1.4 Hígado	17
1.4.1 Fisiología	17
1.4.2 Hepatotoxicidad	18
1.4.3 Cultivos Celulares	18
2. OBJETIVOS	21
3. JUSTIFICACION	22

4. MATERIAL Y METODOS	24
4.1 Cultivo Celular	24
4.2 Condiciones de Tratamiento	24
4.3 Viabilidad Celular	25
4.4 Prueba de Citotoxicidad	25
4.5 Adhesión Celular	26
4.6 Grado de Lipoperoxidación	27
4.7 Determinación de Proteína	27
4.8 Evaluación del Daño en el ADN	28
4.9 Determinación de la Recuperación del Daño en el ADN	30
4.10 Tratamiento Estadístico de Datos	32
5. RESULTADOS	33
5.1 Viabilidad Celular	33
5.2 Prueba de Citotoxicidad	37
5.3 Adhesión Celular	40
5.4 Grado de Lipoperoxidación	43
5.5 Evaluación del Daño en el ADN	45
5.6 Determinación de la Recuperación del daño en el ADN	53
6. DISCUSION	61
7. BIBLIOGRAFIA	68

ABREVIATURAS UTILIZADAS

μg	microgramos
μl	microlitros
μM	micromolar
μm	micrómetros
$^{\circ}\text{C}$	grados centígrados
A	adenina
Abs	Absorbancia
ADN	ácido desoxirribonucleico
ALAT	alanin amino transferasa
ASAT	aspartato amino transferasa
BAL	2,3-dimercapto propanol
C	citosa
cm	centímetros
CO_2	bioxido de carbono
D.E.	Desviación Estándar
dL	dosis Letal
DMEM	medio de cultivo
DMPS	ácido 2,3-dimercapto propano-1-sulfónico
DMSA	ácido meso-2,3-dimercaptosuccinico
DMSO	dimetil sulfóxido
EDTA	ácido etilen diamino tetra acético
EGTA	etilen glicol Bis-(β -aminoetil éter)
EU	Electroforesis Unicelular
FDA	Food and Drug Administration
Fe	fierro
G	guanina
GSH	glutation
h	horas

Hg	mercurio
HgCl₂	cloruro de mercurio
inc.	incubar
l	litros
LDH	lactato deshidrogenasa
long	longitud
LP	lipoperoxidación
M	molar
mA	miliamperes
MDA	malondialdehido
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
mM	milimolar
N	normal
NaCl	cloruro de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
nM	nanomolar
nm	nanómetros
nmoles	nanomoles
PBS	buffer de fosfatos
RN	rojo neutro
s/inc.	sin incubar
s/s	sin suero
SNC	sistema nervioso central
T	timina
T.	tratamiento
ton	toneladas
V	volts

1. INTRODUCCION

1.1 GENERALIDADES ACERCA DE LOS METALES

Los metales son probablemente los tóxicos más antiguos conocidos por el hombre, están distribuidos de manera natural en el medio ambiente por ciclos geológicos y biológicos. Normalmente se encuentran presentes en el medio ambiente, en distintas concentraciones en el aire, en las rocas, en la tierra, en el agua y en general en los organismos vivos (Domingo J.L., 1994).

Además, los metales son liberados al medio ambiente en gran parte por la actividad industrial como es el caso de la fabricación y aplicación comercial de metales y en la combustión de combustibles fósiles (Nriagu, 1988).

Así, la contaminación ambiental por metales, es un reflejo tanto de las fuentes naturales como de la industrialización.

A diferencia de otras sustancias tóxicas, los metales no son creados ni destruidos por el hombre, sin embargo, el uso por los humanos crea un desequilibrio y se han incrementado en la atmósfera, lo cual ejerce un efecto potencial dañino importante. Los ciclos biológicos de los metales, incluyendo la bioconcentración por plantas y animales y su incorporación a la cadena alimenticia, implica algunos riesgos de salud desconocidos para futuras generaciones (Li, 1981; Beijer y Jernelov 1986. Nriagu y Pacyna, 1988).

Los metales forman una gran variedad de compuestos químicos y cada uno de ellos tiene características específicas, lo que implica que se incremente su potencial para causar un efecto adverso en la salud humana.

Varios estudios han demostrado las propiedades tóxicas de los metales *in vivo*, además el efecto de muchos de ellos ha sido estudiado en sistemas celulares *in vitro* (Rothstein, 1959; Vallee y col, 1972; Kajikawa y col, 1972; Waters y col., 1974; Potter y Matrone, 1977; Huisingh y col., 1977; Jacobs y col., 1978; Kusell y col., 1978; Chin y col 1978; Levis y col, 1978; Ammitzboll y col., 1978; Whiting y col., 1979; Olsen y Jonsen, 1979).

1.2 MERCURIO

1.2.1 Generalidades

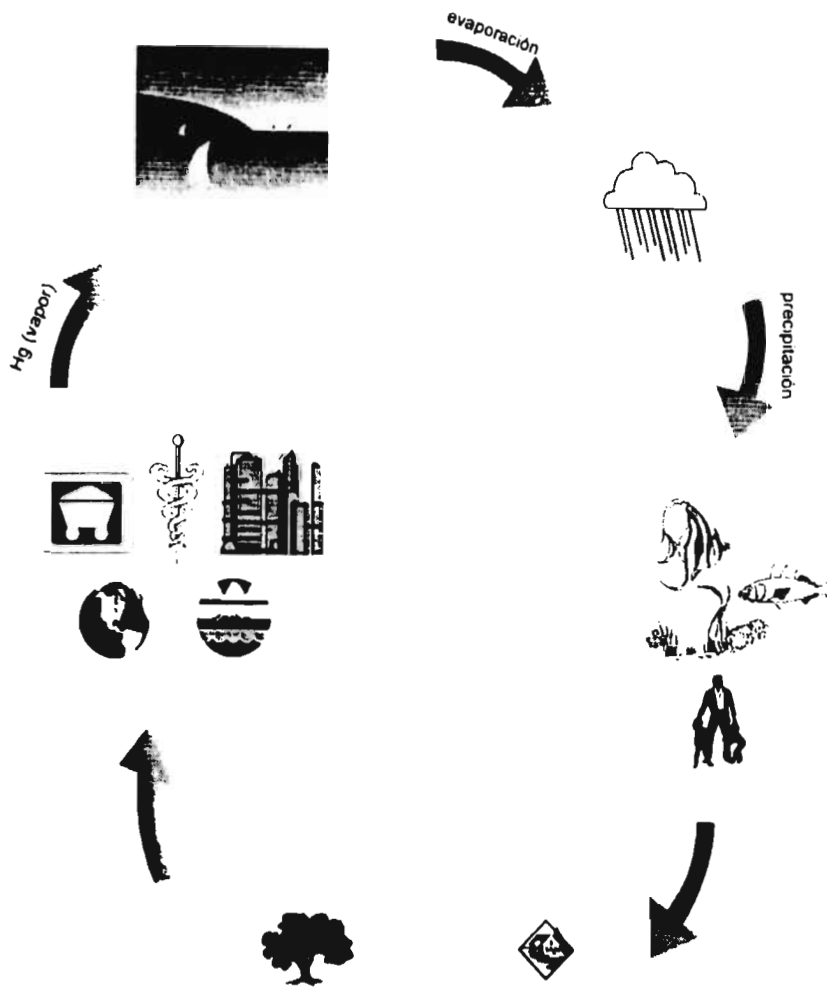
El mercurio (Hg) es uno de los metales pesados tóxicos más importantes que se encuentra presente como contaminante en el medio ambiente y que se ha incrementado en los últimos años. Puede encontrarse en gran diversidad de minerales y yacimientos y en una gran variedad de estados físicos y químicos.

El Hg es un metal pesado el cual no es esencial para la vida, sin embargo, esta presente en el medio ambiente en concentraciones significativas, en gran parte como producto de las diversas actividades humanas, sin embargo también se encuentra presente en forma de vapores producidos por la desgasificación de la corteza terrestre, los cuales circulan y llegan a los océanos donde después se evaporan y posteriormente se precipitan al llover distribuyéndose en el agua y en la atmósfera, donde contamina a los organismos vivos como en el caso de los peces y las algas y otros que se alimentan de éstos. Estos organismos a su vez excretan Hg hacia el ambiente generando, nuevamente el ciclo como se puede observar según el esquema del ciclo natural del Hg.

El Hg está distribuido en forma de vapor, como Hg metálico o elemental (Hg^0), en su forma iónica (Hg^{+1} , Hg^{+2}) formando sales inorgánicas (HgCl_2) o bien en forma de compuestos orgánicos de Hg (CH_3Hg , etc.), cada uno de ellos presenta una toxicidad diferente.

Las sales alcalinas de Hg son las que tienen mayor importancia toxicológica ya que son los compuestos que se incorporan a la cadena alimenticia, el más tóxico de este tipo de compuestos es el metil mercurio. (McIntyre AR., 1971; Pierce PE y col., 1972).

El incremento de este metal en el medio ambiente se debe a que es un producto liberado en la elaboración y posteriormente en el desecho de diversos productos químicos y farmacéuticos (Anttila 1990).



Ciclo Natural del Mercurio

El Hg presente en el ambiente general proviene de los escapes industriales, del empleo de combustibles fósiles tales como carbón, lignita, petróleo y gas natural y de la desgasificación natural de la corteza terrestre y de los océanos. La contaminación de ríos, lagos y bahías se ha atribuido a la descarga de efluentes industriales. Se ha estimado que de 2.3 - 8.3 x 10⁴ toneladas (ton) de Hg por año se transmiten al medio ambiente por todos estos procesos (Nriagu y Pacyma, 1988).

Goldwater y Stopford (1977), han estimado que la liberación de Hg por fuentes naturales es de 25 000 a 150 000 ton por año. Se ha reportado que la actividad humana resulta en la liberación de 20 000 toneladas de Hg anual (Friberg y col, 1986).

A su vez, estas cantidades, por contacto con otros compuestos químicos, microorganismos y agua, sufren procesos de modificación de su estado original, dando origen a compuestos mercuriales que ingresan a los organismos vivos y de ahí se transfieren a la cadena alimenticia llegando al hombre.

La redistribución y acumulación de compuestos que contienen a este metal tóxico como resultado de la industrialización son la causa fundamental de la exposición humana a cantidades mayores que las producidas naturalmente, lo cual es importante considerar por su potencial para causar efectos adversos en la salud humana (Departamento de Salud y Servicios Humanos, 1992, U.S.).

1.2.2 Usos

A través de los años el Hg se ha utilizado en la medicina, la agricultura y la industria. Este metal se utilizó con fines terapéuticos en el tratamiento de sífilis (1500 A.D.). Los compuestos orgánicos de Hg se utilizaron durante varios años como diuréticos, como parte de la formulación de laxantes y en algunas enfermedades cardíacas. Actualmente el uso de este metal ha sido sustituido por otro tipo de fármacos más efectivos y seguros.

La industria hace uso del Hg con varios objetivos, uno es el aprovechamiento de sus características físicas: expansión y contracción por acción de la temperatura, capacidad de sufrir compresión y transmitirla a otro punto, opacidad y brillo para la

fabricación de diversos productos. Así, el Hg elemental y como compuesto inorgánico es utilizado en la industria química como cátodo líquido para la producción electrolítica de sosa cáustica, ácido clorhídrico y ácido acético, también se utiliza en la industria cloroalcalina (25%), en la manufactura de equipo electrónico: relojes, baterías, lámparas de Hg, medidores, interruptores, tubos de rayos X y soldaduras (20%), equipo científico: termómetros, barómetros, etc (10%). Otros usos industriales incluyen la preparación de amalgamas dentales (3%), en procesos mediados por catálisis y en la elaboración de preservativos y explosivos. Sus características de interferencia en determinados procesos biológicos son utilizadas en la fabricación de productos farmacéuticos y de cosméticos (20%). También es utilizado en laboratorios de análisis químicos y de investigación, así como en la preparación y tratamiento de plata, oro, bronce y platino, en la producción de fungicidas mercuriales, en la elaboración de pinturas y pigmentos para tatuajes y productos fotográficos (Khayat AY., 1985; Vega GS., 1985; Toxicology Update, 1995). Algunos aditivos para alimentos contienen Hg lo cual es objeto de regulación bajo la agencia de Administración de Alimentos y drogas de USA (FDA).

1.2.3 Fuentes de Contaminación y Exposición

Los factores físicos o químicos como la temperatura, el pH, el potencial de oxidorreducción, las afinidades químicas a los materiales orgánicos y la tensión del oxígeno en el medio acuático, influyen en los procesos de formación de vapor de Hg y de las formas orgánicas de este metal.

Actualmente es evidente que las fuentes antropogénicas incrementan la liberación de este metal al medio ambiente excediendo las fuentes naturales. Las fuentes antropogénicas representan entre el 30-75% del transporte de Hg ambiental por año (W. F. Fitzgerald, 1994).

Muchos factores meteorológicos y geoquímicos pueden alterar el ciclo natural del Hg, haciendo que las concentraciones usuales aumenten hasta niveles peligrosos para el ser humano.

En la mayoría de las veces, la contaminación del agua se debe a los desechos industriales que contienen Hg, este metal en el agua puede sufrir el proceso de metilación transformándose en metilmercurio, el cual puede ser ingerido y bioacumulado por peces y la biota acuática y a través de éstos puede llegar al ser humano.

Cada día en el ambiente la población en general está rutinaria y repetidamente expuesta tanto aguda como crónicamente a bajas concentraciones de mercurio en el ambiente, en el aire y en el agua, es decir, del Hg liberado tanto de los recursos naturales como antropogénicos. La exposición a este metal puede ser de tipo ocupacional o no ocupacional. Dentro del ambiente ocupacional, el Hg tiene sus principales fuentes de contaminación en las actividades de extracción y de refinamiento, en su utilización industrial, agrícola y en odontología.

En general, las principales fuentes de exposición a Hg para el hombre en el ambiente general son los pescados, las algas, los mariscos, el pan preparado con cereales que hayan sido tratados o contaminados con plaguicidas mercuriales y los animales o productos de animales que se alimentaron con otras fuentes contaminadas, todos ellos son los intermediarios que sirven para que el Hg que ha ingresado al ambiente llegue al organismo humano.

Algunos medicamentos tales como, antisépticos, antisifilíticos, preservativos y diuréticos, también han tenido importancia como fuentes de contaminación de Hg para el hombre, aunque se han tomado muchas acciones para disminuir este tipo de exposición. En personas sometidas a tratamientos periódicos de restauración dental con amalgama, ésta puede representar un aporte importante de Hg iónico para su organismo, comparable a las cantidades que ingresan mediante los alimentos y el agua (Handley y col., 1993).

Los indicadores más utilizados en las evaluaciones de exposición al Hg son las determinaciones de sus concentraciones encontradas en el organismo humano en

sangre (5.0 mg/l), en orina (0.5 mg/l) y en pelo (2.0 mg/l) (Galvao L. y Corey G., 1987).

Las concentraciones de Hg en sangre de 10 a 20 $\mu\text{g} / \text{dL}$, generalmente no están asociadas con síntomas tóxicos, sin embargo, concentraciones en sangre aproximadamente de 50 a 100 $\mu\text{g} / \text{dL}$ se consideran tóxicas.

1.2.4 Salud

Bajo cualquier forma que se encuentre el Hg es tóxico para el hombre y los seres vivos en general. Desde el punto de vista de riesgo para la salud humana, las formas más importantes del Hg son el metilmercurio, el mercurio en estado de vapor, o las sales de mercurio. Dependiendo de la forma fisicoquímica en que se presenta el Hg (metálico, compuestos inorgánicos y compuestos orgánicos), presenta distintos procesos cinéticos y efectos tóxicos.

Dos propiedades importantes del Hg elemental que lo hacen potencialmente dañino para la salud son: que puede cruzar la membrana celular porque es altamente liposoluble y que es fácilmente oxidado a la forma mercúrica.

El principal órgano blanco para el Hg es el riñón y el sistema nervioso central (SNC), sin embargo, el Hg puede ser tóxico para el hígado (Ashour y col. 1993). También se acumula en el cerebro, el tracto gastrointestinal y el pulmón.

La exposición crónica al Hg produce efectos tóxicos significativos (Clarkson TW, 1972). La exposición crónica a vapores de Hg preferencialmente ataca el SNC (Hryhorezuk Do y col, 1982). Por otra parte, la exposición crónica a compuestos inorgánicos de Hg produce complicaciones renales. La diferencia de los efectos se explica en base a la liposolubilidad del compuesto. Las diferencias entre una exposición aguda y crónica a compuestos de Hg son mínimas. Una de las características es que los síntomas pueden ocurrir semanas o meses después de una exposición aguda. El estado emocional de un individuo que ha sido expuesto repetidamente al Hg también se ve alterado, se incrementa la irritabilidad, la pérdida de la memoria y el individuo pierde el interés por la vida. Si el envenenamiento con este metal es severo, los síntomas no son reversibles.

Actualmente existe una controversia acerca del posible efecto de riesgo a la salud asociado con la exposición al mercurio por amalgamas dentales (Clarkson y col., 1988; Lorscheider y col., 1995).

Los signos y síntomas son cuantitativa y cualitativamente dependientes de la estructura química del compuesto, de la cantidad y duración de la exposición y de la sensibilidad individual a un compuesto en particular. (Curtis HA y col, 1987).

El Hg orgánico y en forma de vapor son reportados como neurotóxicos (Cheung y Verity 1985; Chang y Verity, 1995). El Hg inorgánico se ha reportado como nefrotóxico (Nielsen JB. y col., 1994) y hepatotóxico (Toxicology Update, 1995).

Aunque exposiciones a altas dosis de cloruro de mercurio ($HgCl_2$) son directamente tóxicas en las células tubulares renales, exposiciones crónicas a bajas dosis a sales de Hg o vapores de Hg elemental causan respuestas de hipersensibilidad. Se ha reportado que este metal induce una reacción renal autoinmune (Klaassen C.D. y col., 1986). Las sales inorgánicas de Hg prácticamente no atraviesan la barrera cerebral, sólo trazas pueden alcanzar el cerebro. Los compuestos orgánicos del Hg, por su liposolubilidad, atraviesan con facilidad las membranas biológicas, así como la barrera hematoencefálica y la placenta (WHO, 1991).

El Hg ha causado muertes masivas importantes debido a intoxicaciones por vapor de este metal producidas en incendios en las minas, en el consumo de pescado contaminado u otros alimentos. Los efectos adversos en trabajadores expuestos indican que los signos y síntomas de intoxicación por Hg pueden ser causados por la exposición a concentraciones variables, según los compuestos y por las condiciones ambientales del trabajo. Uno de los accidentes más graves por envenenamiento con Hg ocurrió por 1970 cuando una población consumió una cosecha de granos que fue tratada con metil mercurio mezclado con flúor. Más de 500 personas murieron en Iraq (Bakir F. y col 1976).

1.2.5 Toxicidad y Toxicocinética

La toxicidad de cualquier sustancia o agente depende de la dosis y se desarrolla si el tóxico impide los mecanismos de protección y/o los de adaptabilidad de los sistemas biológicos.

Un gran número de agentes xenobióticos, entre los que se encuentran los metales pesados, ejercen de manera directa su efecto tóxico, mientras que la toxicidad de otros agentes se debe en gran parte a los productos de su metabolismo.

En muchos casos los agentes xenobióticos interaccionan con otras moléculas en el cuerpo que tienen grupos funcionales susceptibles, de manera que al incrementarse su reactividad pueden dar lugar a compuestos electrofílicos, nucleofílicos, a radicales libres, etc.

MECANISMO DE TOXICIDAD

Varios planteamientos han sido propuestos para explicar la toxicidad celular producida por metales, esto incluye la interacción con grupos sulfhidrilos, la inhibición de la función mitocondrial y la supresión de antioxidantes celulares.

Además se ha reportado que los metales son tóxicos en sistemas biológicos a través de sustituir en muchos procesos a los metales esenciales (C. Burton y col., 1995). Así todos los agentes químicos producen su efecto tóxico vía la alteración en la bioquímica y fisiología celular.

El efecto tóxico de los metales puede explicarse ya sea porque su metabolismo es similar al de un elemento esencial, por el desplazamiento de iones metálicos biológicamente activos, por la formación de complejos con los grupos sulfhidrido de las proteínas, o bien, por la alteración del transporte de iones esenciales.

La mayoría de los metales afectan múltiples órganos y sistemas, y los blancos para la toxicidad son procesos bioquímicos específicos, enzimas y/o membranas celulares y de organelos. El efecto tóxico del metal involucra una interacción entre el ion libre del metal y el blanco toxicológico. Las diferencias específicas en la toxicidad de los distintos iones metálicos pueden estar relacionadas con las diferentes

solubilidades, la absorción, el transporte, la reactividad química y los complejos que éstos forman dentro del cuerpo (Stohs S. y Bagchi D., 1995).

Los efectos tóxicos producidos por varios compuestos de Hg están en función de su forma química, ruta de administración y la duración de la exposición.

El Hg forma enlaces con los grupos sulfhidrilo además de grupos fosfato, carboxil, amida y grupos funcionales de aminas. Este metal también reacciona con varias enzimas y otras proteínas que contengan estos grupos funcionales. Así, el Hg interfiere con reacciones enzimáticas celulares, sin embargo, aún no es claro el mecanismo por el cual actúa este metal a nivel celular.

Toxicocinética

En cuanto a su metabolismo, transformación y excreción se sabe que el Hg elemental o metálico es oxidado a Hg divalente después de la absorción del tejido en el cuerpo.

Absorción:

El ingreso del Hg al organismo humano es por vía inhalatoria, digestiva o cutánea, y es oxidado al ion mercurico en la sangre, el hígado y otros tejidos por acción de la enzima catalasa (Bressa y Cima 1984).

Distribución:

El Hg se distribuye por todo el organismo y luego se deposita en algunos órganos, conforme a su forma química y la presencia de otras sustancias.

El Hg, es transportado por las proteínas plasmáticas a su órgano blanco (Suzuki, 1991). En general se encuentran concentraciones significativas del metal en la sangre, los riñones, el hígado y el cerebro.

La mayor acumulación de Hg inorgánico en el cuerpo es en el riñón y en segundo lugar en el hígado, donde se deposita en concentraciones elevadas.

Eliminación:

El Hg no induce metalotioneina en el hígado, aunque es el sitio común para la inducción de dicha proteína en respuesta de otros metales. El Hg inorgánico o el vapor de Hg inducen la síntesis de la metalotioneina específicamente en el riñón y es en este órgano donde se forma el complejo metalotioneina-mercurio, el cual es soluble y se excreta principalmente por la orina y las heces.

Por otra parte la eliminación ocurre también por las glándulas sudoríparas, lagrimales, mamarias y salivales.

Bioacumulación:

Los compuestos metilmercuriales se hacen presentes en la cadena alimenticia, ya que en lugares en donde hay contaminación, presentan una fuerte tendencia a la bioacumulación en los animales y en los vegetales.

Se ha reportado que a cualquier dosis, los niveles de mercurio en el riñón son significativamente más altos que en el hígado (Khan, A. y col. 1996).

En el riñón el Hg metálico se oxida (Hg^0 a Hg^{+2}) y los compuestos orgánicos de este metal se biotransforman a Hg inorgánico.

1.2.6 Agentes Quelantes y Protectores

Los agentes quelantes generalmente se consideran poco específicos en su afinidad por los metales, éstos forman un complejo con el metal en el cual el ion del metal se asocia con una carga del agente quelante.

La manera más efectiva de eliminar el Hg inorgánico, ya sea como resultado de una exposición aguda o crónica, es con agentes quelantes. Las opciones incluyen el dimercaprol, penicilamina y sus derivados N-acetilados (Smith ADM y col., 1961).

Se ha reportado el uso de algunos agentes quelantes en la terapia de intoxicaciones con Hg entre los que se encuentran el 2,3-dimercapto propanol (BAL), el ácido meso-2,3-dimercaptosuccinico (DMSA), ácido 2,3-dimercaptopropano-1-sulfónico (DMPS) (Aposhian y col., 1996), sin embargo, aunque BAL, DMSA y DMPS son agentes quelantes igualmente efectivos a dosis equimolares (Inns y col., 1993), la baja toxicidad del DMSA y DMPS ofrecen una ventaja significativa sobre sus precursores análogos (Aposhian, 1996). Estos han sido la primera opción para terapias clínicas con agentes quelantes.

El etileno glicol bis-(β-aminoetil eter) (EGTA) es otro agente quelante, el cual a pesar de no ser específico para quelar Hg, se ha reportado como un buen agente quelante en la captura de este metal adherido a la membrana plasmática (1997 SOT Annual Meeting, Cincinnati)

Se ha reportado que el glutatión (GSH) es un agente hepatoprotector (James, S. y col., 1995) y que el GSH exógeno decrece la citotoxicidad del HgCl₂ (C. Burton y col., 1995), ya que es uno de los encargados de mantener el cociente oxidoreductor de la célula.

1.2.7 Efecto a Nivel Celular

Se ha reportado que el Hg a nivel celular interfiere con la síntesis de proteínas (Beattie y col. 1990) y ácidos nucleicos (Choi y col. 1983), inhibe las enzimas citosólicas (Miura y col. 1987), disminuye la secreción de albúmina (Denizeau y col. 1990), altera el metabolismo de porfirinas (Woods y col. 1995) y tiene un efecto mitogénico (Bucio y col., 1995).

Al tratar las células con ^{203}Hg como trazador y hacer subfraccionamiento celular, se encuentra que el Hg se distribuye principalmente en el núcleo y la mitocondria (1997 SOT Annual Meeting, Cincinatti).

El Hg se une con las macromoléculas que contienen grupos sulfhidrilo, además se ha reportado que el Hg tiene una variedad de efectos en el ADN que incluyen la alteración de su estructura y es capaz de unirse al ADN *in vitro* (Sissoeff y col., 1976; Yamane y col., 1961; Nandi y col., 1965) e *in vivo* (Cantoni y col., 1984; Ariza y col., 1994). También se ha reportado que el HgCl_2 a concentraciones de $1 \mu\text{M}$ inhibe significativamente la síntesis de ADN (Wroblewski, J. y col. 1995).

Otros de los efectos del Hg en el ADN son el incremento de la incidencia de aberraciones cromosómicas tales como los rompimientos cromosomales, el intercambio de cromátidas hermanas, anaploidismo y/o poliploidismo (Kazantis, 1981; Leonard y col., 1982; Gebhart, 1984; De Flora, S. y col. 1994).

Se ha estudiado el rompimiento de hebras simples del ADN y la citotoxicidad inducida por el HgCl_2 en un sistema *in vitro* donde se ha observado que el papel de la actividad del oxígeno intracelular es importante para que el metal induzca daño en el ADN (Tsuzuki-K y col. 1994). Asimismo, células de ovario de hamster han sido tratadas con HgCl_2 produciendo una rápida inducción de rompimientos de hebra simple del ADN, este estudio mostró una relación directa entre la producción de radicales libres y la inducción de rompimientos en el ADN. (Cantoni, O. y col. 1984).

La literatura considera al Hg como uno de los metales más potente para inducir rompimientos en la hebra del ADN cuando se adiciona a ADN aislado o bien, cuando éste fue aislado a partir de células tratadas con este metal (Robinson, S. y col. 1984).

Se ha demostrado que el Hg tiene diversos efectos en las células y se ha reportado que es citotóxico y genotóxico (Betti C. y col., 1993) y que dependiendo del sistema de prueba es mutagénico (Kazantis, 1981; Leonard y col., 1982; Gebhart, 1984; Hansen y col., 1984).

Algunos estudios sobre los efectos mutagénicos del Hg en células eucariontes demuestran que a concentraciones a las cuales este metal no es citotóxico causa un incremento en la frecuencia de mutaciones en un gen. Los resultados de este estudio

sugieren que pueden haber riesgos asociados con la exposición a niveles de Hg no citotóxicos. (Ariza, M. y col. 1994, 1996). Asimismo, se ha reportado la genotoxicidad de materiales dentales a base de Hg (Heil J. y col., 1996).

1.3 ADN

1.3.1 Generalidades

El ácido desoxirribonucleico (ADN), está constituido por una doble hélice de cadenas antiparalelas de azúcar-fosfato, además posee el mismo número de residuos de adenina que de timina (A=T) y el mismo número de residuos de guanina que de citosina (G=C). La composición de bases del ADN varía extensamente entre organismos diferentes. Las bases en las hebras opuestas se unen por enlaces de hidrógeno de forma geoméricamente complementaria para formar los pares de bases A-T y G-C.

El ADN es el portador de la información genética en todas las formas de vida celular, así como en muchos virus. Tiene dos funciones:

1. Dirigir su propia replicación durante la división celular.
2. Dirigir la transcripción de moléculas del ácido ribonucleico (ARN).

Debido a la disposición natural del ADN a sufrir cambios, la interacción con agentes en el ambiente, que sean capaces de alcanzar el núcleo celular, es un evento que podría traducirse en la producción de mutaciones.

1.3.2 Genotoxicidad: Mutagénesis y Carcinogénesis

La genotoxicidad se presenta cuando al menos hay una evidencia de que un agente químico interactúa con moléculas biológicas para inducir una respuesta adversa, en donde un primer efecto del químico o uno de sus metabolitos resulta en una alteración de la información codificada en el ADN. La genotoxicidad indica que el agente químico responsable podría iniciar el proceso neoplásico, que la sustancia está biodisponible y que tiene un potencial para interferir con procesos biológicos.

Los agentes químicos genotóxicos interactúan directamente con el ADN nuclear (Hartwig A., 1995). Algunos estudios en los que evalúan los efectos

genotóxicos producidos por los metales y sus compuestos sobre la estructura del ADN y su funcionamiento, muestran modificaciones en las bases, en el entrecruzamiento de señales, así como en la inducción del rompimiento de una hebra y en la inducción de aberraciones cromosómicas e intercambio en cromátidas hermanas (Christie NT. y Costa M., 1983).

El ADN está alojado en el núcleo de las células de los organismos superiores, así, al referirse a mutaciones, se habla de daño en células individuales que son las que sufren las mutaciones en primera instancia, por lo que mutación se define como un cambio en la forma o en la naturaleza en la información heredable contenida en el ADN. Cualquier agente que causa una mutación se le denomina mutágeno. Los mutágenos son de gran interés ya que la inducción del daño genético puede causar un incremento en la incidencia de enfermedades genéticas en futuras generaciones y enfermedades en células somáticas.

Las mutaciones pueden ocurrir en forma natural y espontánea o por interacción con agentes ambientales físicos y/o químicos.

Muchos agentes químicos considerados carcinogénicos son mutagénicos y viceversa, sin embargo es importante tomar en cuenta la sensibilidad particular de cada especie u órgano hacia un efecto carcinogénico, ya sea por su capacidad de metabolizar dicho agente o bien por activar la reparación del daño inducido en el ADN. El evento inicial de la carcinogénesis puede ser una mutación.

La carcinogénesis es un proceso de múltiples pasos los cuales ocurren a través de una variedad de mecanismos no entendidos por completo a la fecha. La carcinogénesis se presenta por procesos de iniciación, promoción y progresión. Se considera que los dos primeros pasos son fases reversibles mientras que al tercero se le considera como un proceso irreversible (Pittot, 1988).

No hay evidencias claras de que el mercurio inorgánico sea un agente carcinogénico en humanos (Agencia de protección ambiental (EPA), 1984 y 1990; Departamento de Salud y Servicios Humanos US, 1993). Estudios epidemiológicos en distintas poblaciones no han reportado una correlación entre la exposición al Hg y el

cáncer por lo que no se considera a la fecha que el Hg pueda ser carcinogénico en humanos (Cragle y col., 1984; Ellingsen y col., 1965; IARC 1993).

1.3.3 Reparación del ADN

A pesar de su alta reactividad con compuestos electrofilicos y radicales libres, el ADN nuclear mantiene su estructura constante, en parte porque su cromatina está empaquetada y por la disponibilidad de diferentes mecanismos de reparación para corregir alteraciones.

Naturalmente, los agentes químicos o ambientales que han estado presentes a través de la evolución dañan el ADN y causan mutaciones, sin embargo, los organismos vivos presentan una diversidad de mecanismos celulares como son los mecanismos de reparación que remueven el daño antes de que ocurra la mutación, tal como es el caso de un aducto en el ADN, o bien los mecanismos de tolerancia de daño, en donde no se repara el cambio, pero se permite que la célula sobreviva a pesar de éste.

Varios tipos celulares como las células del hígado y del cerebro, deben usar la información de su ADN por semanas, meses o aún años, ya que las células de estos tejidos se dividen lentamente ó ya no lo hacen. El ADN en todas las células es susceptible a daño físico y químico. Si no se contara con mecanismos de reparación el ADN de células no proliferantes se producirían proteínas defectuosas. La respuesta celular a este problema ha sido el desarrollo de sistemas de reparación del ADN. (Rossman y Klein, 1988).

Sin embargo, es importante considerar que los mecanismos de reparación no dan una protección completa de una mutación o cáncer, ya que estos procesos pueden llegar a saturarse o bien algunos tipos de daño son reparados inefficientemente. Así, la corrección de los errores en la secuencia del ADN en todos los tipos de células es importante para su sobrevivencia.

Diversos metales afectan los diferentes pasos de la reparación del ADN. El mecanismo por el cual alteran este proceso se ha explicado por la competencia con

iones de metales esenciales. En el caso del Hg se ha reportado un efecto positivo en la reparación del ADN (Snyder y col., 1989).

En general, se considera que los metales inducen lesiones a nivel de ADN. En un estudio de células tratadas con $HgCl_2$ se encontró que a pesar de que éste induce daño, la célula es capaz de echar andar mecanismos de reparación (Robinson, S. y col 1984).

1.4 HIGADO

1.4.1 Fisiología

El hígado constituye aproximadamente del 2-5% del peso del cuerpo en el adulto. Se encuentra situado debajo del diafragma y está dividido en dos lóbulos (derecho e izquierdo). El tejido hepático está formado por una serie de estructuras llamadas lobulillos hepáticos que son las unidades funcionales del hígado, dentro de los cuales la sangre circula pasando por las células hepáticas.

El hígado está formado por células del parénquima o hepatocitos que son células epiteliales, las cuales representan aproximadamente del 60-70% de las células del hígado. Alrededor de las estructuras tubulares están los capilares sinusoides donde se encuentran asociadas otro tipo de células no parenquimatosas como son las células endoteliales, las células de Kupffer, las células "pit" y las células estelares hepáticas. Estas células sinusoidales constituyen cerca del 30% del volumen hepático. Las células endoteliales tienen numerosas funciones en varias reacciones biológicas entre las que se encuentran transporte activo, coagulación, fibrinólisis, respuesta inmune, etc. Las células de Kupffer son macrófagos que poseen una gran capacidad fagocitaria encargándose de la desintoxicación. Las células no parenquimatosas están localizadas a lo largo de los sinusoides del hígado y son las primeras en estar expuestas a los agentes xenoblóticos.

Entre las principales funciones del hígado están: la formación de bilis, el almacenaje y liberación de carbohidratos, la formación de urea y del colesterol metabólico, la producción de proteínas plasmáticas, varias funciones relacionadas con el metabolismo de las grasas, las vitaminas y las proteínas, la inactivación de

algunas hormonas polipeptídicas, la inducción y conjugación de hormonas esteroideas corticosuprarrenales gonadales y la desintoxicación de muchas sustancias y toxinas.

1.4.2 Hepatotoxicidad

El daño hepático inducido por sustancias químicas es un problema de salud pública, ya que es en este órgano en donde se lleva a cabo, principalmente, el metabolismo de los diferentes agentes xenobióticos.

Los agentes químicos inducen daño hepático como resultado tanto de una exposición aguda como crónica, produciendo alteraciones en la estructura del hígado tanto de tipo degenerativo como proliferativo.

Se ha observado que el daño hepático no depende únicamente del agente químico involucrado, sino también de la dosis y del periodo de exposición. Algunas formas de daño hepático son reversibles, mientras que otras resultan en una alteración permanente del órgano.

Dada su función metabólica, el hígado está en contacto con una gran variedad de tóxicos y todas las células en el hígado tienen un papel importante en la distribución y biotransformación de los xenobióticos, incluyendo algunos metales (Gregus y Klassen, 1986).

Se ha reportado que el hígado, y particularmente los hepatocitos sufren daño por el efecto tóxico del Hg, por lo que el estudio de los efectos tóxicos de los metales en células hepáticas resulta de gran interés.

1.4.3 Cultivos celulares

La evaluación de la citotoxicidad química inducida es frecuentemente difícil de determinar en animales, ya que numerosos factores no pueden ser controlados. El ser humano es muy complejo y esto hace difícil el establecimiento del riesgo real que presentan diversos agentes sobre la salud, es decir, existen mecanismos que mantienen la homeostasis del organismo como son la detoxificación celular, la reparación del ADN por enzimas celulares, la apoptosis, el metabolismo en hígado o pulmones, el sistema excretor y el sistema inmunológico.

La tecnología de cultivo celular ha sido también adaptada dentro de muchas aplicaciones rutinarias en la medicina y en la industria. Las ventajas que tiene trabajar con un cultivo son el control de parámetros sobre el medio ambiente que rodea a la célula como son la concentración a la cual son expuestas las células, el determinar de una manera directa la secreción de diferentes metabolitos, así como conocer el mecanismo por el cual se ejerce el daño sin la intervención de sistemas homeostáticos, sin embargo, se tiene un sólo tipo celular y en realidad un órgano está compuesto por diferentes tipos celulares.

Por otra parte es importante hacer notar que muchos de los estudios realizados con cultivos celulares y células aisladas tienen como objetivo conocer el daño producido a nivel celular, así como el mecanismo por el cual se efectúa un cambio y que posteriormente se complementa con estudios en animales integros con el fin de correlacionar el mecanismo con la respuesta en un individuo que presenta sistemas homeostáticos.

Es importante tomar en cuenta que se tienen muchas diferencias entre las condiciones ambientales de una célula *in vitro* e *in vivo* como son los componentes involucrados en la regulación homeostática, el metabolismo celular y el metabolismo energético, los cuales juegan un papel importante. Sin embargo, muchas funciones especializadas son expresadas en cultivos, por lo que pueden ser utilizados con gran éxito para estudiar alteraciones producidas a nivel celular.

Existen diferentes modelos dentro de los cultivos celulares entre los que están los cultivos primarios y las líneas celulares, siendo de gran utilidad estas últimas ya que las células asumen una homogeneidad, así, cada subcultivo de cada muestra replicada será idéntica y las características de la línea pueden perdurar a lo largo de varias generaciones.

Entre las líneas celulares hepáticas, se puede adquirir comercialmente las células WRL-68, las cuales fueron obtenidas por Apostolov (1976) a partir de un hígado fetal humano. Estudios de las características morfológicas y funcionales de

esta línea celular, indican que estas células mantienen características del órgano que proceden como son la secreción de albúmina y algunas otras proteínas características, actividades enzimáticas específicas, patrón de citoqueratinas de células hepáticas, etc., las cuales hacen que esta línea sea un sistema útil para el estudio de algunas alteraciones producidas por metales (Gutiérrez y col 1994).

También se ha reportado que esta línea es útil en la evaluación de la inducción de hepatotoxicidad por metales pesados, además de que estas células pueden ser empleadas en la investigación de alteraciones funcionales producidas por metales pesados a nivel celular. (Gutiérrez y col. 1992). Asimismo se ha reportado que el HgCl_2 induce alteraciones en esta línea celular hepática (Bucio y col., 1995). Se encontró que el metal produce alteraciones morfológicas principalmente a nivel mitocondrial. Así mismo, se produjo un incremento en la liberación de enzimas marcadoras de daño hepático como ALAT, ASAT y LDH, un aumento en el grado de lipoperoxidación, así como una disminución en la cantidad de GSH. Al evaluar la capacidad de inducción del Hg de metalotioneína, se encontró que este metal no induce esta proteína, resultados semejantes a los encontrados *in vivo* para el hígado, a pesar de que para otros metales como el cadmio, se logra un incremento considerable. Esto es un resultado que nos indica que esta línea puede ser útil para el estudio del mecanismo de daño producido por metales, ya que tiene la capacidad de discriminar entre los diferentes metales.

Utilizando ^{203}Hg se reportó que el metal se distribuye en el interior celular principalmente en la mitocondria y en el núcleo y en una menor proporción en microsomas y en el citosol (1997 SOT Annual Meeting, Cincinatti). Ya que el núcleo es uno de los principales puntos de acumulación del metal, resulta muy interesante evaluar el posible daño del metal a nivel de ADN.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el daño producido a nivel de ADN en una línea celular hepática humana por exposición aguda y crónica a cloruro de mercurio.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Evaluar la viabilidad y algunos parámetros de citotoxicidad de las células en presencia de Hg.
- ✓ Correlacionar el grado de lipoperoxidación con el daño en el ADN.
- ✓ Evaluar la recuperación del daño en el ADN inducido por el Hg.

3. JUSTIFICACION

La contaminación ambiental es un problema actual importante por los efectos tóxicos que producen gran diversidad de agentes. En México, las actividades humanas en diferentes industrias químicas, la producción y uso de plaguicidas, la disposición ilegal de desechos industriales de alto riesgo y la falta de equipo de protección en lugares de trabajo, son las principales causas de exposición a agentes genotóxicos

Un gran número de metales o sus compuestos son clasificados por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer, como carcinogénicos humanos, aunque el mecanismo por el cual se lleva a cabo la formación del tumor aún no se conoce. La evidencia está basada principalmente en los resultados de estudios epidemiológicos en poblaciones ocupacionalmente expuestas. Estos datos sugieren la posible carcinogenicidad de otros metales entre los que están el mercurio y el cobalto. En el caso del Hg las evidencias han sido insuficientes para clasificarlo como un metal de riesgo humano carcinogénico (IARC 1993).

El Hg es uno de los elementos que se produce por distintos procesos industriales, este metal no es biodegradable y su bioacumulación ocasiona efectos adversos dañinos para la salud.

En base a la literatura revisada, hay evidencias de que este metal como agente contaminante es nefrotóxico, hepatotóxico, neurotóxico, inmunotóxico y tiene efectos teratogénicos, sin embargo, son pocos los estudios que se han realizado para determinar si este metal produce daño en el ADN y aún menos, los que han evaluado la reversibilidad del efecto. Es así como mediante la realización de este trabajo se puede establecer el impacto de este agente genotóxico en el ambiente ya que su presencia puede alterar el genotipo.

De esta manera el presente estudio es una contribución a la investigación en cuanto al efecto del Hg a nivel de daño en el ADN y más aún en la reversibilidad del mismo de lo cual se tiene muy poca información.

Por otra parte, la mayoría de los estudios se han realizado en animales de experimentación y la extrapolación al humano es difícil, así en respuesta a la necesidad de encontrar sistemas de prueba cercanos al humano, se realiza este estudio en una línea celular humana donde se puede determinar directamente la exposición al metal.

En estudios epidemiológicos se ha incrementado el interés en encontrar marcadores biológicos los cuales proporcionan una medida de exposición y más aún del daño biológico. Las lesiones en el ADN en líneas celulares humanas son utilizadas como biomarcadores los cuales aportan información acerca de los efectos genotóxicos de los agentes sobre los tejidos y acerca de los mecanismos por los que se produce esa alteración.

Así, evaluar el efecto de la exposición al Hg, es de gran interés dada la amplia distribución de este metal y los efectos adversos que puede representar para la salud. Dentro de estos estudios es primordial el determinar el efecto que puede tener a nivel de daño de ADN, el cual puede relacionarse con mutagénesis, carcinogénesis o con una funcionalidad celular deficiente.

En este estudio es de particular interés relacionar la citotoxicidad inducida por el Hg y el incremento en la lipoperoxidación, así como correlacionar la cantidad de radicales libres formados con el daño en el ADN, en una línea celular hepática humana.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1 Cultivo Celular

El presente estudio se llevó a cabo utilizando una línea celular hepática humana de origen fetal (WRL-68). Las células fueron mantenidas con medio de cultivo, suplementado con suero de ternera de bovino adicionado con Fe (8%), aminoácidos no esenciales (1%), piruvato de sodio (1%) y anti-bac (penicilina-estreptomicina al 1%), el medio de cultivo así preparado lo llamaremos en lo sucesivo DMEM completo. Las células se sembraron en botellas de plástico estériles para cultivo de 25 y 75 cm² o bien, en multicámaras de 4 y 24 pozos y en cajas Petri de 3 cm de diámetro. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37 °C y con una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad. El medio de cultivo fue reemplazado cada dos días y las células se cosecharon una vez por semana utilizando una solución de Tripsina-Verseno (0.025%).

Todos los experimentos fueron realizados después de 24 h de haber sembrado las células y a una densidad tal que las células estuvieran en su fase de crecimiento logarítmica.

4.2 Condiciones de Tratamiento

Las células fueron expuestas a 0.5 y 5.0 μM de HgCl₂ durante 3 h (tratamiento agudo) y a 0.5 μM durante 7 días (tratamiento crónico). Se utilizó DMEM sin suero durante las últimas 3 h de tratamiento crónico y durante las 3 h del tratamiento agudo con el metal para evitar que éste se pegue a las distintas proteínas del suero y tener una concentración real del Hg.

4.3 Viabilidad Celular

El azul de tripano es un colorante de exclusión, el cual indica la pérdida de viabilidad celular cuando se intercala dentro del ADN. En células viables la membrana plasmática previene que el azul de tripano entre y tiña el núcleo, en contraste, en células muertas la permeabilidad de la membrana plasmática deja de ser una barrera y el azul de tripano fácilmente tiñe el núcleo (Tyson CA. y Frazier JM., 1994).

Para determinar la viabilidad celular se sembraron 30 000 células por pozo en multicámaras de plástico de 24 pozos, a las 24 h se lavaron con buffer de fosfatos (PBS) y se dejaron expuestas a diversas concentraciones de Hg en un rango de 0.05 hasta 1000 μM en DMEM sin suero durante 3 h, pasado este tiempo se desechó el medio que contenía el metal y las células se lavaron de nuevo con PBS, después se determinó la viabilidad celular agregando 500 μl a cada pozo de una solución de azul de tripano-NaCl (0.9%) al 0.4%, las células se incubaron durante 5 min, pasado este tiempo se lavaron con PBS y se observaron por microscopía óptica. A las concentraciones del metal a las que se observaron varias células teñidas debido al daño o muerte celular, éstas se levantaron con tripsina y se contó el número de células que no habían incorporado el colorante utilizando un hemocitómetro.

4.4 Prueba de Citotoxicidad

Rojo Neutro (RN)

El ensayo de RN es una medida de citotoxicidad para determinar la viabilidad celular *in vitro*, y se basa en la capacidad de incorporar el RN dentro de los lisosomas de las células viables después de ser incubadas con el agente de prueba. El RN se acumula en los lisosomas ya que se fija en las cargas ácidas dentro de la matriz del lisosoma. En caso de daño o muerte celular, el RN es retenido en menor proporción, o bien no es retenido en los lisosomas (Dogle A. y col., 1990).

Se sembraron 60 000 células por pozo en multicámaras de plástico de 24 pozos, 24 h después se lavaron con PBS y se expusieron a concentraciones de 0.5, 5.0 y 500 μM de HgCl_2 en DMEM sin suero. Se incubaron a 37 °C durante 3 h, pasado el tiempo de tratamiento, se lavaron con PBS y se agregó 1 ml a cada pozo

de una solución de RN previamente centrifugado, se volvieron a incubar durante 3 h y posteriormente se lavaron con PBS, se les aplicó 200 μ l / pozo de una solución fijadora de cloruro de calcio (1%) y formaldehído (0.5%), se les retiró dicha solución y se agregaron 800 μ l / pozo de una solución ácido acético (1%) y etanol (50%) durante 10 min para extraer el colorante. Posteriormente se determinó el cambio de absorbancia (Abs) a 540 nm en un espectrofotómetro (Beckman, modelo Du 640).

4.5 Adhesión Celular

La adhesión celular es considerada una medida de funcionalidad celular y es la capacidad que tienen las células de adherirse al sustrato. Es importante su determinación para valorar que se inician los experimentos con igual número de células aún estando expuestas a algún tóxico a través del tiempo.

En este caso se sembraron 600 000 células en una caja de plástico de 25 cm², a las 24 h se lavaron con PBS y las células se expusieron a una concentración de 0.5 μ M de HgCl₂ en DMEM completo durante 5 días. Al quinto día las células se levantaron del sustrato con tripsina (0.5 ml) y se sembraron 30 000 células por pozo en multicámaras de plástico de 4 pozos, a las 4 h las células se volvieron a lavar con PBS (0.5 ml) con el fin de quitar las no adheridas y las células pegadas a la caja se levantaron del sustrato con tripsina (100 μ l), se contó el número de células adheridas a dicho tiempo mediante el equipo contador automático de células Coulter Counter. Esta misma operación se repitió con las células tratadas crónicamente.

4.6 Grado de Lipoperoxidación

En cualquier proceso degenerativo se sabe que hay producción de radicales libres. El producto de la reacción de los radicales libres formados con el ácido tiobarbitúrico, es el malondialdehído (MDA) el cual es colorido, por lo que su concentración se puede determinar por un cambio en la Abs.

Se determinó el grado de lipoperoxidación (LP) por el método de Buege y Aust (1978). Se sembraron 5×10^6 células en botellas de plástico de 75 cm², a las 24 h las células se lavaron con PBS y se les agregó el metal en DMEM sin suero. Al terminar el tiempo de exposición de los tratamientos agudo y crónico (3 h y 7 días correspondientemente), las células se lavaron con solución isotónica de NaCl (0.9%), se levantaron del sustrato raspándolas con un gendarme de goma y se resuspendieron en 1.2 ml de PBS. De esta suspensión se tomaron 0.2 ml de cada muestra para determinar proteína y al volumen restante de muestra se le adicionó ácido tricloroacético (15%), ácido tiobarbitúrico (0.5%) y ácido clorhídrico (0.25 N). Así, se obtuvo una mezcla homogénea que se calentó en baño de agua a 96 °C durante 25 min. Posteriormente las muestras se dejaron enfriar y se centrifugaron a 3000 g durante 10 min. Se leyó el cambio de densidad óptica en el sobrenadante a 534 nm en el espectrofotómetro.

4.7 Determinación de Proteína

El contenido de proteína en las células se determinó por el método de Lowry (1951). Se preparó una solución A (carbonato de sodio al 2%, hidróxido de sodio al 0.4% y tartrato de sodio y potasio al 0.02%) y una solución B (sulfato de cobre-pentahidratado al 0.5%), se mezcló A y B (50:1) para obtener una solución C. A 20 µl de la muestra se le agregó 5 ml de la solución C y 0.5 ml del reactivo de Folin (2 N).

Las muestras se agitaron y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 45 min. Pasado este tiempo, se leyó el cambio de densidad óptica a 660 nm en el espectrofotómetro. Se realizó una curva estándar con albúmina para determinar el contenido de proteína de las muestras.

4.8 Evaluación del Daño en el ADN

El ensayo de Electroforesis Unicelular (EU) es una técnica sensible para detectar la presencia de rompimientos en cadenas simples en el ADN y daño en sitios alcalino-lábiles en células individuales. Esta técnica es usada para calcular y comparar el nivel de daño en el ADN en células de mamíferos.

El ensayo se basa en dejar libre el ADN de las células mediante una solución de lisis precipitando citoplasma y proteínas nucleares. Así, se someten los núcleos a un campo electroforético, obteniéndose una imagen semejante a la de un cometa en la cual el centro es el núcleo y el ADN fragmentado es la cola cuya longitud es un reflejo del grado de daño.

La metodología que se utilizó para detectar daño en el ADN fue propuesta por Singh y col. (1988) modificada por Tice y col. en (1990), adecuada a la línea celular hepática con la que se trabajó.

Se sembraron 300 000 células por caja en cajas Petri de plástico (3 cm de diámetro). A las 24 h se lavaron con PBS y se expusieron a las diferentes concentraciones de $HgCl_2$ en DMEM sin suero. Al término del tiempo de exposición correspondiente a cada tratamiento, las células se lavaron con PBS y con un gendarme de goma se levantaron del sustrato, se resuspendieron en un determinado volumen de PBS y se fraccionaron para obtener muestras de 10 000 células por cada 10 μ l. Se manejó una caja control del número de células como referencia, a la cual se le agregó tripsina y se contó el número de células en el equipo Culter Counter.

Se preparó agarosa de bajo punto de fusión y agarosa regular al 0.5 y al 0.75 % respectivamente en PBS libre de calcio y magnesio, las cuales se calentaron hasta disolución. Se utilizaron portaobjetos esmerilados para colocar las muestras. A cada portaobjeto se le agregó 110 μ l de agarosa regular y se colocó un cubreobjeto a cada uno. Una vez seca esta capa de agarosa se retiró el cubreobjeto y se adicionaron 85 μ l de muestra mezclada con agarosa de bajo punto de fusión (por cada 10 μ l de muestra se adicionaron 75 μ l de agarosa). Se dejaron solidificar en bloques de hielo colocando de nuevo un cubreobjeto en cada preparación durante 5 min., pasado este tiempo se retiró el cubreobjeto y se agregó otra capa a cada

muestra de 75 μ l de agarosa de bajo punto de fusión y se dejaron solidificar bajo las mismas condiciones. Posteriormente se retiró el cubreobjeto de cada portaobjeto y las muestras se colocaron en un vaso Koplín el cual contenía una solución de lisis (2.5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris y sarcosinato de sodio al 1%, a pH = 10.0, con Triton X-100 al 1 % y DMSO concentrado al 10 %), la cual se dejó estabilizar a 4°C durante 1 h antes de introducir las muestras. Las preparaciones se mantuvieron en estas condiciones por al menos una hora. Las muestras se retiraron de la solución de lisis y se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal durante 20 min, la cual se llenó cubriendo las preparaciones con una solución buffer de electroforesis (45 ml de NaOH 10N con 7.5 ml de EDTA 200 mM a pH= 10, a un volumen total de 1.5 l). Las condiciones para la corrida de las muestras fueron 25 V y 244 mA durante 30 min. Pasado este tiempo se retiraron las preparaciones de la cámara de electroforesis y cada una se cubrió con 1 ml de un buffer de neutralización (Tris 0.4 M a pH = 7.5) dejando reposar 5 min. Esta operación se repitió dos veces más.

Posteriormente las preparaciones se colocaron en una cámara de tinción protegida de la luz y a cada una se le agregó 50 μ l de bromuro de etidio (2 mg / ml en agua desionizada). Finalmente las preparaciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia acoplado al sistema OPTOMAX-V en donde se analizaron las imágenes de tres muestras por triplicado para cada tratamiento y de cada una se seleccionaron al azar 25 núcleos de un mismo campo. Utilizando el equipo, se midió la longitud de la migración del ADN como indicador de daño utilizando el programa VIDS V.

4.9 Determinación de la Recuperación del Daño en el ADN

Con el fin de determinar la recuperación del ADN dañado se utilizaron dos protocolos, el primero basado en la remoción del Hg por agentes quelantes y el segundo en la adición de GSH, hepatoprotector que controla el estado redox celular.

Las células WRL-68 se lavaron con diferentes agentes quelantes como DMSA y el EGTA con el fin de despegar el Hg. Se siguieron las mismas condiciones de tratamiento que en los casos anteriores y se llevó a cabo el mismo ensayo de EU.

DMSA

Una vez terminado el tiempo de tratamiento con HgCl_2 , las células se lavaron dos veces con DMSA (5.0 μM) en medio de cultivo sin suero y se dejaron incubando a 37 °C durante 5 min. Pasado este tiempo se lavaron con PBS y se dejaron incubando durante 30 min más con DMEM completo. Posteriormente las células se despegaron del sustrato con un gendarme de goma y se realizó el ensayo de EU bajo las mismas condiciones utilizadas anteriormente.

Para evaluar si el DMSA alteraba la viabilidad celular, se sembraron 250 000 células en cada caja Petri de plástico de 3 cm de diámetro, a las 24 h cada caja se expuso a diferentes condiciones durante 3 h. Unas células estuvieron con DMEM sin suero y después se lavaron dos veces con DMSA sin incubarse, otras células se trataron con DMEM sin suero y se lavaron sólo con PBS, otras células estuvieron expuestas a HgCl_2 5.0 μM en DMEM sin suero y se lavaron con PBS y otras también se trataron con estas últimas condiciones pero se lavaron con DMSA dos veces dejándolas incubar 5 min cada vez. Posteriormente todas las células se dejaron en DMEM completo durante 72 h. Después de este tiempo se levantaron del sustrato con tripsina-verseno al 0.025% y se contó el número de células en cada caja utilizando el equipo contador de células Coulter Counter.

ANALISIS DE CONDICIONES

Para establecer las condiciones más adecuadas para la recuperación del daño en el ADN, se sembraron en cajas Petri de plástico de 3 cm de diámetro 300 000 células en cada caja. A las 24 h cada una se expuso a diferentes condiciones.

Se manejó una caja control dejando a las células en DMEM sin suero durante 3 h, después se lavaron con PBS y se dejaron en medio de cultivo completo durante 30 min. Otras células estuvieron expuestas a un tratamiento agudo de HgCl₂ 5.0 µM en DMEM sin suero, se lavaron con PBS y de éstas algunas estuvieron en DMEM completo durante 30 min y otras en DMEM completo con Hg por el mismo tiempo. Otras células se expusieron al mismo tratamiento con HgCl₂, unas se lavaron dos veces con DMSA sin incubarse y otras con PBS-EGTA (50 µM), después se dejaron en DMEM completo durante 30 min. Otras células se expusieron a un tratamiento crónico, unas se lavaron con PBS y otras con DMSA sin incubarse y posteriormente se dejaron en DMEM completo durante 30 min. Finalmente se realizó el ensayo de EU anteriormente descrito.

PBS-EGTA

Una vez terminado el tiempo de exposición a HgCl₂ correspondiente a cada tratamiento, las células se lavaron dos veces con PBS-EGTA (50 µM) sin incubarlas, posteriormente se dejaron en recuperación incubándolas con DMEM completo por intervalos de tiempo de 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 22 h y 24 h. Al término de cada tiempo, las células se levantaron del sustrato con un gendarme de goma tomando una alícuota correspondiente a 10 000 células / 10 µl de muestra, así, cada una se mantuvo a 4 °C hasta obtener la última muestra para realizar el ensayo de EU bajo las mismas condiciones previamente descritas.

GSH

Para ver si disminuía el tiempo de recuperación del ADN, las células WRL-68 fueron tratadas con un agente antioxidante (GSH).

Se sembraron 300 000 células por caja en cajas Petri de 3 cm de diámetro, a las 24 h se lavaron con PBS y se expusieron a HgCl_2 5 μM en DMEM sin suero. Al terminar el tiempo de exposición al metal, las células se lavaron dos veces con PBS-EGTA (50 μM) sin incubarlas, posteriormente se dejaron incubando a 37 °C con GSH 5 mM a pH= 7.2 en DMEM completo durante intervalos de tiempo de recuperación de 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h y 22 h. Al terminar el tiempo de recuperación correspondiente a cada muestra se siguieron las mismas condiciones anteriormente descritas y se realizó el mismo ensayo de EU.

4.10 Tratamiento Estadístico de Datos

Los experimentos fueron realizados utilizando cultivos celulares independientes por lo menos por duplicado y en algunos casos por triplicado manejando datos independientes. Los datos fueron analizados por un Análisis de Varianza (ANOVA), seguidos de una prueba de tukey. El valor de $p \leq 0.05$ se tomó como nivel de significancia. Además, se utilizó la prueba estadística de U-Mann-Whitney para analizar la proporción de células dañadas a nivel de ADN.

5. RESULTADOS

5.1 Viabilidad Celular

Las células WRL-68 fueron expuestas a diferentes concentraciones de HgCl_2 durante 3 h mostrando que la pérdida de capacidad de las células para excluir el azul de tripano depende de la concentración del metal (Tabla 1)

Tabla 1
Viabilidad de las células WRL-68 tratadas con Hg

HgCl ₂ μM	% de viabilidad	\pm D.E.	p
Control	100	-	-
0.05	100	-	-
0.1	100	-	-
0.5	100	-	-
1.0	100	-	-
5.0	100	-	-
10	100	-	-
50	95.55	7.68	0.423
100	57.29	5.84	*0.004
500	38.78	3.39	*0.001
1000	0	-	-

* Estadísticamente diferentes con respecto al control con una $p \leq 0.05$

Como se muestra en la figura 1 el porcentaje de viabilidad celular en presencia del Hg empieza a disminuir a partir de 50 μM y con 1000 μM el 100% de las células mueren.

Los resultados indican que las células presentan 100% de viabilidad al tratarse con 0.5 y 5.0 μM de HgCl_2 , por lo que estas concentraciones fueron elegidas como condiciones de tratamiento.

Las células WRL-68 expuestas a dichas concentraciones no mostraron ningún cambio en cuanto a su morfología cuando fueron observadas por microscopía óptica (figura 2).

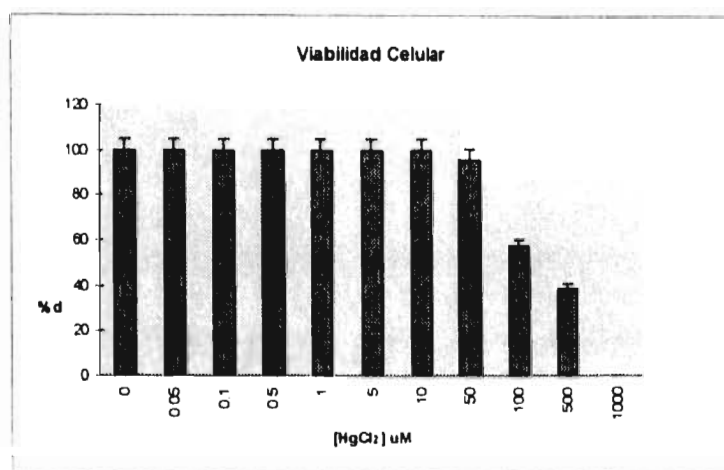


Figura 1. Efecto de la concentración de Hg en la viabilidad celular.

Las células fueron expuestas a HgCl₂ durante 3 h. La viabilidad celular se determinó con el colorante de exclusión azul de tripano. Los datos graficados son representativos de dos repeticiones por triplicado (n=6).

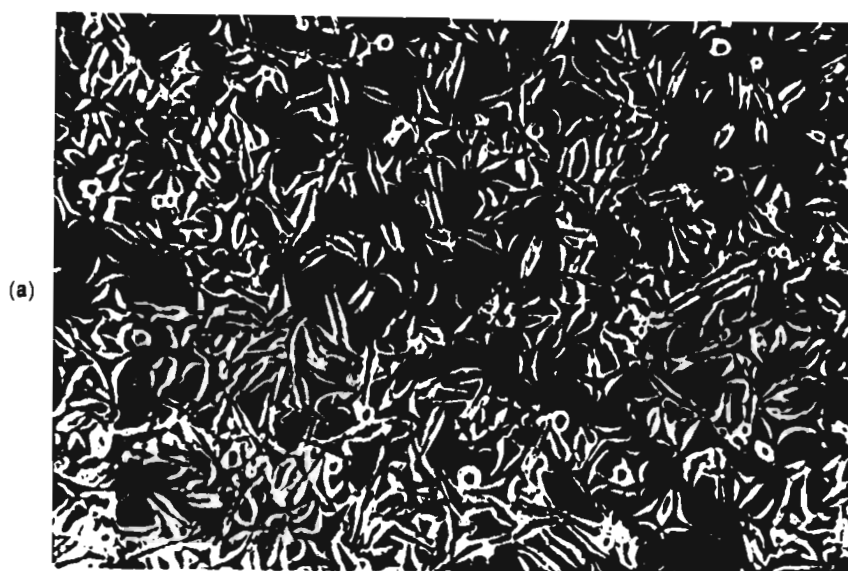
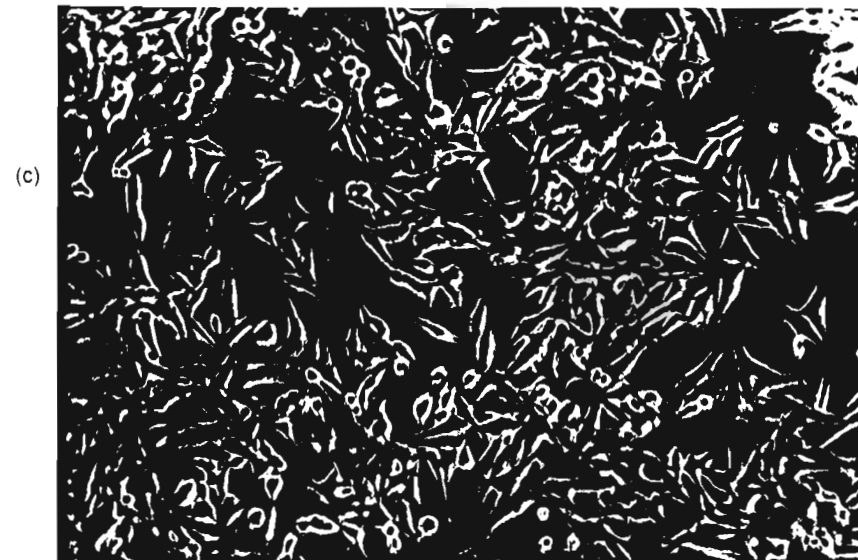
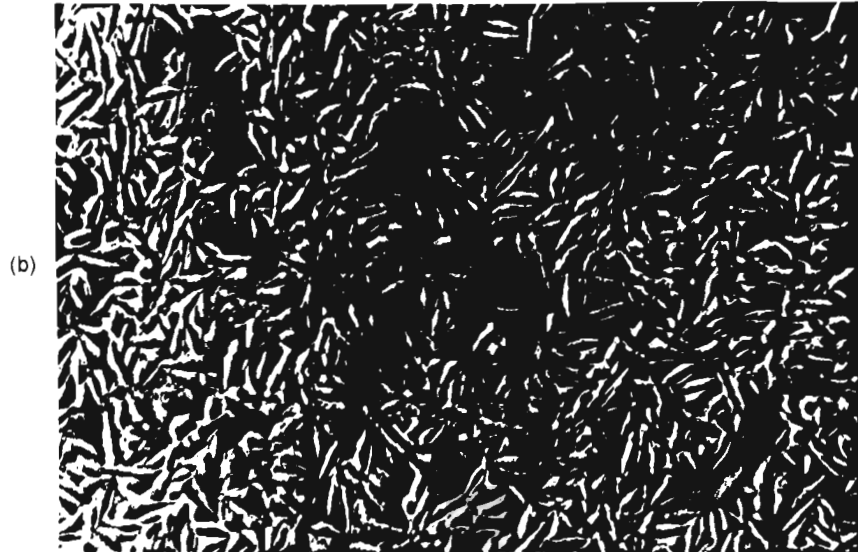


Figura 2. Microscopía óptica de las células WRL-68 expuestas a un tratamiento agudo con HgCl_2 . Células control (a) (100X), células tratadas con $0.5 \mu\text{M}$ (b) (100X) y células tratadas con $5.0 \mu\text{M}$ (c) (100X).



5.2 Prueba de Citotoxicidad

Se determinó la citotoxicidad producida por el Hg en las células WRL-68, al incorporarse el RN dentro de las células viables.

Las células fueron expuestas a HgCl_2 0.5, 5.0 y 500 μM durante 3 h, los resultados indican que el porcentaje de células funcionales con respecto al control disminuye conforme aumenta la concentración de Hg. En el caso de las células tratadas con 0.5 μM de HgCl_2 , aunque la diferencia es apreciable no es significativa (Tabla 2).

Tabla 2

Citotoxicidad inducida por el Hg en las células WRL-68

HgCl_2 μM	% Abs	\pm D.E.	p
Control	100	0.04	-
0.5	98.42	0.04	0.087
5.0	74.28	0.03	*0.015
500	19.05	0.07	*0.002

* Estadísticamente diferentes con respecto al control con una $p \leq 0.05$.

La figura 3 muestra el porcentaje de cambio de absorbancia del RN extraído de las células control con respecto a las células tratadas con Hg.

A pesar de que las células no presentaron alteraciones morfológicas al estar expuestas al Hg, al observarse por microscopía óptica (figura 4) las células tratadas con 5.0 μM presentaron menor capacidad de acumular el RN en los lisosomas lo que indica un daño debido a la presencia del metal.

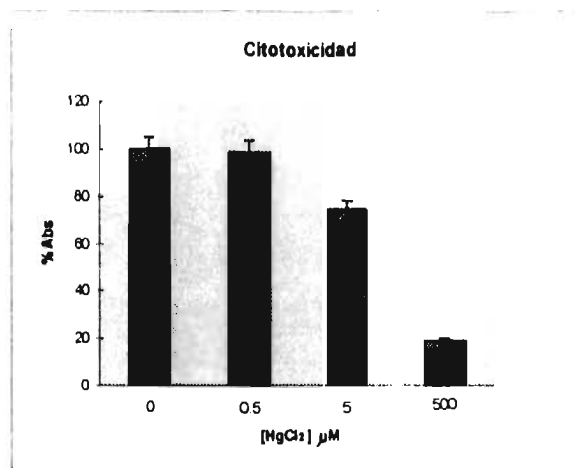


Figura 3. Citotoxicidad producida por el HgCl₂ en la línea celular WRL-68. Las células estuvieron en presencia del metal durante 3 h. La funcionalidad celular se determinó por el porcentaje del cambio de Abs del RN. Los valores graficados son el promedio de 2 repeticiones por triplicado (n=6).

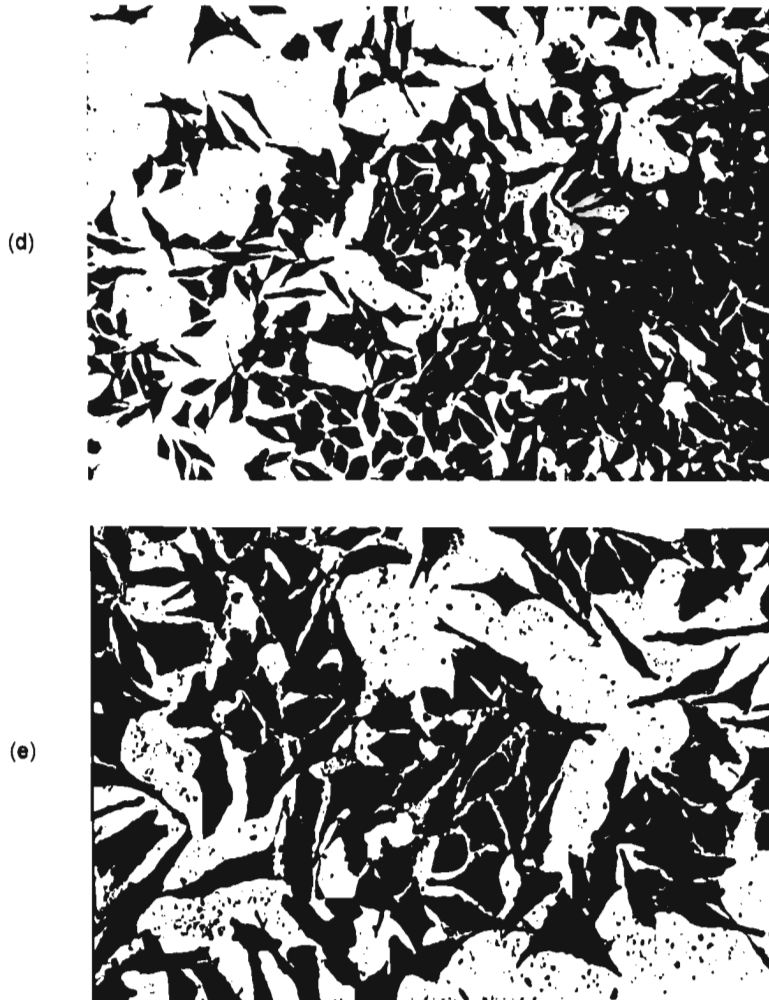


Figura 4. Microscopía óptica de la captación de RN de las células WRL-68 expuestas a un tratamiento agudo con HgCl₂. Células control (d) (100x) y células tratadas con 5.0 μM de HgCl₂ (e) (200x).

5.3 Adhesión Celular

Para evaluar la capacidad de adhesión y proliferación de las células WRL-68 en presencia de Hg durante un periodo de 7 días, las células fueron tratadas con HgCl_2 0.5 μM .

Los resultados muestran el número de células adheridas al sustrato en presencia de Hg a las 4 h de haberse sembrado al sexto día y al término del tratamiento crónico. Se observó que la capacidad de crecimiento de las células tratadas con el HgCl_2 , se incrementó con respecto a las células control (Tabla 3).

Tabla 3

Capacidad de adhesión de las células WRL-68 expuestas a un tratamiento crónico con HgCl_2

Condiciones	Tiempo (días)	Núm de cél. x 10^3	\pm D.E.	p
Control	6	12.85	0.29	-
Control	7	17.94	0.31	-
HgCl_2	6	15.48	1.75	*0.026
HgCl_2	7	19.283	0.79	0.262

* Estadísticamente diferentes con respecto al control con una $p \leq 0.05$.

Los valores indican que el número de células tratadas con HgCl_2 adheridas al sustrato después de 7 días es muy similar al control. Estadísticamente no hay una diferencia significativa ($p \geq 0.05$).

Al observarse las células expuestas al Hg durante 7 días por microscopía óptica no se aprecian diferencias en su morfología (figura 5).



Figura 5. Microscopia óptica de las células WRL-68 expuestas a un tratamiento crónico con HgCl₂ (f) (200x).

En el caso de las células expuestas a 0.5 y 5.0 μM de HgCl_2 durante 3 h, el número de células adheridas al sustrato no es significativamente diferente con respecto al control ($p \geq 0.05$) (Tabla 4).

Tabla 4
Capacidad de adhesión de las células WRL-68 expuestas a un tratamiento agudo con HgCl_2

Tratamiento	Núm de cél. $\times 10^3$	\pm D. E.	p
Control	363.28	0.70	-
0.5 μM	377.60	3.62	0.74
5.0 μM	369.14	2.01	0.96

Los datos de adhesión celular indican que al sembrar igual número de células en todos los tratamientos, se tendrá el mismo número de células en todas las condiciones experimentales. Los valores representan el promedio de dos repeticiones por duplicado ($n=4$).

Tomando en cuenta la viabilidad celular y la capacidad de adhesión al sustrato de las células WRL-68 en presencia de Hg, se eligieron 2 tratamientos, uno agudo (0.5 y 5.0 μM de HgCl_2 durante 3h) y uno crónico (0.5 μM de HgCl_2 durante 7 días).

5.4 Grado de Lipoperoxidación

Con el fin de determinar el grado de LP inducido por el Hg como una medida de daño celular, las células WRL-68 se mantuvieron a las diferentes condiciones de tratamiento antes mencionadas. El grado de LP se determinó por la producción de MDA en presencia de ácido tiobarbitúrico.

Como se muestra en la Tabla 5 las células expuestas a un tratamiento agudo de 0.5 μM muestran un incremento significativo en el grado de LP con respecto al control (183%), al igual que los valores de LP de las células expuestas a un tratamiento agudo de 5.0 μM (248%) y a un tratamiento crónico de 0.5 μM (332%). Los valores obtenidos se expresan en nanomoles de MDA / mg de proteína.

Tabla 5

Efecto del Hg en el grado de LP medido por la producción de MDA

Tratamiento	nmols MDA / mg proteína	\pm D.E.	p
Control	30.52	2.34	-
Agudo 0.5 μM	86.38	4.01	*0.002
Agudo 5.0 μM	106.29	5.55	*0.001
Crónico	131.87	4.74	*0.001

* Estadísticamente diferentes con respecto al control con una $p \leq 0.05$.

Los datos indican que el daño lipoperoxidativo va a depender tanto de la concentración del metal como del tiempo de exposición y el mayor daño se produce en el tratamiento crónico (figura 6).

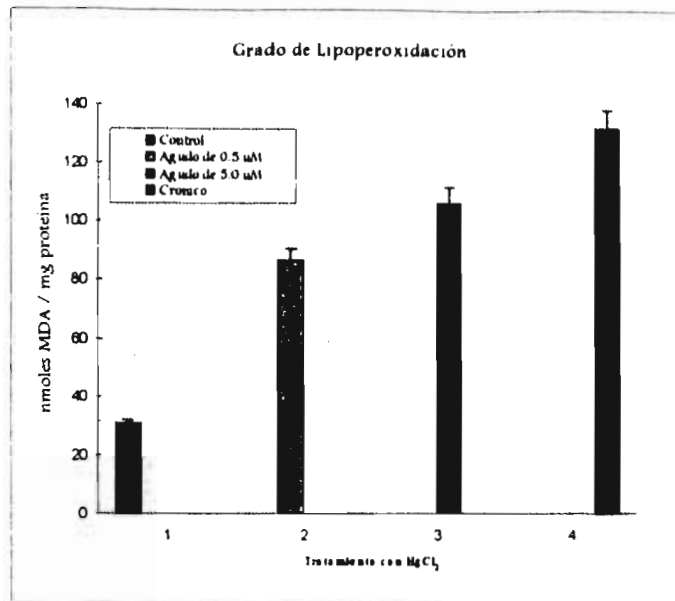


Figura 6. Grado de LP de las células WRL-68 en presencia de Hg.

Las células fueron expuestas a un tratamiento agudo y a un crónico con HgCl₂. La formación de radicales libres como medida de daño se determinó por la producción de MDA en presencia del ácido tiobarbitúrico. Los valores son representativos con una n=5 y con una diferencia significativa de $p \leq 0.05$ con respecto al control.

5.5 Evaluación del Daño en el ADN

PROPORCION DE CELULAS CON DAÑO Y SIN DAÑO

Para conocer la proporción de células dañadas, se analizaron tres muestras por triplicado para cada tratamiento. De cada portaobjeto se midieron al azar 25 núcleos, de los cuales se hizo una relación de cuántos presentaban daño (migración) y cuántos no (núcleo compacto) (Tabla 6). Los valores son representativos de tres repeticiones por triplicado (n=9).

Tabla 6

Proporción de células dañadas por Hg midiendo la long de la migración del ADN como indicador de daño

Tratamiento	núcleos dañados	núcleos sin daño
Control	3	22
Agudo (0.5 μM)	6	19
Agudo (5.0 μM)	8	17
Crónico	9	16

Los resultados indican que el número de células con daño es proporcional a la concentración de Hg y al tiempo de exposición. Siguiendo el método estadístico de U-Mann-Whitney, se calculó la proporción de células con daño mostrando una diferencia significativa en todos los casos con respecto al control con una $p < 0.01$.

NUCLEOS

Se midió la longitud en μm de los núcleos sin daño en el ADN correspondientes a las células control y a las células expuestas a un tratamiento agudo de 5.0 μM y a un crónico con HgCl_2 (Tabla 7). En el caso de las células control se observaron núcleos compactos. Los núcleos sin daño de las células expuestas a Hg bajo las diferentes dosis y tiempos de exposición se observaron con cierto halo

alrededor. Sin embargo, al medir la longitud de los núcleos se encontró que los valores no son significativamente diferentes con respecto al control ($p \geq 0.05$).

Tabla 7

Tamaño de núcleos sin daño

Tratamiento	long. μm	\pm D.E.
Control	14.17	2.34
Agudo	15.02	2.37
Crónico	14.231	3.15

DAÑO A NIVEL DE ADN

Se determinó el daño a nivel de ADN en la línea celular WRL-68 en presencia de Hg siguiendo el ensayo de EU bajo las diferentes condiciones experimentales. El daño en el ADN inducido por el Hg se midió por la longitud de la migración del ADN expresado en μm (figura 7).

En las células expuestas a los diferentes tratamientos con HgCl_2 se encontró un aumento significativo de la longitud de la migración del ADN con respecto al control (Tabla 8). En las células expuestas a $0.5 \mu\text{M}$ durante 3 h el incremento es del 36%, en las células tratadas con $5.0 \mu\text{M}$ por 3 h es del 119% y en las células expuestas a $0.5 \mu\text{M}$ durante 7 días es del 134%. Los valores son representativos de tres experimentos, cada uno con tres observaciones.

Tabla 8

Daño inducido por Hg en el ADN de las células WRL-68 medido por la longitud de su migración

Tratamiento	% de núcleos con daño	long. μm	p
Control	12	31.73 \pm 1.55	-
Agudo (0.5 μM)	20	43.42 \pm 2.13	*0.01
Agudo (5.0 μM)	32	69.58 \pm 1.71	*0.001
Crónico	36	74.38 \pm 0.73	*0.001

* Estadísticamente diferentes con respecto al control con una $p \leq 0.05$.

Al observarse en el microscopio, los núcleos de las células control se aprecian compactos y en los casos en donde hubo migración del ADN ésta presenta una forma de cometa específica (forma de botella). En contraste, la mayoría de los núcleos de las células tratadas con Hg no se observan compactos por la migración del ADN cuya longitud y forma del cometa es diferente con respecto al control (figura 8).

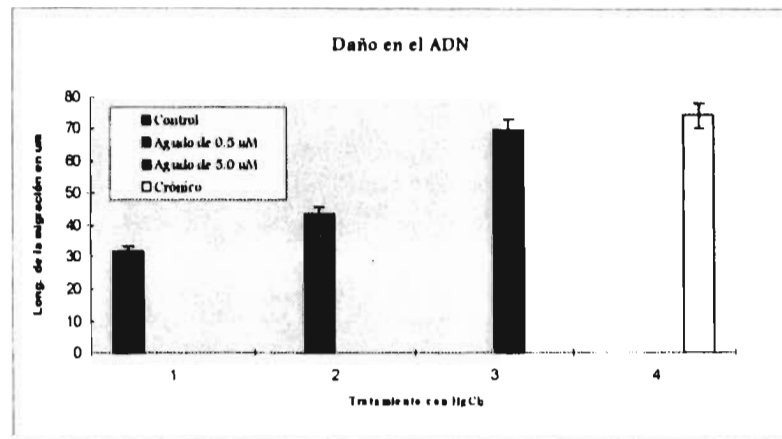


Figura 7. Daño en el ADN de las células WRL-68 en presencia de Hg.
Las células estuvieron expuestas a HgCl₂ 0.5 μM y 5.0 μM durante 3 h, y 0.5 μM durante 7 días. El daño se determinó por la longitud de la migración del ADN celular en μm. Los valores graficados son el promedio de 3 repeticiones independientes por triplicado (n=9) con una diferencia significativa de $p \leq 0.05$ con respecto al control.

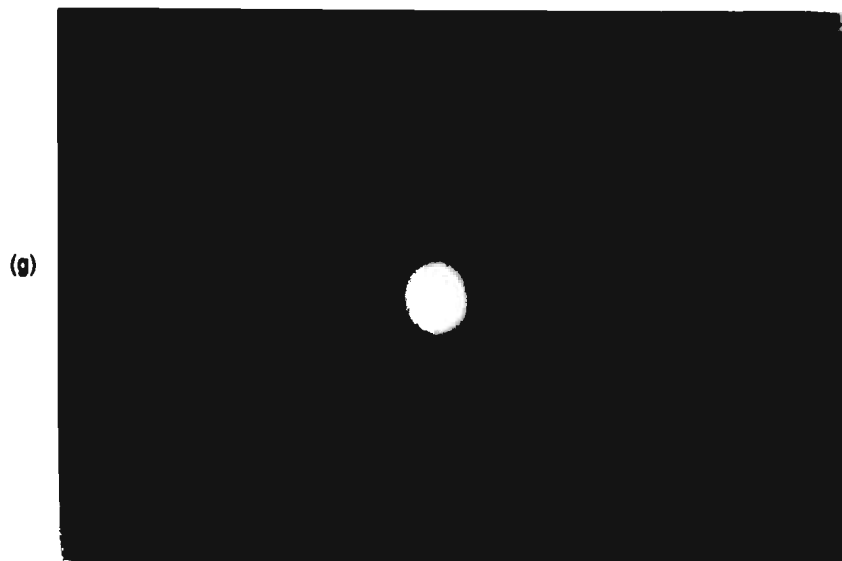
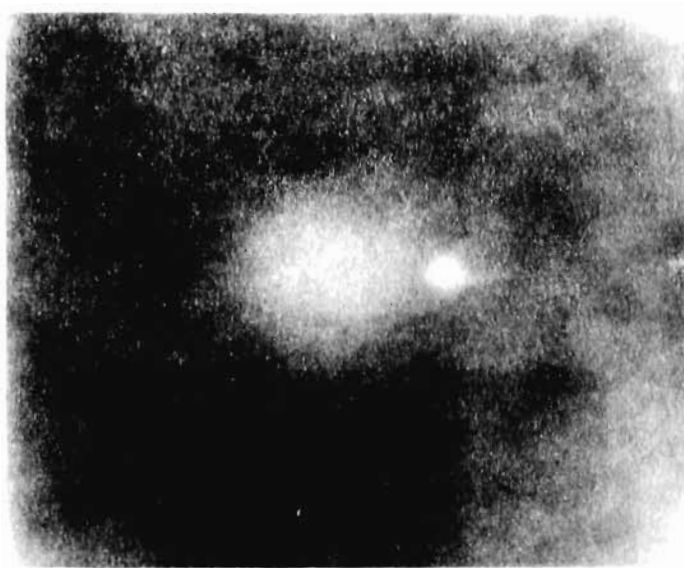


Figura 8. Microscopia de epifluorescencia de los núcleos de las células WRL-68 expuestas a un tratamiento agudo y crónico con HgCl_2 . Núcleos de células control (g), migración del ADN de: células control (h), células tratadas con $0.5 \mu\text{M}$ 3h (i), células tratadas con $5.0 \mu\text{M}$ 3h (j), células tratadas con $0.5 \mu\text{M}$ durante 7 días (k).

(h)



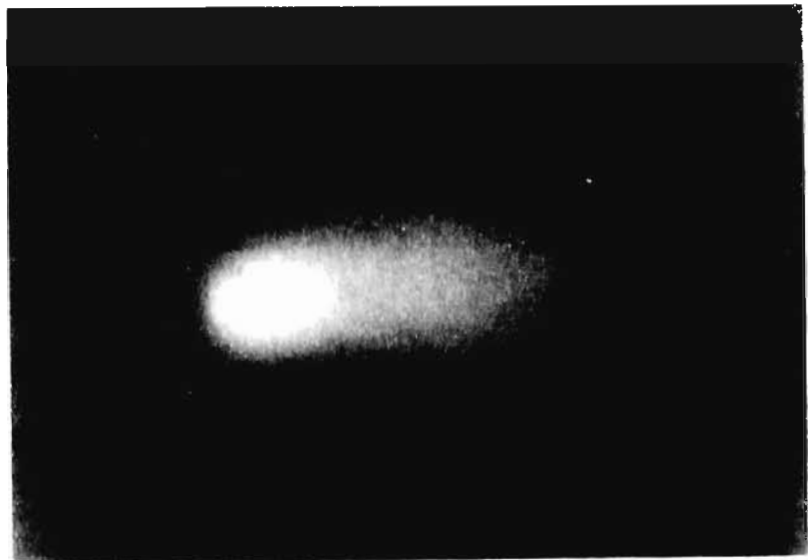
(i)



(i)



(k)



CORRELACION CONCENTRACION-EFECTO

La correlación concentración-efecto se muestra en la figura 9. El análisis estadístico de los datos indica una relación directa entre la dosis de Hg y el daño en el ADN de las células ($r=0.94$)

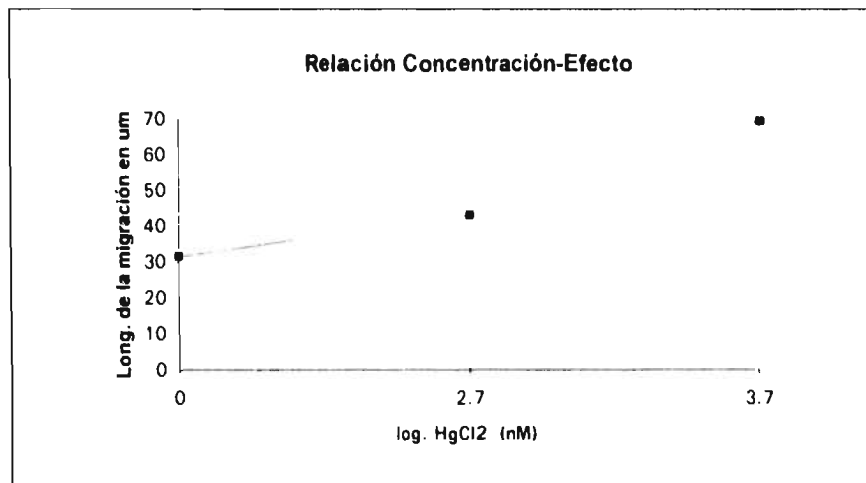


Figura 9. Correlación de la concentración de HgCl₂ con el daño en el ADN de las células WRL-68 medido por la longitud de la migración en μm .

5.6 Determinación de la Recuperación del Daño en el ADN

Con el fin de ver la recuperación del daño inducido en el ADN por la presencia de Hg en la línea celular WRL-68, se realizó el mismo ensayo de EU bajo las diferentes condiciones de tratamiento con HgCl₂ y se evaluó el efecto de algunos agentes quelantes.

Debido a que se ha reportado que el DMSA es el agente quelante de elección en las terapias de tratamiento para intoxicaciones con Hg, las células se trataron con dicho agente. Sin embargo, la longitud de la migración del ADN aumentó significativamente con respecto a las células que no fueron tratadas con DMSA como se muestra en la Tabla 9. Los valores son representativos de dos repeticiones por duplicado (n=4).

Tabla 9

Efecto del tratamiento con DMSA en las células expuestas a Hg

Tratamiento	% de núcleos dañados	long μm
Control DMSA	72	114.83 \pm 7.38
Agudo (0.5 μM)	36	82.62 \pm 6.54
Agudo (5.0 μM)	44	98.96 \pm 9.02
Crónico	56	88.57 \pm 4.19

Al observarse las muestras en el analizador de imágenes se encontró que las células tratadas con DMSA en todos los casos presentan una longitud de migración más larga y de mayor volumen en comparación con las células únicamente expuestas al Hg. Los datos indican que el DMSA incrementa por sí mismo el daño celular.

Para corroborar si el incremento en la longitud de la migración del ADN se debía al DMSA, se sembraron inicialmente 300 000 células que se expusieron a diferentes condiciones y se contó el número de células viables (Tabla 10).

Tabla 10
Efecto del DMSA en la viabilidad celular

Condiciones	Núm. de cél. viables x 10 ³
DMEM s/s + PBS	393.52
DMEM s/s + DMSA s/inc.	307.87
HgCl ₂ + PBS	407.85
HgCl ₂ + DMSA inc.	212.60

Los datos indican que el DMSA disminuye significativamente la viabilidad celular con respecto al control y a las células tratadas únicamente con Hg. Así mismo las células expuestas a Hg y posteriormente tratadas con DMSA muestran una disminución mayor del número de células viables.

Como el DMSA no revirtió el efecto, sino que por el contrario causó mayor daño, se analizaron otras condiciones. Las células VRL-68 se expusieron a HgCl₂ 5.0 μ M durante 3 h y otras a 0.5 μ M por 7 días, se trataron con diferentes condiciones con el fin de establecer la mejor para la recuperación del daño en el ADN.

Siguiendo el mismo ensayo de EU, se evaluó la longitud de la migración del ADN en μ m para todos los casos (Tabla 11)

Tabla 11

Condiciones de tratamiento para la recuperación del daño en el ADN

Condiciones	long. μm	\pm D.E.
Control	32.52	3.30
T. agudo + PBS + DMEM	84.32	5.97
T. agudo + PBS + DMEM con Hg	81.50	2.70
T. agudo + DMSA s/inc + DMEM	94.03	7.93
T. agudo + PBS-EGTA + DMEM	74.06	4.25
T. crónico + PBS + DMEM	75.44	1.82
T. crónico + DMSA s/inc. + DMEM	87.59	5.68

Los datos muestran que después de haber sido expuestas las células al Hg, el tratamiento con PBS-EGTA fue el más efectivo ya que no se incrementó significativamente el daño en el ADN, aunque no se observó reversión del efecto.

Por esta razón se eligió tratar a las células con PBS-EGTA después de su exposición al Hg estableciendo diferentes tiempos de recuperación. Así, las células WRL-68 se expusieron a las distintas condiciones de tratamiento establecidas en presencia de Hg y se evaluó el efecto del EGTA como agente quelante siguiendo el mismo ensayo de EU. La posible reversión del daño producido por Hg se midió tomando como indicador la disminución de la migración de la longitud del ADN en μm (Tabla 12).

Tabla 12

Efecto del tratamiento con EGTA en la recuperación del daño en el ADN

Tratamiento	tiempo min	long. μm	\pm D.E.	p
Agudo 0.5 μM	0	43.42	2.13	-
Agudo 0.5 μM	10	45.09	7.46	*0.03
Agudo 0.5 μM	30	46.58	4.70	*0.04
Agudo 5.0 μM	0	69.58	1.71	-
Agudo 5.0 μM	10	70.97	2.75	*0.02
Agudo 5.0 μM	30	77.29	1.00	*0.004
Crónico	0	74.38	0.73	-
Crónico	10	74.67	1.22	*0.003
Crónico	30	79.08	0.25	*0.001

* Estadísticamente diferente con respecto al control con una $p \leq 0.05$.

Los datos indican que a los tiempos probados no se hace evidente la recuperación del ADN. Para ver si el tiempo era el factor principal, se decidió aumentar el tiempo de recuperación del ADN. Las células se expusieron a HgCl_2 5.0 μM durante 3h, se trataron con PBS-EGTA y se dejaron en recuperación eligiendo diferentes tiempos incubándose a 37 °C con DMEM completo.

La recuperación del ADN se determinó siguiendo el mismo criterio que en el caso anterior. Se analizaron 25 núcleos por muestra y los valores son representativos de 2 repeticiones por triplicado ($n=6$) (Tabla 13).

Tabla 13

Efecto del tiempo en la recuperación del daño en el ADN

Tiempo	% de núcleos con daño	long. μm	\pm D.E.	p
0	32	69.58	1.71	-
10 min	56	73.12	7.42	*0.02
30 min	48	82.04	5.83	*0.003
1 h	52	88.59	2.79	*0.009
2 h	60	77.06	5.21	*0.006
4 h	68	80.35	1.62	*0.009
6 h	28	73.98	4.27	*0.005
8 h	4	-	-	-
22 h	8	-	-	-
24 h	0	-	-	-

* Estadísticamente diferente con respecto al control con una $p < 0.05$.

Los datos indican que conforme pasa el tiempo de recuperación aumenta el número de núcleos sin daño.

Como se muestra en la figura 10, en los primeros minutos y hasta la hora de tiempo de recuperación el daño en el ADN se incrementa y a partir de las 2 h estos valores empiezan a disminuir significativamente hasta no presentar migración desde las 8 h observándose núcleos compactos indicando una total recuperación (figura 11).

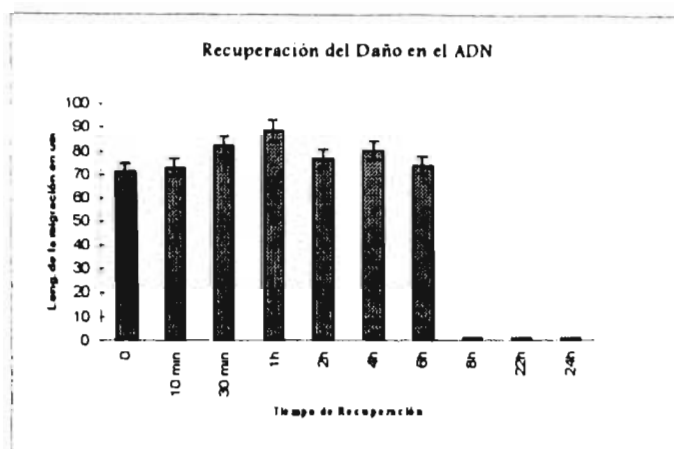


Figura 10. Efecto del tiempo en la recuperación del ADN.

Las células estuvieron expuestas a HgCl_2 $5.0 \mu\text{M}$ durante 3 h y tratadas con EGTA. La recuperación del ADN se determinó por la presencia de núcleos compactos ($0 \mu\text{m}$) por el ensayo de EU. Los datos graficados son representativos de $n=4$ con una diferencia significativa de $p \leq 0.05$.

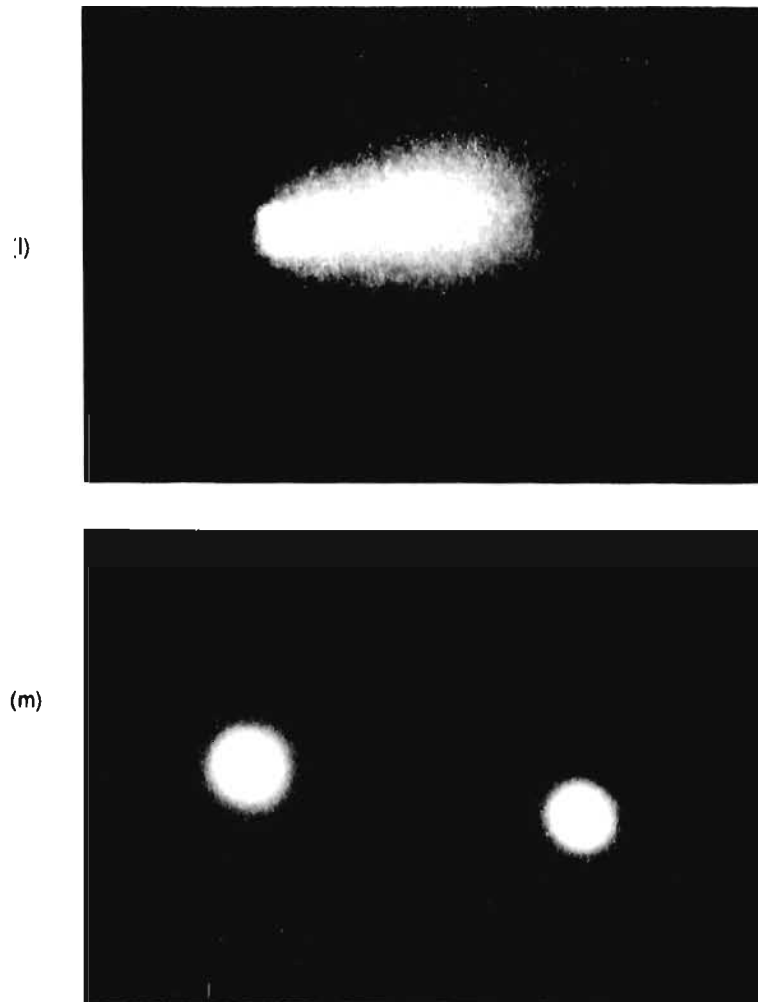


Figura 11. Microscopía de epifluorescencia de los núcleos de las células WRL-68 expuestas a 5.0 μM de HgCl_2 tratadas con EGTA. Migración del ADN a las 6h de recuperación (l), núcleo de las células a 8h de recuperación (m)

Debido a que se ha reportado que el GSH es un agente importante en la desintoxicación de agentes xenobióticos y oxidantes (W. Dekant y col. 1993), las células WRL-68 fueron tratadas con GSH para corroborar si con un agente antioxidante disminuía el tiempo de recuperación del ADN.

Las células se expusieron a HgCl_2 5.0 μM durante 3 h, se lavaron con PBS-EGTA y se incubaron a 37°C con GSH en medio de cultivo completo por intervalos de tiempo. Siguiendo el mismo criterio que en el caso anterior, se midió la recuperación del ADN por el ensayo de EU (Tabla 14).

Tabla 14
Efecto del GSH en la recuperación del daño inducido por Hg en el ADN

Tiempo	% de núcleos con daño	long. μm	\pm D.E.	p
0	8	31.57	1.36	-
1 h	64	87.02	4.32	*0.000
2 h	56	75.93	7.33	*0.001
4 h	48	71.52	2.05	*0.001
6 h	24	62.87	3.45	*0.002
8 h	16	-	-	-
22 h	-	-	-	-

* Estadísticamente diferente con respecto al control con una $p \leq 0.05$

Los datos muestran una disminución de la longitud de la migración del ADN dependiente del tiempo, observándose una recuperación total a partir de las 8 h. Aunque no es evidente la recuperación del ADN a tiempos más cortos al tratar a las células con GSH, la longitud de la migración es menor que en el caso de las células que sólo se dejaron en recuperación con medio de cultivo completo.

Los resultados son representativos de 2 repeticiones (n=2) con una diferencia significativa de $p \leq 0.05$

6. DISCUSION

Al revisar la literatura se encontró que son muy pocos los reportes de evidencias acerca del potencial genotóxico de los metales (Friberg y Nelson 1981; IARC 1987). Es por esto que evaluar el efecto de la exposición al Hg a nivel de ADN fue de gran interés dada su persistencia en el medio ambiente y los efectos adversos que puede representar para la salud humana.

El hígado es el órgano donde se acumulan algunos metales, entre ellos el Hg. En el presente trabajo se estudiaron los efectos producidos por el Hg en células hepáticas evaluando algunos parámetros considerados como medida de daño celular, así como la alteración a nivel de ADN.

Para determinar el daño producido por el Hg se utilizó una línea celular hepática de origen fetal humano (WRL-68) ya que es un modelo *in vitro* útil para evaluar directamente la toxicidad del metal a nivel celular (Gutiérrez y col. 1994).

Las concentraciones de Hg elegidas se determinaron tomando en cuenta que son cantidades que pueden llegar a presentarse a nivel sérico en individuos expuestos, es decir, que tienen relevancia fisiológica y considerando un 100% de viabilidad celular, así como la capacidad de las células de adherirse al sustrato al resembrarse como una medida de funcionalidad celular. Las células WRL-68 se expusieron a 0.5 y 5.0 μM de HgCl_2 , concentraciones que también han sido utilizadas en otros estudios de evaluación de daño por el metal (Bucio y col, 1995; Joao BT. y col., 1995).

Las células estuvieron expuestas a un tratamiento agudo y crónico con el fin de tener un parámetro de daño comparativo a la misma dosis (0.5 μM), pero a diferentes tiempo (3 h y 7 días) y por otra parte manteniendo constante el tiempo (3 h) y variando la dosis (0.5 y 5.0 μM).

El tratamiento agudo fue administrando para evaluar el daño que produce el tóxico sobre diferentes parámetros celulares. En el caso del tratamiento crónico se determinó además del efecto producido por el metal, la capacidad de respuesta de la célula ante una agresión.

Los diferentes tratamientos siempre se hicieron manteniendo a las células en confluencia y así evitar tenerlas en la fase de duplicación ya que en la fase S el ADN no es compacto y se obtienen resultados poco precisos, así al controlar la posición del ciclo celular los resultados obtenidos son consecuencia del tratamiento con Hg.

Por la técnica de exclusión de azul de tripano, se encontró que el porcentaje de células viables va disminuyendo conforme se incrementa la concentración de HgCl₂. A las concentraciones elegidas (0.5 y 5.0 µM), las células mostraron 100% de viabilidad.

La funcionalidad celular determinada por la prueba de RN resultó con una disminución de la capacidad lisosomal a medida que aumentaba la concentración del metal. Asimismo la exposición prolongada a HgCl₂ disminuyó considerablemente la funcionalidad del lisosoma para absorber el colorante, lo cual muestra que no sólo el aumento en la concentración del metal, sino también el periodo de exposición son importantes en el daño celular producido. Datos similares se han reportado en estudios con una línea celular de ovario de hamster As52 al exponerlas a un tratamiento agudo con Hg (Ariza y col., 1996).

La evaluación de la capacidad de proliferación de las células expuestas a un tratamiento crónico con HgCl₂, indica que durante los siete días de exposición al metal, la proliferación celular se incrementa significativamente con respecto al control, lo cual indica que el Hg tiene un efecto mitogénico sobre esta línea celular. Bucio y col. (1995) y Lu (1990), reportan que el Hg es capaz de estimular la proliferación.

La capacidad de adhesión no se ve alterada en ninguno de los tratamientos, asegurando que al sembrar un número constante de células se cuenta con la misma proporción celular en todos los tratamientos, manteniendo por tanto constante una densidad celular a la cual el cultivo no presenta duplicación.

A pesar de que por microscopía óptica no se observaron alteraciones en la morfología de las células a las concentraciones elegidas con respecto al control los resultados de los parámetros bioquímicos determinados indican que el Hg induce daño celular.

Estudios recientes han descrito que la producción de radicales libres, lipoperoxidación, es una consecuencia temprana y sensible de la exposición a metales (Bagchi y col. 1996). En el presente estudio se consideró el grado de lipoperoxidación como un parámetro de daño degenerativo a nivel celular causado por el Hg. Aun cuando las células presentaron 100% de viabilidad y no se observaron alteraciones en su morfología por microscopia óptica, se encontró un incremento significativo en el grado de lipoperoxidación en las células WRL-68 al estar expuestas a un tratamiento crónico y agudo con $HgCl_2$, indicando que el daño celular inducido por este metal depende tanto de su concentración como del tiempo de exposición, resultado que concuerda con lo reportado por Zaman K. y col. (1994).

Teniendo referencias bibliográficas como antecedente de que el Hg se distribuye principalmente en el núcleo y en las mitocondrias de células hepáticas (Gutiérrez y col., 1991), que se une al ADN *in vitro* (Sissoeff y col., 1976; Yamane y col., 1961; Nandi y col., 1965) e *in vivo* (Cantoni y col., 1984; Ariza y col., 1994), en este estudio se evaluó el daño producido a nivel del ADN en las células WRL-68 por una exposición aguda y crónica a $HgCl_2$ utilizando el ensayo de EU el cual actualmente es utilizado para medir daño en el ADN de diferentes células, por ser un método muy sensible para detectar rompimientos en células individuales (Tice, 1994; Betancourt y col 1995; Klaude y col, 1996; Leroy y col, 1996; Yamano T., 1996; Rojas E. y col., 1996).

Dado lo novedoso de esta técnica, se encontraron pocos estudios acerca de los efectos de agentes genotóxicos en células de hígado por el ensayo de EU (Monteith y Vanstone, 1995; Deventer, 1996; Storer y col., 1996) y prácticamente nula la información acerca del efecto del Hg, lo cual dificulta la discusión de los datos obtenidos en el presente trabajo, pero que son de gran relevancia dado que son uno de los primeros estudios que se realizan utilizando esta técnica.

Los resultados obtenidos en el tratamiento agudo indican que el daño en el ADN es dependiente de la concentración, es decir, se incrementa a medida que se aumenta la concentración. En el caso del tratamiento crónico se encontró que a medida que aumenta el tiempo de exposición, se incrementa el daño. Como se

muestra en los resultados hay una relación directa entre la concentración de Hg y el tiempo de exposición con el daño a nivel de ADN. Asimismo, la proporción de células dañadas aumenta con la concentración y el tiempo de exposición al metal.

Por microscopía de epifluorescencia, en los núcleos de las células control se pueden encontrar en algunos casos una pequeña migración del ADN con una forma característica, considerada como un daño basal de la célula. Fairbairn y col. (1995), reportan que esta migración característica se debe a las células en apoptosis. En el caso de las células tratadas con Hg, el daño a nivel de ADN observado se puede apreciar por la forma alargada del cometa debida a la migración del ADN. La longitud de la migración se incrementa dependiendo de la concentración y del tiempo de exposición.

El potencial genotóxico del Hg reportado en este estudio concuerda con algunos reportes donde se han estudiado el rompimiento de hebras simples del ADN y la citotoxicidad inducida por el $HgCl_2$ (Tsuzuki-K y col. 1994; Robinson y col. 1984; Cantoni y col. 1984; Wroblewski, y col., 1995)

Podemos concluir que tanto en una exposición aguda como en una crónica, el Hg es un agente genotóxico al producir daño a nivel del ADN, observándose el mayor daño en el ADN en las células expuestas a un tratamiento crónico. Sin embargo, es importante que se lleven a cabo otros estudios para determinar el tipo de daño a nivel de ADN que es inducido por este metal. Al respecto, se ha demostrado que el Hg tiene diversos efectos en las células y se ha reportado que dependiendo del sistema de prueba es mutagénico (Kazantis, 1981; Leonard y col., 1982; Gebhart, 1984; Hansen y col., 1984; Ariza y col., 1996).

Los resultados de todos los ensayos indican que la exposición crónica a Hg resulta más dañina a nivel celular que una exposición aguda.

Se ha reportado que el daño en el ADN puede inducirse de manera exógena por radiaciones o agentes químicos o bien de manera endógena por radicales libres (Collins y col, 1996). En este trabajo se correlacionó el grado de lipoperoxidación con el daño en el ADN en células hepáticas. Los resultados muestran que existe una relación directa entre los valores obtenidos del grado de lipoperoxidación y el daño en el ADN. Resultados semejantes se reportan en un estudio realizado en células de ovario de hamster tratadas con $HgCl_2$ donde se observa una relación directa entre la formación de radicales libres y la inducción de rompimientos en el ADN (Cantoni y col, 1984).

El daño en el ADN y la reparación son aspectos importantes en la evaluación genotóxica de contaminantes ambientales. Al revisar la literatura se encontró que se ha estudiado la recuperación del daño en el ADN de algunos agentes genotóxicos (Vogel y col, 1996), sin embargo, son muy pocos los estudios que se han realizado acerca de la reparación del daño producido en el ADN de células dañadas por metales, en el caso del Hg no se tienen referencias al respecto, por lo que en este estudio fue de gran interés evaluar la recuperación del daño en el ADN inducido por este metal en células hepáticas, utilizando el mismo ensayo de EU. Fairbairn y col. (1995), reportan en un estudio de la revisión de esta técnica la utilización de este ensayo con el mismo objetivo.

Los resultados obtenidos indican que la célula no tiene la capacidad de compensar el daño producido por el Hg mientras el metal se encuentra presente en el medio. En el caso del tratamiento crónico el daño en el ADN presenta un valor mayor que en el tratamiento agudo mostrando que la célula no se adapta ante la presencia del Hg.

Con el fin de evaluar la reparación del daño a nivel de ADN, se utilizó como primera opción tratar a las células con DMSA después de exponerlas al Hg, por ser el agente quelante de elección en las terapias de intoxicaciones con este metal (Aposhian y col. 1996) y de otros metales pesados (J. Xie, y col., 1996). Las células tratadas con DMSA muestran un incremento significativo en el daño en el ADN con respecto a las células no tratadas con este agente quelante. Esto puede explicarse

debido a que el DMSA como agente quelante no atrapa solamente el Hg presente sino también elementos esenciales para la célula como el Ca^{+2} y el Mg^{+2} al ser la interacción DMSA-metal de tipo electrostático. El valor de daño más alto se obtuvo en las células tratadas con DMSA y ausencia de Hg, esto se puede explicar ya que al no estar presente el metal, el DMSA atrapa mayor cantidad de metales esenciales con el consecuente daño celular. Lo anterior se comprobó al exponer a las células WRL-68 a distintas condiciones con DMSA y contar el número de células viables, los resultados indican que el DMSA disminuye significativamente la viabilidad celular.

Las otras condiciones analizadas con el fin de disminuir la cantidad de Hg presente en la célula resultaron mejores que en el caso del DMSA. Sin embargo, dado que es muy difícil remover el Hg a nivel celular, ya que los agentes utilizados no son específicos, los resultados obtenidos presentan valores de recuperación muy bajos dado que la remoción del metal no se puede realizar sino únicamente una disminución en la concentración que está afectando a la célula. A pesar de estas limitaciones se consideró el tratamiento con PBS-EGTA como la mejor opción. Los tiempos de recuperación resultaron mayores a los previstos ya que al no poder remover totalmente el metal a nivel celular, éste sigue presente continuando el proceso de daño. Sin embargo, a tiempos más prolongados es evidente la capacidad de recuperación de las células.

Los resultados muestran que la recuperación del daño inducido por el Hg en el ADN de células hepáticas, se lleva a cabo paulatinamente y se hace evidente por completo a partir de las 8 h de permanecer las células incubadas a 37°C con medio de cultivo completo.

Podemos concluir que el daño en el ADN de las células WRL-68 inducido por el Hg es reversible ante una exposición aguda y crónica y requiere para hacerse evidente la disminución del Hg presente en la célula, lo cual concuerda con lo observado por Snyder y col. (1989) y Robinson y col. (1984).

Asimismo, podemos decir que los procesos de reparación del ADN propios de la célula están presentes desde la agresión inicial con el metal ya que las células sobreviven y proliferan en presencia del Hg. Sin embargo, no se hizo evidente la

reparación del daño ya que al estar presente el Hg se siguió produciendo el daño que la célula tiene que seguir reparando, de manera que al remover en lo posible al metal, el equilibrio se desplaza hacia la reparación y así ésta se hace evidente después de un tiempo determinado.

Debido a que se ha reportado que el GSH es un agente hepatoprotector que mantiene estable el estado redox celular (James, S. y col. 1995) y que el GSH exógeno decrece la citotoxicidad del HgCl_2 (C. Burton y col., 1995), en este estudio se utilizó en la evaluación de la recuperación del daño en el ADN esperando que los tiempos de recuperación fueran menores. Sin embargo, aunque en los resultados se puede apreciar una tendencia a la disminución en el tiempo de recuperación, los valores no presentan diferencias.

Desde la larga historia nos hemos acostumbrado al mundo que nos rodea y a pesar de que el hombre está expuesto continuamente a una serie de contaminantes ambientales, el organismo tiene una gran capacidad de adaptación y dependiendo del tiempo de exposición y de la concentración de los agentes xenotóxicos, cuenta con una serie de mecanismos de reparación que permiten mantener la funcionalidad de los procesos celulares y evitan la alteración de la genética humana.

7. BIBLIOGRAFIA

- Amdur MO Doull J. Klaassen CD. **Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons.** Pergaman Press Fouth de. U.S. 1991. Chapters 3, 5, 6, 19.
- Ammitzboll T., Kobayasi T., Grundt Y., and Clausen J. (1978). **Toxicology of triethyllead, methylmercury and cadmium, determined in chick embryo brain cell cultures.** Arch Toxicol. Suppl. 1: 319-322.
- Antilla S. (1990). **Biological effects of occupational and environmental exposure to chromium.** In Metal Ions "Biology and Medicine". Coltery Ph., Poirier LA., Manfait M., Etienne (Eds). John Libbey Eurotext, Paris, pp 315-319.
- Aposhian MM., Maiorino RM., Xu Zhaofa., Aposhian HV. (1996). **Sodium 2,3-dimercapto-1-propanesulfonate (DMPS) treatment does not redistribute lead or mercury to the braien of rats.** Toxicology 109: 49-55.
- Apostolov K. United States patant 3935066, January 27, 1976.
- Arias, Bayer, Fausto, Jakoby, Schachter. **The Liver Biology and Pathobiology.** third edition. Reven Press 1994 pp 19-33.
- Ariza ME. and Williams MV. (1996). **Mutagenesis of AS52 Cells by Low Concentrations of Lead (II) and Mercury (II).** Environ and Molec Mutag., 27: 30-33.
- Ariza ME., Holliday J., Williams MV. (1994). **Mutagenic effect of mercury (II) in eukaryotic cells.** In Vivo, 8: 559-564.
- Ashour H., Abdel-Rahman M. and Khodair A. (1993). **The mechanism of methyl mercury toxicity in isolated rat hepatocytes.** Toxicol Letters, 69: 87-96.
- Bagchi D., Bagchi M., Hassoun EA. and Stohs SJ. (1996). **Cadmium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, glutathione depletion and hepatic lipid peroxidation in Sprague-Dawley Rats.** Biological Trace Element Research 52: 143-154.
- Bakir F., Al-khalidi A., Clarkson TW., Greenwood R. (1976). **Clinical observations on treatment of alkylmercury poisoning in hospital patients.** Bull World Health Organ, 53: 87-92.
- Beattie JH., Marion M., et al. (1990). **The cytotoxic effects of cadmium chloride and mercury chloride mistures in rat primary hepatocyte cultures.** Toxicology 62: 161-173.
- Beijer, K., and Jernelov, A. (1986). **Sources, transport and transformation of metals in the environment.** Handbook on the toxicology of metals (Friberg, L., Nordberg, G. F., and Vouk, V. B. eds). Vol. 1. General Aspects. Elsevier Scientific Publ. Amsterdam. pp 68-74.
- Betancourt M., Ortiz R., González C. et al. (1995). **Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis / comet assay.** Mutat. Res. 5701 xxxc: 1-13.

- Betti C., Barale., Pool-Zobel BL. (1993). **Comparative studies on cytotoxic and genotoxic effects of two organic mercury compounds in lymphocytes and gastric mucosa cells of Sprague-Dawley rats.** Environ Mol Mutag., 22(3): 172-180.
- Bressa G. and Cima L. (1984). **Il Mercurio (Hg). Y composti inorganici, terapia e prevenzione.** Scienza Governo pp 37-39.
- Bryan Ballantyne, Timothy Marrs, Paul Turner. **General and Applied Toxicology.** Edit. Stockton Press. Vol 2, 1993 pp 957-961.
- Bucio L., Souza V., Albores A., Sierra A., Chavez E., Carabez A., Gutiérrez-Ruiz MC. (1995). **Cadmium and mercury toxicity in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells).** Toxicology 102(3): 285-299.
- Buege JA. and Aust SD. (1978). **Microsomal lipid peroxidation.** In Methods of Enzymology. Eilscher S. and Packer L. (Eds). Academic Press, Vol. 53. New York. pp 102-310.
- Burton CA., Hatlelid K., Divine K., et al. (1995). **Glutathione Effects on Toxicity and uptake of mercuric chloride and sodium arsenite in rabbit renal cortical slices.** Environmental Health perspectives, 103(1): 81-84.
- Cantoni O., Christie NT., Robison SH., Costa M. (1984). **Characterization of DNA lesions produced by HgCl₂ in cell culture systems.** Chem Biol Interact, 49: 209-224.
- Clarkson TW. (1972). **The pharmacology of mercury compounds.** Ann Rev Pharmacology, 12: 375-406.
- Clarkson TW., Friberg L., Hursh JB., Nylander M. (1988). **The prediction of intake of mercury vapor from amalgams.** In Clarkson TW, Friberg L., Nordberg GF., Sager PR (Eds): "Biological Monitoring of Toxic Metals". New York: Plenum pp 247-260.
- Collins AR., Dusinská M., Gedik CM., et al. (1996). **Oxidative Damage to DNA: Do We Have a Reliable Biomarker?** Environmental Health Perspectives, 104 (3).
- Cragle DL., Hollins DR., Qualters JF., et al. (1984). **A mortality study of men exposed to elemental mercury.** J. Occup. med., 26: 817-821.
- Curtis HA., Ferguson SD., Kell RL., Samuel AH. (1987). **Mercury as a health hazard.** Arch Dis Child., 62: 293-295.
- Chang, L., and Verity, M. A., (1995). **Mercury Neurotoxicity: Effects and Mechanisms.** Handbook of neurotoxicology (L. W. Chang and R. S. Dyer, eds.), pp 31-59. Dekker, New York.
- Charles A. Tyson and John M. Frazier. **In Vitro Toxicity Indicators. Methods in Toxicology.** Vol 1 part B 1994. Academic Press INC.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Cheung, M. K., and Verity, M. A. (1985). **Experimental methyl mercury neurotoxicity: Locus of mercurial inhibition of protein synthesis *in vivo* and *in vitro*.** J. Neurochem. 44,1799-1803.
- Chin B., Lesowitz GS., Bernstein IA. (1978). **A Cellular Model for Studying accommodation to Environmental Stresses: Protection and Potentiation by Cadmium and other metals.** Environ Res, 16: 432-442
- Choi, Bit and Kim RC. (1984). **The comparative effects of methylmercuric chloride and mercuric chloride upon DNA synthesis in mouse fetal astrocytes *in vitro*.** Exp. Mol. Pathol. 41: 371-376.
- Christie NT. and Costa M. (1983). ***In Vitro* assessment of the toxicity of metal compounds. Effects of metals on DNA structure and function in intact cells.** Biol. Trace Elem Res. 5(1): 55-71.
- Darnell, Lodish, Baltimore. **Molecular Cell Biology.** Second Edition. Scientific American Books 1990 pp 473-476.
- De Flora S., Bennicelli C., Bagnasco M. (1994). **Genotoxicity of mercury compounds.** Mutation Research, 317(1): 57-79.
- Denizeau F., Marion M., et al. (1990). **Toxicity of heavy metals in cultured hepatocytes.** Environ Toxicol. Chem 9(6): 737-793.
- Department of Health and Human Services US. **Toxicology and Carcinogenesis studies of Mercury Chloride.** (CAS no. 7487-94-7) in F344 Rats and B6C3F Mice, NIH publ No. 93-3139. National Institute of Health, National Toxicology Program Research Triangle Park, NC (1993).
- Deventer K. (1996). **Detection of Genotoxic Effects on Cells of Liver and Gills of *B. rerio* by Means of Single Cell Gel Electrophoresis.** Bull Environ. Contam. Toxicol, 56: 911-918.
- Dogle A., JB. Griffiths and DG. Newell. **Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures.** ECACC Centre for Applied Microbiology and Research Porton Down Salisbury U.K. Wiley 1990 pp 4B: 7.1.
- Domingo JL. (1994). **Metal-Induced Developmental Toxicity in Mammals: A review.** Journal of Toxicology and Environmental Health, 42: 123-141.
- Ellingsen DG., Andersen A., Nordhagen HP., et al. (1965). **Incidence of cancer and mortality among workers exposed to mercury vapour in the Norwegian chloralkali pathological study of two cases of intrauterine intoxication by a methyl mercury compound.** J. Neuropathol. Exp., 24: 563-574.
- Environmental Protection Agency. **Mercury Health Effects Update.** (EPA) 600/8-84-019 EPA, Washington, DC (1984).
- Fairbairn DW., Oliver PL., O'Neill KL. (1985). **The comet assay: A comprehensive review.** Mutat. Res. Rev. Gen. Toxicol. 339 (1): 37-59.

- Fitzgerald WF. (1994). **Global biogeochemical cycling of mercury**. Presented at the DOE/FDA/EPA Workshop on Methylmercury and Human Health. Bethesda, MD.
- Friberg L. and Nelson N. (1981). **Introduction, general findings and general recommendations. Workshop / Conference on the role of metals in carcinogenesis.** Environ Health Perspect. 40: 5-10.
- Friberg L., Nordberg GF., and Vook VB. (Eds). (1986). **Handbook on the Toxicology of Metals**. 2nd Edn, Vol.2, pp 387-445.
- Galvao L., Corey G. **Mercurio**. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. OMS 1987.
- Gebhart E. (1984). **Chromosome damage in individuals exposed to heavy metals.** Toxicol Environ chem, 8: 253:265.
- Goldwater L. and W. Stopford. (1977). **Mercury in the Chemical Environment**. By J. Lenihan and W. Fletcher. Academic Press, New York.
- Gregus, Z., and Klassen, C. D. (1986). **Disposition of metals in rats: A comparative study of fecal, urinary, and biliary excretion and tissue distribution of eighteen metals.** Toxicol. Appl. Pharmacol. 85, 24-38.
- Gutiérrez-Ruiz MC, Bucio L, Souza V, Gómez JL, Campos C and Cárabez C (1994) **Expression of some hepatocyte-like functional properties of WRL-68 cells in culture** . In Vitro Cell Dev. Biol. 30: 366-371.
- Gutiérrez-Ruiz MC., Bucio L., Gómez JL., et al. (1991). **Functional and morphological alterations of WRL-68 cells chronically and acute treated with ethanol.** Proc. West. Pharmacol Soc., 34: 39-42.
- Gutiérrez-Ruiz MC., Bucio L., Souza V., et al. (1992). **Morphological and functional alterations of WRL-68 cells treated with heavy metals.** Proc. West. Pharmacol. Soc., 35: 57-60.
- Gutiérrez-Ruiz MC., García C., Bucio L., Souza V. and Betancourt M. (1997). **Uptake, cellular distribution and DNA damage produced by Hg in a human fetal hepatic cell line.** SOT Annual Meeting 1997 Cincinnati U.S.A.
- Handley, J., Todd, D., and Burrows, D. (1993). **Mercury allergy in a contact dermatitis clinic in Northern Ireland.** Contact Derm. 29: 258-261.
- Hansen K. and Stern RM. (1984). **A survey of metal-induced mutagenicity *in vitro* and *in vivo*.** Toxicol Environ Chem 9: 87-91.
- Hartwing A. (1995). **Current aspects in metal genotoxicity.** Biometals, 8(1): 3-11.
- Heil J., Reifferscheis G., Waldmann P., et al. (1996). **Genotoxicity of dental materials.** Mutation Research Gen Tox Test., 368: 181-194.

- Hryhorezuk DO., MeyersL., ChenG. (1982). **Treatment of mercury intoxication in a dentist with N-acetyl-D.L-penicillamine.** J Toxicol Clin Toxicol., 19: 401-408.
- Huisingh JL., Inmon JP., King LC., Williams K and Waters MD. (1977). **The use of primary rat liver parenchymal cells in evaluating cellular response to toxic metals and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons.** In Vitro, 13:182-190.
- Ian R: Freshney, Alan R. Liss. **Culture of animal cells. A Manual of Basic Technique.** New York 1984. pp 3-11, 119-121.
- IARC (1987). **Monograph on the Evaluations of carcinogenicity: An Update of IARC Monographs.** Vols. 1-42 Suppl 7. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Lyon France.
- Inns, R. H., and Rice, P. (1993). **Efficacy of dimercapto chelating agents for the treatment of poisoning by percutaneously applied dichloro(2-chlorovinyl) arsine in rabbits.** Hum Exp. Toxicol. 12, 241-246.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (1993). International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 58, **Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the Glass Manufacturing Industry.** IARC Scientific Publications, Lyon.
- Jacobs A., Hoy T., Humphrys J. and Perera P. (1978). **Iron overload in Chang cell cultures: Biochemical and morphological studies.** Br. J. Exp. Pathol., 59: 489-498.
- James S. Woods., Shunan Li., Terrance S., et al. (1995). **Genetic alterations of glutathione synthesis as an adaptative response to mercury (Hg)-induced oxidative stress.** Vth COMTOX Symposium on Toxicology and Clinical Chemistry of metals. Vancouver B.C., Canada.
- Joao BT., Rocha, Pereira ME, Emanuelli T., Christutari RS. (1995). **Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on S-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats.** Toxicology 100:27-37.
- Kajikawa M., Suzuki N., Suzne R. and Kawada S. (1972). **Detection of heavy metal toxicity by cell culture method.** Jpn. J. Nutr. 30: 159-164.
- Kazantis G. (1981). **Role of cobalt, iron, lead, manganese, mercury, platinumium, selenium and titanium in carcinogenesis.** Environ Health Perspect, 40: 143-161.
- Khan AJ., Graham TC., Webster JE., et al. (1996). **Mercury levels in target organs of female rats following multiple doses of mercury chloride.** In Fundamental and Applied Toxicology. Supplement Vol.30 No. 1 part 2. pp 12.
- Khayat Al. (1985). **Disposition of Metallic Mercury Vapor and Mercury Chloride in Adult and fetal Tissue.** Influence of Pretreatment with Ethylalcohol, Aminotirazole, Selenium and Telurium. Doctoral Thesis, ISBN 91-554-1706.

- Klaassen CD., Amdur MO. and Doull J. (Eds). **Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons**. 3rd. Edn. MacMillan Publishing, New York (1986).
- Klaude M., Eriksson S., Nygren J. and Ahnstrum G. (1996). **The comet assay: mechanisms and technical considerations**. *Mut Researc.* 363: 89-96.
- Kusell M., O'cheskey S. and Gerschenson LE. (1978). **Cellular and molecular toxicology of lead. Effect of lead on cultures cell proliferation**. *J. Toxicol. Environ Health*, 4: 503-513.
- Leonard A., Jacquet P., Lauwerys RR. (1982). **Mutagenicity and teratogenicity of mercury compouns**. *Mutat Res* 114: 1-18.
- Leroy T., Van Hummelen P., Anard D., et al. (1996). **Evaluation of three methods for the detection of DNA single-strand breaks in human lymphocytes: alkaline elution, nick translation, and single-cell gel electrophoresis**. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 47: 409-422.
- Levis AG., Bianchi V., Tamino G. and Pegoraro B. (1978). **Cytotoxic effects of hexavalent and trivalent chromium on mammalian cells *In Vitro***. *Br. J. Cancer*, 37: 386-396.
- Li, Y. -H. (1981). **Geochemical cycles of elements and human perturbation**. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 45: 2073-2084.
- Lorscheider FL., Vimy MJ., Summers AO. (1995). **Mercury exposure from "silver" tooth fillings: Emerging evidence questions a tradictional dental paradigm**. *FASEB J.* 9: 504-508.
- Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL, et al. (1951). **Protein measurement with the folin phenol reagent**. *J. Biol Chem* 193: 205-275.
- Lu KP., Zhao SH. and Wang DS. (1990). **The stimulatory effect of heavy metal cations proliferation of aortic smooth muscle cells**. *Sci. China Ser.* 33:303-310.
- McIntyre AR. (1971). **The toxicities of mercury and its compounds**. *J Clin Pharmacol.*, 11: 397-401.
- Miura K. and Imura N. (1987). **Mechanism of methylmercury cytotoxicity**. *CRC Crit. Rev Toxicol* 18: 161-189.
- Monteith, DK., Vanstone J. (1995). **Comparision of DNA damage from genotoxicants using the microgel electrophoresis assay with primary cultures of rat and human hepatocytes**. *Mutation Resarch*, 354: 79-86.
- Nandi US., Wang JC., Davison N. (1965). **Separation of desoxiribonucleic acids by Hg (II) binding and CS₂SO₂ density-gradient centrifugation**. *Biochemistry*, 4: 1687-1896.
- Nielsen JB., Anmdersen HR., Andersen O., et al. (1994). **Dose and time relations in Hg (II)-induced tubular necrosis and regeneration**. *Environ Health Perspct* 102(3): 317-320.

- Nriagu JO. and Pacyna JM. (1988). **Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals.** Nature, 333: 134-139.
- Olsen Y. and Jonsen J. (1979). **Effect of cadmium acetate, copper sulfate and nickel chloride on organ cultures of mouse trachea.** Acta Pharmacol. Toxicol., 44: 120-127.
- Pierce PE., Thompson JF., Likosky WH., et al. (1972). **Alkyl mercury poisoning in humans. Report of an outbreak.** JAMA 220: 1439-1442.
- Pittot HC. (1988). **hepatic Neoplasia: chemical induction.** In Arias IM., Jakoby WB., Popper H., et al. (Eds.): *Tehe liver: Biology and Pathobiology*, 2nd ed. Reven Press, New York, 1988 pp 1125-1146.
- Potter SD. and Matrone G. (1977). **A tissue culture model for mercury-selenium interactions.** Toxicol Appl. Pharmacol., 40: 201-215.
- Robert A. Goyer, Curtis D. Kawsen, Michel P. Waalkers. **Metal Toxicology.** Academic Press 1995. U.K. pp 19-37, 87, 339, 403, 619-626.
- Robinson S., Cantoni O., Costa M. (1984). **Analysis of metal-induced DNA lesions and DNA-repair replication in mammalian cells.** Mutal-Res., 131(3): 173-181.
- Rojas E., ValverdeM., Herrera LA., et al. (1996). **Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluate by the single gel electrophoresis assay in human lymphocytes.** Mutation Research Environ Mutag and Rel Sub., 359: 77-84.
- Rossman TG. and Kein CB: (1988). **From DNA damage to mutation in mammalian cells: a review.** Environ Mol Mutagen. 11: 119-133.
- Rothstein A. (1959). **Cell membrane as site of action of heavy metals.** Fed. Proc., 18: 1026-1038.
- Singh NP., McCoy MT., Tice RR. and Schneider. (1988). **A simple technique for quantitation of low low levels of DNA damage in individual cells.** Exp. Cell Res., 174: 184-191.
- Sissoeff Y., Grisuard J. Guille E. (1976). **Studies on metal ions-DNA interactions: Specific behavior of reiterated DNA sequences.** Prog Biophys Molec Biol, 31: 165-169.
- Smith ADM., Miller JW. (1961). **Treatment of inorganic mercury poisoning with N-acetyl-D.L-penicillamine.** Lancel 1:640.
- Snyder RD., Lachmann PJ.)1989). **Thiol involvement in the inhibition of DNA repair by metals in mammalian cells.** Mol Toxicol., 2(2): 117-128.
- Stohs SJ., Bagchi D. (1995). **Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions.** Free Radica Biology & Medicine 18(2): 321-336.

- Storer Richard D., Troy W. Mckelvey, Kraynak RA., et al. (1996). **Revalidation of the *in vitro* alkaline elution rat hepatocyte assay for DNA damage: improved criteria for assessment of cytotoxicity and genotoxicity and results for 81 compounds.** Mutation Research, 368: 59-101.
- Suzuki, T., Imura, N., and Clarkson, T. W. (1991). Overview. **Advances in Mercury Toxicology.** pp. 1-32. Plenum, New York.
- Thomas A. Gossel and J. Douglas Bricker. **Principles of Clinical Toxicology.** Third edition. Raven Press 1994 U.S.A. pp 196-200.
- Tice RR. (1994). **The single cell gel / comet assay: A microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells.** In: DH. Phillips and S. Venitt (Eds). Environmental Mutagenesis. Bios Scientific. Oxford, in press.
- Tice RR., Andrews PW. and Singh NP: (1990). **The single cell gel assay: A sensitive technique for evaluating intracellular differences in DNA damage and repair.** In: B. Sutherland and A. Woodhead (Eds). Methods for the detection of DNA damage in human cells. Plenum, New York. pp 291-301.
- **Toxicology Update.** (1995). Journal of applied Toxicology. Vol 15(6): 483-493.
- Tsuzuki-K, Sugiyama M., Haramaki N. (1994). **DNA single-strand breaks and cytotoxicity induced by chromate (VI), cadmium (II) and mercury (II) in hydrogen peroxide-resistant cell lines.** Mutat. Res. 4:56-64.
- U. S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (ATSDR). (1992). **Toxicological profile for mercury.** U.S. Government Printing Office. Atlanta, GA.
- US Environmental Protection Agency. **IRIS Integrated Risk Information System.** Washington, DC (1990).
- Vallee BL. and Olmer DD. (1972). **Biochemical effects of mercury, cadmium and lead.** Annu. Rev. Biochem., 41:91-128.
- Vega GS. **Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales.** (1985). Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Panamericana de la Salud (OMS):
- Vogel EW., Nivard MJM., Ballering LAB., et al. (1996). **DNA damage and repair in mutagenesis and carcinogenesis: implications of structure-activity relationships for cross-species extrapolation.** Mutation Research, Fund. Molec. Mechan. of Mutag, 113: 177-218.
- Waters MD., Gardner DE and Coffin DL. (1974). **Cytotoxic effects of vanadium on rabbit alveolar macrophages *In Vitro*.** Toxicol. Appl. Pharmacol., 28: 253-263.
- Whiting RF., Stich HF. and Koropatrick DJ. (1979). **DNA damage and DNA repair in cultured human cells exposed to chromate.** Chem-Biol. Interact., 26: 267-280.

-
- Woods, J. S. (1995). **Porphyrin metabolism as indicator of metal exposure and toxicity.** Handbook of Experimental Pharmacology, Vol 115. Toxicology og metals: Biochemical Aspects (R. A. Goyer and M. G. Cherian, eds.) Springer-Verlag, Berlin. pp 19-52.
 - World Health Organization (WHO). (1991). **IPCS: Environmental Health Criteria 118: Inorganic Mercury.** Worl Health Organization, Genova.
 - Wroblewski J., Megessi AM. and Sodervall G. (1995). **Effects of HgCl₂ on DNA-Synthesis and expression on metallothionein and Proto-oncogenesis in LGJ1 myoblas.** COMTOX Symposium on Toxicology and Clinical Chemistry of Metals. Vancouver B.C., Canada.
 - Xie, J., Funakushi T., Shimada H., et al. (1996). **Comparative Effects of Chelating Agents on Pulmonary Toxicity of Systemic Nickel in Mice.** Journal of Applied Toxicology, 16(4): 317-324.
 - Yamane T., Davison N. (1961). **On the complexing of desoxiribonucleic acid (DNA) by mercuric ion.** J Am Chem Soc., 83: 2599-2607.
 - Yamano T. (1996). **Dissociation of DDVP-induced DNA strand breaks from oxidative damage in isolated rat hepatocytes.** Toxicology, 108: 49-56.
 - Zaman K., Balcabe JO., MacGill RS., et al. (1994). **Insect model for assessing mercury toxocity: Mercury-induced lipid peroxidation, depletion of glutathione and induced protein oxidation in the housefly and cabbage looper moth.**Toxic. Subst J. 13(2): 129-140.