

03062

15
Ley



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y
DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANEUPLOIDOGENA DEL
ARSENITO DE SODIO Y PENTOXIDO DE VANADIO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A
Q.F.B. PATRICIA RAMIREZ NOGUERA

MEXICO, D. F. '

JUNIO 1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN
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.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U. N. A. M. bajo la tutoría de la Dra. Patricia Ostrosky-Wegman.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Patricia Ostrosky-Wegman por todo el apoyo que he recibido.

A los miembros del comité tutorial, Dr. Lino Díaz de León y al Dr. Fabio Salamanca Góñez por las sugerencias tan valiosas y por los comentarios recibidos durante la realización del trabajo.

Al jurado por los comentarios y las aportaciones recibidas al revisar este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio por los momentos compartidos:

Ana Ma., Alejandro, Angélica, Aurora, Carol, Daniel, Emilio, Esperanza, Gabriela, Guillermo, Isidro, Juliana, Libia, Luis, Ma. Eugenia, Mahara, Martha del Valle, Martha Luna, Montserrat, Patricia A.R., Patricia Guzmán, Pavel, Regina, Rocío, Rosa E., Silvia, Tzutzuy.

A mis padres, Pedro y Beatriz

y

A mis hermanos, Rodrigo y Beatriz Carolina por el apoyo que siempre he recibido y por todo lo que me han enseñado.

A Roberto por brindarme su apoyo y por llenar mi vida con su amor.

A mi abuelita Pina, en su memoria.

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANEUPLOIDOGENA DEL ARSENITO DE SODIO Y
PENTOXIDO DE VANADIO.**

INDICE GENERAL	PAGINA
I. Resumen	2
II. Introducción	3
III. Arsénico	
Propiedades físicas y químicas	5
Exposición	6
Absorción, distribución y eliminación	8
Efectos tóxicos	9
Genotoxicidad	10
IV. Vanadio	
Propiedades físicas y químicas	12
Exposición	13
Absorción, distribución y eliminación	14
Efectos tóxicos	15
Genotoxicidad	16
V. Aneuploidías	
Definición	19
Aneuploidías y el medio ambiente	19
Métodos de análisis	20
Mecanismos de acción	22
VI. Microtúbulos	23
Tubulina	23
Polimerización y formación de microtúbulos	24
VII. Planteamiento del problema	28
VIII. Hipótesis	30
IX. Objetivos	30
X. Material y Métodos	31
XI. Resultados y Discusión	39
XII. Conclusiones	63
XIII. Referencias	64

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TAILLAS	PAGINA
TABLA A. Formas químicas y toxicidad de algunos metaloides y metales	18
TABLA 1. Porcentaje de hipodiploidías, diploidias, hiperploidias y tetraploidias en células de primera y segunda división celular.	39
TABLA 2. Número de linfocitos tratados con colcemid conteniendo 0, 1, 2, 3, 4 ó más marcas de hibridación para los cromosomas 1 y 9.	41
TABLA 3. Proporciones de hiperdiploidías para los cromosomas 7 en linfocitos tratados con V_2O_5 .	46
TABLA 4. Número de linfocitos tratados con V_2O_5 conteniendo 0, 1, 2, 3, 4 ó más marcas de hibridación para los cromosomas 1 y 7.	49
TABLA 5. Número de linfocitos tratados con $NaAsO_2$ conteniendo 0, 1, 2, 3, 4 ó más marcas de hibridación para los cromosomas 1 y 7.	51
TABLA 6. Proporciones de hiperdiploidías para los cromosomas 7 en linfocitos tratados con $NaAsO_2$.	53

FIGURAS	PAGINA
FIGURA A. Polimerización de tubulina	25
FIGURA B. Aeuploidias aparentes	45
FIGURA C. Núcleo y metafase diploides	35
FIGURA D. Núcleos hiperdiploides	35
FIGURA 1. Hiperploidias en primera y segunda división inducidas por colcemid	40
FIGURA 2. Hiperploidias inducidas por colcemid para los cromosomas 1 y 9	42
FIGURA 3. Hiperploidias inducidas por V_2O_5 para los cromosomas 1 y 7	48
FIGURA 4. Hiperploidias inducidas por $NaAsO_2$ para los cromosomas 1 y 7	52
FIGURA 5. Alteraciones inducidas al huso mitótico por $NaAsO_2$ y V_2O_5	56
FIGURA 6. Purificación de tubulina	57
FIGURA 7. Inhibición de la polimerización de tubulina por $NaAsO_2$	58
FIGURA 8. Depolimerización de tubulina inducida por $NaAsO_2$	59
FIGURA 9. Inhibición de la polimerización de tubulina por V_2O_5	60
FIGURA 10. Depolimerización de tubulina nducida por V_2O_5	61

ABREVIATURAS

As	Arsénico
AGT	Tiempo promedio de generación
FI	Filamentos intermedios
FITC	Acetato de fluoresceína
GTP	Trifosfato de guanosina
IgG	Inmunoglobulina G
MF	Microfilamento
MT	Microtúbulo
MTOC	Centros organizadores de microtúbulos
NaAsO ₂	Arsenito de sodio
P _{1, 2, 3, o 4}	Pastilla 1, 2, 3 ó 4
PHA	Fitohemaglutinina (Mitógeno)
PM	Marcador de peso molecular
PN	Amortiguador de fosfatos/Nonidet p-40
PNM	Amortiguador de fosfatos/Leche descremada
S _{1, 2, o 3}	Sobrenadante 1, 2 ó 3
SSC	Solución de citratos
T	Tubulina
V	Vanadio
V ₂ O ₅	Pentóxido de vanadio

I. RESUMEN

Los metaloides y metales representan un grupo importante de contaminantes medioambientales cuya presencia en el ecosistema se ha visto incrementada como resultado de la contaminación emitida por industrias en que los procesos o productos generados involucran, en algún momento, a estas especies químicas; tal es el caso del arsénico y el vanadio.

El estudio de la capacidad que presentan el arsenito de sodio (NaAsO_2) y el pentóxido de vanadio (V_2O_5) de inducir aneuploidías o incrementar su frecuencia es importante, ya la inducción de células cromosómicamente desbalanceadas en células meióticas y mitóticas se ha correlacionado con ciertos desórdenes genéticos, abortos espontáneos y con el riesgo al desarrollo de algunos cánceres. Hay datos que alertan acerca de la capacidad de transformación celular del vanadio y de la carcinogenicidad asociada a la exposición a As.

En este trabajo, se estudió la capacidad aneuploidógena del NaAsO_2 y del V_2O_5 mediante la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en linfocitos humanos así como el efecto de estas sustancias sobre del huso mitótico, específicamente sobre la tubulina a nivel de organización, polimerización y depolimerización. Fenómenos indispensables en la división celular durante la segregación cromosómica.

El NaAsO_2 y V_2O_5 mostraron un efecto dosis-respuesta en la inducción de hiperdiploidías para los cromosomas 1 y 7 *in vitro*. En las concentraciones evaluadas la frecuencia de células hiperdiploides fué significativamente diferente respecto al colcemid y al control negativo ($p < 0.05\%$) encontrando una proporción de hiperdiploidías de aproximadamente $2\% + 0.5\%$ para ambos compuestos a una concentración de $0.1\mu\text{M}$. En el caso del NaAsO_2 existió susceptibilidad individual en los efectos observados.

Los metales en estudio alteraron el ensamble adecuado de microtúbulos y microfilamentos *in vitro* en las concentraciones evaluadas. Se presentaron principalmente en las concentraciones evaluadas, células monopolares. En las concentraciones máximas, se presentó destrucción total de microtúbulos y microfilamentos *in vitro*.

La interacción directa de los compuestos en estudio con la tubulina se comprobó mediante ensayos de polimerización y depolimerización de tubulina *in vitro*. El NaAsO_2 y V_2O_5 inhibieron la polimerización de tubulina llegando a ser de hasta 48% y 53% respecto al control respectivamente. También alteraron el proceso de depolimerización de tubulina. El NaAsO_2 y el V_2O_5 depolimerizaron hasta un 23.3% y 29.83% los microtúbulos previamente formados.

Los resultados muestran que el V_2O_5 y el NaAsO_2 *in vitro* interactúan directamente con la tubulina alterando los procesos de polimerización-depolimerización incrementando la probabilidad de que se presenten células aneuploides durante la división celular por la inadecuada formación del huso mitótico alterándose la segregación cromosómica a las concentraciones evaluadas.

II. INTRODUCCION

Los metales constituyen un grupo importante de contaminantes que estan fuertemente relacionados con el medio ambiente y las actividades humanas.

Su toxicidad varia enormemente con su estado químico, sus propiedades fisicoquímicas, transformación sufrida en el medio ambiente y con los niveles de exposición entre otros aspectos.

Aunque se pudiera pensar que los metales son sustancias relativamente estables, cuando interaccionan con otras sustancias o estructuras celulares sus efectos pueden verse incrementados o abatidos. Por ello, es importante considerar que los mecanismos por los que una sustancia, compuesto o elemento químico puede llevar acabo su acción estan, en la mayoría de los casos, relacionados con otras estructuras químicas capaces de interaccionar entre sí y desencadenar un efecto biológicamente considerable.

Existen evidencias epidemiológicas que alertan sobre el potencial carcinogénico o de la carcinogenicidad comprobada de algunos metales y metaloides contaminantes del medio ambiente. En la Tabla A se observa que la toxicidad de estos elementos es muy variada puede ir desde una ulceración cutánea hasta enfermedades mentales y en algunos casos cáncer.

El arsénico (As) es un metaloide considerado carcinogénico que se encuentra ampliamente distribuido (0.0005%) en la corteza terrestre (U.S. EPA, 1984). Se encuentra en diversos compuestos inorgánicos naturales y sintéticos así como orgánicos.

Los compuestos arsénicales se han utilizado ampliamente en la agricultura (herbicidas y fungicidas) así como en la preservación de ciertas fibras como la lana (Wade, 1993). A principios del siglo XX fue notorio su uso como uno de los primeros agentes quimioterapéuticos. La llamada "solución de Fowler" fué usada en el tratamiento de asma bronquial, la leucemia, sífilis, las infecciones parasitarias y la psoriasis (Wade, 1993).

Actualmente el As ha encontrado uso como ingrediente activo de plaguicidas, herbicidas, conservador de maderas así como en la industria vidriera y electrónica (IARC, 1980; Webb et al; 1984).

El mecanismo por el que ejerce su carcinogenicidad se desconoce.

Por otra parte, el vanadio (V) considerado como un posible elemento traza y también ampliamente distribuido en la corteza terrestre 0.02%. Es usado en la producción de colorantes, tintas, barnices, insecticidas y materiales fotográficos (Browning, 1969).

La exposición del hombre a este metal no se limita a la ocupacional, también se han encontrado grandes concentraciones en el suelo y en las plantas cercanas a las operaciones industriales (Wade, 1993).

No existen evidencias suficientes para considerar al V como un elemento carcinógeno sin embargo, estudios *in vitro* demuestran su capacidad transformante en cultivos celulares. (Klarlund, 1985).

El estudio de los efectos tóxicos de los elementos como el vanadio y el arsénico así como de los mecanismos por los que ejercen su toxicidad tiene gran importancia ya que permite conocer sus efectos a corto y largo plazo así como los efectos observados directamente en el blanco celular a fin de poder prevenirlos o tratarlos adecuadamente.

III. Arsénico

Propiedades físicas y químicas.

El arsénico (As) es un elemento de grupo V A de la tabla periódica, su número atómico es 33 y su peso atómico 74.9 teniendo un punto de sublimación de 613⁰C, 1 atm. Los estados de oxidación en que se encuentra son el As -3, +3 y +5; en el estado -3, el compuesto más importante es la arsina (AsH₃); en los estados +3 y +5 se encuentra formando numerosos compuestos, fundamentalmente arsenitos (As III) y arsenatos (As V), respectivamente (Friberg, 1979).

Los compuestos pueden ser poco ó muy solubles en agua (arsenitos y arsenatos respectivamente). En agua puede haber un intercambio de estados de oxidación dependiendo del pH o de la presencia de otros compuestos que pueden ser reducidos u oxidados (Ferguson y Gavis 1972).

Aunque no es un metal, el As tiene muchas de las propiedades de un metal pesado, considerándose un metaloide. Las formas de As (III) o arsenitos, son de las más tóxicas. El As difiere del resto de los metales pesados comunes en que la mayoría de sus compuestos orgánicos son menos tóxicos que los inorgánicos (Alloway, 1990; Koren, 1991).

Las propiedades químicas del As contribuyen a su toxicidad. El As reacciona con los residuos sulfhidrilo de las proteínas y sustituye al fósforo en algunas reacciones bioquímicas (Leonard, 1980; Wade, 1993).

El As está ampliamente distribuido en la corteza terrestre ocupa el vigésimo lugar entre los elementos más abundantes, aproximadamente de 2 a 5 ppm (Manahan, 1991; NAS, 1977). En México, en la Comarca Lagunera, se reportaron niveles entre 3 y 9 ppm en la superficie y hasta de 20 ppm en el subsuelo (González, 1972).

La producción mundial de As es de alrededor de 72,000 toneladas/año (GESAMP, 1976) y México se encuentra entre los principales productores. Este metaloide se obtiene principalmente como un producto secundario de la refinación de metales no-ferrosos (Nelson, 1976) siendo también constituyente natural de ciertas rocas y formaciones minerales como los minerales de sulfuro y principalmente la arsenopirita. Además de su ocurrencia natural, el arsénico se genera como subproducto en la extracción del Cu, Pb, Au y Ag.

Cabe señalar que el As ocupa el lugar número 12 de los elementos más abundantes en el cuerpo (Shrift, 1973).

Exposición

La exposición ocupacional, iatrogénica y ambiental son las formas más frecuentes de exposición al As. La exposición ocupacional ocurre principalmente por la presencia del As inorgánico (óxido de arsénico) en el aire del ambiente de trabajo de las fundidoras de metales, plantas productoras de As y de los plaguicidas que contienen As así como las plantas generadoras de energía eléctrica por combustión de carbón mineral.

La exposición iatrogénica se da por el uso de medicamentos que en su formulación contienen As como son el carbarsone, melarsoprol y la triparsamida.

La exposición ambiental ocurre de manera natural por consumo de agua con elevadas cantidades de As y de productos marinos. También se presenta esta exposición por la contaminación de fuentes de agua potable como son ríos y lagos así como la que generan al ambiente por las plantas fundidoras o productoras de As inorgánico (Gonsebatt, 1994).

La ingestión de agua contaminada por As (hidroarsenicismo) y de preparaciones medicinales se asocia con la aparición de cáncer de piel. Las evidencias indican que el As puede inducir también cáncer de hígado, pulmón, riñón y vejiga (Argüello et al., 1979; Roth, 1958; IARC, 1980; Chen y Wang, 1990; Bates et al., 1992; Cuzick et al., 1992).

El hidroarsenicismo crónico es un problema de salud que ha sido estudiado en varias partes del mundo. Destacan en la literatura los estudios hechos en Argentina, Chile, Taiwan, además de algunas regiones del norte del Continente Americano, como son: Alaska, Canadá y E.U.A. (Astolfi et al., 1981; Biagini, 1975; Argüello, 1979; Borgoño et al., 1977, Tseng et al., 1968; Harrington et al., 1978; Goldsmith et al; 1972).

En México se han descrito episodios de hidroarsenicismo en los estados de Puebla (González et al., 1972) y Chihuahua (Vidal et al., 1979). En la Región Lagunera la intoxicación crónica por arsénico es un problema endémico, que ha sido sujeto de diversos estudios en los que se describe la contaminación del agua en algunos poblados y algunos de los efectos tóxicos que presentaron las personas expuestas al metaloide (Espinoza, 1963, Albores et al., 1979; Cebrián et al., 1983; Ostrosky-Wegman et al., 1991).

Absorción, distribución y eliminación

Los componentes pentavalentes del As son relativamente inactivos fisiológicamente. Son solubles en agua lo que facilita su absorción a través de las membranas mucosas. Esto permite una rápida penetración en diferentes tejidos que son capaces de reducir al arseniato a arsenito, ésta reducción se ha observado *in vivo* en rata, ratón y conejo (Vahter y Envall, 1981; Lerma y Clarkson, 1983; Vahter y Marafante, 1987).

El metabolismo desempeña un papel importante en la toxicidad del As. En los mamíferos, incluyendo al hombre, los óxidos inorgánicos de As son interconvertidos y metabolizados a ácido metilarsónico y ácido dimetil arsínico (Nuñez, 1994)

La metilación del As en los mamíferos es la vía de destoxicación más conocida, los metabolitos orgánicos son menos tóxicos y más rápidamente excretables que las formas inorgánicas. La actividad metilante se localiza en el citosol y es dependiente de glutatión reducido requiriendo en el medio un pH 7.5-8.0 y *s*-adenosil metionina donadora de metilos *in vivo* (Marafate y Vahter, 1984; Buchet y Lauwerys, 1987). Se sabe que la forma química de As metabolizado por el hombre es un derivado dimetilado, que comunmente se denomina ácido cacodílico (Del Razo et al., 1990).

A diferencia de los compuestos pentavalentes, los compuestos trivalentes del As se absorben menos a través de las membranas mucosas debido a su hidrofobicidad pero son mejor absorbidos a través de la piel (Schoolmeester y White, 1980)

El As trivalente es la especie inorgánica más tóxica, debido posiblemente a la capacidad que presenta de unirse a grupos sulfhidrilo constituyentes de varias enzimas. Sin embargo, la forma pentavalente, como ya se mencionó, puede ser convertida a la forma trivalente en el cuerpo (Creelius, 1977; U.S. EPA, 1984).

La vida media del As en los humanos es de 3 a 5 días. La principal ruta de excreción es a través del riñón, pero las heces, la piel y el cabello también pueden contener apreciables cantidades de As (Tadlock y Aposhian, 1980).

Hay evidencias que demuestran diferencias en el metabolismo del As entre el ser humano y algunas especies animales. Se ha encontrado que la absorción, distribución, el metabolismo y excreción del As dependen de una gran cantidad de factores, tanto fisiológicos como ambientales; lo que podría explicar en parte, las diferencias en la toxicidad de este compuesto en las distintas especies estudiadas (Lanz et al., 1950; Crecelius, 1977; Poinproy et al., 1980; Vahter y Norin 1980; Buchet et al., 1981).

Efectos tóxicos

Las manifestaciones clínicas (Tabla A) de envenenamiento agudo por As, generalmente ocurren pocas horas después de la ingestión o exposición. La lesión principal de una intoxicación aguda con As es el daño gastrointestinal con vómito y diarrea, otros síntomas incluyen calambres musculares, edema facial, dermatitis, encefalopatía y anomalías cardíacas. Los individuos que sobreviven a intoxicaciones agudas desarrollan problemas a nivel del sistema nervioso periférico (WHO, 1981; Bryson, 1989).

En el caso de las exposiciones crónicas a As, se ha observado que trabajadores de las industrias fundidoras y en personas que beben agua con una elevada concentración de As, presentan lesiones en el tracto respiratorio superior incluso perforaciones en el septo nasal y alteraciones dérmicas como hiperqueratosis palmoplantar respectivamente. Esto último se ha observado también en personas que se encuentran bajo tratamiento prolongado con medicamentos arsenicales. Las alteraciones dérmicas incluyen hipo e hiperpigmentaciones (WHO, 1981; Bencko, 1987; ATSDR, 1989).

Personas que beben agua contaminada con As y trabajadores de fundidoras expuestos a concentraciones elevadas de compuestos arsenicales han mostrado alteraciones en la piel como hiperqueratosis palmoplantar, incluso se presenta en los trabajadores cáncer de tipo broncogénico por la inhalación de compuestos arsenicales. Las alteraciones dérmicas se han observado también en pacientes con tratamiento prolongado de soluciones arsenicales como la de Fowler (Gonsebutt et al., 1994; IARC, 1980; WHO, 1981; Bencko, 1987).

Genotoxicidad

En cuanto a la genotoxicidad se ha observado que el As no es mutagénico en sistemas de prueba bacterianos ni en células de mamífero (Jacobson-Kram y Montalbo 1985).

Los estudios realizados *in vitro* han demostrado que el As presenta capacidad clastógena (Leva, 1945; Nygren, 1949; King y Lundford, 1950; Oppenheim y Fishbein, 1965; El Sadek, 1972; Paton y Allison, 1972; Léonard y Lauwerys, 1980; Vega et al., 1995) así como comutagénica (Okui y Fujiwara, 1986; Li y Rossman, 1989).

El arsenito de sodio (NaAsO_2) es capaz de inducir células aneuploides y poliploides cultivadas *in vitro* en presencia del metaloide (Eastmond et al., 1989; Vega et al., 1995). *In vivo* Gonsebutt et al., 1992a corroboraron la capacidad aneuploidógena del As al encontrar que el análisis cromosómico de individuos expuestos a As mostró una elevada proporción de células poliploides en segunda división.

La presencia de células cromosómicamente desbalanceadas puede atribuirse a la afinidad demostrada del As por los enlaces sulfhidrilo (Li y Rossman, 1989) y en consecuencia por proteínas del huso mitótico (Cherian, 1987; Vega et al., 1995).

En trabajadores expuestos al metal se ha observado un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales (Petres et al; 1977; Nordenson et al: 1978). Gonsbatt 1994, describe una frecuencia elevada de aberraciones cromosómicas de tipo cromatídico en linfocitos de individuos expuestos crónicamente a dosis elevadas de As en el agua de bebida.

IV. Vanadio

Propiedades físicas y químicas

El vanadio (V) está ampliamente distribuido en la corteza terrestre, es el vigésimo primer elemento más abundante con una concentración promedio de 135 ppm. En el agua marina, este metal ocupa el lugar trigésimo cuarto en abundancia con una concentración de 2 ppb (Nechay, 1984). La química del V es compleja porque el metal puede existir con estados de oxidación -1 a +5. El V +4 es la forma química más estable. Tiene como número atómico 23, es el primer elemento del grupo 5 en la tabla periódica de los elementos y presenta un peso atómico de 50.95.

El V en su forma metálica no se encuentra de manera natural en la tierra, sin embargo se conocen cerca de 70 minerales de vanadio, de los cuales 40 son vanadatos (Strokinger, 1981; WHO, 1988). La extracción de metales como el hierro, uranio, titanio y aluminio está ligada a la producción de V. Se calcula que la producción de V en forma de pentóxido estaba entre 34,000 y 45,000 toneladas en los años de 1980-1985 (WHO, 1988). Los principales productores de V son en orden de importancia: Sudáfrica, USSR, U.S.A., Finlandia y China (Léonard y Gerbet, 1994).

La mayor parte del V es utilizado en la industria metalúrgica, formando aleaciones con el acero, el resto es empleado en la industria catalítica en la producción de ácido sulfúrico y en la aeronáutica (Strokinger, 1981; WHO, 1988; Baroch, 1983). Se estima que anualmente son emitidas al ambiente 280 toneladas de las cuales el 70% se originan de fuentes naturales (erosión, emisiones volcánicas) y el resto provienen de actividades humanas. Aproximadamente el 50% de éstas últimas, son emitidas por procesos industriales (Lantzy et al., 1979).

Exposición

La principal forma de exposición a compuestos de V, principalmente a óxidos del metal se presenta por la contaminación ambiental natural de la tierra y el aire (erosión y emisiones volcánicas) así como la emitida por las actividades industriales, principalmente las que emplean carbón y petróleo (Zhong et al., 1994). En el humano, la principal vía de exposición al V es por la inhalación de sus compuestos

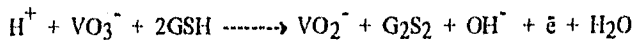
Se han encontrado altas concentraciones del metal en plantas ubicadas cerca de las zonas industriales (Roldán et al., 1990) también en el aire proveniente de pozos petroleros en combustión (Madany et al., 1992). Su presencia en el ambiente se debe a que se obtiene como co-producto de desecho en la extracción de uranio, fosfato, bauxita o de alguno de los 70 minerales más conocidos que contienen vanadio en diferentes formas químicas (Baroch, 1983; Phillips et al., 1983; Rosenbaum, 1983).

Absorción, distribución y eliminación

El metabolismo del V no está bien estudiado. Sin embargo, se sabe que los compuestos del metal especialmente los óxidos insolubles son pobremente absorbidos por el tracto intestinal y menos del 5% del tartrato de vanadio es excretado en la orina (Dimond et al., 1963). En contraste, la absorción del V en el pulmón es mayor (aproximadamente del 90% en 4 días) encontrándose que una pequeña fracción de los óxidos puede ser retenida por un tiempo mayor (French y Jones, 1993; Rhoads y Sanders, 1985).

En bajas concentraciones el V se encuentra en los mamíferos y las aves en forma monomérica hidratada. En fluidos corporales a pH 4-8, la especie predominante es VO_3^- con estado de oxidación +5 y se conoce como vanadato (metavanadato). El VO_3^- puede entrar a la célula por el sistema de transporte aniónico y puede ser reducido por el glutatión a VO_2^- , con un estado de oxidación de +4, conocido como vanidil (Nechay, 1984).

Se cree que las reacciones de oxido-reducción pueden llevarse de la siguiente forma.



((Nechay, 1984)

En el humano la forma pentavalente es rápidamente reducida a la forma tetravalente (Johnson et al., 1974).

La ingesta diaria de V proveniente de los alimentos y del agua es de aproximadamente 116 μg siendo la principal vía de excreción la orina. Se sabe que los tejidos blandos de los animales y los humanos presentan una elevada afinidad por los compuestos de V. Concentraciones elevadas de V se han encontrado en el pelo y queratina probablemente la afinidad iónica a los grupos sulfhidrilo presentes en estas estructuras (Waters, 1977).

El cuerpo humano contiene normalmente cerca de 100-200 μg de V (Byrne et al., 1978), encontrándose la mayor cantidad en los órganos parenquimales.

Efectos tóxicos

Potencialmente, el V presenta muchos sitios bioquímicos y celulares de acción. Dentro de los efectos tóxicos atribuidos al V resalta su potente acción inhibitoria de enzimas como las ATP fosfolidrolasas, ribonucleasas, adenilato cinasa, fosfofructocinasa, escualen-sintetasa, gliceraldehído 3-fosfo deshidrogenasa, glucosa 6-fosfatasa (Singh et al., 1981) y fosfotirosil-protein-fosfatasa (Swarup, 1982)

Una de las ATP_{asas} (dependiente de Ca y Mg) que es inhibida por el V en concentraciones micromolares es la dineína, enzima involucrada en la motilidad de diversas células, así como en la formación del huso durante la mitosis (Cande et al., 1978, Kobayashi et al., 1978, Gibbons et al., 1978).

El V influye los procesos oxido-reducción de la vía metabólica lipídica y la formación del eritrocito (Nechay, 1984). Generalmente la forma pentavalente del V es más tóxica que la trivalente dada la facilidad de entrar a la célula (Nechay et al., 1986). Existen diferencias entre especies ya que se ha observado una susceptibilidad incrementada en el ratón, rata y cuyo (Léonard y Gerber, 1994).

Se considera que el V posee propiedades alérgicas como las que presenta el Ni y el Cr (Vouk, 1979).

En la Tabla A se muestran algunos de los signos, síntomas y enfermedades frecuentemente observados en personas expuestas a éste metal. Faulkner, y colaboradores reportan la presencia de irritación pulmonar y neumonitis con edema en personas expuesta a elevadas concentraciones en el área de trabajo (Faulkner et al., 1964).

Genotoxicidad

La información concerniente a la actividad genotóxica del V *in vivo* es escasa, sin embargo los estudios *in vitro* son más abundantes.

Hasta la fecha en los estudios publicados no se observa un claro efecto clastógeno por parte del V *in vitro* (Owusu-Yaw, 1990; Roldán et al., 1990; Migliore et al., 1993).

El V₂O₅ después de la inyección intraperitoneal, subcutánea ó de su inhalación, incrementó la frecuencia de micronúcleos en la médula ósea de ratón. Sin embargo, cuando se administró el compuesto por vía oral los resultados fueron negativos, debido probablemente a la baja absorción del V por esta vía (Sun, 1987).

Estudios recientes, indican la capacidad de ciertos compuestos de V (SVO₅, Na₃VO₄, NH₄VO₃) de incrementar la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de ratón tratado *in vivo*. En contraste, y con la excepción del SVO₅, los demás compuestos probados no incrementaron significativamente la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales.

La frecuencia de células hipoploides e hiperploides en segunda división se incrementaron significativamente respecto al control, no así la de células poliploides (Ciranni et al., 1995).

Como se mencionó anteriormente, el V en concentraciones micromolares, es capaz de interferir con las enzimas involucradas en la formación del huso mitótico como las ATPasas de cincina (Conde y Wolniak, 1978; Kobayashi et al., 1978; Gibbons et al., 1978).

Estudios *in vitro* revelaron que el VOSO₄ y el V₂O₅ incrementan la frecuencia de las células diploides y poliploides en *Saccharomyces cerevisiae* y de los linfocitos humanos respectivamente (Sora, 1986 y Roldán et al., 1990). También se han descrito resultados similares algunos acerca de la capacidad aneuploidógena del V en líneas celulares y del daño general al huso mitótico en *Allium cepa* (Sharma et al., 1987; Roldán et al., 1990).

Ciertas especies de V resultaron ser mutagénicas o débilmente mutágenas, sin embargo, los resultados son poco concluyentes (Sun, 1987). A nivel de la división celular, el V en ciertas concentraciones micromolares es capaz de estimular la incorporación de la timidina así como la división celular de los fibroblastos humanos (Sabbioni et al., 1983),

Roldán et al., 1990 reportan un decremento significativo en el índice mitótico de los linfocitos tratados con V_2O_5 en concentraciones 2, 4 y 6 $\mu\text{g/ml}$; mientras que el tiempo promedio de generación (AGT) se incrementó.

No existen evidencias suficientes acerca de la carcinogenicidad del V, aunque se sabe que este metal es capaz de promover la transformación celular *in vitro* (Klarlund, 1985) y de estimular la fosforilación de la tirosin cinasa por vanadato (Brown et al., 1984), sugiriendo posibles repercusiones a nivel de oncogenes si se considera la relación de ésta enzima con estos genes.

TABLA A. Formas químicas y toxicidad de algunos metaloides y metales.

Elemento metálico	Valencia	Compuestos orgánicos importantes	Enfermedades signos y síntomas.
Arsénico	As ⁻³ As ⁰ As ³⁺ As ⁵⁺	Arsenobetaina Arsenocolina Ac. metilarsonico Ac. dimetilarsínico Ac. trimetil arsínico Oxido trimetilarsínico	Pie negro (angiitis) Cáncer de piel. Envenenamiento crónico y agudo (gastroenteritis, arritmias cardíacas entre otros)
Cadmio	Cd ⁰ Cd ²⁻	Metil cadmio Inestable	Enfermedad Itai-Itai (osteomalacia, osteoporosis) Nefropatía túbulo intersticial Cáncer de pulmón y de próstata).
Cromo	Cr ⁰ Cr ³⁺ Cr ⁶⁺		Ulceración cutánea y mucosa Cáncer de pulmón (Cr ⁶⁺) Dermatitis alérgica por contacto
Plomo	Pb ⁰ Pb ²⁺ Pb ⁴⁺	Tetrametil/etil plomo Trimetil/etil plomo Dimetil/etil plomo	Deficiencia neuroconductual en niños, envenenamiento agudo y crónico (síntomas neurológicos, gastrointestinales y signos hematológicos) Nefropatía túbulo intersticial Hipertensión Cáncer renal (Pb ⁰)
Mercurio	Hg ⁰ Hg ⁺¹ Hg ²⁺	Metil mercurio Dimetil mercurio	Enfermedad de Minamata (ataxia y disturbios visuales retardo mental) Envenenamiento agudo y crónico con Hg inorgánico.
Vanadio	V ⁵⁺ V ⁴⁺ V ³⁺	Metavanadato de sodio Metavanadato de amonio Ortovanadato de amonio Pentóxido de vanadio Sulfato de vanidil Trióxido de vanadio	Rinitis, irritación bronquial, anemias, tos crónica, faringitis.

(Adaptación hecha de Wade, 1993 y Altamirano, L.M.A. 1992)

V. ANEUPLOIDIAS

Definición

Se define a la aneuploidía (como resultado de la no disyunción) como la ganancia o pérdida de cromosoma(s) de un genoma, en células germinales o somáticas. Se excluye a las células poliploides que presentan números extras de complementos ($3n$, $4n$ etc.).

Las heteroploidías representan el conjunto de alteraciones numéricas en los cromosomas.

Aneuploidías y el medio ambiente.

Diversos estudios moleculares y citogenéticos han enfatizado la importancia de la presencia de alteraciones genéticas como deleciones, translocaciones, recombinaciones y aneuploidías en procesos carcinogénicos. Se ha reconocido la presencia de éstas aberraciones cromosómicas en otros desórdenes genéticos como la infertilidad, abortos espontáneos y el retraso mental.

El estudio de la capacidad que presentan ciertos contaminantes medioambientales de inducir aneuploidías o incrementar su frecuencia a causado gran interés, ya que la inducción de células cromosómicamente desbalanceadas en células meióticas y mitóticas se ha correlacionado con ciertos desórdenes genéticos, abortos espontáneos y con el riesgo al desarrollo de algunos cánceres.

Se estima que cerca del 0.3% de todos los recién nacidos son aneuploides la estimación incluye desórdenes genéticos como el síndrome de Down, Patau, Klinefelter y Turner (Bond y Chandler, 1983; Hansmann, 1983; Hook, 1985).

Al menos el 4% de los embarazos reconocidos clínicamente presentan un problema de aneuploidías y que cerca del 35% de los abortos espontáneos y del 4-6% de las muertes infantiles están asociados con aneuploidías (Hook, 1985).

Aún en los casos clínicamente "menos severos", las aneuploidías se presentan frecuentemente en los casos de desarrollo sexual anormal y de infertilidad. (Hook, 1983).

Metodos de análisis.

Por muchos años, el análisis citogenético de células en metafase encaminado al estudio de aberraciones estructurales y numéricas en linfocitos de individuos expuestos a sustancias tóxicas con el fin de identificar poblaciones con un riesgo incrementado al desarrollo de enfermedades genéticas o cáncer ha tenido éxito.

Sin embargo, el uso de técnicas citogenéticas tradicionales en el estudio de estas poblaciones expuestas ocupacionalmente o ambientalmente es limitado ya que se requiere la presencia de células capaces de dividirse *in vitro*.

Aunado a lo anterior, los estudios exigen un trabajo intenso y personal altamente capacitado además existen problemas de carácter técnico como son la pérdida cromosómica durante la preparación de metafases.

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) con sondas específicas es un método citogenético molecular mediante el cual se puede obtener información relativamente rápida de células interfásicas cromosómicamente desbalanceadas (aneuploides).

La hibridación con éstas sondas resulta en la tinción compacta de una región marcada con la sonda DNA específica acoplada a un fluorocromo lo que permite conocer el número de copias de un cromosoma de interés (aneuploidías) ó bien la localización una región cromosómica (rearrreglos estructurales) en una cantidad apreciable de células (Rupa et al., 1995; Eastmond et al., 1995).

Este método ha sido aplicado en varios tipos celulares para la detección de aneuploidías inducidas por agentes químicos y físicos *in vitro* (Rainondi et al., 1989; De Sario et al., 1990; Eastmond y Tucker, 1990; Vagnarelli et al., 1990; Zhang et al., 1994; Rupa et al., 1995; Robbins et al., 1994).

El método de FISH, comienza ha utilizarse en el estudio de poblaciones humanas expuestas a diversos compuestos químicos encontrando por ejemplo; incrementos en la frecuencia de alteraciones cromosómicas numéricas en linfocitos cultivados de personas expuestas a pesticidas (Rupa et al., 1995), fumadores de cigarro (Eastmond, Rupa, Hasegawa y Thompson, resultados no publicados) y en trabajadores expuestos a benceno (Smith et al., 1995) así como en espermatozoides de pacientes bajo quimioterapia (Robbins et al., 1994).

Existen factores que influyen en el análisis aneuploidogénico como son la edad, el sexo (Fitzgerald y McEwan, 1977; Galloway y Buckton, 1978; Stone y Sandberg, 1995), el criterio de análisis (Vershaeve et al., 1979; Eastmond et al., 1994, 1995), pérdida cromosómica (Cimino et al., 1986) y posiblemente el período de cultivo celular así como la densidad de metafases en la preparación.

Mecanismos de acción.

Dentro de los mecanismos que podrían explicar la generación de células cromosómicamente desbalanceadas o aneuploides se encuentran:

1) Daño al huso mitótico.

Los cromosomas se encuentran unidos a los microtúbulos formadores del huso mitótico y del aster los cuáles permiten una adecuada distribución cromosómica hacia la célula hija.

2) Alterando los procesos de polimerización y depolimerización de tubulina durante la formación del huso mitótico.

3) Daño de estructuras celulares como los centrosomas que migran a los polos durante la mitosis funcionando como centros organizadores del huso o centros organizadores microtubulares (MTOC); los cinetocoros (centrómeros) responsables de la unión de los cromosomas al huso mitótico.

4) Reducción de la condensación cromosómica generando cromosomas rezagados.

5) Alteración de la membrana nuclear a la cuál esta asociada la cromatina.

6) Disfunción de los procesos de citocinesis por los que una célula mitótica genera dos células hijas.

(Oshimura et al; 1986; Dellarco et al; 1985a)

VI. MICROTUBULOS

El citoesqueleto está principalmente constituido de 3 elementos estructurales: microtúbulos (MTs), microfilamentos (MF) y filamentos intermedios (FI). Todos ellos presentan una variedad de funciones celulares como el mantener la arquitectura celular y la organización interna, regulando la arquitectura celular, motilidad, división celular (mitosis y meiosis) y otros procesos celulares (B. Alberts et al., 1983).

Tubulina

Los MTs estan compuestos principalmente de dos proteínas similares conocidas como α -tubulina y β -tubulina que forman un heterodímero que se ensambla para formar los microtúbulos (Figura A) (Dellarco et al., 1985a). Existe una tercer proteína que es conocida como γ -tubulina originalmente descubierta en *Aspergillus nidulans* y la cuál presenta hasta 35% de homología respecto a α y β -tubulina (Oakley et al., 1989).

La tubulinas presentan un peso molecular de aproximadamente 50,000. Su secuencia y estructura se encuentra altamente conservada en diversas especies (B. Alberts et al., 1983).

La γ -tubulina se localiza en los centros organizadores de MTs (MTOC) de diferentes tipos celulares y específicamente está concentrada en el material pericentriolar donde los microtúbulos terminan (Oakley et al., 1989; Zheng et al., 1991; Stearns et al., 1991).

Los MTOC (centrosomas en células animales) están involucrados en la regulación del ensamble microtubular y establecen la polaridad de los microtúbulos.

Se cree que el componente MTOC- γ tubulina podría interactuar directamente con el heterodímero $\alpha\beta$ desempeñando un papel importante en la nucleación de microtúbulos (Oakley et al., 1990).

Los centrosomas controlan la nucleación de los microtúbulos *in vivo* e *in vitro* y establecen la polaridad de los microtúbulos necesaria durante el ensamble y desensamble de T (Weisenberg et al., 1975; McGill et al., 1975; Snyder et al., 1975; Euteneuer et al., 1981; Melntosh et al., 1984; Bergen et al., 1980; Bertolero et al.; 1980; Arelier et al., 1994)

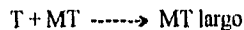
Polimerización y formación de microtúbulos.

El huso mitótico y meiótico están compuestos de fibras de T altamente organizadas en MTs.

La formación del huso mitótico puede ser dividida en 2 fases:

- a) Iniciación y crecimiento de los MT del huso
- b) Organización de los MTs con otras estructuras

En general, los MTs crecen *in vitro* a causa de la condensación de la T a polímeros de acuerdo a la siguiente reacción:



(Dellarco et al., 1985a).

La iniciación en la elongación puede ocurrir en cualquier extremo, siendo las constantes de crecimiento diferentes en cada caso. El ensamble de la T está acompañado por la hidrólisis de una molécula unida de GTP, el tiempo en que se lleva a cabo la hidrólisis no está rigurosamente acoplado al tiempo en el que se adicionan las subunidades de T. Dependiendo de ésta tasa de ensamble, un microtúbulo puede contener dos clases de T, la tubulina-GDP formada por la hidrólisis nucleotídica de GTP (D) y un "cap" de tubulina-GTP (T) en las subunidades recientemente comprometidas a su adición en el ensamble y que aún no ha experimentado la hidrólisis (Dellarco et al., 1985a).

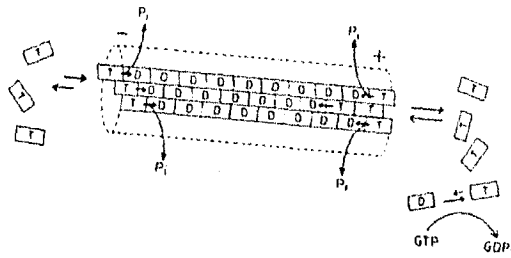


FIGURA A. Polimerización de tubulina.

La iniciación del crecimiento microtubular espontáneo *in vitro* es un proceso complejo el cual involucra la organización de oligómeros de T para formar la geometría tubular. El número de polímeros formados al inicio de la elongación de los MTs depende de la condensación de unidades monoméricas de T llegando a ser saturable la polimerización dependiendo de la concentración de T en el medio (Dellarco et al., 1985)

El ensamble microtubular se caracteriza por una fase "lag" o de crecimiento que es el reflejo del ensamble de varios dímeros en una forma organizada para iniciar la formación del microtubulo (Becker, 1986).

La fase inicial de "nucleación" es seguida de una rápida fase de elongación en donde las unidades diméricas se adicionan al crecimiento del MT. La polimerización ya iniciada provoca un decremento de la T libre ocasionando un equilibrio entre las unidades monoméricas a ensamblar y los dímeros adicionados durante la polimerización (Becker, 1986).

Los centrosomas y los cinetocoros pueden iniciar el crecimiento microtubular *in vitro* siendo más eficientes en este proceso los centrosomas. esquemáticamente, pudiera pensarse que el centrosoma funciona como un "saco de semillas" del cual emergeran los MTs (Dellarco et al., 1985a; Oakley et al., 1990).

Un MT crece por adición de dímeros en uno de sus extremos (Figura A). La unidireccionalidad del crecimiento microtubular es resultado de la polaridad molecular de los dímeros y del MT en formación (Oakley et al., 1990; Euteneuer et al., 1981).

En la mayoría de los casos, la iniciación en la elongación microtubular está mediada por el centrosoma, el cual requiere de energía de activación menor para iniciar la polimerización microtubular *in vivo e in vitro* (Dellarco et al., 1985a).

Estudios estructurales demuestran que la organización de los MTs con los cromosomas, cinetocoros, centriolos, centros organizadores de MTs y otras estructuras mitóticas son procesos complejos (Dellarco et al., 1985a)

Temporalmente estos procesos coinciden en algún punto pero mecanísticamente son distintos.

Los dímeros de T co-ensamblan con otras proteínas conocidas como proteínas asociadas a MTs (MAP) las cuales alteran o favorecen las características del ensamble *in vitro* y presumiblemente *in vivo* (Vallee et al., 1984; Stebbings, 1988).

Estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de la T de polimerizar por la acción de diversas sustancias y condiciones fisiológicas específicas.

Se sabe que la adición de agentes secuestradores como el EDTA ó el EGTA y GTP ó ATP a los sobrenadantes de homogenados de cerebro inducían el reensamble de MTs (Weisenberg et al., 1972).

El reensamble puede generarse *in vitro* rápidamente a 37 °C, revertirse a 4 °C e inhibirse por calcio, colcemid y mebendazol en cisticercos (Shelanski et al., 1973; Lacleste et al., 1980).

La capacidad que presentan los MTs de polimerizar *in vitro* en respuesta a diversas sustancias como el glicerol y la sacarosa ha permitido la purificación de la T por procesos de polimerización y depolimerización de esta proteína.

Con este procedimiento, se pueden obtener solo aquellas subunidades de T capaces de polimerizar y eliminar la proteína desnaturalizada en la preparación.(Shelanski et al.,1973)

VII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El mecanismo de mitosis es un fenómeno complejo, ya que en él están involucradas una gran variedad de estructuras celulares que son susceptibles durante el curso de la mitosis a sustancias citotóxicas y genotóxicas.

Si consideramos, que la exposición humana al As y al V es alta y que además existen evidencias epidemiológicas que alertan acerca de la carcinogenicidad del As y de la carcinogenicidad potencial del V resulta entonces importante conocer, estudiar y caracterizar los efectos tóxicos que ejercen estos elementos a nivel celular así como el o lo(s) mecanismo(s) mediante los cuales pudieran llevar a cabo estos efectos.

Se ha reportado que el pentóxido de vanadio (V_2O_5) es capaz de inducir células poliploides *in vitro* en cultivos de linfocitos humanos. Existen también indicios de su interacción con el huso mitótico en sistemas de origen vegetal y de la capacidad de inducir células micronucleadas en células de mamífero (Roldán et al., 1990; Sing et al., 1980).

Por otro lado, hay evidencias de que el arsenito de sodio ($NaAsO_2$) es capaz de inducir células aneuploides y poliploides en cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro*, se sabe también que ésta sustancia altera la proliferación celular normal *in vitro* de linfocitos humanos expuestos *in vivo* a éste metaloide (Ostrosky-Wegman et al., 1991).

De manera similar que el V, existen evidencias cualitativas que sugieren una interacción del arsénico con el huso mitótico en líneas celulares (Chou et al., 1989).

Estos y otros estudios hacen sospechar que tanto el arsénico como el vanadio son capaces de inducir alteraciones celulares en los linfocitos proliferantes en cultivo *in vitro* quizá a nivel de división celular.

El estudio de la capacidad que presentan el arsenito de sodio (NaAsO_2) y el pentóxido de vanadio (V_2O_5) de inducir aneuploidías o incrementar su frecuencia es importante, ya que la inducción de células cromosómicamente desbalanceadas durante la división celular meiótica y/o mitótica se ha correlacionado con ciertos desórdenes genéticos, abortos espontáneos y con el riesgo al desarrollo de algunos cánceres

Por lo anterior, resulta útil e importante estudiar la capacidad aneuploidógena del NaAsO_2 y del V_2O_5 pentóxido de vanadio en linfocitos humanos expuestos *in vitro* a estas sustancias así como el mecanismo por el cuál se podrían estar generando células cromosómicamente desbalanceadas.

Con este fin, se estudió la capacidad aneuploidógena del NaAsO_2 y del V_2O_5 en linfocitos humanos expuestos *in vitro* a estas sustancias. Se determinaron también los efectos sobre el huso mitótico, que constituye una de las estructuras básicas en la distribución cromosómica durante la división celular.

VIII. HIPOTESIS

Si el arsenito de sodio y el pentóxido de vanadio alteran la proliferación celular *in vitro* induciendo células cromosómicamente desbalanceadas, esto puede ser resultado de su interacción con proteínas constitutivas del huso mitótico como la tubulina alterándose los procesos de polimerización y depolimerización en la división celular.

IX. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Evaluar la actividad aneuploidógena *in vitro* del arsenito de sodio y del pentóxido de vanadio en linfocitos humanos mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

Conocer el efecto del arsenito de sodio y del pentóxido de vanadio sobre el huso mitótico.

OBJETIVOS PARTICULARES

Comparar las técnicas citogenética clásica y FISH en la evaluación del colcemid como agente aneuploidógeno *in vitro*.

Conocer la frecuencia de células aneuploides en cultivos de linfocitos tratados con arsenito de sodio y pentóxido de vanadio.

Determinar los efectos *in vitro* del arsenito de sodio y del pentóxido de vanadio al huso mitótico a través de la tinción inmunofluorescente de la β -tubulina, así como la acción de estos compuestos sobre la polimerización de ésta proteína.

X. MATERIAL Y METODOS

Se llevaron a cabo 3 diseños experimentales. El primero para comparar la sensibilidad y reproducibilidad de la técnica citogenética clásica y la técnica de FISH, se trabajó con un aneuploidógeno ya conocido, el colcemid. El segundo permitió conocer el efecto aneuploidógeno del arsenito de sodio y el pentóxido de vanadio mediante FISH utilizando sondas específicas para el cromosoma 1 y 7 en cultivos de linfocitos humanos.

Finalmente se estudió, mediante técnicas de inmunofluorescencia y de polimerización *in vitro* de tubulina, los efectos de los compuestos en estudio sobre ésta proteína.

Efecto aneuploidógeno por la técnica citogenética clásica.

Se hicieron cultivos de sangre entera de 2 individuos clínicamente sanos. Se cultivaron 0.5 ml de sangre en medio de cultivo RPMI-1640 (SIGMA) suplementado con glutamina y aminoácidos no esenciales. La proliferación celular se indujo con 0.2 ml fitohemaglutinina (PHA), Microlab, México y bromodesoxiuridina a una concentración final de 32 μM para detectar las células en fase de síntesis se incubaron los cultivos a 37 °C durante 72 horas. A las 48 horas de iniciado el cultivo, las células fueron tratadas con cada una de las concentraciones a probar de los compuestos en estudio (Colcemid, NaAsO_2 ó V_2O_5) se incubaron durante 24 horas más. A las 70 horas de cultivo se agregó 0.2 ml de colcemid (Gibco) y las células se incubaron por 2 horas más.

Transcurrido el período de cultivo, las células se cosecharon con una solución hipotónica 0.1 M de KCl (Dauford, 1984) durante 10 minutos a 37° C y después fijar el material con ácido acético-metanol 3:1.

Se utilizó colcemid (0.1 μM) como control positivo para los estudios de citogenética clásica y de FISH.

El material se goteó cuidadosamente sobre un portaobjetos para evitar la pérdida cromosómica por efectos técnicos y finalmente las láminas se tiñeron por la técnica FPG (Perry y Wolff, 1974).

Efecto aneuploidógeno mediante la técnica de FISH.

Se hicieron cultivos de sangre entera (0.5 ml) en medio de cultivo RPMI-1640 (SIGMA) suplementado con glutamina y aminoácidos no esenciales. La proliferación fué estimulada con 0.2 ml fitohemaglutinina (PHA), Microlab, México. Los cultivos se incubaron a 37 °C.

A las 48 horas de iniciado el cultivo, las células se trataron con diferentes concentraciones de Colcemid, NaAsO₂ ó V₂O₅ y se incubaron durante 24 horas más a 37 °C, para finalmente cosechar con solución hipotónica de 0.075 M de KCl y una solución fijadora ácido acético-metanol 3:1.

El material celular fué goteado una sola vez en un punto y las láminas así fijadas se guardaron hasta la hibridación bajo una atmósfera de N₂ en congelación.

a) Hibridación

El material fijado se desnaturalizó con una solución de formamida al 70% en solución de citratos (SSC) durante 2 minutos a 70 °C. Inmediatamente después, se deshidrató el material incubándolo con etanol al 70%, 85% y 100% durante 2 minutos en cada uno. La mezcla de hibridación: Solución "Master mix" (55% formamida, 1 x SSC, 10% dextran) sonificado de esperma de salmón (500 ng), agua destilada y la sonda específica para el cromosoma de interés se calentó a 70 °C durante 5 minutos. La mezcla de hibridación se depositó sobre la lámina cubriéndola con un cubreobjetos y sellándolo con pegamento plástico. Las láminas fueron incubadas durante toda la noche a 37 °C en una cámara húmeda.

Al día siguiente las láminas se lavaron con una solución de formamida al 50 % si las láminas se hibridaron con sondas para cromosoma 1 ó 9 y al 60% si eran hibridadas para el cromosoma 7. Después fueron lavadas con solución 2 x SSC y con amortiguador PN (amortiguador de fosfatos pH=8.0 conteniendo 0.5% de Nonidet p-40) para finalmente teñirlas con los anticuerpos correspondientes.

En el caso de las sondas marcadas con biotina se utilizó un anticuerpo anti-avidina-FITC (1:400) se realizó una amplificación de la señal con anticuerpos antiavidina-biotinilada (1:100) y anticuerpos anti-avidina-FITC (1:400). En el caso de las sondas marcadas con digoxigenina solo se utilizó anticuerpo anti-digoxigenina-FITC (1:100). Todos los anticuerpos se prepararon en amortiguador PNM (amortiguador PN conteniendo 5% de leche descremada). Las láminas fueron almacenadas a 4 °C hasta el análisis al microscopio.

Las sondas empleadas fueron las siguientes:

Sonda centrómerica α -satélite para el cromosoma 1 marcada con biotina ó digoxigenina (ONCOR), sonda centrómerica α -satélite para el cromosoma 7 marcada con digoxigenina (ONCOR) ó sonda centrómerica satélite clásica para el cromosoma 9 marcada con digoxigenina (ONCOR).

Análisis

Efecto aneuploidógeno.

a) Citogenética clásica

Se determinó la frecuencia de células hipoploides, hiperploides tetraploides y diploides en 200 metafases de segunda división de acuerdo al número de cromosomas que presentaban:

Número de cromosomas	Células
44-45	hipoploides
46	diploides(2n)
>47	hiperdiploides
4n	tetraploides

b) FISH

Se evaluó la proporción de núcleos con 0, 1, 2, 3, 4 ó más marcas de hibridación en un total de 1000 núcleos consecutivos utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus modelo BX60 con un filtro de excitación azul BP450-490 nm mediante el siguiente criterio:

0 marcas de hibridación = Ineficiente hibridación ó falta de penetración de la sonda.

1 marca de hibridación = Aparente hipodiploidia o sobreposición de las marcas de hibridación.

2 marcas de hibridación = Núcleo diploide (Figura C).

3, 4 ó más marcas de hibridación = Núcleo hiperdiploide (Figura D).

(Eastmond et al., 1990)

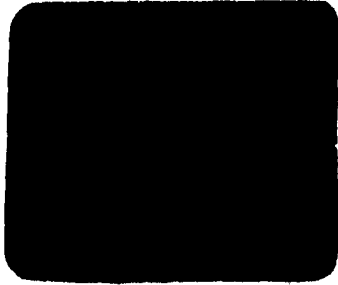


FIGURA C. Núcleo y metafase diploides

Núcleo interfásico y metafase diploides
para el cromosoma 9 en linfocitos humanos.

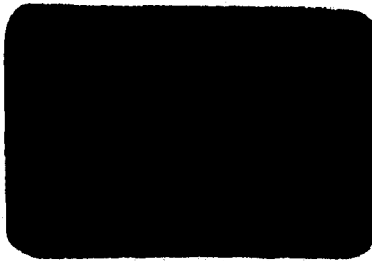


FIGURA D. Núcleos hiperdiploides

Núcleos hiperdiploides para el cromosoma
7 en linfocitos tratados *in vitro* con V₂O₅.

Efectos sobre la tubulina

a) Inmunofluorescencia

Para detectar los efectos sobre la β -tubulina esta proteína fue teñida siguiendo la técnica descrita por Zhang, 1994. Para ello, se cultivaron los linfocitos de sangre entera proveniente de un individuo sano extraídos por una columna de Ficoll-Hypaque. Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con glutamina y aminoácidos no esenciales durante 48 hrs estimulando su proliferación con PHA. En la última hora de cultivo las células fueron tratadas con arsenito de sodio y pentóxido de vanadio 10, 1 y 0.1 μM se incubaron nuevamente a 37 $^{\circ}\text{C}$. Transcurrido el periodo de cultivo las células se procesaron especialmente para ser teñidas de manera indirecta con anticuerpos anti- β tubulina y anti-IgG de ratón acoplados a fluoresceína. Las láminas así teñidas, se almacenaron a 4 $^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis al microscopio.

El análisis al microscopio fue cualitativo y consistió en el examen de figuras mitóticas anormales tales como: organización de la β -tubulina mitosis monopolares, multipolares, presencia o ausencia de microtúbulos e intensidad de fluorescencia

Se utilizó un microscopio de epifluorescencia Olympus, modelo BX60, con un filtro de excitación azul BP450-490 nm.

b) Polimerización de la tubulina

Para determinar el efecto del NaAsO_2 y del V_2O_5 sobre la polimerización de la tubulina inducida por Trifosfato de guanosa (GTP), se purificó la tubulina del cerebro de ratones recién nacidos. La purificación se llevo a cabo mediante ciclos de polimerización y depolimerización inducidos por el GTP a una temperatura y un pH específicos.

La tubulina fué extraída del cerebro de 150 ratones recién nacidos. El tejido se homogenizó en amortiguador de re-ensamble (EGTA, $MgCl_2$, MES y GTP $pH=6.4$). Una vez homogeneizado, se centrifugó a 55.000 x g durante 1 hora a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se incubó a 37 °C durante 20 minutos para inducir el primer ciclo de polimerización en presencia de glicerol 8M (S_1) Figura 18. La tubulina se recuperó por centrifugación a 55,000 x g durante 1 hora a 25 °C (P_1). El sobrenadante se descartó (S_2). La pastilla 2 (P_2) se depolimerizó con buffer frío de re-ensamble y se incubó por 30 minutos en hielo (Primera depolimerización). Se recuperó el sobrenadante (S_3) descartando la pastilla 3 (P_3). La tubulina con un ciclo de polimerización (S_3) se almacenó a -20 °C en amortiguador de re-ensamble $pH=6.5$ con 25% de glicerol (Shelanski et al., 1973).

La tubulina utilizada en los ensayos, presentaba 2 ciclos de polimerización (P_4) Figura 6. (Shelanski et al.,1973) y su concentración fué determinada y ajustada a 1 mg/ml según Lowry et al., 1951 y Lacleite et al., 1980 respectivamente.

-Electroforesis-

La proteína purificada se caracterizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12.5%.

c) Ensayos de polimerización

Se incubó la proteína (1 mg/ml) durante 30 minutos a 37 °C con cada una de las concentraciones de los metales en estudio.

Las concentraciones a probar fueron las siguientes:

$NaAsO_2$ 10, 0.1, 0.001 μM

V_2O_5 0.1, 0.001, 0.00001 μM

Teniendo como control negativo y positivo medio de re-ensamble y colcemid 0.075 μM respectivamente.

Por otra parte, se hicieron ensayos para conocer los efectos de los metales sobre la polimerización de la tubulina (depimerización), las concentraciones probadas fueron:

NaAsO ₂	0.01, 0.001, 0.00001 μM
V ₂ O ₅	1, 0.01 μM

Los metales se adicionaron a los 5 y 9 minutos de iniciada la polimerización manteniendo en todo momento la temperatura de 37°C. La inducción de la polimerización se dió mediante la adición única de GTP a una concentración final de 1mM al minuto 1.

Los efectos del V₂O₅ y NaAsO₂ sobre la polimerización y depimerización de tubulina por acción de GTP a una concentración final de 1mM, se midió, registrando la turbidez inducida por el GTP en las muestras a 350 nm durante un tiempo total de 15 minutos a 37 °C en un espectro Beekman modelo DU-600. Las mediciones se registraron cada minuto y solo se agregó el GTP en el minuto 0.

XI. RESULTADOS Y DISCUSION

-Citogenética clásica y FISH-

Se estudió la inducción de aneuploidias en cultivos de linfocitos por el colcemid mediante la técnica citogenética clásica y FISH con el fin de comparar su reproducibilidad y sensibilidad en la detección de agentes aneuploidógenos.

Para la evaluación de las aneuploidias por la técnica clásica, se determinó la proporción de células diploides (2n), hipoploides (44-45 cromosomas), hiperploides (>46 cromosomas) y tetraploides (4n), en metafases de primera y segunda división.

Se realizaron cultivos de linfocitos estimulados con PHA de 2 individuos durante 72 h. En las últimas 24 h de cultivo las células se trataron con colcemid a una concentración 0.025, 0.05, 0.075 μM .

Como se muestra en la tabla I, el Colcemid indujo hipoploidias, hiperploidades y tetraploidias en células de segunda división y solo hipoploidias e hiperploidades en primera división.

La proporción de aneuploidias observadas en los controles se encontró en un rango de 5-6% en las células de primera división y entre 6-8% en células de segunda división (Tabla I).

Se observó que la inducción de heteroploidias fué ligeramente mayor en las células de segunda división que en células de primera división (Tabla I).

TABLA 1. Porcentaje de hipodiploidías, diploidías, hiperdiploidías y tetraploidías en células de primera y segunda división celular.

PRIMERA DIVISION

	HIPO	2n	HIPER	4n
Agente (µM) Colcemid				

Donador 1

0	5	95	0	0
0.025	11	82	7	0
0.05	22.5	70	7.5	0
0.075	14	72.5	13.5	0

Donador 2

0	5	94	1	0
0.025	11	80	9	0
0.05	17	71	10	2
0.075	18.3	65	14.7	2

SEGUNDA DIVISION

Agent (µM) Colcemid	HIPO	2n	HIPER	4n

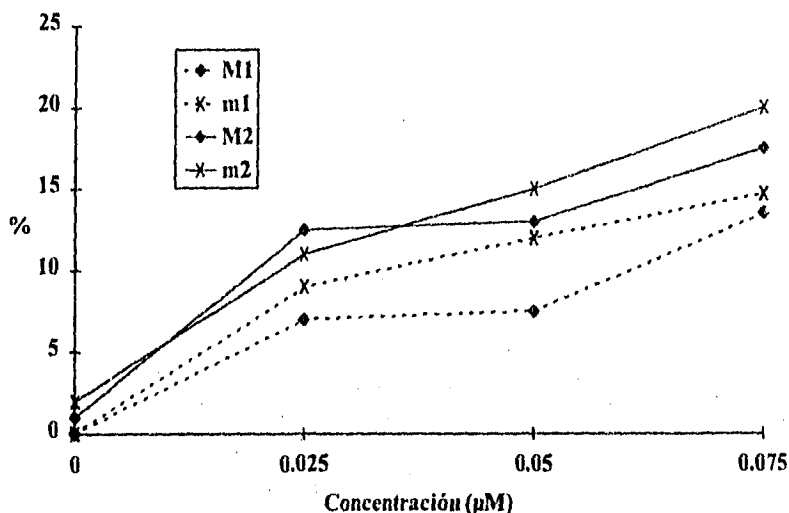
Donador 1

0	5.5	93.5	0.5	0.5
0.025	15.5	72	12.5	0
0.05	17	70	13	0
0.075	23.5	64	15.5	2

Donador 2

0	6	92	2	0
0.025	11	78	9	2
0.05	15	70	11	4
0.075	20	60	15	5

La inducción de hiperploídías por efecto del Colcemid en células de primera división presentó la misma tendencia ($y=176.7(x) + 1.35$, $r^2=0.8765$) que la proporción encontrada en las células de segunda división ($y=192(x) - 3.8$, $r^2=0.7931$) con relación a la dosis (Figura 1).



Primera División (M1)
 $Y=176.7(x) + 1.35$
 $r^2=0.8765$

Segunda división (M2)
 $Y=192(x) + 3.8$
 $r^2=0.7931$

Figura 1. Hiperploídías en primera y segunda división inducidas por colcemid.

Cultivos de linfocitos humanos se trataron durante las últimas 24 horas de cultivo con diferentes concentraciones de colcemid. Dos horas antes de la cosecha se agregó colcemid como arrestador mitótico y el material cosechado se tiñó mediante la técnica de fluorescencia-Giemsa (Perry-Wolf, 1974). Se contaron los cromosomas en 200 metafases de primera (M1) y segunda división (M2).

Donador 1 ♦ ♀ Donador 3 x ♂

Por otra parte al determinar la frecuencia de hiperdiploidías (núcleos con 3 o más marcas de hibridación) inducidas por colcemid para los cromosomas 1 y 9 mediante la técnica de FISH,

se observó al igual que con el método convencional, un comportamiento dosis respuesta (Cromosoma 1 $y= 53.86(x) + 0.3815$, $r^2= 0.8128$; Cromosoma 9 $y= 44.04(x) + 0.3385$, $r^2= 0.8959$) (Tabla 2, Figura 2).

TABLA 2. Número de linfocitos tratados con colcemid conteniendo 0, 1, 2, 3, 4 ó más marcas de hibridación para los cromosomas 1 y 9

Agente (μ M)	Marcas por núcleo				
	0	1	2	3	4 ó +
Donador 1					
Crs 1					
0	19	64	915	2	0
0.025	20	34	932	10*	4*
0.05	47	64	871	11*	7*
0.075	62	85	825	23*	5*
Crs 9					
0	17	58	923	2	0
0.025	33	84	969	10*	2*
0.05	34	56	899	9*	2*
0.075	21	83	887	19*	11*
Donador 2					
Crs 1					
0	11	50	931	6	2
0.025	15	50	921	11*	3*
0.05	37	88	842	26*	7*
0.075	49	98	808	32*	13*
Crs 9					
0	9	44	950	4	2
0.025	25	75	888	9*	3*
0.05	2	49	930	22*	8*
0.075	4	43	918	12*	21*

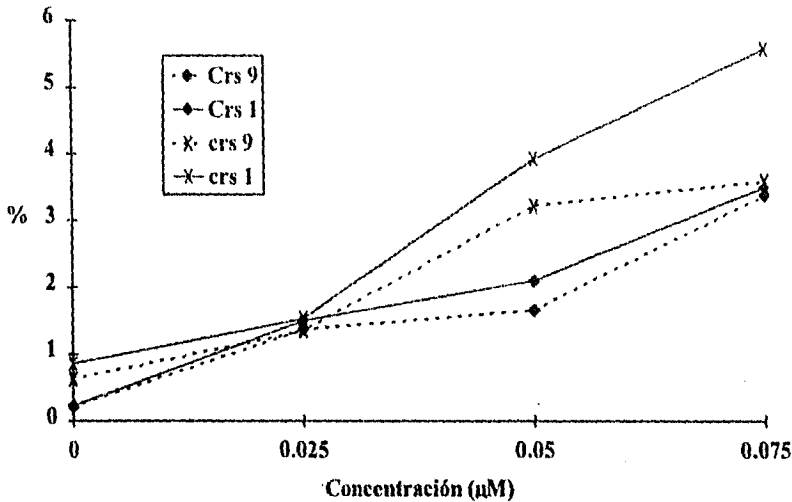


Figura 2. Hiperdiploidías inducidas por colcemid para los cromosomas 1 y 9.

Cultivos de linfocitos humanos se trataron durante las últimas 24 horas de cultivo con diferentes concentraciones de colcemid. El material cosechado y fijado se hibridó con sondas DNA específicas para los cromosomas 1 ó 9.

Donador 1 ♦ ♀ Donador 3 × ♂

No se encontró una sensibilidad especial en la inducción de hiperdiploidías por el colcemid para alguno de los cromosomas en estudio, el comportamiento dosis-respuesta se mantuvo al sumar el efecto para ambos cromosomas ($y=47.449(x) + 0.385$, $r^2=0.8026$).

Las diferencias encontradas en las frecuencias de 0, 1 y 2 zonas de hibridación para los cromosomas estudiados tampoco fueron significativas (Tabla 2).

Las proporciones de hiperdiploidías fueron significativamente diferentes ($p < 0.05\%$) respecto al control (0.12-0.56%) alcanzando niveles de hasta de 5.57% en la concentración máxima evaluada de colcemid (0.075 μM) para el cromosoma 1 (Figura 2).

Se observó una reproducibilidad del efecto obtenido en la técnica citogenética clásica y FISH ya que con ambos métodos la inducción de células hiperploides siguió un comportamiento dosis-respuesta (Figuras 1).

Evaluando la sensibilidad del método convencional y la técnica de FISH en la evaluación de agentes potencialmente aneuploidógenos, hay que considerar que mediante la técnica clásica se evalúa el total de los cromosomas ($46/46 = 100\%$) mientras que por FISH, solo se evaluó en este caso, $4/46$ del genoma aproximadamente el 2.2% (2 cromosomas).

Sin embargo debemos ser cuidadosos en la evaluación del efecto aneuploidógeno por ambas técnicas.

En el caso de la técnica de FISH existe la posibilidad de que los núcleos evaluados contengan rompimiento(s) cromosómico(s) en la región de hibridación con lo que se sobrestimaría el efecto aneuploidógeno del agente al contar núcleos que presentan 3 o más zonas de hibridación por un efecto clástogeno del agente y no por un efecto aneuploidógeno (Figura B). Esto se presenta generalmente en la evaluación de agentes clástógenos con potencial aneuploidógeno como el benceno (Rupa et al., 1995, Eastmond et al., 1990).

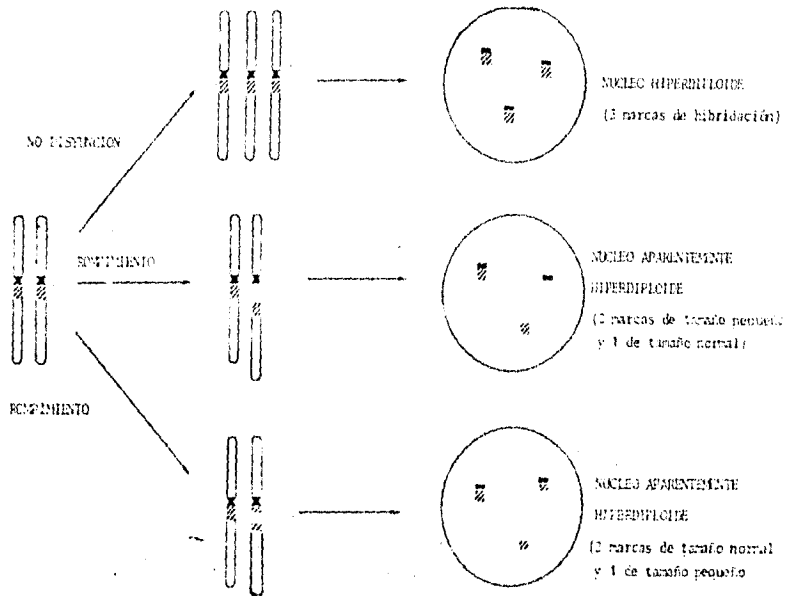


FIGURA B. Aneuploidías aparentes.

(Tomado de : Eastmond et al., 1994)

Existen también los factores técnicos como el análisis de las marcas de hibridación, métodos y condiciones de hibridación. entre otros, los que influyen y algunas veces dificultan la interpretación de los resultados. (Eastmond et al., 1995).

Otro factor que posiblemente influye en la evaluación de aneuploidias en los linfocitos humanos cultivados es que, mediante FISH no podemos saber si los núcleos analizados se han

dividido o no en presencia del agente a estudiar. Si esto es cierto, se estaría "subestimando" el efecto del agente en estudio.

En el caso de la técnica convencional, el principal inconveniente se da por causas técnicas (Pérdida o ganancia de cromosomas al realizar las preparaciones) y por el tiempo invertido en la evaluación.

Considerando los resultados anteriores podemos decir que la técnica de FISH resultó apropiada en la evaluación del colcemid como agente aneuploidógeno.

-Aneuploidías inducidas por V₂O₅ y NaAsO₂-

Una vez que se demostró la actividad aneuploidógena del Colcemid mediante las técnicas de citogenética clásica y de FISH, se estudió el efecto aneuploidógeno que ejerce el pentóxido de vanadio (V₂O₅) y arsenito de sodio (NaAsO₂) sobre los linfocitos.

El rango de concentraciones evaluadas fué de 0.1-0.001 uM para el V₂O₅ y el NaAsO₂ , ya que en estudios previos, se encontró que la mayor inducción de las células hiperdiploides se daba en este rango de concentracion. Las células fueron cultivadas durante 72 hrs y a las 48 horas de iniciado el cultivo fueron tratadas con los metales en estudio.

Se observó que la inducción de hiperdiploidías por V₂O₅ fué dosis dependiente para el cromosoma 1 ($y = 14.2438(x) + 0.68$, $r^2 = 0.7273$) y 7 ($y = 17.33(x) + 0.92$, $r^2 = 0.6776$) en los individuos estudiados (Tabla 3 y Figura 3).

TABLA 3. Proporciones de hiperdiploidías en linfocitos tratados con V₂O₅.

Agente (uM)	V ₂ O ₅ Crs 1			V ₂ O ₅ Crs 7		
	Media [⊕]	±	Desv. estándar	Media [⊕]	±	Desv. estándar
0	0.17	±	0.12	0.2	±	0.18
0.001	0.76	±	0.66	1.03	±	0.76
0.01	1.34	±	0.62	1.78	±	1.19
0.1	2.06	±	0.79	2.58	±	1.20
Colcemid	3.08	±	0.40	3.53	±	1.17

Nota: ⊕ = Promedio de los 6 datos.

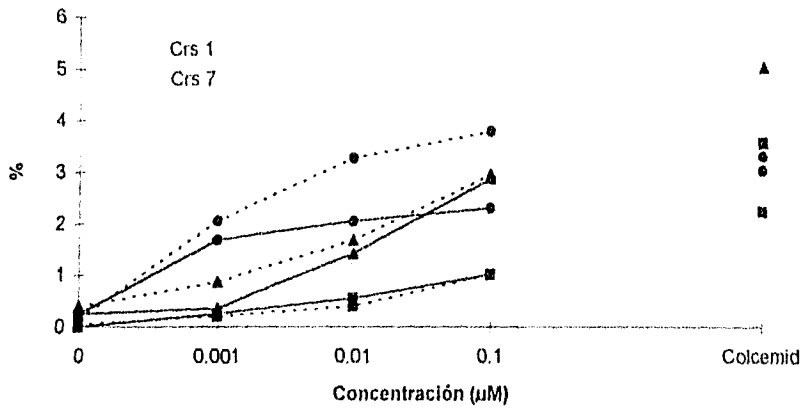


Figura 3. Hiperdiploidías inducidas por V₂O₅ para los cromosomas 1 y 7.

Cultivos de linfocitos humanos se trataron durante las últimas 24 horas de cultivo con diferentes concentraciones de V₂O₅. El material cosechado y fijado se hibridó con sondas DNA específicas para los cromosomas 1 ó 7.

Donador 1 ■ ♀ Donador 2 ▲ ♀ Donador 3 ● ♂

Los núcleos hiperdiploides inducidos por el V₂O₅ tanto para los cromosomas 1 y 7 representan entre el 0.23 y 4.27%. Esta proporción fué significativamente diferente ($p < 0.05$) de la que se observó en los controles negativos (0-0.5%) y en los positivos (2.14-5.26%) en todas las concentraciones evaluadas. (Tabla 4).

TABLA 4. Número de linfocitos tratados con V₂O₅ conteniendo 0, 1, 2, 3, 4 ó más marcas de hibridación para los cromosomas 1 y 7

Agente (µM)	Marcas por núcleo				
	0	1	2	3	4 ó +
Donador 1					
Crs 1					
0	40 [@] /50 [@]	55/47	905/903	0/0	0/0
0.001	49/54	52/46	897/897	2/3*	0/0
0.01	35/35	66/68	894/890	5/6*	0/1*
0.1	29/40	71/74	890/876	10/7*	0/3*
Colcemid	50/46	65/61	860/867	22/19	3/7
Crs 7					
0	90/49	43/45	867/905	0/1	0/0
0.001	53/34	70/66	872/898	2/2*	0/0
0.01	60/49	39/38	898/908	3/4*	0/1*
0.1	71/61	49/38	770/891	9/7*	1/3*
Colcemid	33/43	100/70	846/864	19/22	2/1
Donador 2					
Crs 1					
0	59/53	39/29	899/899	3/2	0/0
0.001	50/60	43/35	888/890	18/13*	0/2*
0.01	50/63	57/31	872/887	19/15*	2/4*
0.1	47/49	50/48	881/880	18/13*	4/10*
Colcemid	90/43	65/64	814/865	27/25	4/3
Crs 7					
0	53/22	47/67	897/911	3/0	0/0
0.001	79/37	68/45	832/899	20/17*	1/2*
0.01	43/28	56/52	866/892	26/23*	9/5*
0.1	29/32	60/57	870/879	39/31*	2/1*
Colcemid	36/22	86/91	843/858	23/27	12/2
Donador 3					
Crs 1					
0	40/47	75/37	883/914	2/1	1/1
0.001	50/48	95/34	850/915	2/3*	2/0*
0.01	43/39	100/43	844/903	7/8*	6/7*
0.1	39/61	85/38	850/871	16/13*	10/17*
Colcemid	36/55	86/53	843/858	23/33	12/1
Crs 7					
0	49/51	89/74	859/872	3/2	2/1
0.001	71/64	93/83	830/845	5/7*	4/1*
0.01	63/58	87/77	835/850	15/13*	3/2*
0.1	71/49	95/39	803/886	21/17*	10/9*
Colcemid	49/51	100/89	801/814	39/37	11/9

Notas: @=Duplicado del primer experimento (*)

*= Significativo respecto a los controles

ANOVA - FISHER p<0.05 %

No se encontró una sensibilidad especial en la inducción de hiperdiploidías por el V_2O_5 para alguno de los cromosomas en estudio, el comportamiento dosis-respuesta se mantuvo al sumar el efecto para ambos cromosomas.

La inducción de núcleos hiperdiploides fué diferente para cada uno de los individuos estudiados, esto podría sugerir que existe una susceptibilidad individual en la inducción de células hiperdiploides por V_2O_5 en los donadores estudiados (Figura 3), ésa susceptibilidad puede ser atribuida a diferencias biotransformantes en el metabolismo del óxido de vanadio.

Estas diferencias ya han sido observadas para algunos compuestos, tal es el caso del diepoxibutano, niclosamida y metronidazol en donde se cree que éstas diferencias se presentan a nivel genético (Wiencke et al., 1992; Ostrosky-Wegman et al., 1986; Elizondo et al., 1994).

Con respecto al $NaAsO_2$, las evidencias estadísticas muestran que la inducción de núcleos hiperdiploides para el cromosoma 1 y 7 siguió un comportamiento dosis respuesta en los individuos estudiados (cromosoma 1 $y = 13.6912(x) + 0.7226$, $r^2 = 0.7089$; cromosoma 7 $y = 10.9515(x) + 0.7636$, $r^2 = 0.8465$) (Tabla 5 y Figura 4).

TABLA 5. Número de linfocitos tratados con NaAsO₂ conteniendo 0, 1, 2, 3, 4 ó más marcas de hibridación para los cromosomas 1 y 7.

Agente (µM)	Marcas por núcleo				
	0	1	2	3	4 ó +
Donador 1					
Crs 1					
0	59/49@	39/46	899/901	3/4	0/0
0.001	54/37	47/66	890/889	9/7*	0/1*
0.01	30/49	59/51	894/886	16/13*	1/1*
0.1	50/64	48/48	882/882	15/18*	5/0*
Colcemid	90/68	65/71	814/829	27/30	4/2
Crs7					
0	18/27	37/47	945/925	0/1	0/0
0.001	25/34	45/63	923/898	6/5*	1/0*
0.01	31/41	41/68	917/881	11/6*	0/4*
0.1	29/29	36/71	921/883	13/12*	1/5*
Colcemid	31/39	39/83	903/847	26/30	1/1
Donador 2					
Crs1					
0	35/38	34/20	931/941	0/1	0/0
0.001	40/45	30/30	922/918	8/6*	0/1*
0.01	20/35	46/36	923/917	11/7*	0/5*
0.1	30/43	51/38	897/899	18/19*	4/1*
Colcemid	50/50	43/43	877/866	28/27	1/1
Crs7					
0	22/31	67/51	911/917	0/1	0/0
0.001	24/40	68/71	900/878	8/9*	0/2*
0.01	15/27	63/56	911/903	11/9*	0/5*
0.1	47/23	78/53	854/905	17/10*	4/9*
Colcemid	22/35	91/59	858/875	27/28	2/3

Nota: @=Duplicado del primer experimento (**)

*= Significativo respecto a los controles
ANOVA-FISHER P< 0.05%

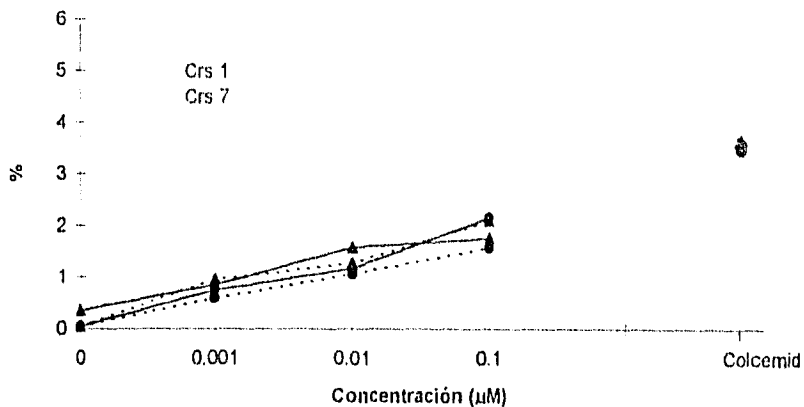


Figura 4. Hiperdiploidías inducidas por NaAsO₂ para los cromosomas 1 y 7.

Cultivos de linfocitos humanos se trataron durante las últimas 24 horas de cultivo con diferentes concentraciones de NaAsO₂. El material cosechado y fijado se hibridó con sondas DNA específicas para los cromosomas 1 ó 7.

Donador 1 ● ♀ Donador 2 ▲ ♂

La proporción de células hiperdiploides en cada una de las concentraciones evaluadas fueron significativamente diferentes respecto a los controles negativos (0-0.4%) y positivos (2.77-3.09%) (Tabla 6).

TABLA 6. Proporciones de hiperdiploidías para los cromosomas 1 y 7 en linfocitos tratados con NaAsO₂.

Agente (μ M)	NaAsO ₂ Crs 1			NaAsO ₂ Crs 7		
	Media [⊕]	±	Desv. estándar	Media [⊕]	±	Desv. estándar
0	0.2	±	0.16	0.5	±	0.05
0.001	0.8	±	0.07	0.78	±	0.22
0.01	1.37	±	0.24	1.16	±	0.15
0.1	2.04	±	0.15	1.83	±	0.30
Colcemid	3.17	±	0.09	3.04	±	0.18

Nota: ⊕ = Promedio de los 4 datos.

Al igual que con el V₂O₅, no se detectó una sensibilidad especial en la inducción de hiperdiploidías por el NaAsO₂ para alguno de los cromosomas en estudio, el comportamiento dosis-respuesta se mantuvo al sumar el efecto para ambos cromosomas.

Cabe mencionar que la proporción de células hipodiploides en promedio para el cromosoma 1 fué ligeramente mayor comparada con la encontrada para el cromosoma 7 probablemente por la sensibilidad que presenta la región heterocromática a rompimientos (Tabla 7) (Eastmond et al., 1989).

Con respecto a los núcleos con una o ninguna marca de hibridación (aparentemente hipodiploides) tablas 4 y 6, se observa que la frecuencia combinada es varias veces mayor que la observada para núcleos hiperdiploides y mucho mayor con respecto a los valores basales determinados en el laboratorio por citogenética clásica (aproximadamente 0.25%).

Estas diferencias, pueden ser atribuidas a: Ineficiencia en la penetración de la sonda, pérdida cromosómica o no disyunción, rompimientos en la zona de hibridación y por sobreposición de las zonas de hibridación de las copias cromosómicas.

Aunado a lo anterior, el comportamiento en la inducción de hipodiplaidías para los cromosomas en estudio no fué claro (Tablas 5 y 6).

Consideramos por lo tanto que la técnica de FISH no fué apropiada en la evaluación de núcleos hipodiploides ya que existe una alta probabilidad de que se esté sobreestimando el efecto hipodiploide para un cromosoma.

-Efectos sobre la tubulina.-

Para investigar el efecto del V_2O_5 y el $NaAsO_2$ sobre el huso mitótico a nivel de la organización microtubular se estandarizó la técnica de inmunofluorescencia descrita por Luoping, Z. 1994, utilizando anticuerpos específicos anti- β tubulina.

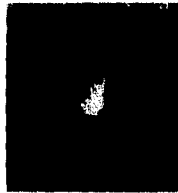
Se observó que las células tratadas con V_2O_5 presentaban configuraciones mitóticas anormales encontrando principalmente mitosis monopolares en 10(a), 0.1(b), 0.001 (c) μM (Figura 5), en el control (d) se observó la tinción homogénea de la tubulina. En la concentración máxima evaluada (10 μM) se presentó una desorganización microtubular completa semejante a la que se presentó con el colcemid (e) (control positivo), alterándose en consecuencia, el citoesqueleto en el linfocito, en algunos casos, se observaron sólo los centros organizadores de microtúbulos.

El efecto del $NaAsO_2$ sobre la integridad microtubular a las mismas concentraciones evaluadas fué similar al del observado con V_2O_5 . Se presentó una completa desorganización y mitosis monopolares en la concentración máxima evaluada (f). Mientras que a 0.1 (g) y 0.001 (h) μM predominaban las mitosis monopolares.

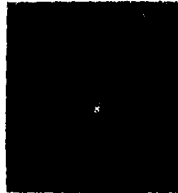
Los efectos observados mediante el análisis inmunofluorescente del huso mitótico reflejan la interacción de los metales en estudio con la tubulina.



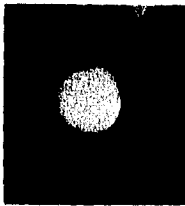
a



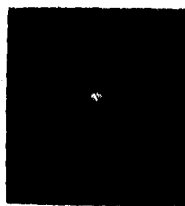
b



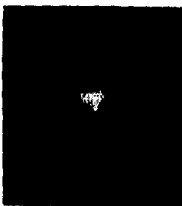
c



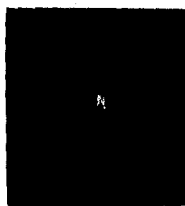
d



e



f



g



h

Figura 5. Alteraciones inducidas al huso mitótico en linfocitos.

Se tiñó, por tinción inmunofluorescente indirecta, la β -tubulina de linfocitos tratados *in vitro* con NaAsO_2 10 (a), 0.1 (b) y 0.001 (c) μM . Los resultados se compararon con linfocitos sin tratamiento (d) y tratados con colcemid (e).

También se evaluó el efecto inducido por V_2O_5 en el mismo rango de concentraciones: 10 (f), 0.1 (g) y 0.001 (h) μM .

Para conocer el efecto del NaAsO_2 y del V_2O_5 específicamente sobre la polimerización *in vitro* de la tubulina, se purificó la tubulina a partir del cerebro de ratones recién nacidos mediante ciclos de polimerización y depolimerización.

Los resultados obtenidos mostraron que se logró purificar la tubulina a partir de extractos crudos de tejido cerebral provenientes de ratones recién nacidos. En la figura 6 se puede observar que en el extracto obtenido (P_4) y después de haber tenido 2 ciclos de polimerización-depolimerización; la proteína mayoritaria en la muestra presentaba un peso molecular de aproximadamente 55 KDa y que corresponde al peso molecular de la tubulina.

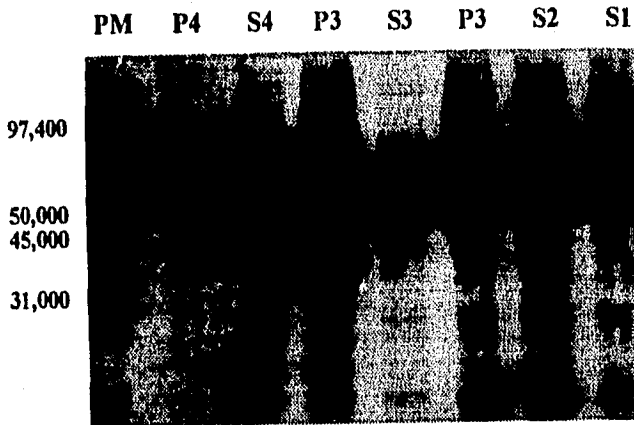


Figura 6. Análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida.

Las proteínas fueron extraídas del cerebro de ratones recién nacidos mediante ciclos de polimerización y depolimerización.

P_x y S_x = Corresponden a las fracciones obtenidas de la separación diferencial a partir del homogenado inicial S_1 .

La fracción P_4 corresponde a la tubulina aislada después de 2 ciclos de polimerización y depolimerización.

Las fracciones S_3 corresponden a las proteínas obtenidas después de la fracción de un ciclo de polimerización y depolimerización

Una vez purificada la tubulina se hicieron los ensayos de polimerización, en los que se observó que el arsenito de sodio presentó un efecto inhibitorio sobre la polimerización de la tubulina a las concentraciones evaluadas.

El NaAsO_2 $0.001 \mu\text{M}$ fue suficiente para producir una inhibición en la polimerización de la tubulina del 46.30% respecto al control negativo. el efecto fue semejante cuando se probaron dosis de NaAsO_2 $0.1 \mu\text{M}$ (Figura 7).

La máxima inhibición de la polimerización por arsénico se dió a una concentración de $1 \mu\text{M}$ y fue de 48.8% a los 15 minutos de inducida la polimerización (Figura 7).

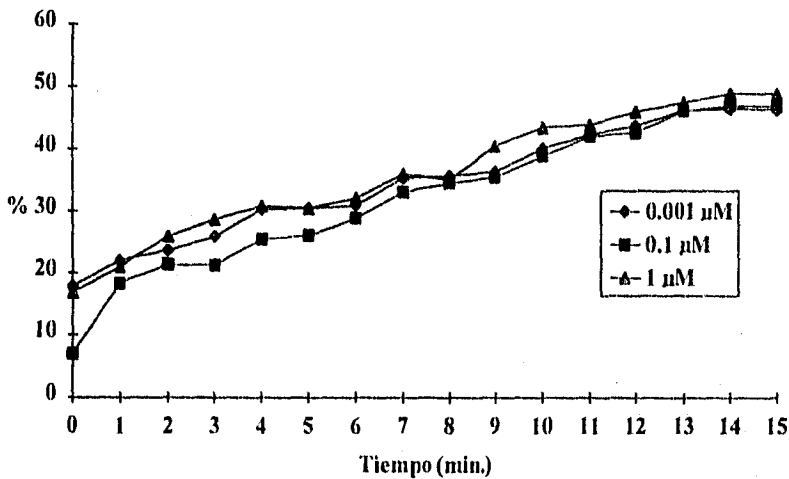


Figura 7. Inhibición de la polimerización de tubulina inducida por NaAsO_2 .

La tubulina extraída de cerebro de ratones recién nacidos ($1-2 \text{ mg/ml}$) se incubó durante 30 minutos con diferentes concentraciones de NaAsO_2 . Se determinó la polimerización inducida por GTP (1 mM) mediante mediciones espectrofotométricas de la turbidez durante 15 minutos.

Se observó por otro lado, que el NaAsO_2 no sólo es capaz de inhibir la polimerización de la tubulina sino que también es capaz de depolimerizar los microtúbulos previamente formados *in vitro* a las concentraciones de 0.01, 0.001 y 0.00001 μM . Esto se presentó desde los primeros 5 minutos de iniciada la polimerización el mismo efecto fué observado a los 9 minutos de iniciada la polimerización llegando a ser de hasta 23% respecto a la turbidez observada antes de la adición de arsenito (Figura 8)

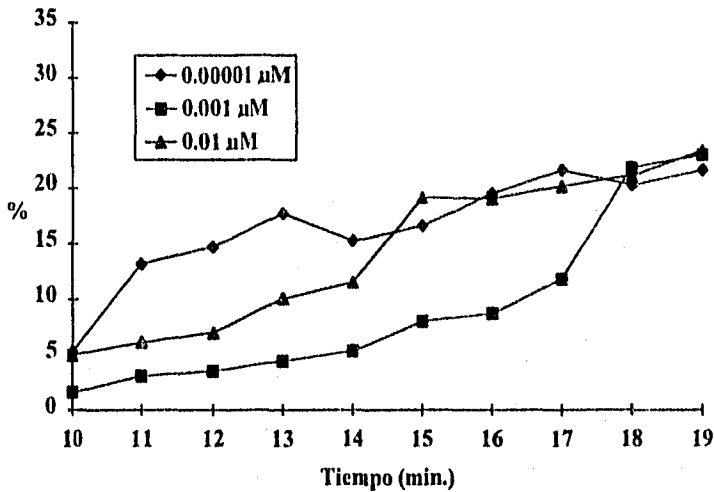


Figura 8. Depolimerización de tubulina inducida por NaAsO_2 .
La polimerización de la tubulina (1-2 mg/ml) se indujo por adición única de GTP (1mM). Diferentes concentraciones de NaAsO_2 se adicionaron a los 9 minutos de iniciada la polimerización. Se determinó la polimerización mediante mediciones espectrofotométricas de la turbidez hasta los 19 minutos.

En el caso del V_2O_5 los efectos observados fueron similares a los encontrados con el arsénito de sodio. El V_2O_5 $0.1 \mu M$ fué capaz de inhibir en un 53.63% la polimerización de la tubulina a los 15 minutos de inducción. La inhibición observada fué ligeramente mayor a la que se presentó en la concentración de $1 \mu M$ esto debido quizá a la toxicidad causada por el V_2O_5 a esa concentración (Figura 9).

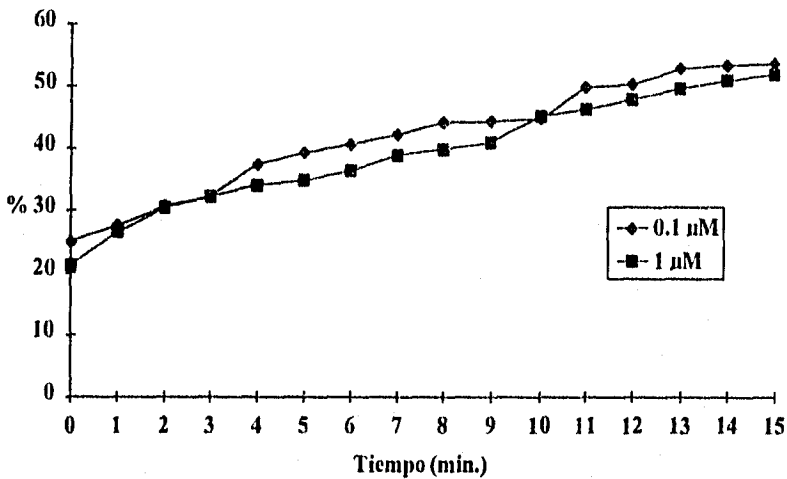


Figura 9. Inhibición de la polimerización de tubulina inducida por V_2O_5 .

La tubulina extraída de cerebro de ratones recién nacidos (1-2 mg/ml) se incubó durante 30 minutos con diferentes concentraciones de V_2O_5 . Se determinó la polimerización inducida por GTP (1 mM) mediante mediciones espectrofotométricas de la turbidez durante 15 minutos.

El V_2O_5 0.01 y 1 μM adicionado a los 9 minutos de iniciada la polimerización de la tubulina fué capaz depolimerizar los microtúbulos *in vitro* llegando a ser de hasta el 29.83% después de 11 minutos de haber agregado el vanadio (Figura 10).

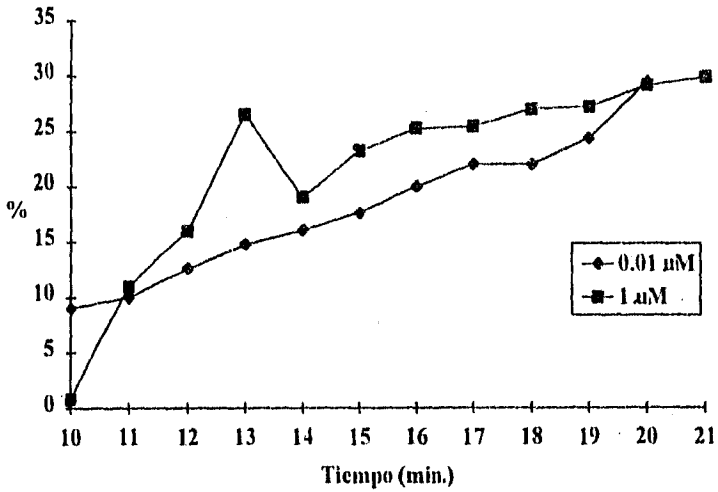


Figura 10. Depolimerización de tubulina inducida por V_2O_5 .

La polimerización de la tubulina (1-2 $\mu g/ml$) se indujo por adición única de GTP (1 mM). Diferentes concentraciones de V_2O_5 se adicionaron a los 9 minutos de iniciada la polimerización. Se determinó la polimerización mediante mediciones espectrofotométricas de la turbidez hasta los 21 minutos.

Los resultados anteriores muestran que el V_2O_5 y el $NaAsO_2$ *in vitro* interactúan directamente con la tubulina alterando los procesos de polimerización-depolimerización de esta proteína a las concentraciones evaluadas. Esto incrementa la probabilidad de que se presenten células aneuploides durante la división celular por la inadecuada formación del huso mitótico alterándose la segregación cromosómica a las concentraciones evaluadas.

Se sabe que el As y el V ejercen su toxicidad por unión a grupos sulfhidrilo presentes en muchas proteínas (Sunderman et al. 1979; Goyer et al., 1986; Li y Chou et al., 1992; Berg, 1986).

El As y el V son capaces de inhibir enzimas involucradas durante el ciclo celular como las fosfatasas que requieren para llevar a cabo su actividad catalítica de grupos sulfhidrilo; tal es el caso de ATP fosfatasas (dineína), serin/treonin fosfatasas entre otras (Jones y Basinger et al., 1983).

Las evidencias anteriores son importantes ya que cabe la posibilidad de que los metales en estudio, interactúen con los grupos sulfhidrilo presentes en la molécula de la tubulina proteína formadora de los microtúbulos alterando los procesos de la polimerización-depolimerización de ésta proteína y en consecuencia el ensamble de microtúbulos.

Así, al entrar las células en división en presencia del V_2O_5 y el $NaAsO_2$ el material genético no se distribuye correctamente por falta o daño del huso mitótico.

XI. CONCLUSIONES

Considerando los resultados anteriores, podemos concluir que el arsenito de sodio y el pentóxido de vanadio:

1. Inducen células aneuploides en cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro* y éstas pueden ser detectadas mediante la técnica de FISH.
2. Alteran el ensamble de los microtubulos y los microfilamentos en linfocitos proliferantes *in vitro*.
3. Inhiben la polimerización de tubulina *in vitro*.
4. Alteran el proceso de depolimerización de tubulina *in vitro*.
5. La técnica de FISH es un método útil en la evaluación de agentes con potencial aneuploidógeno y durante su estudio hay que considerar particularmente los factores (técnicos y celulares) influyentes en ésta evaluación.

XIII. REFERENCIAS

- Albores, A., Cebrián, M.E., Téllez, I. y Valdez, B. 1979. Estudio de hidroarsenicismo crónico en dos comunidades de la Región Lagunera de México. Bol. Of. Sanit. Panam. 86.196-205.
- Alloway, B.J. Ed. 1990. Heavy metals in soils. Blackie, Londres. pp. 83-99.
- Archer, J. y Solomon, F. 1994. Cell. 76. 589-591.
- Argüello, P.L. 1979. El problema del arsenicismo crónico. Introducción al tema. Bol. Acad. N.A. Med. Supl. 55.119-147.
- Astolfi, E., Maccagno, A., García-Fernández, J.C., Vaccaro, R. y Stímola, R. 1981. Relation between arsenic in drinking water and skin cancer. Biol. Trace Elements Res. 3.134-143.
- ATSDR. 1989. Toxicological Profile for Arsenic. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) U.S. Public Health Service, Oak Ridge National Laboratory, USA.
- Bates, M.N., A.H. Smith y C. Hopenhayn-Rich 1992. Arsenic ingestion and internal cancers: a reviews. Am. J. Epidemiol., 135. 462-476.
- Baroch, E.F. 1983 Vanadium and vanadium alloys. in Encyclopedia of Chemical Technology. Vol. 23, John Wiley and Sons, New York pp. 673-687.
- B. Alberts, D.Bray, J. Lewis, M Ralf, K. Roberts y J.D. Warson (Eds). 1983. Molecular Biology of the cell. Garland Press, New York.
- Becker, W.M. 1986. The world of the cell. The Benjamin/ Cununings Publishing Company, Inc.
- Bencko, V. 1987. Arsenic. in: Genotoxic and Carcinogenic Metals: Environmental and Occupational Ocurrence and Exposure. Fishbein, L., Furst, A. and Mehlman, M.A. Eds. Princenton Scientific Publishing Co. New Jersey. pp 1-30.
- Bergen, L.G., Kuriyama, R. y Borisy, G.G. 1980. Polarity of microtubules nucleated by centrosomes and chromosomes of chinese hamster ovary cells in vitro. J. Cell Biol. 84. 151-159.

Bertolero, F.G., Kuriyama, R. y Borisy, G.G. 1980. Polarity of microtubules nucleated by centrosomes and chromosomes of chinese hamster ovary cells in vitro *J. Cell Biol.* 84, 151-159.

Biagini, R.E. 1975. Hidroarsenicismo crónico en la República Argentina. *Med. Cutan. Ibero. Lat. Am.* 3,423-432.

Bond, D. J., Chandler, A.C. 1983. "Aneuploidy" Oxford monographs in Medical Genetics. No. 11 Oxford : Oxford University Press.

Borgoño, J.M., Vincent, P., Venturino, H. e Infante, A. 1977. Arsenic in the drinking water of the city of Antofagasta: epidemiological and clinical study before and after the installation of a treatment plants. *Environ. Health Perspect.* 19,103-105.

Brown, D.J. y J.A. Gordon 1984 The stimulation of pp60^{v-src} tyrosine kinase activity by vanadate in intact cells accompanies a new phosphorylation state of the enzyme *J. Biol. Chem.*, 259, 9580-9586.

Browning, E. 1969 Vanadium, in: Toxicity of industrial metals, Second edition. Bytterworth, New York, pp.340.

Bryson, P.D. 1989. Comprehensive Review in Toxicology 2a. Ed Aspen Publishers, Inc. Rockville, Maryland Royal Tunbridge Wells. 53-60, 501-508.

Buchet, J.P., Lauwerys, R. y Roels, H. 1981. Comparison of the urinary excretion of arsenic metabolites after a single oral dose of sodium arsenite, monomethylarsonate or dimethylarsinate in man, *Inst. Arch. Occup. Environ. Health.* 48, 71-79.

Byrne, A. R. y Kosta, L. 1978. Vanadium content in foods and in human body fluids and tissues. *Sci. Total Environ.*, 10, 17-30.

Cande, W.Z. y Wolniak, S.M. 1978. Chromosome movement in lysed mitotic cells in inhibited by vanadate *J. Cell Biol.*, 79, 573-580.

Cebrián, M.E., Albores, A., Aguilar, M. and Blakely, E. 1983. Chronic arsenic poisoning in the north of México. *Hum. Toxicol.* 2,121-123.

Chen, C.-J. y Wang, C.-J. 1990. Ecological correlation between arsenic level in well water and age-adjusted mortality from malignant neoplasms. *Cancer Res.* 50, 5470-5474.

Cherian, G. Metallothionein and metal toxicity. CRC Press. U.S.A. 1987. pp 2223-2224.

Chou, I. 1989. Distinct cytoskeletal injuries induced by As, Cd, Co, Cr and Ni compounds. *Biomed. Environ. Sci.* 2,358-365.

Cimino, M., Tice, R. y Liang, J. 1986. Aneuploidy in mammalian somatic cells in vivo, *Mutation Res.*, 167, 107-122

Ciranni, R., Antonetti, M. y Migliore, L. 1995. Vanadium salts induce cytogenic effects in vivo treated mice, *Mut. Res.* 343, 53-60.

Crecelius, E.A. 1977. Changes in the chemical speciation of arsenic following ingestion by man. *Environ. Health. Perspect.* 19,147-150.

Cuzick, J., Sasieni, P. y Evans, S. 1992. Ingested arsenic, keratoses, and bladder cancer. *Am. J. Epidemiol.* 136(4), 417-421.

Dauford, N. 1984. Measurements of levels of aneuploidy in mammalian cells using a modified hypotonic treatment. *Mutat. Res.*, 139, 127-132.

Del Razo, L.M., Arellano, M.A y Cebrián, M.E. 1990. The oxidation states of arsenic in well-water from a chronic arsenicosis areas of northern Mexico. *Environ. Pollut.*, 64,143-153.

Dellarco, V.L.; Mavroumín, K.H., Tice, R.R. 1985a. *Aneuploidy: Etiology and Mechanisms.* New York: Plenum.

De Sario, A., Vagnarelli, P. y De Carli, L. 1990. Aneuploidy assay on diethylstilbestrol by means of *in situ* hybridization of radioactive and biotinylated DNA probes on interphase nuclei. *Mutat. Res.* 243,127-131.

Dimond, E.J., Caravaca, J. y Benchimol, A. 1963 Vanadium, Excretion, toxicity, lipid effects in man, *Am J. Clin. Nutr.*, 12, 141-148.

Eastmond, D.A. y Pinkel, D. 1990. Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in situ* hybridization with chromosome-specific DNA probes. *Mutat. Res.* 234,303-318.

Eastmond, D.A., Rupa, D.S. y Hasegawa, L.S. 1994. Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutat. Res.* 322, 9-20.

Eastmond, D. y Tucker, J. 1989. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and a antikinetochores antibody. *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34-43.

Eastmond, D.A., Schuler, M. y Rupa, D.S. 1995. Advantages and limitations of using fluorescence *in situ* hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells. *Mut. Res.* 34, 153-162.

El Sadek, K.M. 1972. Mitotic inhibition and chromosomal aberrations induced by sinerylarsenic acids and its compounds in root-tips of maize. *Egypt. J Genet. Cytol.* 1, 218-224.

Elizondo, G., Montero, R., Herrera, J., Hong, E. y Ostrosky-Wegman, P. 1994. Lymphocyte proliferation and sister chromatid exchanges in individuals treated with metronidazole. *Mut. Res.* 305, 133-137.

Espinoza-González, E. 1963. Intoxicación colectiva por arsénico en Torreón, Coah., México. *Bol. Epidem. (México)*; 27, 213-220.

Euteneuer, U. y McIntosh, J.R. 1981. Structural polarity of kinetochores microtubules in PK1 cells. *J. Cell Biol.* 89, 338-345.

Faulkner-Hudson, T.G.H. 1964 *Vanadium. Toxicology and Biological Significance*, Elsevier, Amsterdam.

Fitzgerald, P.H. y McEwan, C.M.. 1977. Total aneuploidy and age-related sex chromosome aneuploidy in cultured lymphocytes of normal men and women. *Hum. Genet.*, 39, 329-337.

Friberg, L., Nordberg, G.F., y Vouk, V.B. 1979. Handbook on the Toxicology of Metals. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.

French, R. J. y P.J.H Jones 1993 Role of vanadium in nutrition: metabolism, essentiality and dietary considerations, *Life Sci.*, 52, 339-346.

Ferguson, J. F. y Gavis, J. 1972. A review of the arsenic cycle in natural waters. *Water Res.* 6, 1259.

Galloway, S.M. y K.E. Buckton. 1978. Aneuploidy and ageing: chromosome studies on a random sample of the population using G-banding. *Cytogen. Cell Genet.* 20, 78-95.

GESAMP. 1976. Joint group of experts on the scientific aspects of marine pollution. Review of harmful substances. Reports and studies No.2, Doc. No. 76-98245, United Nations. New York.

Gibbons, I.R., Cosson, M.O., Evans, J.A., Gibbons, B.H., Houck, B., Martinson, K.H., Sale, W.S. y W.J.Y., Tang 1978. Potent inhibition of dynein adenosinetriphosphatase and of the motility of cilia and sperm flagella by vanadate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75 2220-2224.

Goldsmith, J.R. 1972. Evaluation of health implications of arsenic in well water. *Water Res.* 6, 1113-1136.

Gonsebatt, M.E. Vega, L. Montero, R., García Vargas, G., Del Razo, L.M., Albores, A., Cebrián, M.E. y Ostrosky-Wegman, P. 1994 Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water, *Mutation Res.* 313, 293-299.

Gonsebatt, M.E., Montero, R., Vega, L., Barba, H., Espinosa, J., García-Vargas, G., Del Razo, L., Cebrián, M.E. y Ostrosky-Wegman, P. 1992a. Genotoxic and non-genotoxic effects in arsenic human exposure, in: *Arsenic in the Environment and its Influence on Health*, Chile University, pp. 9-14.

Gonsebatt, M.E., Vega, L., Herrera, L.A., Montero, R., Rojas, E., Cebrián, M.E. y Ostrosky-Wegman, P. 1992b Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation, *Mutation Res.*, 283,91-95.

González, A., Hernández, A., Arreortua, H., Guzmán, J. y Mora, J. 1972. Arsenicismo crónico en una comunidad rural y subdesarrollada. *Rev. Inv. Sal. Pub.* 321, 82-88.

Goyer, R.A. 1986. Toxic effects of metals. in C.D. Klaassen, M.O. Andur y J. Doull (Eds), Gasarett y Doull's Toxicology, MacMillan, New York, 1986, 99 582-635.

Hansmann, I. 1983. Factors and mechanisms involved in nondisjunction and X-Chromosome loss. In Sandberg, A.A. (Ed): Cytogenetics of the Mammalian X Chromosome Part A. Basic Mechanism of X Chromosome Behavior. New York: Alan R. Liss, pp 131-170.

Harrington, J.M. 1978. A survey of a population exposed to high concentrations of arsenic in well water in Fairbanks, Alaska. Am. J. Epidemiol. 108, 377-385.

Hook, E. 1985 Maternal age, paternal age, and human chromosome abnormality: nature, magnitude, etiology and mechanisms of effects, in: V.L. Dellarco, P. Voytek and A. Hollaender (Eds.), Aneuploidy, Plenum Press, New York, pp. 117-131.

IARC. 1980. Monograph on the evaluation of the carcinogenic risk of Chemicals to humans. Some metal and metallic compounds, Vol. 23, International Agency for Research on Cancer, Lyon France.

Jacobson-Kranz, D. y Montalbo, D. 1985. The reproductive effects assesment groups report on the mutagenicity of inorganic arsenic. Environ. Mutagen 7, 787-804.

Johnson, J.L., Cohen, H.J., Rajagopalan, K.V. 1974. Studies of vanadium toxicity in the rat lack of correlation with molibdenum utilization. Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 940-946.

Jones, M.M. y Basinger, N.A. (1983) Chelate antidotes for sodium vanadate and vanadyl intoxication in mice, J. Toxicol. Environm. Health 12:749-756.

King, H. y Lundorfd. 1950. The relation between the constitution of arsenicals and their action on cell division. J. Chem. Soc. 8, 2086-2088.

Klarlund, J.K. 1985 Transformation of cells by an inhibitor of phosphatases acting on phosphotyrosine in proteins. Cell 41, 707-717.

Koren, H. 1991. Handbook of Environmental Health and Safety Principles and Practices, Lewis Publishers, 2a. ed. vol. I, pp. 109, 147-148, 243-244, 252, 449, 457.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Kobayashi, T., Martensen, T., Nath, J. y Flavin, M. 1978. Inhibition of dynein ATP_{ase} by vanadate, and its possible use as a probe for the role of dynein in cytoplasmic motility. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 81, 1313-1318.
- Laclette, J.P., Guerra, G. y Zetina, C. 1980. Inhibition of tubulin polymerization by mebendazole. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 92(2):417-423.
- Lanz, H., Jr., Wallace, P.W. y Hamilton, J.G. 1950. The metabolism of arsenic in laboratory animals 74 As as tracer. *Univ. Calif. Pub. Pharmacol.*, 2, 263.
- Lantzy, R. J. y Mackenzie, F.K. 1979. Atmospheric trace metals: Global cycles and assessment of man's impact. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 43, 511-525.
- Lerma, S. y Clarkson, T.W. 1983. The metabolism of arsenite and arsenate by rat. *Fund. Appl. Toxicol.*, 3, 309-314.
- Léonard, A. y Lauwerys, R.R. 1980. Carcinogenicity, Teratogenicity and mutagenicity of arsenic. *Mut. Res.* 75, 49-62.
- Léonard, A. y Gerber, G.B.. 1994. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds, *Mut. Res.*, 317, 81-88.
- Leva, A. 1945. Cytological reactions induced by inorganic salt solutions, *Nature (London)*, 156, 751-752.
- Li, J-H y Rossman, T.G. 1989. Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis. *Molec. Toxicol.* 2, 1-9.
- Lowry, D.H. , Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. *J. Biol. Chem.* 193, 265-274.
- Madany, I.M. y Raveendran, E. 1992 Polycyclic aromatic hydrocarbons, nickel and vanadium in air particulate mater in Bahrain during the burning of oil fields in Kuwait, *Sci. Tot. Environ.*, 116, 281-289.
- Madany, I.M. y Raveendran, E. 1992. Polycyclic aromatic hydrocarbons, nickel and vanadium in air particulate mater in Bahrain during the burning of oil fields in Kuwait, *Sci. Tot. Environ.*, 116, 281-289.

Manahan, S.E. 1991. Environmental Chemistry, Lewis Publishers, 5a. ed. USA, pp. 148, 152, 493-499, 504.

Marafante, E. y Vahter, M. 1984 The effect of methyltransferase inhibition on the metabolism of (⁷⁴As) arsenite in mice and rabbits, Chem. Biol. Interact. 50, 49-57.

McGill, M. y Brinkley, B.R. 1975 Human chromosomes and centrioles are nucleating sites for the in vitro assembly of microtubules from bovine brain tubulin. J. Cell Biol. 67, 188-199.

Mchintosh, J.R. y Euteneuer, U. 1984 Tubulin hooks as probes for microtubule polarity: an analysis of the method and evaluation of data on microtubule polarity in the mitotic spindle. J. Cell Biol. 98, 525-533.

Migliore, L.R., Bocciardi, C., Macri y F. Lo Jacono 1993. Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe, Mutation Res., 319, 205-213.

NAS. 1977. Medical and biologic effects of environmental pollutants: Arsenic, National Academy of Sciences, Washington. D. C.

Nechay, B. R. 1984. Mechanisms of action of vanadium. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.

Nelson, K.W. 1976. Industrial contributions of arsenic to the environment. Environ. Health Perspect. 19, 31.

Nordenson, I., Beckman, L. y Nordström, S. 1978. Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. II. Chromosomal aberrations in workers exposed to arsenic. Hereditas, 88, 47-50.

Núñez, B.R. 1994. Relación entre la biotransformación del arsénico y el desarrollo de tolerancia a sus efectos tóxicos. Tesis de Maestría CINVESTAV.

Nygren, A. 1949. Cytological studies of the effects of 2,4-DMCPA y 2,4,5-T on *Allium cepa*. Ann. Ro. Coll. (Sweden), 16, 273-278.

Oakley, B. R. 1989. Identification of γ tubulin a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. Nature, 338, 662-664.

Oakley, B.R., Oakley, C.E., Yoon, Y., Jung, M.D. 1990. γ tubulin Is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell*, 61, 1289-1301.

Okui, T. y Fujiwara, Y. 1986. Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the comutagenic effect in V79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.*, 172, 69-76.

Oppenheim, J.J. y Fishbein, W.N. 1965. Induction of chromosome breaks in cultures normal human leukocytes by potassium arsenite, hydroxyurea and related compounds. *Cancer Res.*, 25, 980-985.

Oshimura, M. y Barthe, C. 1986. Chemical induced aneuploidy in mammalian cells: mechanisms and biological significance in cancer, *Environ. Mutagen.*, 8, 129-159.

Ostrosky-Wegman, P., García, G., Montero, R., Perez Romero., Alvarez Chacón, R. y Cortinas de Nava, C. 1986. Susceptibility to genotoxic effects of niclosamide in human peripheral lymphocytes exposed *in vitro* and *in vivo*. *Mut. Res.* 173, 81-87.

Ostrosky-Wegman, P., M.E. Gonsbatt, R. Montero, L. Vega, H. Barba, J. Espinosa, A. Palao C. Cortinas, G. Garvía-Vargas, L.M. del Razo y M. Cebrián 1991. Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico, *Mutation. Res.*, 250, 477-482.

Owusu-Yaw, J., Cohen, M.D., Fernando, S.Y. y Wei, C.I. 1990. An assessment of the genotoxicity of vanadium, *Toxicol. Lett.*, 50, 327-336.

Paton, G.R. y Allison, A.C. 1972. Chromosome damage in human cell cultures induced by metals salts. *Mut. Res.* 16, 332.

Perry, P. y S. Wolf 1974. New Giemsa method for differential staining of sister chromatids, *Nature (London)*, 261, 156.

Petres, J., Baron, D. y Hagerdom, M. 1977. Effects of arsenic on cell metabolism and cell proliferation: cytogenetic and biochemical studies. *Environ. Health Perspect.* 19, 223-227.

Phillips, T.D. Nechay, B.R. Heidelbaugh, N.D. 1983 Vanadium: Chemistry and the kidney. *Fed. Proc.* 42: 2969-73.

- Promptoy, C., Charrfboneau, S.M., Mc Cullough, R.S., Tam, G.K., 1980. Human retention studies with As 74. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 53, 550-556.
- Raimondi, E., Scariolo, A. De Sario and L. De Carli. 1989. Aneuploidy assays on interphase nuclei by means of in situ hybridization with DNA probes. *Mutagenesis.* 4, 165-169.
- Rhoads, K. y Sanders, C.L. 1985 Lung clearance, translocation and acute toxicity of arsenic, beryllium, cadmium, cobalt, lead, selenium, vanadium and ytterbium oxides following deposition in rat lung, *Environ. Res.*, 36, 359-378.
- Robbins, W.A., Cassel, M.J., Blakey, D.H., Meistrich, M.L. y Wyrobek, A.J. 1994. Induction of aneuploidy in the sperm of Hodgkin's disease patients treated with NOVP chemotherapy (Detection by multi-chromosome fluorescence *in situ* hybridization). *Environ. Molec. Mutagen.*, 23 Suppl. 23, 58.
- Roldán, R.E., y Altamirano, L.M.A.. 1990. Chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges, cell kinetics and satellite associations in human lymphocytes cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mut Res.* 245, 61-65.
- Rosenbaum, J.B. 1983. Vanadium compounds in: *Encyclopedia of Technology*, Vol. 23, John Wiley and Sons, New York, 688-704.
- Roth, F. 1958. Über den Bronchialkrebs arsengeschädigter Winzer. *Arc. Pathol.*, 331, 119.
- Rupa, D.S., Hasegawa, L. y Eastmond, D.A.. 1995. Detection of chromosomal breakage in the 1cen-1q12 region of interphase human lymphocytes using multicolor fluorescence in situ hybridization with tandem DNA probes. *Cancer Res.* 55, 640-645.
- Sabbioni, E., Clerici, L. y Brazzelli, A. 1983. Different effects of vanadium ions on some DNA-metabolizing enzymes, *J. Toxicol. Environ. Health*, 12, 737-748.
- Schoofmester, W. y White, D. 1980. Arsenic poisoning. *South Me. J.* 73. 198-202.
- Sharma, A. y G. Talukder. 1987. Effects of metals on chromosomes of higher organisms, *Environ. Mutagen.*, 9, 191-226.
- Shelanski, M.L., Gaskin, F. y Cantor, C.R. 1973. Microtubule Assembly in the Absence of Added Nucleotides. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70 (3): 765-768.

Shrift, A. 1973. Metabolism of selenium by plants and microorganisms. In Klayman DL., Gunther WHH (ed): *Organic Selenium Compounds: Their Chemistry and Biology*, New York, John Wiley & Sons, pp 763-814.

Singh, J., Nordlie, R.C., Jorgenson, R.A. 1981. Vanadate: A potent inhibitor of multifunctional glucose-6-phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta.* 678, 477-482.

Singh, O.P. 1979. Effects of certain chemical pollutants on plant chromosomes, Ph. D. Thesis, University of Calcutta.

Singh, O.P. y Sharma, A.. 1980. Effects of certain metallic pollutants in plants genetic systems: a review, *Nucleus*, 23, 15-29.

Smith, M.T., Zhang, L., Rothman, N., Wang, Y., Hayes, G.-L. y S.-N., Yin 1995. Interphase cytogenetics of workers exposed to benzene, *Toxicologist*, 15,87.

Snyder, J.A. y McIntosh, J.R. 1975. Initiation and growth of microtubules from mitotic centers in lysed mammalian cells. *J. Cell Biol.* 67, 744-760.

Stearns, T., Evans, L. Y Kirschner, M. 1991. γ tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell* 65, 825-836.

Stebbing, H. 1988. Cytoplasmic dynein graduates. *Nature* 336, 14-15.

Stockinger, H.E. 1981 The metals, in: G.D. Clayton y F.E. Clayton (Eds.), *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*, Vol. 2A Wiley-Interscience Publishers, New York, pp. 1493-2060.

Stone, J.F., Sandberg, A.A. 1995. Sex chromosome aneuploidy and aging. *Mutat. Res.* 338, 107-113.

Sun, M. (Ed.) 1987. Toxicity of vanadium and its environmental Health standard, Changdu West China University of Medical Sciences, Report.

Sunderman, F.W. 1979. Mechanism of metal carcinogens. *Biol. Trace Elem. Res.* 1, 53-86.

Swarup, G., Cohen, S., Garbers, D.L. 1982 Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107:1104-9.

Tadlock, C. y Aposhian, H. 1980. Protection of mice against the lethal effects of sodium arsenite by 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid and demercaptosuccinic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94, 501-507.

Tseng, W.P., Chu, H.M., How, S.W., Fong, J.M., Lin, C.S. y Yeh, S. 1968. Prevalence of skin cancer in an endemic area of chronic arsenicism in Taiwan. *J. Natl. Cancer Inst.*, 40, 453-463.

U.S. Environmental Protection Agency (1984): Health Assessment Document for Inorganic Arsenic Washington, DC, Office of Environmental Assessment, EPA 600/8-83/028bF.

Vahter, M. y Envall, J. 1983. In vivo reduction of arsenate in mice and rabbits, *Environ. Res.* 32, 14-24.

Vahter, M. y Marafante, E. 1987. Effects of low dietary intake of methionine, choline or proteins on the biotransformation of arsenite in the rabbit. *Tox. Letters.* 37, 41-46

Vahter, M. y Norin, H. 1980. Metabolism of ⁷⁴As- labeled trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice, *Environ. Res.*, 21, 446-457.

Vallee, R.B., Bloom, G.S. y Theurkauf, W.E. 1984. Microtubule associated proteins: subunits of the cytomatrix. *J.Cell.Biol.* 99, 38s-44s.

Vagnarelli, P., A. De Sario y L. De Carli. 1990. Aneuploidy induced by choral hydrate detected in human lymphocytes with the Y97 probe. *Mutagenesis*, 5, 591-592.

Vega, L. Gonsebatt, M.E., Ostrosky-Wegman, P. 1995. Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes *in vitro*: an individual susceptibility effect detected. *Mut Res.* 334, 365-373.

Verschaeve, L., Driesen, M., Kirsch-Volders, M., Hens, L. y Susanne, C. 1978. Chromosome distribution studies after inorganic lead exposure. *Hum. Genet.* 49, 147-58.

Vidal-Lozano, A., Abbud y Ochoa, A. 1979. Arsenicismo crónico. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*, 36(5):849-861.

Vouk, V.B. 1979 Vanadium, in: L. Friberg, G.F. Nordberg y V.B. Vouk (Eds.), *Handbook on Toxicology of Metals*, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

Wade, M.J., Davis, B. K., Carlisle, J.S., Klein, A.K. y Valoppi, L.M. 1993. Environmental transformation of toxic metals. *Occup. Med.* 3, 575-601.

Waters, M.D. 1977. Toxicology of vanadium, *Adv. Mod. Toxicol.*, 2, 147-189.

Webb, D.R., Sipes, I.G. y Carter, d.E. 1984. In vitro solubility an in vivo toxicity of gallium arsenide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 76, 95-104.

Weisenberg, R. C. y Rosenfeld, A.C. 1975. In vitro polymerization of microtubules in toasters and spindles in homogenates of surf clam eggs. *J.Cell. Biol.* 64, 146-158.

Weisenberg, R.C. 1972 Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science* 177, 1104.

WHO. 1981. Environmental health criteria: Arsenic, World Health Organization, Geneva.

WHO 1988 Vanadium, WHO Regional Pub., Copenhagen, 361-371.

Wiencke, J. y Yager, J. 1992. Specificity of arsenite on potentiating cytogenetic damage induced by the DNA crosslinking agent diepoxybutane *Environ. Mol. Mutagen.*, 19: 195-200.

Zhang L., Venkatesh, P., Creek, M.L.R. y Smith, M.T. 1994. Detection of 1,2,4-benzenetriol induced and microtubule disruption by fluorescence in situ hybridization and immunocytochemistry. *Mut. Res.* 320, 315-327.

Zheng Y., Jung, M.K. y Oakley, B.R. 1991. γ tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome. *Cell* 65, 817-823.

Zhong, B.-Z., Gu, Z.W., Wallace, W.E., Whong, W.Z., Ong, T. 1994 Genotoxicity of vanadium pentoxide in Chinese hamster V79 cells, *Mut. Res.*, 321, 35-42.