



00346 5
24.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**EVALUACION DE LA FRECUENCIA DE
MICRONUCLEOS EN CELULAS EPITELIALES COMO
PRUEBA PARA DETECTAR EXPOSICION CRONICA
A ARSENICO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A :
BIOL. DORA PATRICIA GUZMAN BAZAN**



DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría de la Dra. María Eugenia Gensebatt Bonaparte

*Esta Tesis fue financiada con beca de PAPIIT
No. IN-207196*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte por la dirección, la enseñanza y el apoyo que me brindó durante la realización de esta tesis

A la Dra. Patricia Ostrosky-Wegman por brindarme esta oportunidad, su apoyo y estímulo de siempre.

A los miembros del jurado Dras. Rosano Rodríguez Ariza, Patricia Ramos Morales, Luz María del Razo Jiménez, Regina Montero Montoya y a los Drs. Javier J. Espinosa Aguirre y Mario Agustín Altamirano Montoya por los valiosos comentarios y aportaciones recibidos al revisar este trabajo.

A mis compañeros del Departamento de Genética y Toxicología Ambiental Ana María, Angélica, Aurora, Carol, Daniel, Emilio, Gabriela, Guillermo, Juliana, Libia, Lilia, Luis Alonso, Luis, Norma, Mahara, Martha Luna, Martha del Valle, Miriam, Monserrat, Patricia Ramírez, Víctor, Vicky y Roble.

A los alumnos de la Esc. Sec. Dna. No. 60 "República de Honduras" en quienes espero haber sembrado el deseo y la inquietud de la superación a través del conocimiento y un agradecimiento especial al Sr. Director Alonso Toledano Moo.

DEDICATORIA

*A MIS PADRES:
VICENTA Y MARIO*

A MARIANA, PAOLA Y FERNANDA

A ENRIQUE

INDICE	PAG
RESUMEN	3
CAPITULO 1 - INTRODUCCION	4
CAPITULO 2 - BIOMARCADORES	5
Ensayo de Micronucleos	8
Origen de los Micronucleos	9
Factores de confusión de los Micronucleos	10
CAPITULO 3 - CAVIDAD BUCAL	13
Tejidos componentes	13
I Epiteio bucal	14
Proliferación epitelial	14
Queratinización	14
Epiteio queratinizado	15
Epiteio no queratinizado	15
No queratinocitos	15
Lamina basal	16
II Lamina propia	17
Cambios de la mucosa bucal con la edad	17
CAPITULO 4.- ARSÉNICO	19
El Arsénico Inorgánico como Carcinógeno Ambiental	19
Localización	19
Exposición y metabolismo.	21
Toxicidad	22
CAPITULO 5 - PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
Hipótesis	25
Objetivo General	25
Objetivos específicos	25

INDICE	PAG
CAPITULO 6 - MATERIAL Y METODOS	26
Individuos de estudio	26
Criterios de inclusión	26
Criterios de no inclusión	26
Determinación de exposición a As	26
Oblención y fijación de muestras	27
Tinción de las laminillas	27
Análisis al microscopio	27
Criterio para cuantificación	28
Análisis estadístico	28
CAPITULO 7.- RESULTADOS	29
Comarca Lagunera	29
Chile	30
CAPITULO 8.- DISCUSIÓN	31
CAPITULO 9.- CONCLUSIONES	33
CAPITULO 10.- PERSPECTIVAS	33
BIBLIOGRAFIA	34
TABLAS Y GRÁFICAS	45

INDICE DE TABLAS Y GRAFICAS

TABLAS		PAGINA
TABLA 1.	<i>Marcadores biológicos de exposición a carcinógenos.</i>	7
TABLA 2	<i>Frecuencia promedio de MNs en células exfoliadas asociada a diversos factores de riesgo.</i>	12
TABLA 3	<i>Formas más frecuentes de exposición a As.</i>	24
TABLA 4.	<i>Marcadores de exposición de las poblaciones estudiadas en la Comarca Lagunera</i>	45
TABLA 5	<i>Frecuencia de MNs en células del epitelio bucal de individuos control, Comarca Lagunera</i>	46
TABLA 6	<i>Frecuencia de MNs en células del epitelio bucal de individuos expuestos a As, Comarca Lagunera</i>	47
TABLA 7.	<i>Promedio \pm error estándar de MNs/1000 células epiteliales Comarca Lagunera</i>	48
TABLA 8.	<i>Frecuencia de atipias nucleares en 1000 células del epitelio bucal de individuos testigo, Comarca Lagunera</i>	49
TABLA 9.	<i>Frecuencia de atipias nucleares en 1000 células del epitelio bucal de individuos expuestos a As, Comarca Lagunera</i>	50
TABLA 10.	<i>Promedio \pm error estándar de atipias nucleares en 1000 células del epitelio bucal de individuos control y expuestos a As, Comarca Lagunera</i>	51
TABLA 11.	<i>Marcadores de exposición de las poblaciones estudiadas, Chile.</i>	52
TABLA 12.	<i>Frecuencia de MNs en células del epitelio bucal de individuos control, Chile.</i>	53
TABLA 13.	<i>Frecuencia de MNs en células del epitelio bucal de individuos expuestos a As, Chile.</i>	54
TABLA 14.	<i>Promedio \pm error estándar de MNs/1000 células epiteliales, Chile.</i>	55
TABLA 15.	<i>Frecuencia de atipias nucleares en 1000 células del epitelio bucal de individuos control, Chile.</i>	56
TABLA 16.	<i>Frecuencia de atipias nucleares en 1000 células del epitelio bucal de individuos expuestos a As, Chile.</i>	57
TABLA 17.	<i>Promedio \pm error estándar de atipias nucleares en células del epitelio bucal de individuos control y expuestos a As, Chile.</i>	58
TABLA 18.	<i>Valores de Ji y probabilidad del total absoluto de cada una de las atipias Vs. el total absoluto de células analizadas en las poblaciones estudiadas.</i>	59
GRAFICAS		
GRAFICA 1.	<i>Frecuencia de MNs en células bucales, Comarca Lagunera</i>	60
GRAFICA 2.	<i>Frecuencia de Mns por sexo en individuos expuestos, Comarca Lagunera.</i>	61
GRAFICA 3.	<i>Frecuencia de MNs en células bucales de individuos con y sin lesiones en la piel, Comarca Lagunera.</i>	62
GRAFICA 4.	<i>Frecuencia de atipias en células bucales, Comarca Lagunera.</i>	63
GRAFICA 5.	<i>Frecuencia de MNs en células bucales, Chile.</i>	64
GRAFICA 6.	<i>Frecuencia de atipias en células bucales, Chile.</i>	65

INDICE DE FIGURAS

FIGURAS.		PAGINA
FIGURA 1	<i>Procesos y mecanismos que originan a las CMNs y otros abomas nucleares por exposición a agentes ambientales</i>	11
FIGURA 2	<i>Epitelio queratinizado (estratos)</i>	18
FIGURA 3	<i>Epitelio no queratinizado (estratos)</i>	18
FIGURA 4	<i>Fuentes y ciclo del As en el ambiente.</i>	20

ABREVIATURAS

As	Arsénico
ATP	Adenosin trifosfato
CA	Aberraciones cromosómicas
CMNs	Células micronucleadas
LMP	Límite máximo permisible
MMS	Metil metano sulfonato
MNs	Micronucleos
OMS	Organización mundial de la salud
BN	Célula binucleada
Cr	Núcleo carotético
Ci	Núcleo carotético
Cc	Núcleo con cromatina condensada
Pic	Núcleo picnótico

RESUMEN

Las aberraciones cromosómicas son eventos importantes en los procesos de iniciación y promoción tumorales, por lo que su presencia es indicativa de un riesgo aumentado para cáncer. La prueba de micronúcleos (MNs) en epitelios de descamación permite la evaluación de daño citogénico en las células provenientes de los tejidos directamente expuestos a agentes xenobióticos. Así mismo, es posible valorar en estas muestras otros parámetros como los cambios a nivel de los núcleos celulares (la presencia de más de un núcleo, núcleos canaliculados, cariométicos y otros), con lo cual se obtiene información acerca de otros tipos de daño celular como son los procesos inflamatorios, los infecciosos, los de premalignidad o los de malignidad, complementando los hallazgos genotóxicos.

La actividad carcinogénica del arsénico (As) vía agua de bebida, ha sido ampliamente documentada como agente carcinogénico. En este trabajo estudiamos la frecuencia de MNs y atipias nucleares en muestras de la mucosa oral de individuos expuestos crónicamente a As por ingestión de dos poblaciones rurales de México (Santa Ana, Coah. y Nazareno, Dgo.) y de otras dos en Chile (San Pedro y Toconao). Los niveles de As en el agua de bebida fueron superiores a los permisibles en las poblaciones de Santa Ana, Coah. ($>300 \mu\text{g/l}$) y de San Pedro ($>500 \mu\text{g/l}$). Los resultados mostraron un incremento en la frecuencia de MNs en las dos poblaciones expuestas (2.21 ± 0.47 para la Región Lagunera y de 1.96 ± 0.42 , en Chile), mientras que en los grupos testigo fue de: 0.56 ± 0.31 para Nazareno, Dgo. y de 0.51 ± 0.31 para Toconao. Estos datos fueron estadísticamente significativos con la prueba t de Student para una $p < 0.005$. El análisis de las atipias con la prueba de Ji-cuadrada mostró significancia con la frecuencia de MN. En base a estos datos se concluye que las células de la mucosa oral son un tejido blanco en la exposición a As vía agua de bebida, por lo que la prueba resulta eficaz para la evaluación temprana del riesgo de exposición a arsénico a través de esta vía y a las concentraciones investigadas.

1. INTRODUCCION

El desarrollo científico y tecnológico han mejorado las condiciones de vida de nuestra especie, pero al mismo tiempo han dado lugar a la introducción de agentes xenobióticos al medio ambiente. Se estima que cada año se producen aproximadamente 260 millones de toneladas de desechos tóxicos generados por la industria y que conjuntamente con los desechos radioactivos representan un riesgo para la salud de las comunidades en contacto con ellas (Sullivan y Kneger, 1992).

Numerosas enfermedades humanas están directa o indirectamente asociadas a diversos agentes ambientales (físicos, químicos y biológicos) cuyos efectos están lejos de ser conocidos. La mayoría de los agentes que dañan los ácidos nucleicos cuando existen exposiciones a dosis elevadas evocan efectos crotoxicos específicos en un amplio conjunto de procesos celulares. Por lo que el último objetivo de la Toxicología Genética es el detectar y estimar el riesgo de daño genético que produce la exposición a los agentes que tienen afinidad por los ácidos nucleicos y que son capaces de inducir alteraciones a concentraciones subtóxicas (Brusick, 1994).

Esta clase de alteraciones son responsables de una gran proporción de enfermedades hereditarias. Estudios epidemiológicos y diversos modelos experimentales han demostrado que existe una vinculación entre la exposición a agentes xenobióticos o a la radiación ionizante con las mutaciones a nivel de células somáticas y/o germinales y la aparición de malformaciones congénitas, estenidad, enfermedades degenerativas y cáncer (Brusick, 1987; Ehling, 1991). Tomatis, (1990) menciona que el 90% de los diferentes tipos de cáncer conocidos se originan por exposición ambiental u ocupacional y que de estos el 90% se originan en tejidos epiteliales. En nuestro país, los estudios epidemiológicos han reportado que los tumores malignos, son la segunda causa de mortalidad entre la población general (Epidemiología, 1995).

La Toxicología Genética surgió ante la necesidad de estudiar los efectos de estos contaminantes en la actividad fisiológica normal de los seres vivos. Gracias a los estudios generados por esta disciplina, ha sido posible identificar a aquellos contaminantes del ambiente que pueden producir un efecto genotóxico y estimar el riesgo potencial que ello implica en los seres humanos. Sin embargo, las pruebas que se utilizan para identificar a los agentes genotóxicos, no pueden ofrecer una evaluación cuantitativa de las respuestas *in vivo* en relación al daño carcinogénico o mutagénico inducido en los tejidos blanco.

Es por ello que uno de sus objetivos es el de encontrar marcadores biológicos de exposición temprana, en tejidos blanco, que permitan predecir un daño a la salud de los individuos, de tal manera que se pueda realizar una detección temprana, la prevención, así como el de detectar los mecanismos de acción de las sustancias carcinogénicas.

El arsénico (As) es un agente carcinógeno al que están expuestos numerosos grupos humanos, en nuestro país y en el resto del mundo, cuya actividad genotóxica ha sido demostrada en grupos de individuos expuestos. En este trabajo se investigan los efectos de la exposición al arsénico en la frecuencia de micronúcleos en células bucales de individuos expuestos a concentraciones superiores a los 300 µg/l de As a través del agua de bebida, con el objetivo de determinar la sensibilidad de esta metodología, sencilla y no invasiva, para monitorear los efectos tempranos de la exposición a este carcinógeno.

2. BIOMARCADORES

Cuando deseamos conocer la identidad de los agentes mutagénicos presentes en el ambiente, la magnitud de la exposición, la dosis biológicamente activa y los cambios biológicos que inicialmente se provocan, se debe de utilizar metodologías que permitan evaluarlos. De esta manera es posible establecer sistemas de vigilancia epidemiológica en las zonas afectadas por problemas de contaminación ambiental. Para ello resulta útil encontrar marcadores tempranos de daño a la salud del individuo, específicamente marcadores de daño genético que pudieran traducirse en la detección temprana y prevención de trastornos genéticos y cáncer.

Un biomarcador se define como cualquier alteración biológica que puede ser medible en tejidos, células o fluidos corporales (Hulka 1990). Estas alteraciones pueden ser usadas como indicadores de exposición ambiental que reflejan los efectos adversos tempranos tales como daño celular. Esto es especialmente importante en el caso de estudios poblacionales de cáncer, donde existe un período de latencia muy largo entre la exposición a carcinógenos y la aparición del efecto. Los biomarcadores tienen la ventaja de poder cuantificar los efectos iniciales en las células y tejidos expuestos a carcinógenos, permitiendo la intervención de estrategias preventivas poco después de que cesa la exposición a estos agentes.

Los biomarcadores se clasifican de manera general en:

a)-Indicador de exposición - es el indicador que permite conocer las dosis de exposición de los organismos a contaminantes ambientales. Las dosis de exposición pueden ser:

Externas - Es la concentración o cantidad de material xenobiótico en el medio ambiente en el que vive un organismo.

Internas - Es la cantidad de xenobiótico que es transferida o absorbida por el organismo y que al interactuar con un receptor celular o un blanco tisular crítico se inicia entonces un efecto biológico (Dosis biológicamente efectiva).

En la tabla 1 se muestran algunos marcadores de exposición a carcinógenos que están siendo estudiados y de pruebas citológicas empleadas para valorar sus efectos.

b) - Indicador de efecto - Son alteraciones que sufren los sistemas biológicos a nivel bioquímico, fisiológico y genético (estructural o numérico) y se utilizan para evaluar el riesgo potencial o efectivo por la exposición a un agente xenobiótico.

c).- Indicador de Susceptibilidad - Es un marcador biológico que permite conocer una limitación heredada o adquirida de la capacidad de un organismo para responder a la exposición de un agente xenobiótico específico.

Las pruebas que se utilizan actualmente para evaluar genotoxicidad se basan en general en pruebas *in vitro* y en una sola evaluación citogenética *in vivo*: Micronúcleos (MNs) o aberraciones cromosómicas (CA) en médula de ratón. Sin embargo, aunque estas baterías de

prueba resultan extremadamente útiles para identificar agentes genotóxicos, no pueden ofrecer una evaluación cuantitativa de las respuestas *in vitro* de daño carcinogénico o genotóxico en los tejidos blanco. Por otra parte el proceso carcinogénico es demasiado complejo y muestra especificidad por los tejidos para permitir que las pruebas de genotoxicidad arriba descritas, puedan utilizarse como criterio de potencial carcinogénico. Es por esto que se ha visto la necesidad de implementar técnicas que permitan medir la toxicidad genética en tejidos blanco *in vivo* si se quieren realizar predicciones del potencial genotóxico y carcinogénico (MacGregor y cols., 1995).

TABLA 1. MARCADORES BIOLÓGICOS DE EXPOSICIÓN A CARCINOGENOS

Tomado y modificado de Perera (1996)

MARCADOR	TEJIDO O LÍQUIDO ANALIZADO	TIPO DE DAÑO
I CITOLOGÍCO:		
<i>Papanicolaou</i>	<i>Mucosa cérvico-uterina</i>	<i>Daño citotóxico, inflamación, preinvasividad y malignidad</i>
<i>Prueba de Micronúcleos</i>	<i>Orina, sangre, esputo y células epiteliales de diversos tejidos como piel, mucosas bucal y del tracto genitourinario</i>	<i>Daño citotóxico y citogénético indica mayor riesgo de cáncer pulmonar, de vejiga, riñón y piel</i>
II MOLECULAR:		
<i>Aducto aflatoxina B 1-DNA</i>	<i>Orina, hígado</i>	<i>Lesión génica aflatoxina, mayor riesgo de cáncer hepático.</i>
<i>Aducto +HPA-DNA</i>	<i>Sangre, pulmón, placenta</i>	<i>Lesión génica provocada por HPA presentes en el humo de tabaco y en ambientes ocupacionales. Se investiga como indicador de riesgo de cáncer pulmonar</i>
<i>Aducto y amino bifenil hemoglobina</i>	<i>Sangre</i>	<i>Exposición activa o pasiva al humo de tabaco (se investiga como marcador de riesgo en cáncer de vejiga)</i>
<i>Glicoforrina (base del DNA oxidada)</i>	<i>Orina</i>	<i>Lesión génica causada por agentes oxidantes (se está investigando como marcador de riesgo para diversos tipos de cáncer).</i>
<i>Mutación en el gen de supresión p-53</i>	<i>Mama, hígado, pulmón, entre otros.</i>	<i>Mutación del gen p-53 indica un mayor riesgo de cánceres diversos.</i>

**HPA=Hidrocarburos aromáticos policíclicos.*

ENSAYO DE MICRONUCLEOS

Los MNs son fragmentos cromosómicos o cromosomas completos que no son incorporados en el núcleo hijo durante la división celular apareciendo en la célula hija como pequeños núcleos secundarios, debido a rompimiento cromosómico y a la no disyunción de los cromosomas por interferencia o mal funcionamiento del huso mitótico (Evans y cols., 1959; Matter y Schmid, 1971; Heddle, 1973; Yamamoto y Kikuchi, 1980), y que pueden resultar de la exposición a agentes ambientales (Vine, 1990).

Neumann, (1869), observó la presencia de pequeñas estructuras que se tenían de igual forma que el núcleo en eritrocitos de médula ósea. Más tarde, en un intento por explicar el origen de estas estructuras, Howell (1891) estableció que eran fragmentos de material nuclear y Jolly (1907) los describió como restos nucleares. Estos fragmentos también fueron descritos en otros tipos celulares, por ejemplo en células de ratón y en células embrionarias de raza (Brenneke, 1937) y en *Vicia faba* (Thoday, 1951; Read y Kihlman, 1956), y Thoday (1951) fue quien por primera vez empleó el término de "micronúcleos".

Evans y cols. (1959) establecieron la utilidad de la Prueba de MNs como indicadores de daño citogénico al observar que la exposición a rayos gamma y a neutrones rápidos incrementaba la frecuencia de MNs en los ápices radiculares de *Vicia faba*, pero el paso decisivo para que el ensayo de MNs se estableciera como un sistema para evaluar el riesgo potencial de la exposición a agentes genotóxicos, se inició con los trabajos de Bolter y Schmid (1970) y de Heddle (1973) que valoraron la frecuencia de MNs en células de criceto chino y en eritrocitos policromáticos *in vivo*, expuestos a genes mutagénicos. Más tarde, Countryman y Heddle (1976) introdujeron a las células linfocíticas como otro sistema celular para detectar daño cromosómico por la presencia de MNs, y sólo 10 años después este sistema fue utilizado eficientemente, cuando Fenech y Morley (1985) solucionaron el problema para diferenciar las células proliferantes de las células no proliferantes usando el método de citocalcina B.

Otros tejidos en los que se puede utilizar la prueba de MNs, es en células exfoliadas de epitelio de la cavidad oral, la cavidad nasal, los bronquios, el esófago, el cervix, la vejiga y el tracto urinario. Stich y Stich (1982) desarrollaron esta prueba con el propósito de detectar daño genotóxico en tejidos humanos, los cuales son blanco de carcinógenos órgano-específicos y en los que se desarrollarán más tarde carcinomas. La técnica cuenta con la ventaja de ser una prueba *in vivo*, que no requiere de estimulación celular y es poco invasiva en la toma de muestras celulares, lo que permite la realización de muestreos repetidos (Stich, y cols., 1983), además de que el daño evaluado refleja los eventos genotóxicos que ocurrieron en la capa basal en división de las tres últimas semanas (ver cap.3).

Diversos estudios han reportado elevadas frecuencias de células micronucleadas (CMNs) en individuos expuestos a sustancias o factores asociados con un riesgo incrementado de cáncer. Muchos de ellos se han realizado en células provenientes de la cavidad oral en individuos expuestos a conocidos carcinógenos orales, como el fumar cigarrillos, mascar tabaco y nuez de betel, aditivos y conservadores alimenticios, entre otras, y mostraron el referido incremento en la frecuencia de CMNs cuando se los comparó con testigos no expuestos (Pickler y Fox, 1986; Mandard y cols., 1987; Sarto y cols., 1987).

El consumo de alcohol y tabaco eleva la frecuencia de CMNs de una manera directamente proporcional al consumo diario de cigarrillos, lo cual coincide con datos de estudios epidemiológicos que reportan una interacción sinérgica entre el alcohol y el tabaco en el incremento de riesgo para el cáncer oral (Wynder y cols., 1957; Stich y cols., 1983a). Stich y cols.,

(1982 a, b) aplicaron la prueba de MNs en células exfoliadas del epitelio bucal de fumadores de tabaco de Bihar, India y encontraron una elevada frecuencia de CMNs en los 27 individuos examinados. También reportaron que en cultivos de fibroblastos de ratón expuestos a extractos acuosos de tabaco hubo un incremento de aberraciones cromosómicas y MNs

Las radiaciones ionizantes son inductoras de aberraciones cromosómicas. En células exfoliadas de la cavidad oral obtenidas durante radioterapia se observó un incremento de CMNs, el que se elevó después de la misma y finalmente disminuyó al terminar la radiación (Bianchi y cols., 1983).

De la misma manera, se ha observado un incremento en la frecuencia de MNs en células exfoliadas del tracto gastrointestinal en individuos expuestos a diversos agentes que de acuerdo a estudios epidemiológicos, se asocian con un riesgo aumentado para el desarrollo de cáncer de vejiga, por ejemplo, el hábito de fumar (Rosin y Gilbert, 1990), algunas enfermedades parasitarias consideradas carcinogénicas, como la esquistosomiasis (Reafat y col. 1984, Silverman y cols., 1992, Rosin y Anwar 1992), y las radiaciones en la región pélvica en las que se ha observado un incremento de 2 a 8.7 veces en el riesgo de cáncer de vejiga, dependiendo de la dosis, la edad del paciente y del tipo de exposición (Stich y cols., 1983, Silverman y cols., 1992) Blas, (1995) reportó un incremento en la frecuencia de MNs en células uroepiteliales de individuos expuestos a As a través del agua de bebida.

Estos datos han permitido establecer que la evaluación de MNs en células exfoliadas de varios tejidos epiteliales en los seres humanos resulta una herramienta muy útil para el estudio de carcinógenos (Toitbert y cols., 1991, 1992) pues provee evidencia de exposición a clastógenos, una medición del grado de daño genotóxico y una estimación de efecto aditivo o de intercambio cuando algunos agentes carcinogénicos o genotóxicos actúan juntos.

En la tabla 2 se observa la prevalencia de MNs en células exfoliadas del epitelio bucal y del tracto gastrointestinal reportadas por diversos autores, en ella puede apreciarse que existen variaciones en las frecuencias reportadas para los grupos testigos. Mucha de esta variabilidad se debe a la falta de rigor con que se determina la frecuencia de MNs. Reaf y cols., (1987) y Toitbert y cols., (1992) sugieren la necesidad de analizar un mínimo de 3000 células por sujeto, ya que la presencia de células micronucleadas con un alto grado de certidumbre es baja.

Origen de los MNs

Neumann (1869), Howell (1891) y Jolly (1907) asumieron que los MNs se originan a partir del núcleo celular, sin embargo, aún existen dudas respecto al mecanismo o mecanismos por los cuales se generan.

En 1948, Discombe observó que los cromosomas que se rezagaban durante la telofase aparecían en las células como cuerpos de Howell-Jolly (término utilizado por los hematólogos para los MNs) estableciéndose así una evidencia indirecta de que los MNs se derivaban de material nuclear, durante la división celular. Investigaciones posteriores permitieron establecer que la mayoría de los MNs se originaban de fragmentos cromosómicos acéntricos y de cromosomas completos.

Se ha observado que la frecuencia de MNs en linfocitos se incrementa después de ser tratados con agentes xenobióticos. Con la prueba de MNs en linfocitos se asumió que los mecanismos más importantes por los cuales se originan corresponden a: 1) la pérdida de fragmentos cromosómicos y 2) la pérdida de cromosomas completos por interferencia en el huso mitótico, lo cual implica riesgo genético. Se ha encontrado que la frecuencia de MNs en linfocitos

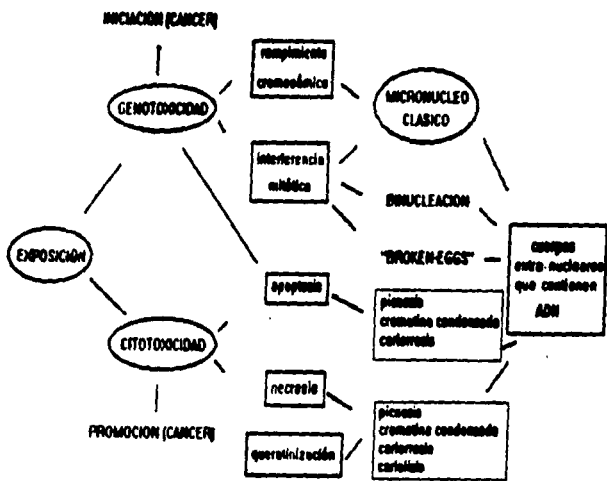


FIG. 1.- Procesos y mecanismos que dan origen a CMNs y otras alteraciones nucleares por exposición a agentes ambientales, tomado de Tolbert y cols., (1992)

**TABLA 2. FRECUENCIA PROMEDIO DE MNs EN 1000 CELULAS EXFOLIADAS ,
ASOCIADA A DIVERSOS FACTORES DE RIESGO.
Tomado y modificado de Smith y cols., (1993)**

TIPO DE EXPOSICIÓN	TIPO CELULAR	CONTROLES	EXPUESTOS	REFERENCIAS
Raz de betel	BUCAL	3.9	72.0	Sich y cols. (1982)
Tabaco y alcohol	"	3.3	2.63	Sich y Rosin (1983a)
Schistosoma haematobium	UROTELIAL	5.3	71.7	Raafat y cols. (1984)
Síndrome de Bloom	"	2.8	41.5	Rosin and German (1985)
	UROTELIAL	6.0	44.4	
Tabaco	BUCAL	0.7	2.4	Fontham y cols., (1986)
	UROTELIAL	0.5	2.9	
Aditivos alimenticios	"	3.6	5.5	Picker y Fox (1986)
Tabaco	"	0.6	0.9	Sario y cols., (1987)
Ataxia-talangiestasia	"	2.9	15.1	Rosin y cols., (1989)
Pesticidas	BUCAL	4.0	34.0	San y cols., (1989)
	UROTELIAL	6.0	33.6	
Humo de cigarro	"	2.7	22.2	Livingston y cols. (1990)
Pinturas	"	5.0	9.0	Diaz y cols., (1990)
Aminas aromáticas	"	"	"	
a) Fumadores	"	3.0	4.2	Ribeiro, (1990)
b) No fumadores	"	"	"	
Currido de pieles	"	"	"	
a) Fumadores	"	9.7	10.5	Gonzalez Cid y cols., (1991)
b) No fumadores	"	4.0	9.6	
Radioterapia	"	1.6	10	Tolbert y cols. (1992)
Schistosoma haematobium	"	1.2	8.4	Wagida y cols., (1993)
a) Fumadores	"	0.9	9.5	
b) No fumadores	"	1.3	7.9	
Arsénico	BUCAL	0.56	2.21	Gonsebatt y cols., (1996)
	UROTELIAL	0.48	2.22	

3. CAVIDAD BUCAL

El primer paso del complejo proceso en la transformación de los alimentos se realiza en la cavidad bucal, aquí el alimento es triturado por los dientes durante la masticación y mezclado con saliva.

La cavidad bucal consta de dos partes, un vestíbulo externo limitado por los labios y las mejillas, y la cavidad bucal propiamente dicha, la cual está separada del vestíbulo por los rebordes alveolares, portadores de los dientes y sus encías. El límite superior de la cavidad bucal (techo) está formado por los paladares blando y duro, el límite inferior lo forman el piso de la boca y la base de la lengua, mientras que el límite posterior está limitado por los pilares de las fauces y las amígdalas.

La mucosa bucal muestra diferencias estructurales considerables, en las diferentes regiones de la cavidad bucal, reconociéndose tres tipos principales de mucosa que se identifican de acuerdo con su función primaria en:

- a) Mucosa masticatoria
- b) Mucosa de revestimiento
- c) Mucosa sensorial

Mucosa masticatoria. - Está presente en encías y paladar duro que son zonas de la cavidad bucal expuestas a las fuerzas abrasivas de la masticación, por lo que el epitelio de estas zonas es grueso, duro e inflexible debido al proceso de maduración celular conocido como queratinización; por lo general siempre está ortoqueratinizado, aunque también se encuentran zonas paraqueratinizadas (ver queratinización). La encía presenta numerosas crestas epiteliales y está firmemente unida al hueso del paladar duro, los procesos alveolares por la inserción de los haces de fibras colágenas de la lámina propia del perostio de los huesos subyacentes forman un mucoperostio. Esta inserción es directa permitiendo que el epitelio sea inextensible y capaz de resistir las fuerzas abrasivas.

Mucosa de revestimiento. - Se encuentra en la superficie bucal del labio, paladar blando, piso de la boca, cara inferior de la lengua y en los carrillos, se caracteriza por su capacidad para experimentar movimiento, distensión, o ambos, es un epitelio mucho más grueso que la mucosa masticatoria y por lo general no está queratinizado, aunque en algunos casos puede estar paraqueratinizado.

Mucosa sensorial. - Se localiza en el dorso de la lengua, tiene funciones semejantes a las de la mucosa masticatoria, sin embargo la presencia de diversos tipos de papilas linguales, que realizan funciones mecánicas o sensoriales (botones o papilas gustativas) coloca a esta mucosa en una clasificación diferente.

La mucosa bucal cumple varias funciones. La más importante de ellas es la protección que otorga a los tejidos más profundos de la cavidad bucal. Otras de sus funciones son la sensibilidad, la regulación térmica y la secreción de saliva.

Tejidos componentes

Los dos tejidos principales de la mucosa bucal son: un epitelio escamoso estratificado, llamado epitelio bucal; y un tejido conectivo subyacente, llamado lámina propia o corion, que se describen a continuación.

I Epitelio bucal

El epitelio bucal es un epitelio plano estratificado que consta de células estrechamente adosadas entre sí, dispuestas en una serie de capas o estratos distintos que forman una barrera primaria entre el medio bucal y los tejidos más profundos. Estas capas son:

- 1).-Capa basal (*stratum basale*), formada por una capa de células cúbicas o cilíndricas adyacentes a la membrana basal.
- 2).-Capa de células espinosas (*stratum spinosum*), formada por varias capas de células más grandes, esféricas o elípticas que se encuentran intercomunicadas por numerosos puentes intercelulares llamados desmosomas.
- 3).-Capa granular (*stratum granulosum*), esta capa está formada por células más grandes y aplanadas que contienen una serie de pequeños gránulos intensamente basófilos (gránulos de queratohialina).
- 4).-Capa córnea (*stratum corneum*), es la capa queratinizada compuesta por células eosinófilas muy aplanadas.

Proliferación epitelial.

Al igual que la epidermis y el revestimiento del tracto gastrointestinal, el epitelio bucal mantiene su integridad estructural mediante un sistema de renovación celular continua, por la cual las células producidas por divisiones mitóticas en la capa basal, migran hacia la superficie para reemplazar a aquellas que se pierden durante el proceso de descamación, de esta forma las células de las capas basales corresponden a la población celular progenitora, que en los epitelios gruesos, como los de los carrillos y el paladar, están formadas por dos o tres capas celulares. Las células progenitoras se dividen en dos subpoblaciones celulares funcionalmente distintas:

- a).- Células germinativas, son células progenitoras que se caracterizan por reciclarse muy lentamente cuya función es la de reproducir células basales y retener así el potencial proliferativo del tejido.
- b).-Células amplificadoras, cuya función es la de aumentar el número de células disponibles para una maduración posterior.

Independientemente de los subtipos celulares de la capa basal, después de la división celular, cada célula hija puede reciclarse en la población progenitora o entrar al compartimento de maduración (Ten Cate 1986)

El tiempo de recambio, es decir el tiempo que le lleva a una célula dividirse y atravesar todo el epitelio durante su diferenciación en el carrillo, es de 25 días (Ten Cate 1986 y Livinstong, 1990).

Queratinización (maduración epitelial)

La queratinización es un proceso que incluye, la síntesis de una proteína fibrosa llamada queratina así como la división, la diferenciación, la maduración, la migración y la exfoliación de las células.

La formación de queratina se da principalmente en las células de el tercer estrato de los epitelios y se acompaña de la aparición de elementos estructurales específicos como son: los tonofilamentos, las tonofibrillas, los gránulos de queratohialina, los queratinosomas y el engrosamiento de las membranas celulares, en especial de su cara citoplásmica (Davis, 1986).

Las células que actúan en la queratinización reciben el nombre de queratinocitos e incluyen a células de los cuatro estratos celulares tanto de los epitelios que queratinizan como de los que no lo hacen. El empaquetamiento intracelular de los tonofilamentos determina el grado de queratinización.

Dependiendo de la región de la cavidad bucal que se estudie este epitelio puede ser grueso o delgado; completamente queratinizado (ortoqueratinizado) o no queratinizado (paraqueratinizado).

Epitelio queratinizado

La característica más sobresaliente en un epitelio queratinizado, es la presencia de gránulos de queratohialina en el estrato granuloso que aparecen como partículas basófilas al microscopio óptico y como estructuras electrodensas en cortes ultrafinos. Son de forma irregular, su tamaño habitual es de 0.5 a 1 μm , y son sintetizados probablemente por los ribosomas. Se piensa que los gránulos de queratohialina forman la matriz en la cual están inmersos o agregados los tonofilamentos de la capa queratinizada (Ten Cate, 1986). Cuando las células de la capa granulosa alcanzan la unión con la capa córnea o queratinizada, hay un cambio brusco en su aspecto. Todos los orgánulos u organoides incluyendo los núcleos y los gránulos de queratohialina van desapareciendo. Las células de esta última capa están deshidratadas y extremadamente aplanadas, siendo resistentes al daño mecánico y a los solventes químicos (Ten Cate, 1986).

En un corte histológico, un epitelio queratinizado, como el de la piel, muestra los cuatro estratos celulares mencionados (Fig. 2).

Epitelio no queratinizado

El epitelio no queratinizado presenta modificaciones en las capas celulares. Las capas basal y espinosa generalmente son parecidas a las descritas para el epitelio queratinizado aunque las células de este epitelio son algo más grandes y los puentes intercelulares no son tan conspicuos, es por esta razón que en el epitelio no queratinizado no existe la capa de células espinosas ni la capa granulosa sino que en su lugar se encuentra una capa intermedia (*stratum intermedium*); y por encima de ésta se encuentra la capa superficial o córnea (*stratum superficiale*) cuyas células presentan núcleos bastante redondos (Ten Cate, 1986) (Fig. 3).

Este epitelio se encuentra en los carrillos, labios, mucosa alveolar y piso de la boca, y en algunos casos es mucho más grueso que el queratinizado (por ejem. en los carrillos es de 500 μm de espesor).

No queratinocitos

Hasta este momento, todas las células descritas como componentes del epitelio bucal se han clasificado como queratinocitos. Sin embargo, no todos los queratinocitos actúan en la queratinización.

Los no queratinocitos o células claras no contienen tonofilamentos, por lo general no forman uniones desmosómicas, y no participan en fenómenos de maduración semejantes a los de los queratinocitos. Estas células son:

1) Melanocitos: son células de localización basal que producen el pigmento endógeno oscuro llamado melanina. Carecen de desmosomas y sintetizan la enzima tirosinasa.

2) Células de Langerhans: se localizan en los estratos externos del epitelio, sobre todo en el granuloso aunque se han observado en estratos basales. Se caracterizan por la presencia de gránulos en forma de bastoncillo o de raqueta y de un núcleo globulado. Se les han atribuido diversas funciones, entre ellas: 1) función nerviosa, 2) regulación en el proceso de maduración de los queratinocitos, y 3) función en la respuesta inmune, en especial porque estas células son portadoras de un antígeno de superficie relacionado con la actividad inmunológica (Davis, 1986).

3) Células de Merkel: residen casi exclusivamente en la capa celular basal e incluso en la lámina propia subyacente. Estas células no dendríticas poseen unos cuantos desmosomas y tonofilamentos, se caracterizan por la presencia de pequeños gránulos esféricos semejantes a los gránulos de catecolamina y en la mayoría de los casos están relacionadas con fibras nerviosas. Pruebas neurofisiológicas han mostrado que la célula de Merkel es una célula sensorial que responde al tacto (Davis, 1986).

4) Células inflamatorias: pequeñas cantidades de linfocitos, leucocitos polimorfonucleares y células cebadas que son componentes normales del epitelio bucal, lo que no indica por fuerza que exista un proceso inflamatorio.

Lámina basal

Es la interfase, ondulante e irregular, donde el tejido conectivo de la lámina propia se conecta con el epitelio bucal suprayacente a través de crestas epiteliales que se alternan con papilas dérmicas del tejido conectivo que van de aplanadas a cónicas. El número y el tamaño de estas papilas varían en las diferentes partes de la mucosa bucal, en la mucosa masticatoria se observan en mayor número que en la mucosa de revestimiento. Esta disposición hace que la superficie de la interfase sea mayor, permitiendo que las fuerzas aplicadas en la superficie del epitelio se dispersen en una zona de tejido conectivo mucho más grande, aumenta también la superficie para vasos sanguíneos y nervios y constituye una mejor interfase de unión para los dos tejidos de diferente origen en su desarrollo.

Los componentes principales de la lámina basal son glucoproteínas, en especial mucopolisacáridos, con un grosor de 500 a 800 Å y está formada por dos capas:

1).-Lámina lúcida. Es una zona clara que está en contacto directo con las células del estrato basal del epitelio por medio de hemidesmosomas y se piensa que estas células epiteliales secretan la lámina basal (Davis, 1986).

2).-Lámina densa. Está formada por material granular o filamentosos (colágeno tipo IV) incluido en una matriz amorfa. Este material se conoce como fibrillas de anclaje que se caracterizan por su configuración en asas finamente bandeadas. Las fibrillas de colágeno de la

lámina propia pasan a través de estas asas formando un complejo de unión entre ambas láminas (Davis, 1986).

II Lámina propia

Es el tejido conectivo en el cual se apoya el epitelio bucal y está formado por células, fibras, una sustancia fundamental amorfa, nervios y vasos sanguíneos. Las fibras del tejido conectivo son básicamente colágena del tipo I, aunque también se encuentran fibras elásticas reticulares y de oxitalano (Davis, 1986)

La lámina propia se divide en dos capas

- 1) - Capa papilar asociada con los cordones o clavos papilares, con fibras de colágena delgadas y laxamente dispuestas en forma de asas capilares (Ten Cate, 1986)
- 2) - Capa reticular en esta capa las fibras de colágenas se hallan dispuestas en haces compactos y gruesos que corren paralelos al plano superficial (Ten Cate, 1986)

Entre las células de la lámina propia se incluyen las siguientes: 1) fibroblastos 2) macrófagos 3) células cebadas y 4) células inflamatorias (linfocitos y células plasmáticas). La distribución de estas células refleja las funciones y necesidades específicas en las diversas regiones de la cavidad bucal (Davis, 1986 y Ten Cate 1986)

La sustancia fundamental amorfa de la lámina propia está compuesta por glucosaminoglicanos, como el ácido hialurónico y el condroitinsulfato B. Estos se organizan en forma de complejos constituidos por proteínas y carbohidratos (polisacáridos) para formar proteoglicanos y glicoproteínas, que son megamoléculas con gran hidratación. Además de estos complejos, la lámina propia de la mucosa bucal también contiene proteínas derivadas del suero (Davis, 1986).

Cambios de la mucosa bucal con la edad

Se ha visto que en la mucosa bucal hay marcados cambios estructurales con la edad. El epitelio se adelgaza, varía el tamaño y la forma de las células y sus núcleos, existe una mayor desfoliación y queratinización celular. También hay un aplanamiento de la interfase epitelio-tejido conectivo, por disminución de los brotes y cordones epiteliales; estos cambios se incrementan cuando hay déficit nutricional de hierro y de vitaminas del grupo B. Las glándulas sebáceas de labios y carrillos también aumentan con la edad (Ten Cate, 1986). En la lámina propia disminuye el número de células del tejido conectivo mientras que las fibras de colágena se reducen y muestran signos de degeneración (Davis, 1986).

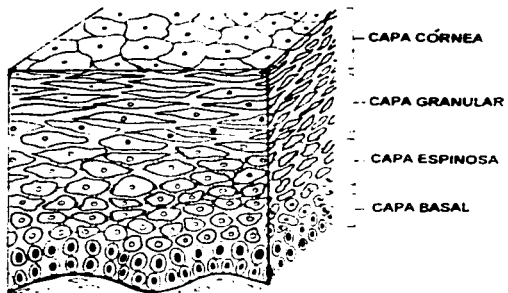


FIG. 2- El epitelio queratinizado en la piel, se caracteriza por presentar los cuatro estratos celulares Takahashi, (1985)

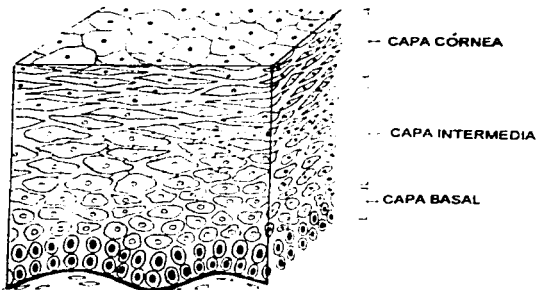


FIG. 3- El epitelio no queratinizado presenta una capa celular intermedia como modificación de las capas granulosa y espinosa del epitelio queratinizado, por lo que es más grueso en los camillos de la mucosa bucal Takahashi, (1985).

4 ARSÉNICO

El Arsenico Inorgánico como Carcinogeno Ambiental

Químicamente el arsenico (As) ha sido descrito como un metaloide, con propiedades parecidas al fósforo y con toxicidad similar a la de metales pesados como el mercurio y el plomo. Los estados de oxidación en que se encuentra son 3⁺, 3⁻ y 5⁻; en el estado 3⁺ el compuesto más importante es la arsina (AsH₃) en los estados 3⁺ y 5⁻ forma numerosos compuestos, fundamentalmente arsenitos (As III) y arseniatos (As V), respectivamente (Ferber y cols., 1979).

El As es un elemento ubico en la naturaleza y fue el primer metal identificado como un carcinogeno ambiental por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, 1980), cuya exposición en humanos ha sido asociada a la presencia de cáncer pulmonar cuando es aspirado y a cáncer de piel, vejiga, riñón e hígado cuando es ingerido. Sin embargo el mecanismo de acción de este elemento es aun desconocido.

Localización

En algunos lugares de la tierra, en donde existen depósitos de azufre, el As está presente como sulfuro de arsenico y como arseniuro de algun metal, estados en los cuales el As es capaz de contaminar depósitos subterráneos de agua, de los que en ocasiones se abastecen gran parte de la población de algunas ciudades. Al ambiente puede liberarse durante la fundición de metales, combustión de carbón mineral, producción de vidrio, semiconductores y otros procesos industriales (Braman y Foreback, 1973; Lindeberg y cols., 1975).

En la agricultura se usa como plaguicida, fungicida y herbicida. También se ha usado extensamente en el tratamiento de algunas enfermedades como anemia, pelagra, asma y reumatismo (NAS, 1977). El arsenico, además de ser un tóxico general, ha demostrado ser un agente genotóxico capaz de producir daño mutagenico, carcinogenico y teratogenico en algunos sistemas de prueba (Ferm, 1977; Vladimir, 1977; Deknudt y cols., 1986). En la figura 4 se ilustra la complejidad de la exposición a arsenico.

Este elemento aparece con frecuencia en agua natural, debido a la erosión de la superficie del suelo y rocas volcánicas. En general, en aguas superficiales el contenido de arsenico es bajo, pero hay casos en que alcanza altas concentraciones, como ocurre en algunos lugares de Polonia (Geyer, 1898); Tawan (Tseng y cols., 1968); Argentina (Arguello y cols., 1938; Treiles y cols., 1970); E.U.A. (Goldblatt y cols., 1963); India (Bagla, 1996) y Chile (Aposhian, 1997).

En México, en algunos poblados de la Comarca Lagunera, localizada en la parte central del norte de México, la cantidad de arsenico en el agua llega a niveles de 0.300 mg/l (Del Razo y cols., 1990) cuando el limite máximo permisible (LMP) recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es de 0.050 mg/l (WHO, 1992). En ellos, el envenenamiento crónico por arsenico es endémico (Castellano y cols., 1964; Chávez y cols., 1964; Bracho, 1971; Sánchez de la Fuente y cols., 1976).

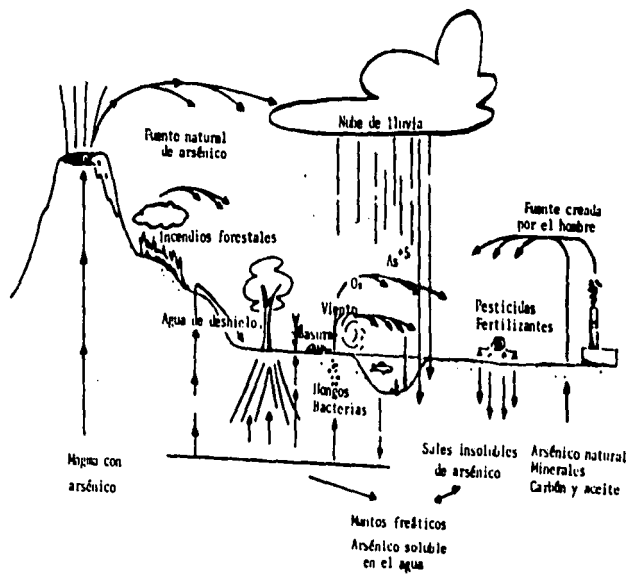


FIG. 4.- Fuentes y ciclo del arsénico en el ambiente (Fishbein y cols., 1967)

Exposición y metabolismo

Existen diversas formas a través de las cuales el ser humano puede estar expuesto al arsénico, las de mayor interés para la salud pública son la inhalación y la ingesta de compuestos arsenicales (Tabla 3).

El arsénico inorgánico tiene dos estados oxidativos, (III) y (V), arsénico trivalente o pentavalente respectivamente. La reducción de arsénico V a arsénico III $As(V) \rightarrow As(III)$ como reacción preliminar para su metilación se ha demostrado en rata, ratón y conejo (Vahter y Envalf, 1983; Lerman y Clarkson, 1983; Vahter y Marafate, 1987). La principal actividad metilante está localizada en el citosol hepático, y este proceso requiere la presencia de glutatión reducido, un pH óptimo entre 7.5 y 8.0 y la S-adenosil metionina como donador de metilos $As(III) \rightarrow As(III)Me$ (Marafate y Vahter, 1984; Buchet y Lauwerys, 1987).

Datos de estudios con animales y con seres humanos muestran que el As es excretado como arsénico inorgánico y en forma de componentes monometilados (ácido monometil arsónico) y dimetilados (ácido cacodílico). De acuerdo con Smith y cols. (1977), los componentes metilados aparecen en la misma proporción en cerca del 66% del arsénico total, en la orina de trabajadores expuestos a bajos y altos niveles de trióxido de arsénico en el aire, indicando que el porcentaje de biotransformación no cambia con la dosis. Sin embargo Martell (1981), mostró que la relación As (III)/As (V) se incrementa en relación con la magnitud de la exposición mientras que Ostrosky y cols. (1995), reportan una disminución en las formas dimetiladas en individuos con exposición crónica a niveles por encima de 300 $\mu g/l$, lo cual sugiere una alteración de la biotransformación.

El arseniato pentavalente es la forma química en la que más frecuentemente se encuentra el arsénico en la naturaleza y este es menos tóxico que el arsenito trivalente. Los componentes pentavalentes son relativamente inactivos fisiológicamente, son solubles en agua y por lo tanto absorbidos rápidamente a través de las membranas mucosas. Esto permite una rápida penetración en todos los tejidos corporales, la mayoría de los cuales son capaces de reducir arseniato a arsenito tóxico (Del Razo, 1990).

Los componentes de arsénico trivalente son menos absorbidos a través de las membranas mucosas por su solubilidad lipídica pero, son mejor absorbidos a través de la piel (Schoolmeester y White, 1980). La forma química del As en el aire, suelo y agua, no es muy conocida en muchas áreas urbanas y suburbanas ya que se encuentra en una mezcla de arsénico inorgánico tri y pentavalente, predominando esta última en la gran mayoría de los casos. Por otra parte, se sabe que la forma química del arsénico ya metabolizado por el hombre es un derivado dimetilado, que comúnmente se denomina ácido cacodílico (Bertolero y cols., 1987; Del Razo y cols., 1994).

Bajo condiciones normales aproximadamente 1mg de arsénico es ingerido diariamente (Petery y cols., 1970). Después de la absorción, el arsénico se combina con la porción globina de la hemoglobina en los eritrocitos. Después de un periodo de 24 horas, el arsénico es distribuido a órganos tales como el hígado, bazo, pulmón y riñón. Una pequeña cantidad se acumula en músculo y tejido nervioso porque la penetración a la barrera hemato-encefálica es mínima. El arsénico que permanece en la sangre se une a las proteínas, dos o cuatro meses después de la ingestión se incorpora al cabello, uñas y piel como uniones de arsénico a grupos sulfhidrílo de la queratina (Schoolmeester y White, 1980).

La principal ruta de excreción es a través del riñón, pero las heces, piel y cabello también pueden contener apreciables cantidades de arsénico (Tadlock y Aposhian, 1980).

Toxicidad

Las manifestaciones clínicas por envenenamiento agudo por arsénico generalmente ocurren pocas horas después de la ingestión o exposición. La lesión principal de una intoxicación aguda con As inorgánico 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, frecuentemente desarrollan problemas a nivel del sistema nervioso periférico (WHO 1981, Bryson 1989).

Efectos subagudos a compuestos irritantes como el óxido de As(III) en el aire incluyen daño severo en las membranas mucosas del sistema respiratorio y de la piel expuesta. Son frecuentes las perforaciones del septo nasal, irritación intensa de la mucosa nasal, laringe bronquios y canal auditivo. Estos síntomas pueden además estar acompañados de conjuntivitis y dermatitis. El sistema hematopoyético sufre también efectos caracterizados por anemia y leucopenia (granulopenia) (WHO 1981, Bencko, 1987).

Exposiciones crónicas a niveles elevados de As inorgánico en trabajadores de fundidoras, producen lesiones en el tracto respiratorio superior y hasta perforaciones en el septo nasal. Alteraciones de piel como hiperqueratosis palmo-plantar, se desarrollan en individuos expuestos a niveles elevados de As en el agua de bebida o en personas que están bajo medicación prolongada con soluciones como la de Fowler. Otros síntomas dermatológicos incluyen hipopigmentaciones, aunque las lesiones hiperqueratósicas son raras entre los trabajadores de las fundidoras (WHO, 1981, Bencko, 1987, ATSDR, 1989).

La exposición al As ocurre generalmente por ingestión, la cual es una vía directa a través de los alimentos o del agua de bebida contaminada en concentraciones que no siempre son pequeñas ni siempre están controladas. Por ejemplo, en los depósitos subterráneos de agua el arsénico llega a alcanzar concentraciones de hasta 1 100 mg/l, siendo que el LMP recomendado por la OMS, en el agua potable es de 0.050 mg/l (WHO, 1992). En la actualidad esta organización ha propuesto que se reduzca a 0.010 mg/l debido a que en estudios recientes acerca de la relación del As con la presencia de cáncer en órganos internos está tomando mayor importancia en la relación dosis-respuesta, debido a su mayor letalidad (Del Razo, 1997).

Estudios epidemiológicos muestran que en poblaciones humanas la exposición crónica a arsénico está asociada a una elevada incidencia de cáncer broncogénico cuando es por inhalación (IARC, 1980, 1987), pero también puede causar cáncer de piel, pulmón, vejiga, hígado y bazo, así como por ingestión (Arguello y cols., 1938, Roth, 1958, Galy y cols., 1963; Bergolio, 1964; Tseng y cols., 1968; Biagini, 1972; IARC, 1980, 1987; Chen y Wang, 1990; Tsuda y cols., 1990; Bates y cols., 1992; Cuzck y cols., 1992).

Existe interés en conocer los mecanismos por los cuales algunos metales son capaces de producir daños mutagénico y carcinogénico, ya que se piensa que al comprenderlos se podrá inhibir o prevenir los efectos biológicos que se observan por la exposición a ellos. Se sabe que los oxianiones, tales como el cromato y el arseniato, pueden entrar a la célula usando los sistemas de transporte de fosfato y sulfato que normalmente se encuentra en las membranas (Jennette, 1981).

Las levaduras utilizan el sistema de transporte de fosfatos para ingresar el arseniato (Jung y Rothstein, 1965), el cual inhibe competitivamente a los fosfatos en células 3T3 de fibroblastos de ratón (Hilborn, 1976). La fosfatasa ácida de hígado humano y la de germen de trigo fue inhibida competitivamente por arseniato, vanadato, molibdato y tungstato (Van Etten y cols., 1974). El arseniato inhibió competitivamente la fosfatasa alcalina de *E. coli* (Lazdunski y Lazdunski, 1966).

El arseniato también inhibe (Na^+ , K^+) ATPasa por unirse al sitio débil del ATP en el riñón de perro (Cantley y cols., 1978).

Se ha observado también que el arsénico afecta la oxidación en las mitocondrias celulares, puesto que estimula a la ATPasa de la mitocondria y la oxidación en la ausencia de fosfato inorgánico (Schiller y cols., 1977).

Los estudios de mutagenicidad *in vitro* han demostrado que el arsénico tiene actividad clastogénica (Levan, 1945; Nygren, 1949; King y Lundford, 1950; Oppenheim y Fishbein, 1965; El Sadek, 1972; Platon y Allison, 1972; Leonard y Lauwerys, 1980; Wan y col., 1982; Vega y cols., 1995) y comutagénica, es decir, es capaz de dañar al ADN y de aumentar la capacidad mutagénica de una serie de compuestos con actividad genotóxica comprobada, como la luz ultravioleta y el agente alquilante metil metano sulfonato (MMS) (Okui y Fujwara, 1986; Li y Rossman, 1989).

En la división celular, los efectos del metal incluyen alteraciones en el huso mitótico, detención de las células en metafase, formación de células poliploides y aneuploides, formaciones diplocromáticas, cromosomas rezagados y, finalmente, un decremento en el índice mitótico (Roldán, 1990; Vega y cols., 1995; Ramírez y cols., 1997). Algunas de estas respuestas pueden ser atribuidas a la afinidad de los metales por los ligandos de sulfuro (Rossman, 1989) y, consecuentemente, por las proteínas del huso mitótico (Chenan, 1987).

Sin embargo, hasta el momento no se ha podido demostrar experimentalmente en algunos animales el efecto carcinogénico del arsénico (Hueper y Payne, 1962; Baroni y cols., 1963; Boutwell, 1963; Milner, 1969; Fern, 1977; y Yamanaoka y cols., 1989), e incluso se ha propuesto que podría ser considerado como un anticarcinogeno (Frost, 1983).

Como teratógeno, compuestos de As inorgánico produjeron malformaciones en fetos cuando se trataron ratones y cricetos preñados (Fern y cols., 1971; Hood y Bishop, 1972; Hood y cols., 1982), y también se vieron malformaciones en aves (Ancel, 1946) y embriones de erizo de mar (Pagano y cols., 1982).

Hay evidencias que demuestran diferencias en el metabolismo del arsénico entre el ser humano y algunas especies animales. Se ha encontrado que la absorción, distribución, metabolismo y excreción del arsénico 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 y cols., 1950; Crecellius, 1977; Pomproy y cols., 1980; Vahter y Norrn 1980; Buchet y cols., 1981).

Se han observado aberraciones cromosómicas en trabajadores expuestos a componentes arsenicales (Petres y cols., 1977; Nordenson y Beckman, 1978). En un grupo de individuos expuestos crónicamente a altas dosis de arsénico en el agua de bebida, se observó una frecuencia elevada de aberraciones cromosómicas de tipo cromatídico (Gonsebatt, 1984). Los linfocitos de estos individuos muestran una respuesta proliferativa menor que la observada en los testigos no expuestos, relacionándose esta observación a un probable efecto inmunosupresor de la exposición crónica (Ostrosky y cols., 1991; Gonsebatt, 1994).

Como mencionamos antes, el arsénico ingresa al organismo por inhalación y por ingestión, por lo que los tejidos epiteliales que recubren la cavidad oral, el sistema respiratorio, los túbulos renales y la vejiga se encuentran en contacto directo con el arsénico, además, el tipo de cáncer que se encuentra asociado con la exposición a arsénico indica que estos tejidos son blanco de este metaloide.

Tabla 3. FORMAS MAS FRECUENTES DE EXPOSICIÓN A ARSÉNICO
Gonsebatt, (1994).

OCUPACIONAL	<p>Ocurre principalmente con el arsénico inorgánico (óxido de arsénico) en el aire del ambiente de trabajo en:</p> <ul style="list-style-type: none"> Fundidoras de metales como el cobre, plomo, oro y antimonio Plantas productoras de arsénico (óxido de As). Plantas productoras de plaguicidas. Plantas generadoras de energía eléctrica mediante la combustión de carbón mineral Industria electrónica (arseniuro de galio y arseniuro de indio)
AMBIENTAL	<p>La exposición ambiental ocurre de manera natural por:</p> <ul style="list-style-type: none"> Consumo de agua con elevadas cantidades de As Consumo de alimentos contaminados (marino principalmente) <p>O por la contaminación de:</p> <ul style="list-style-type: none"> Fuentes de agua potable (ríos y lagos) El ambiente alrededor de plantas productoras de As inorgánico
IATROGÉNICA	<p>Por el uso de medicamentos (principalmente antiparasitarios) que contienen arsénico como el carbarsone, el melarsoprol y la triparasamida</p>

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las células de la mucosa bucal representan un tejido blanco de la exposición a As a través del agua de bebida, puesto que están en contacto directo con él. La evaluación del daño genotóxico en las células epiteliales exfoliadas de la mucosa bucal utilizando la prueba de MNs, resulta relevante no solamente desde el punto de vista mecanístico sino porque permitiría obtener información acerca del daño genético temprano que pueda asociarse a estadios o cambios preneoplásicos, importantes para el establecimiento de estrategias preventivas.

HIPOTESIS

La exposición crónica a arsénico a través del agua de bebida, incrementa la frecuencia de MNs y atipias nucleares en células exfoliadas del epitelio bucal.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la frecuencia de MNs en células exfoliadas del epitelio bucal para utilizarlos como marcadores biológicos de efecto en individuos expuestos crónicamente al As, a través del agua de bebida.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1).-Evaluar la frecuencia de MNs en células exfoliadas del epitelio bucal en individuos de dos poblaciones rurales expuestas crónicamente al arsénico ambiental.
- 2).- Correlacionar la presencia de MNs con otras citopatologías como: "broken-eggs", carionéesis, cariólisis, picnosis, cromatinas condensadas y células binucleadas.
- 3).- Determinar la utilidad de este análisis para demostrar efectos geno y citotóxicos.

6 MATERIAL Y METODOS

Individuos de estudio

Se estudiaron individuos que habitan en dos poblados rurales (expuestos y controles) de la Comarca Lagunera en México y dos en Chile. En cada país, se trató de que las características socioeconómicas y situación geográfica fueran similares. Las poblaciones de Santa Ana, en la Comarca Lagunera y la de San Pedro, en Chile, se consideraron como las poblaciones expuestas por presentar altas concentraciones de As en el agua de consumo ($>300 \mu\text{g/l}$ y $593 \mu\text{g/l}$ respectivamente), mientras que las poblaciones de Nazareno, en la Comarca y Toconao, en Chile correspondieron a las poblaciones testigo por tener bajas concentraciones de As en el agua de bebida. En Nazareno, Dgo. los niveles de As oscilaron entre 19 y $26 \mu\text{g/l}$ en los últimos dos años y en Toconao fue de ($21 \mu\text{g/l}$) (Tablas 4 y 11)

En México, se estudiaron 33 individuos del poblado expuesto y 32 del poblado testigo mientras que en Chile, 10 individuos fueron de la población de San Pedro y 8 de Toconao. Se elaboraron historias clínicas, en las que se interrogó sobre sus antecedentes ocupacionales, tiempo de residencia en el lugar, tabaquismo, alcoholismo crónico, dieta, condiciones socioeconómicas, edad, sexo y especialmente sobre lesiones dérmicas características de la exposición a As (Tablas 5, 6, 12 y 13), tomando como:

Criteros de inclusión

- i) Ser mayor de 20 años.
- ii) Haber vivido por lo menos 10 años en su respectivo poblado

Criteros de no inclusión.

i) Personas con antecedentes de exposición reciente y directa a plaguicidas, fertilizantes y medicamentos hormonales durante los últimos tres meses.

- ii) Individuos que sufran de alcoholismo crónico
- iii) Individuos que estén bajo tratamiento medicamentoso.

Determinación de exposición a As.

La determinación de exposición a As ambiental, se realizó cuantificando el arsénico presente en la orina y agua de las poblaciones estudiadas. Esta se llevó a cabo en el Laboratorio de Toxicología del Centro de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV). Las muestras fueron digeridas de acuerdo con el método de Cox (1980) y se determinó la presencia de As por espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros. En el caso de las muestras de orina de los pobladores de Chile los resultados fueron normalizados por la concentración de creatinina. El As inorgánico y las formas metiladas se cuantificaron de acuerdo a Del Razo, (1994). Se utilizaron los estándares de referencia de orina para metales tóxicos (SRM 2670).

Obtención y fijación de muestras de epitelio

Se obtuvieron muestras de la mucosa bucal de cada uno de los individuos seleccionados para el estudio, a los que se les pidió se enjuagaran la boca antes de realizar un raspado en los carrillos con una espátula de madera.

Las muestras se colocaron mediante un froto sobre un portaobjetos limpio y desengrasado y se fijaron con metanol-ácido acético glacial (3:1). Fueron guardadas a 4°C hasta la tinción de las laminillas.

Tinción de las laminillas

Las muestras celulares se sometieron a dos hidrólisis, una con HCl 1N a temperatura ambiente y la segunda a 60°C durante 5 minutos, se enjuagaron en agua destilada y se tñeron con el reactivo de Schiff de 10 a 20 minutos pasado este tiempo se enjuagaron con agua de la llave y posteriormente con agua destilada durante 5 minutos; se contrañeron con Verde Rápido por 10-15 segundos, enjuagando y dejando secar al aire libre (Stch y Rosin, 1983a).

Análisis al microscopio

Las laminillas fueron codificadas para realizar el análisis al microscopio a ciegas, con un ocular de 10X y un objetivo de 40 X, utilizando el objetivo de 100X o el condensador de contraste de fases para apreciar claramente las células micronucleadas y otras atipias celulares.

Los criterios que se utilizaron para estimar las frecuencias de células micronucleadas (CMNs) fueron los establecidos previamente por Heddie y Salamone, 1981; Heddie y cols., 1981; Stch y Rosin, 1983a; Livingston y cols., 1990.

Estos criterios son:

- 1) Morfológico. Incluye la textura, forma y tamaño de los MNs. La textura debe ser comparable a la del núcleo principal, en cuanto a la forma y tamaño los MNs deben ser redondos u ovalados, y su tamaño, 1/3 del núcleo principal.
- 2) Citológico. Se basó en la reacción positiva del DNA con el reactivo de Feulgen.
- 3) Localización en la célula. este criterio se refiere a que los MNs se encuentren en el mismo plano focal y separados físicamente del núcleo principal.

Además de las CMNs se tomaron en cuenta otras atipias nucleares, que fueron caracterizadas por Tolbert y cols., (1991):

- a).- Células binucleadas: presencia de dos núcleos en una célula.
- b).- "Broken egg": se refiere a un fragmento nuclear unido al núcleo principal por material nuclear, este término fue aplicado por Sarto, (1988).
- c).- Picrosis: el núcleo se encuentra contraído.
- d).- Cromatina condensada: la cromatina aparece en forma agregada.
- e).- Carióresis: existe desintegración de la membrana nuclear.

f).- Cariolisis: hay disolución de la cromatina o material nuclear sin desintegración de la membrana nuclear, se aprecia un núcleo remanente o fantasma (reacción al Feulgen negativa).

Critero para cuantificación.

Se analizaron 1000 células por individuo y si la frecuencia de MNs era menor a 3, se volvían a analizar otras 1000 células, así hasta un máximo de 4000 células, esto con el fin de eliminar la probabilidad de que la observación de MNs pudo haber sido azarosa. Cuando las muestras celulares fueron menores a 1000 células se analizaron todas las laminillas reportándose aquellas que presentaran un mínimo de 500 células.

Las células con más de un MNs fueron cuantificadas como células micronucleadas (Livingston, 1990).

Las atipias celulares se cuantificaron conjuntamente con el análisis de las células micronucleadas.

Análisis estadístico.

El número de células con MNs observada en las poblaciones expuestas y testigos se compararon mediante una prueba de Ji cuadrada. Las frecuencias de MNs fueron cotejadas mediante la prueba de t de Student de una cola. Para el análisis de atipias, se utilizaron las pruebas estadísticas anteriormente mencionadas. Por último se realizó un análisis de correlación simple entre las frecuencias de las células micronucleadas y las frecuencias de células con atipias nucleares. El nivel de significancia se estableció en $p \leq 0.05$.

7 RESULTADOS

COMARCA LAGUNERA

En la población de Santa Ana los biomarcadores de exposición externa al As en agua mostraron valores por encima del LMP recomiendo por la OMS (408.17 $\mu\text{g/l}$). Los niveles de As determinados en las muestras de orina (exposición interna) mostraron valores promediados de 739.8 $\mu\text{g/l}$ con una desviación estándar de 361.4, mientras que los habitantes de Nazareno, presentaron en promedio 34.0 $\mu\text{g/l}$ con una desviación estándar de 35.3. La edad promedio de los individuos estudiados fue de 40.6 y sólo el 33% fueron fumadores, en el grupo expuesto; mientras que para el grupo control la edad promedio fue de 39.0 años y el 29% de ellos fueron fumadores (tabla 4).

Se analizaron las muestras de la mucosa bucal de 32 pobladores de Nazareno. Digo, considerados como el grupo testigo y 33 de la población de Sta. Ana, Coah. que representaron el grupo expuesto. En las tablas 5 y 6 se muestran los datos de edad, sexo, años de residencia, lesiones de piel (que sólo se detectaron en la población expuesta), la frecuencia de MNs; y el número de células analizadas de ambos grupos.

El promedio \pm el error estándar de la frecuencia de MNs por 1000 células en el grupo de individuos testigo fue de 0.56 ± 0.13 mientras que para los expuestos fue de 2.21 ± 0.47 ; al comparar estas frecuencias mediante la prueba de t de Student las diferencias resultaron ser significativas para una $p < 0.05$ (tabla 7). En la gráfica 1 se muestra la frecuencia de MNs por 1000 células de los individuos testigo y expuestos. Un análisis similar se realizó para investigar si existía una asociación entre la presencia de MNs y el hábito de fumar, lo cual resultó no significativo. La prueba de Ji cuadrada mostró diferencias significativas entre individuos testigo y expuestos en cuanto a la proporción del número de células con MNs (Ji cuadrada=43.36; $p=0.0001$) (tabla 18).

Cuando analizamos la frecuencia de MNs por sexo, se observó que entre los hombres y las mujeres testigos la muestra era homogénea y no existían diferencias significativas entre ellos, mientras que entre los pobladores de Santa Ana los hombres presentaron una frecuencia mayor (3.08 ± 0.80) que en las mujeres (1.28 ± 0.37) (gráfica 2). La diferencia entre poblados se mantuvo también a nivel de sexo, es decir, los hombres testigo presentaron una frecuencia significativamente menor de MNs que los hombres expuestos y lo mismo sucedió entre las mujeres testigo y las mujeres expuestas. Los participantes con lesiones en la piel tuvieron una frecuencia de MNs más elevada (3.28 ± 0.96) que los que no presentaron lesiones (1.41 ± 0.32) (gráfica 3); estas diferencias fueron igualmente significativas con la prueba t de Student para una $p < 0.005$. Los datos se muestran en la tabla 7.

Los datos obtenidos cuando se analizaron las atipias nucleares en 1000 células se presentan en las tablas 8 y 9. Los promedios \pm el error estándar de cada una de las atipias del grupo control y expuesto se muestran en la tabla 10. El análisis estadístico con la prueba t de Student mostró que no existían diferencias significativas. Sin embargo, al comparar el número total de células normales con el número total de células de ambos grupos la diferencia fue estadísticamente significativa (Ji=48.93, $p=0.0001$). El análisis del número total de cada una de las atipias comparado con el número total de células analizadas mostró una alta significancia estadística para los núcleos canónicos (Ji=4.55, $p=0.0049$), canónicos (Ji=26.61, $p=0.0001$) y células binucleadas (Ji=11.71, $p=0.0010$), y sólo los núcleos "broken-egg" fueron no significativos

($J_i=0.0582$, $p=0.8047$) (tabla 18). En la gráfica no. 4 se muestran las frecuencias de atipias nucleares por individuo tanto del grupo expuesto como del grupo control.

CHILE

Se analizaron 8 individuos pobladores de Toconao y 10 de la población de San Pedro, a los pobladores de esta última se les consideró como el grupo expuesto por presentar altas concentraciones de AS en el agua potable (593.0 $\mu\text{g/l}$) y cuya edad promedio fue de 42.5 años. A los pobladores de Toconao se les consideró como el grupo control por presentar niveles permisibles de AS en el agua durante los dos últimos años (21.0 $\mu\text{g/l}$) y la edad promedio fue de 44.5, (tabla 11).

El análisis de la frecuencia de CMNs en los grupos estudiados en Chile, mostró similitud con la respuesta observada en la Comarca Lagunera. Los pobladores del grupo expuesto presentaron un incremento de MNs cuatro veces mayor (1.96 \pm 0.42) que el grupo control (0.52 \pm 0.31) (tabla 14). La prueba de Ji cuadrada arrojó diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos el número de células que presentaron MNs en ambas poblaciones ($J_i=7.147$, $p=0.0076$; tabla 18). De manera similar cuando se realizó una prueba de t de Student de una cola, la diferencia fue estadísticamente significativa. En la gráfica 5 se muestra la frecuencia de MNs/1000 de los individuos expuestos contra los individuos testigo. El análisis por género y por lesiones no se realizó por ser una muestra poblacional escasa. En las tablas 12 y 13 se muestran las frecuencias de MNs en 1000 células analizadas, edad, sexo y total de células analizadas de las poblaciones estudiadas.

En las tablas 15 y 16 se muestran los datos absolutos obtenidos para las frecuencias de atipias de Toconao y de San Pedro, y la representación gráfica de estos se observan en la gráfica 6. Los promedios y errores estándar se muestran en la tabla 17. Cuando se comparó el número de células normales con el total de atipias celulares de ambas poblaciones los resultados fueron altamente significativos para la prueba de Ji-cuadrada ($J_i=66.87$, $p=0.0001$). Al comparar el número total de cada una de las atipias analizadas con el número total de células normales de ambas poblaciones con la prueba de Ji cuadrada, los núcleos cancróticos ($J_i=21.62$, $p=0.0001$), canalicos ($J_i=26.61$, $p=0.0001$), picnóticos ($J_i=23.54$, $p=0.0001$) y las cromatinas condensadas ($J_i=111.098$, $p=0.0001$) fueron altamente significativos, mientras que las células binucleadas estuvieron en el límite de significancia ($J_i=3.998$, $p=0.430$) y no fueron significativos los núcleos "broken-egg" ($J_i=0.0005$, $p=0.9808$). Estos datos se muestran en la tabla 18.

8. DISCUSION

Uno de los principales objetivos de la Toxicología Genética es el hallar marcadores biológicos tempranos que permitan evaluar el daño a la salud de los individuos, de tal manera que se pueda realizar una detección temprana y prevención. La prueba de micronúcleos (MNs) en epitelios de descamación permite la evaluación de daño citogénico en las células provenientes de los tejidos directamente expuestos a agentes xenobióticos, de una manera no invasiva. Asimismo, es posible valorar en estas muestras otros parámetros como los cambios a nivel de los núcleos celulares por la presencia de: mas de un núcleo en la célula, núcleos canalíticos, canchales etc., los cuales se ha visto que están asociados con otros tipos de daño celular como son los procesos inflamatorios, los infecciosos, los de premalignidad o los de malignidad, complementando los hallazgos genotóxicos (Papanicolaou, 1943)

La frecuencia de MNs en las células descamadas de voluntarios que beben agua con elevados niveles de As. fue cuatro veces mayor que la frecuencia observada en voluntarios que beben agua con niveles aceptables de As. Esta diferencia se observó tanto en la Comarca Lagunera, México, como en pobladores del norte de Chile, quienes sufrían una exposición similar (tablas 7 y 14). Podemos asumir que de acuerdo con los resultados obtenidos las células bucales están siendo dañadas por la ingestión de arsénico. Los micronúcleos observados pueden originarse por tanto, por la clastogenicidad observada en los cultivos de linfocitos de los voluntarios de la Comarca Lagunera (Gonsebatt, 1994) o por el efecto aneuploidogénico observado *in vitro* (Vega y cols., 1995 y Ramírez y cols., 1997)

Esto puede atribuirse a dos aspectos: primero al hecho de que las células del epitelio oral están en contacto directo con el agente carcinógeno, especialmente en aquellos individuos que presentaron altas concentraciones de As metabolizado e inorgánico, y segundo a que este daño pudo originarse en la capa basal del epitelio durante las divisiones celulares que en ella ocurren para repoblar las capas celulares externas (ver cap. 3). En estudios anteriores se observó que la frecuencia de CMNs en células esfoliadas obtenidas de la orina (Blas, 1995) y la frecuencia de CA en linfocitos de los pobladores de Sta. Ana se incrementaron a más del doble respecto al grupo control, aunque no hubo una correlación directa entre la presencia de CMNs en ambos tejidos epiteliales y de CA en linfocitos, esto se debe probablemente a que se trata de tejidos diferentes y a que los linfocitos tienen un ciclo de vida mayor que las células epiteliales (Gonsebatt y cols., 1997).

En este trabajo investigamos la presencia de MNs así como la de áreas nucleares en individuos expuestos crónicamente al arsénico vía agua de bebida. En trabajos anteriores la exposición a As por ingestión se asoció a un incremento en la proliferación celular y con daño citogénico en linfocitos humanos (Gonsebatt y cols., 1992, 1994). En células del tracto gastrointestinal se asoció con daño citogénico (Blas, 1995, Gonsebatt y cols., 1997), así mismo se observaron altas frecuencias de aberraciones cromosómicas (CA) en este tipo de células sanguíneas, datos que coincidieron con los reportados por Nordenson y Beckman (1978) en trabajadores de fundidoras. Se han observado alteraciones S-dependientes en humanos expuestos crónicamente a mutágenos químicos (WHO, 1985; Al-Sabti y cols., 1992). En cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro* con arseniato y arsenito de sodio no solo se indujeron altas frecuencias de deleciones cromatídicas e isocromatídicas, sino también de aneuploidias (Nakamura y Sayato, 1981; Jha y cols., 1992; Vega, y cols., 1995 y Ramírez, 1997), que se sabe originan MNs.

Entre los individuos expuestos, en la Comarca Lagunera, los hombres mostraron mayor incremento en la frecuencia de MNs (3.08 ± 0.80). Estos datos también coincidieron con los obtenidos en células del tracto genitourinario y en la prueba de CA con linfocitos, donde se observó un incremento en la frecuencia de CMNs y CA en los pobladores de Sta. Ana y específicamente en los hombres expuestos (Blas, 1995 y Gensebatt y cols., 1996). Respecto a las diferencias entre sexos de los individuos expuestos Hsueh y col (1995) refinaron una alta prevalencia de cáncer en la piel en hombres que ingerían agua con altas concentraciones de As y lo atribuyeron al hecho de que los hombres bebían más agua contaminada con el metaloide o a que presentaban una mayor sensibilidad a presentar un cáncer de piel que las mujeres. En la Comarca Lagunera, los hombres son campesinos que trabajan al aire libre bajo un clima seco, por lo que beben más agua que las mujeres, de ahí que esto implique un mayor riesgo de daño citogénico, lo cual se vio reflejado en el incremento de la frecuencia de CMNs.

De la población expuesta los individuos que presentaban lesiones en la piel mostraron un incremento en la frecuencia de CMNs mayor (3.28 ± 0.96) que los que no presentaron lesiones (1.41 ± 0.32) (tabla 7), sin embargo no se puede concluir que las lesiones de piel se produzcan más en un género que en otro, ya que la comparación sólo fue en el grupo expuesto que presentó lesiones y en el que se incluían tanto hombres como mujeres.

Las alpias nucleares se observaron tanto en los grupos expuestos como en los testigos pero la comparación del número total de alpias con el número total de células analizadas de las poblaciones expuestas contra las no expuestas de ambos países, mostró una diferencia estadísticamente significativa, estas diferencias fueron dadas por las frecuencias de canorresis, canolisis y las células binucleadas, en la Región Lagunera; y en Chile además de las canorresis, las cromatinas condensadas y las canolisis, lo fueron los núcleos picnóticos, pero no así por las células binucleadas (tabla 18) Tolbert y cols., (1991), mencionan que un incremento de los niveles normales de estas alpias pueden estar asociadas con una respuesta a daño celular inducido por exposición a agentes ambientales. La canorresis, la cromatina condensada y la picnosis se asocian a eventos tempranos de la apoptosis celular (Tolbert y cols., 1991) proceso que también ha sido propuesto como un mecanismo regulador de la homeostasis de los tejidos epiteliales (Bütz, 1994). Su alteración se ha asociado a diversas patologías en las que se ha incluido el cáncer, así como la inhibición de la síntesis de ciertas proteínas (McCaill, y Cohen, 1991, Bütz, 1994, Duke, y cols., 1997), por lo que la metodología utilizada en la prueba de MNs permite también evaluar los efectos tempranos que están modificando los procesos que mantienen a la homeostasis tisular.

Otra de las ventajas que presenta este sistema de prueba es que la renovación celular en el epitelio de la mucosa bucal es 25 días, lo cual permite evaluar el tipo de daño producido en un tiempo muy corto, esto es importante porque el período de latencia entre la exposición y la aparición de biomarcadores de efecto genotóxico, es relativamente corto (Smith y col, 1993). Por otra parte el realizar un ensayo de genotoxicidad en células epiteliales de descamación resulta de gran relevancia debido a que en este tipo de tejidos aparece cerca del 92% de los cánceres (Carns, 1975; Rosin y Gilbert, 1990). Con base en esto, la prueba de MNs puede evaluar el daño en el órgano blanco de interés, con las ventajas de que el daño observado en estas células ocurre *in vivo*, la obtención de la muestra es sencilla, no invasiva, el análisis es complicado y tiene una gran sensibilidad (Stich, 1983). Por todo esto, la prueba de MNs resulta idónea para el monitoreo de poblaciones en riesgo por exposición a carcinógenos.

9. CONCLUSIONES.

La demostración de efectos biológicos en poblaciones en riesgo, por su exposición ambiental o laboral, permite la implementación de medidas de protección y prevención. Los datos obtenidos en este estudio nos permiten concluir que:

- La exposición crónica a altos niveles de As en el agua de bebida induce MNs en las células epiteliales de descamación de la cavidad oral.
- Esto indica que el tejido epitelial de la mucosa está siendo afectado y por ende es un tejido blanco del As en este tipo de exposición.
- La prueba de MNs muestra ser sensible para valorar el daño genético a estas concentraciones de As en agua.
- La evaluación de las atipias nucleares conjuntamente con el análisis de MNs complementa la información obtenida a través de los MNs puesto que nos da información acerca de la citotoxicidad del agente.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar pruebas moleculares utilizando anticuerpos anticinetocoros y pruebas de hibridación *in situ* para valorar los mecanismos por los cuales se originan los MNs.
- Realizar pruebas morfológicas y bioquímicas que permitan conocer si el origen de los núcleos canceróticos es debido a una muerte celular (apoptosis).
- En este estudio la prueba de MNs mostró ser sensible para establecer daño por As en dosis de exposición superiores a los niveles recomendados por las agencias internacionales (WHO, 1995), por lo que resulta de gran interés valorar su sensibilidad para niveles de exposición menores.
- Introducir a la prueba como un método preventivo del cáncer a nivel clínico, para que de esta forma se alerte a los individuos más afectados por la exposición y puedan así protegerse adecuadamente.

BIBLIOGRAFIA

- Al-Sabb, K., Lloyd, D.C., Edwards, A.A. y Stegnar, P. (1992). A survey of lymphocyte chromosome damage in Slovenian workers exposed to occupational clastogens. *Mutation Res.*, 280, 215-223.
- Ancel, P. (1946). Recherche experimentale sur la spina bifida. *Arch Anat Microsc Morphol Exp.*, 36, 45-68.
- Aposhan, H.V., Arroyo, A. y cols. (1997). DMPS- Arsenic challenge test-I. Increased urinary excretion of monomethylarsonic acid in humans given dimercaptopropane sulfonate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 282, 192-200.
- Argüello, R. A., D. D. Cenget y E. E. Tello (1938). Cancer y arsenicismo regional endémico en Córdoba. *Rev Argent Dermatofisiol.*, 22, 461-487.
- ATSDR. (1989). *Toxicological Profile for Arsenic*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) U.S. Public Health Service, Oak Ridge National Laboratory, USA.
- Bagla, P., Kaiser, J. (1996). India's spreading health crisis draws global arsenic experts. *Science*, 274, 173-174.
- Baroni, C., Van Esch, G. J., y Saffioti, U. (1963). Carcinogenesis tests of two inorganic arsenicals. *Arch. Environ Health*, 7, 688.
- Bates, M. N., Smith, A. H. y Hopenhayn-Rich, C. (1992). Arsenic ingestion and internal cancers: A review. *Am. J. Epidemiol*, 135, 462-476.
- Bencko, V. (1987). Arsenic. En: *Genotoxic and Carcinogenic Metals: Environmental and Occupational Occurrence and Exposure*, Fishbein, L., Furst, A. and Mehiman, M.A. Eds. Princeton Scientific Publishing Co, Princeton, New Jersey, pp 1-30.
- Bergolo, R.M. (1964). Mortality from cancer in regions of arsenical waters of the province of Córdoba Argentine Republic. *Prev. Med. Argent.*, 51, 994-998.
- Bertolero, F., G. Pozzi, E. Sabbioni y U. Saffioti (1987). Cellular uptake and metabolic reduction of pentavalent to trivalent arsenic as determinants of cytotoxicity and morphological transformation. *Carcinogenesis*, 8, 803-808.
- Biagini, R.E. (1972). Hidroarsenicismo crónico y muerte por cánceres malignos. *La Semana Medica*, 141, 812-816.
- Bianchi, V., A. Zantedeschi y A.G. Levis. (1983). The scintilometric evaluation of DNA repair synthesis can be distorted by changes of thymidine pool radioactivity. *Chem. Biol. Interact.*, 43, 17-31.
- Bias, V.J. (1995). Evaluación de la frecuencia de micronúcleos en células uroepiteliales de individuos con exposición ambiental a arsénico. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, U.N.A.M.

- Boller, K., Schmid, W. (1970). Chemische Mutagenese beim Säuger. Das Knochenmark des Chinesischen Hamsters als *in vivo* Testsystem. Hämatologische Befunde nach Behandlung mit Trenimon. *Humangenetik* 11, 35-54.
- Boutwell, R. K. (1963). A carcinogenicity evaluation of potassium arsenite and arsenic acid. *J Agr Food Chem.*, 11, 381.
- Bracho, A. R. (1971). Arsenismo crónico en la Comarca Lagunera de Coahuila. Tesis Recreacional. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Coahuila, México.
- Braman, R. S. y Forebeck, C. C. (1973). Methylated forms of arsenic in the environment. *Science*, 182, 1247-1249.
- Brenneke, H. (1937). Strahlenschädigung von Mause- und Rattensperma beobachtet an der Frühentwicklung der Eier. *Strahlentherapie*, 60, 214-238.
- Brusick, D. (1987). *Principles of Genetic Toxicology*, 2da. ed. Plenum Press, Londres, pp 1-2.
- 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. y Laverys, R. (1987). Study of factors influencing the *in vivo* methylation of inorganic arsenic in rats. *Tox Appl Pharmacol.*, 91, 65-74.
- Budz, P.E. (1994). Epidermal Homeostasis: A new Model that includes apoptosis, en Apoptosis II: The molecular basis of apoptosis in disease. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 165-183.
- Cairns, J. (1975). Mutational selection and the natural history of cancer. *Nature (London)*, 255, 197-200.
- Canley, L. C., Reah, M.D., y Guidotti, G. (1978). Vanadate inhibits the red cells (Na⁺, K⁺) ATPase from the cytoplasmic side. *Nature*, 272, 552.
- Castellano, A. L., Viniestra, G., Esilava, G. R., y Álvarez, A. J. (1964). El arsenicismo en la Comarca Lagunera. *Salud Publ. Mex.*, 6, 375-385.
- Chávez, A., Pérez, C., Tovar, E., y Gramilla, M. (1964). Estudios en una comunidad con arsenicismo crónico endémico. *Salud Publ Mex.*, 6(3), 421-433.
- 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. (1987). *Metallothionein and metal toxicity*. CRC Press Boca Raton, FL, USA., pp. 2223-2224.
- Countryman, P. I., y J. A. Heddle. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 41, 321-332.

- Cox, D.H.(1980). Arsenic evolution-electrothermal atomic absorption method for the determination of nanogram levels of total arsenic in urine and water. *J. Anal. Toxicol.*, 4, 207-211.
- Crecekus, E. A. (1977) Arsenite and arsenate levels in wine. *Bull Environ Contam. Toxicol.* 18, 227
- Cuzick, J., Sasieni, P., y Evans, S (1992). Ingested arsenic, keratoses, and bladder cancer. *Am. J. Epidemiol.*, 136(4), 417-421.
- Davis, W.L. (1986). *Histología y embriología bucal*. De. Mc Graw Hill. México, pp186-205.
- DeKnuft G., Leonard A., Arany J., Buisson G., Delavignette E. (1986). *In vivo* studies in male mice on the mutagenic effects of inorganic arsenic. *Mutagenesis*, 6, 33-34.
- Del Razo, L. M., Arellano, M. A. y Cebrián, M. E (1990). The oxidation states of arsenic in well-water from a chronic arsenicism area of northern Mexico. *Environ. Pollut.*, 64, 143-153.
- Del Razo, L. M., Hernández, J. L., García-Vargas, G. G., Ostrosky-Wegman, P., Cortinas de Nava, C. y Cebrián, M. E. (1994). Urinary excretion of arsenic species in a human population chronically exposed to arsenic via drinking water. A pilot study. En *Arsenic. Exposure and Health*, eds. W. Chappell, Ch. Abernathy y R. Cothorn, pp. 91-100.
- Del Razo, L. M. (1997). *Biotransformación del arsénico y su relación con las lesiones de piel en individuos expuestos crónicamente al metaloide*. Tesis doctoral. Departamento de Farmacología y Toxicología. CINVESTAV, I.N.P.
- Discombe, G. (1948). L'origine des corps de Holly-Jolly et des anneaux de Cabot. *Sang.* 19, 262-264.
- Duke, R.C., Ojcius, D.M. y Young, J. D-E., (1996). Cell suicide in health and disease. *Scientific American*, 275:6, 80-87.
- Ehling, U. H. (1991). Genetic risk assessment. *Ann. Rev. Genet.*, 25, 255-280.
- El-Sadek, L.M. (1972). Mitotic inhibition and chromosomal aberrations induced by some arylarsenic acids and its compounds in root-tips of maize. *Egypt J Genet Cytol.*, 1, 218-224.
- Epidemiología (1995). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema único de información. Vol. 12, No. 28, pp 1-19.
- Evans, H. J.; G. J. Neary y F. S. Williams (1959). The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *Int J Radiat Biol.*, 3, 216-229.
- Fenech, M., Morley, AA. (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, 43, 233-246.
- Fern, V. H., A. Saxon y B. W. Smith. (1971). The teratogenic profile of sodium arsenate in the golden hamster. *Arch Environ Health*, 22, 557-560.
- Fern, V. H. (1977). Arsenic as a teratogenic agent. *Env Health Persp.*, 19, 215-217.

- Fishbein, L., Furst, A., y Mehlman, M. A. (1987). *Genotoxic and carcinogenic metals: Environmental and occupational occurrence and exposure*. Princeton Scientific Publishing Co. Inc. U.S.A., 109-200.
- Foa, B., Colombi, A., Maroni, M., Buratti, M. y Calzaferrri, G. (1984) The speciation of the chemical forms of arsenic in the biological monitoring of exposure to inorganic arsenic. *Sci. Total Environ.*, 34, 241-259.
- Frigberg, L., Nordberg, G.F. y Vouk, V.B. (1979). *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam
- Frost, D.V. (1983). What do losses in selenium and arsenic bioavailability signify for health?. *Sci Tot Environ.*, 20, 455-466.
- Galy, P., Touraine, R., Brune, J., Roudier, P., y Gallois, P. (1963) Le cancer pulmonaire d'origine arsénicale des vigneronns du Beaujolais. *J.Fr. Med. Chr. Thorac.*, 17, 303-311.
- Geyer, L. (1898). *Über die chronische Arsenvergiftung der Winzer*. *Arzt Wschr.*, 4, 365-369.
- Goldblatt, E.L., A.S. Vandenberg y R.A. Marsland. (1963). *The usual and widespread occurrence of arsenic in well waters of Lane County*. Oregon Department of Health, Portland, OR.
- Gonsebatt, M.E., Vega, L., Herrera, L. A., Montero, R., Rojas, E., Cebrian, M.E. y Ostrosky-Wegman, P. (1992). Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation. *Mutat Res.*, 283, 91-95.
- Gonsebatt, M.E. (1994). *Marcadores biológicos de exposición a arsénico inorgánico*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, U.N.A.M.
- Gonsebatt, M.E., Vega, L., Guzmán, P., Blas, J., Montero, R., Albores, A., García Vargas, G., Del Razo, L.M., Cebrian, M.E. y Ostrosky-Wegman, P. (1997). Genotoxicity of Arsenic Exposure *Mutation Res.*, 386, 219-228.
- Heddle, J.A. (1973). A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutat. Res.*, 18: 187-190.
- Heddle, J.A. Raj, A.S., y Krepinsky, A.B. (1981). The micronucleus assay. II. En: H.F. Stich y RHC San (ed), *Short-term tests for Chemical carcinogens*, pp.250-254. Springer-Verlag, Berlin, N.Y.
- Heddle, J.A., y Salamone, M. F. (1981). The micronucleus assay. I. *In vivo*. En : H:F. Stich y R:H:C: San (ed.), *Short term test for chemical carcinogens*, pp. 243-249, Springer-Verlag, Berlin. New York.
- Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shetty, M.D., Tucker, J.D., Vanparys, P., MacGregor, J.T. (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ. Mol. Mutagen.*, 18, 277-291.
- Hilborn, D.A. (1976). Serum stimulation of phosphate uptake into 3T3 cells. *J.Cell.Physiol.* 87: 111.

- Hood, R. D., y S. L. Bishop (1972). Teratogenic effects of sodium arsenate in mice. Arch Environ Health, 24, 62-65.
- Hood, R. D., W. P. Harrison, y G. C. Vedel. (1982). Evaluation of arsenic metabolites for prenatal effects in the hamster. Bull Environ Contam Toxicols., 29, 679-687.
- Howell, W.H. (1891) The life-history of the formed elements of the blood corpuscles. J Morphol 4, 57-116.
- Hsueh, Y.-M. Cheng, G.-S. Wu, M.-M. Yu, H.-S. Kuo, T.-L y Chen. C.-J (1995). Multiple risk factors associated with arsenic- induced skin cancers: effects of chronic liver disease and malnutritional status. British Journal of Cancer 71, 109-114.
- Hueper W. C. y Payne, W. W. (1962) Experimental studies in metal carcinogenesis. chromium, nickel, iron, arsenic. Arch Environ Health, 5, 445
- Hulka, B. S., (1990). Overview of biological markers. En Biological Markers in Epidemiology, eds. B. Hulka, T. Wilcotsky, y J Griffith, pp. 1-15. New York. Oxford University Press.
- 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.
- IARC (1987) Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, suppl 7, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France
- Jha, A.N., Nodir, M., Nilson, R. y Natarajan A.T. (1992). Genotoxic effects of sodium arsenite on human cells. Mutat. Res., 248, 215-221.
- Jennette, K. W. (1981). The role of metals in carcinogenesis: biochemistry and metabolism. Environ Health Perspect., 40, 233.
- Jolly, J. (1907) Recherches sur la formation des globules rouges des mammifères. Arch Anat Microsc. 9, 133-314.
- Jung, C., y Rothstein, A. (1965). Arsenate uptake and release in relation to the inhibition of transport and glycolysis in yeast. Biochem. Pharmacol., 14, 1093
- King, H., y R. J. Lundford. (1950). The relation between the constitution of arsenicals and their action on cell division. J Chem Soc., 8, 2086-2088.
- Lanz, H., Jr., Wallace, P.W., y Hamilton, J. G. (1950). The metabolism of arsenic in laboratory animals 74 As as a tracer. Univ. Calif. Pub. Pharmacol., 2: 263.
- Lazdunski, C., y Lazdunski, M. (1966). Étude cinétique du mécanisme d'action catalytique de la phosphatase alcaline d'*Escherichia coli* Biochim. Biophys. Acta, 113: 551.
- Léonard, A., y Lauwerys, R. R. (1960). Carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity of arsenic. Mutat Res., 75: 49-62.

- Lerman, S. y Clarkson, T. (1983). The metabolism of arsenite by rat. *Fund Appl Toxicols.*, 3, 309-314.
- Levan, 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. Toxicols.*, 2, 1-9.
- Lindeberg, S. E., Andrews, A. W. Ardon R.J., Fulkerson W. (1975). Mass balance of trace elements. *Env Health Persp.*, 12, 9-18.
- Lim, C.K. (1982). Some routine applications of high performance liquid chromatography in clinical chemistry. En: *XI International Congress of Clinical Chemistry*, Kaiser E., Gabl F., Muler MM., Bayer M Eds. Walter de Gruyter and Co. Berlin, pp. 957.
- Livingston GK, Reed RN, Olson BL, y col(1990). Induction of nuclear aberrations by smokeless tobacco in epithelial cells of human oral mucosa. *Environ Mol Mutagen.*, 15, 136-144.
- MacGregor, J.T., Tucker, J.D., Eastmond and Wyrobek, J.A. (1995). Integration of cytogenetic assays with toxicology studies. *Environ. Mol. Mutagen.*, 25, 328-337.
- Mandard, A.M., F. Duigon, J. Marnay, Ph. Masson, Q. Song-Lang, Y. Jing-Shu, P. Barrelier y G. Lebigot (1987). Analysis of the results of the micronucleus test in patients presenting upper digestive tract cancers and in non-cancerous subjects. *Int. J Cancer*, 39, 442-444.
- Marafate, E. y Vahter, M. (1984). The effect of methyltransferase inhibition on the metabolism of ⁷⁵As arsenite in mice and rabbits. *Chem Biol Interact.*, 50, 49-57.
- Martell, A. (1981). Chemistry of carcinogenic metals. *Environ Health Perspect*, 40, 207.
- Matter, B., y W. Schmid. (1971) Trenimon induced chromosomal damage in bone marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test. *Mutat Res.*, 12, 417-425.
- McCall, A.C. y Cohen, J.J. (1991). Programmed cell death in terminally differentiating keratinocytes: Role of endogenous endonuclease. *J. Invest. Dermatol.*, 97:1, 111-114.
- Milner, J. E. (1969). The effect of ingested arsenic on methylcholanthrene-induced skin tumors in mice. *Arch environ Health*, 18, 7.
- Nakamura, M. y Sayato, Y. (1981). Comparative studies of chromosomal aberrations and induced by trivalent and pentavalent arsenic. *Mutation Res.*, 88:73-80.
- NAS. (1977). Medical and Biologic effects of environmental pollutants, arsenic National Research Council. *National Acad. Of Sci., Washington, D.C., U.S.A.*
- Neumann, E. (1869) V. Ueber die Bedeutung des Knochenmarkes für die Blutbildung. *Arch Heilkd* X:68-102.

- Nordenson, I. y Beckman, G. (1978). Occupational and environmental risk in and around a smelter in northern Sweden. *Hereditas*, 88: 47-50, 263-267.
- Nygren, A. (1949). Cytological studies of the effects of 2,4-DMCPA y 2,4,5-T on *Allium cepa* Ann Roy Coll (Sweden). 16, 273-278.
- Obe, G. (1994). *Advances in mutagenesis reseach* 5 Berlin, Heidelberg, New York Singer-Verleg p.p. 193.
- Okui, T. y Fujiwara, Y. (1986) Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the co-mutagenic effect in V79 chinese hamster cells. *Mutat Res.* 172, 69-76.
- Oppenheim, J. J. y W. N. Fishbein. (1965). Induction of chromosome breaks in cultured normal human leukocytes by potassium arsenite, hydroxyurea and related compounds. *Cancer Res.*, 25, 990-995.
- Ostrosky-Wegman, P, Gonsebatt, M.E., Montero, R., Vega, L., Barba, H., Espinosa, J., Palao, A., Corbinas, C., Garcia-Vargas, G., del Razo, L.M y Cebrian M (1991). Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutation Res.*, 250, 477-482.
- Ostrosky P., Cebrian M.E., Kelch M. (1995). Technical Report RP 3370-11 on Risk Evaluation of Chronic Exposure to Hydroarsenicism in Mexico, Electric Power Research Institute., in press.
- Papano, G., A. Esposito, P. Bove, M. de Angelis, A.Rota, E. Vamvakinos y G. G. Giordano. (1982). Arsenic induced developmental defects and mitotic abnormalities in sea urchin development. *Mutat Res.*, 104, 351-354.
- Papanicolaou, G.N. (1943). *Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear*. New York, Commonwealth Foundation.
- Paton, G.R., y Allison, A. C. (1972). Chromosome damage in human cell cultures induced by metal salts. *Mutat Res.*, 16, 332.
- Perera, F. (1996). Indicadores internos del riesgo de cáncer. *Investigación y ciencia*, 238, 22-29.
- Petry, J, Rennert, O, Choi H, y cots: (1970). Arsenic poisoning in childhood. *Clin Toxicols.* 3, 519-526.
- 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.
- Picker, J.D., y Fox, D.P. (1986). Do carried foods produce micronuclei in buccal epithelias cells? *Mutat. Res.* 171, 185-188
- Pomroy, C., Chaarborneau, S. M., Mc. Cullough, R. S., Tam, G. K., (1980). Human retention studies with As 74. *Toxicology and Applied Pharmacology.*, 53, 550-556.

- Raafat, M., El- Gerzawi, S., y Stuch, H.F. (1984). Detection of mutagenicity in urothelial cells of bithiazol patients by the micronucleus test. J Egypt Natl Cancer Inst., 1:(3), 63-67.
- Ramirez, N. P., Eastmond, D.A., Laclete, J.P. y Ostrosky-Wegman, P. (1997). Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. Mutat. Res., 386, 291-298.
- Reali, D., Marino, F.D., Bahramandpour, S., Carducci, A., Barale, R., y Loprieno, N. (1987). Micronuclei in exfoliated cells and urine mutagenicity in smokers. Mutat. Res., 192, 145-149.
- Read, J. y Kihlman, B. A. (1958). Comparison of 8-ethoxycaffeine and X-rays on the cytology and growth of roots of *Vicia faba*. Hereditas, 42, 487-507.
- Roldan, E. (1990). Chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and satellite associations in human lymphocytes cultures exposed to vanadium pentoxide. Mutat Res., 245, 61-65.
- Rosin, M.P. y German, J. (1985). Evidence for chromosome instability in vivo in Bloom syndrome: Increased numbers of micronuclei in exfoliated cells. Hum. Genet., 71, 187-191.
- Rosin, M.P. y Gilbert, A. M. (1990). Modulation of genotoxic effects in humans. Mutat. Environ., 5, 351-359.
- Rosin, M. P., y Anwar, W. (1992). Chromosomal damage in urothelial cells from Egyptians with chronic *Schistosoma haematobium* infections. Int. J. Cancer, 50, 539-543.
- Rossmann, T. G. (1989). Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis. Mol Toxicol., 2, 1-9.
- Roth, F. (1958). Über den Bronchialkrebs arsengeschädigter Winzer. Virchows Arch. Pathol., 331, 119.
- Sánchez de la Fuente y cols. (1976). Arsenismo crónico en la zona rural de la Comarca Lagunera, 34th Reun Anu Asoc Front Mex-Estadounidense Salubridad.
- Sarto, F., S. Finotto, L.Giacomelli, d. Mazzoni, R.Tomanin and A.G. Lewis (1967). The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. Mutagenesis, 2, 11-17.
- Schiller, C. M., Fowler, B. A., Woods, J. S. (1977). Effects of arsenic on pyruvate dehydrogenase activation. Environ Health Persp., 19, 205-207.
- Schoonmaester, W. y White D. (1980). Arsenic poisoning. South Med J., 73, 198-202.
- Silverman, D. T., Harige, P., Morrison, A.S., y Devesa, S.S. (1992). Epidemiology of bladder cancer. Hematol. Oncols Clin. North. Am., 6(1), 1-30.
- Smith, T. J., Creelikus, E.A., y Reading, J.C. (1977). Airborne arsenic exposure and excretion of methylated arsenic compounds. Env. Health. Perspect., 19, 89.

- Smith, A.H., Hopenhayn-Rich C. Warner, M. Biggs, M. Moore, I. Smith, M. (1993) Rationale for selecting exfoliated bladder cell micronuclei as potential biomarkers for arsenic genotoxicity. *J Toxicol Env Health.* 40, 223-234.
- Stich, H.F. y Stich, W. (1982). Chromosome damaging activity of saliva of betel nut and tobacco chewers. *Cancer Lett.* 15, 193-202.
- Stich, H., J. Curtis y B. Panda. (1982). Applications of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *Int. J. Cancer.* 30, 553-559.
- Stich, H.F., Stich, W., y Panda, B.B (1982b) Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: Betel quid chewers. *Cancer Lett.* 17, 125-134.
- Stich, H., R. San y M. Rosin. (1983) Adaptation of the DNA repair and micronucleus test to human cell suspensions and exfoliated cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 407, 93-105.
- Stich, H., y M. Rosin (1983a). Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *Int J Cancer.* 31, 305-308.
- Sullivan J.B. y G.R. Kneger. (1992). Introduction to hazardous materials toxicology en: *Hazardous materials toxicology* Sullivan y Kneger Eds., Williams and Wilkins, Baltimore pp 2-8.
- Tadlock, C. y Aposhian, H. (1980). Protection of mice against the lethal effects of sodium arsenite by 2,3- dimercapto-1- propanesulfonic aci and dimercaptosuccinic acid. *Biochem Biophys Res Commun.* 94, 501-507.
- Takahashi, M. (1985). *Atlas color: Citología del cáncer.* Ed. Médica Panamericana, S.A. Buenos Aires, pp 572
- Ten-Cate, A.R. (1986). 'Oral histology: Development, structure and function' C.V. Mosby Co., St. Louis, M.O.
- Thoday, J. M. (1951). The effect of ionizing radiations on the broad bean root, Part IX. Chromosome breakage and the lethality of ionizing radiations to the root meristem, *Br J Radiol.* 24, 572-576, 622-628.
- Tolbert, P., C. Shy y J. Allen (1991). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: field test in snuff users. *Am. J. Epidemiol.* 134, 840-850.
- Tolbert, P.E., Shy, C.M. y Allen, J.W. (1992). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Res.* 271, 69-77.
- Tornatis, L. (1990) *Cancer: Causes Occurrence and Control (IARC Sci Pub N° 100)* International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

- Toniolo, P., Taioli, E. (1995). Development of biomarkers of human exposure to carcinogens: the example of DNA-protein cross-links. *Toxicology letters*, 77, 321-234.
- Trelles, R. A., A. Larghi y J. P. Paez (1970). El problema sanitario de las aguas destinadas a la bebida humana con contenidos elevados de arsénico, vanadio y fluor. Instituto de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires.
- 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. (US)* 40, 453-463.
- Tsuda, T., Nagata, T., Yamamoto, M., y Kume, Y. (1990). An epidemiological study on cancer in certified arsenic poisoning patients in Toroku. *Ind. Health*, 28 (2), 53-62.
- Van Eten, R. L., Waymack, P. P. y Rehkop, D. M. (1974). Transition metal ion inhibition of enzyme-catalyzed phosphate ester displacement reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 96, 67-82.
- Vahler, M. y Nonn, H. (1980). Metabolism of ^{74}As -labelled trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice. *Environ. Res.*, 21, 446-457.
- Vahler, M. (1981). Biotransformation of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice and rats. *Environ. Res.*, 25, 286-293.
- Vahler, M. y Envall, J. (1983). *In vivo* reduction of arsenate in mice and rabbits. *Environ. Res.*, 32, 14-24.
- Vahler, 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.
- Vega, L., Gensebatt, ME. y Ostrosky-Wegman. (1995). Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes *in vitro* : an individual susceptibility effect detected. *Mutat. Res.*, 334, 365-373.
- Vine, M.F. (1990). Micronuclei. En: *Biological Markers in Epidemiology*, eds. B.Hulka, T. Wilcosky, y J. Griffith, pp. 125-146. New York. Oxford University Press.
- Vladimir, B. (1977). Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of arsenic. *Env Healt Persp.*, 19, 179-182.
- Wan, B., R. T. Christian y S. W. Sokup. (1982). Studies of cytogenetic effects of sodium arsenicals on mammalian cells *in vitro*. *Environm. Mut.*, 4, 493-498.
- WHO (1981). *Environmental Health Criteria: Arsenic*, Vol. 18, Geneva.
- WHO (1985). *Guidelines for the study of genetics effects in human populations*, *Environ. Health Criteria* 46, Ginebra.

WHO (1992). Revision of the WHO guidelines for drinking water quality. Report of the final task group meeting, Geneva.

Wynder, E. L., I. J. Bross, y R. M. Feldman. (1957). A study of the etiological factors in cancer of the mouth. *Cancer*, 10, 1300-1323.

Yamamoto, K.I. y Y. Kikuchi. (1980). A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat Res.*, 71, 127-131.

Yamanaka, K., Hasegawa, A., Sawamura, R., y Otada, S. (1989). Dimethylated arsenics induce DNA strand breaks in lung via the production of active oxygen in mice. *Biophys. Res. Comm.* 165, 43-50

TABLA 4. MARCADORES DE EXPOSICIÓN DE LAS POBLACIONES ESTUDIADAS EN LA COMARCA LAGUNERA.

	PROMEDIO \pm D.E.	
	NAZARENO	SANTA ANA
As total en el agua de bebida ($\mu\text{g/l}$) n=4	29.88 \pm 9.78	408.17 \pm 10.44*
As total en orinas ($\mu\text{g/l}$)	34.0 \pm 35.3 n=34	739.8 \pm 361.4* n=35
As inorgánico ($\mu\text{g/l}$)	2.6 \pm 2.38	235.2 \pm 135.8*
MMA ¹ ($\mu\text{g/l}$)	1.78 \pm 1.38	101.3 \pm 86*
DMA ² ($\mu\text{g/l}$)	29.6 \pm 33.9	403.3 \pm 195*
Edad (años)	40.6 \pm 10.6	39.0 \pm 9.7
Fumadores (%)	33	29

*t-test, $p < 0.05$

¹ As monometilado, ² As dimetilado

TABLA 5. FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS EN CÉLULAS EPITELIALES DE CONTROLES (NAZARENO, COMARCA LAGUNERA)

CODIGO	EDAD/ SEXO	AÑOS DE RES. ¹	LESIONES DE PIEL. ²	MNS/1000 CELS.	CELULAS ANALIZADAS
00236	36/M	36	NO	0.58	3446
88629	37/M	37	NO	0.49	4033
96087	38/M	38	NO	0.00	3056
62111	39/M	39	NO	1.00	1000
34833	39/M	39	NO	0.00	3959
12479	43/M	22	NO	0.24	4025
46614	45/M	45	NO	1.00	3000
50948	46/M	36	NO	2.00	3000
13428	45/M	45	NO	0.00	3966
12948	47/M	47	NO	1.00	4000
29881	52/M	52	NO	0.25	4000
97978	66/M	47	NO	1.00	4000
60609	64/M	64	NO	0.24	4016
00020	62/M	62	NO	0.00	3036
53342	22/F	22	NO	1.00	4000
83091	24/F	24	NO	0.74	4041
91758	26/F	26	NO	0.00	3265
17676	28/F	28	NO	0.00	4000
55784	32/F	32	NO	0.00	1000
78258	33/F	10	NO	1.00	1000
87894	34/F	34	NO	0.23	4168
63700	34/F	34	NO	0.00	4016
33851	36/F	36	NO	0.00	4000
37231	35/F	20	NO	1.00	1000
67879	39/F	39	NO	2.00	4000
99547	40/F	40	NO	0.75	4000
00018	40/F	40	NO	1.00	1000
01412	44/F	43	NO	0.28	3650
62880	44/F	44	NO	0.00	4000
89964	45/F	23	NO	0.00	3905
00019	56/F	56	NO	0.33	3000
44105	62/F	62	NO	2.00	1000

1.años de residencia. 2 frecuencia de micronucleos por 1000 células

TABLA 6. FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS EN CÉLULAS DE EPITELIO BUCAL DE INDIVIDUOS EXPUESTOS (SANTA ANA, COMARCA LAGUNERA).

CÓDIGO	EDAD/ SEXO	AÑOS DE RES. ¹	LESIONES DE PIEL ²	MNS/1000 CELS. ³	Nº. DE CÉLULAS ANALIZADAS
81463	28/M	10	1,4	1 00	3000
94771	32/M	32	NO	2 00	1000
67079	32/M	28	NO	1 00	1000
100743	30/M	30	NO	3 00	1000
22554	34/M	34	NO	3 00	1000
05999	38/M	38	2,3	2 00	3000
42866	38/M	16	NO	0 00	4072
47366	38/M	38	NO	2 20	4124
76999	40/M	40	4	0 00	3733
64620	41/M	41	1-5	8 00	1000
66892	42/M	19	2,3,4,5	2 21	3619
15345	43/M	43	NO	0 00	4000
85436	44/M	17	1-4,6	9 00	1000
58212	46/M	46	NO	0 00	4000
39765	49/M	49	2,3	7 00	1000
00742	58/M	58	NO	2 00	1000
67382	68/M	65	2,3,4	10 00	1000
54463	24/F	3	NO	2 00	3000
81619	27/F	27	NO	0 25	4000
13858	28/F	28	NO	0 00	3090
01432	30/F	15	NO	0 50	4000
65978	31/F	15	NO	5 00	1000
05437	33/F	33	4	3 00	1000
39220	35/F	7	NO	1 98	3018
82995	37/F	20	NO	0 00	3000
08015	42/F	42	4	0 00	1000
16777	42/F	42	2,3,4	0 00	4000
72640	42/F	42	1,4	2 47	3231
80222	43/F	43	NO	3 00	1000
84318	44/F	44	4	1 36	2920
97017	47/F	47	NO	0 00	2719
47361	47/F	30	NO	1 00	1000
39693	66/F	36	4	0 00	3148

¹ años de residencia. ² tipos de lesiones en piel: 1: hiperhidrosis, 2: hipopigmentación, 3: hiperpigmentación, 4: hiperqueratosis palmoplantár, 5: queratosis papular, 6: cuernos cutáneos (Yeh, 1973). ³ frecuencia de micronúcleos por 1000 células.

**TABLA 7 PROMEDIO \pm ERROR ESTÁNDAR DE MNs/1000
CÉLULAS EPITELIALES (COMARCA LAGUNERA, MEX.)**

Población	Promedio \pm E.E.
Santa Ana (n=33) hombres mujeres con lesiones de piel sin lesiones de piel	2.21 \pm 0.47* 3.08 \pm 0.80 1.28 \pm 0.37 3.28 \pm 0.96* 1.41 \pm 0.32
Nazareno (n=32) hombres mujeres	0.56 \pm 0.13 0.55 \pm 0.15 0.57 \pm 0.15

*t-test $p < 0.05$

TABLA 8. FRECUENCIA DE ATÍPIAS NUCLEARES EN 1000 CÉLULAS DE EPITELIO BUCAL DE INDIVIDUOS TESTIGO (NAZARENO, COMARCA LAGUNERA)

CDIGO	EDAD/ SEXO	BGG ¹	CR ²	CL ³	BN ⁴
00236	36/M	0	5	5	2
88629	37/M	1	20	8	1
96887	38/M	0	1	2	0
62111	39/M	0	105	50	2
34833	39/M	0	4	23	3
12479	43/M	0	5	20	3
46614	45/M	1	10	1	3
50998	46/M	6	0	11	4
13428	45/M	2	15	34	1
17918	47/M	3	87	10	0
29881	52/M	0	11	20	3
97978	66/M	12	120	10	6
60699	64/M	0	12	15	2
08020	62/M	0	1	3	3
53342	22/F	0	1	15	3
83091	24/F	0	31	2	2
93758	26/F	5	20	5	3
17676	28/F	1	60	11	1
55784	32/F	1	22	3	1
78258	33/F	0	11	11	0
87894	34/F	0	39	52	0
63700	34/F	1	5	4	2
33851	36/F	0	8	26	0
37231	35/F	0	15	6	1
67879	39/F	0	0	9	2
99547	40/F	2	13	16	3
08018	40/F	2	9	4	2
01412	44/F	1	0	28	3
62880	44/F	2	4	5	6
89964	45/F	0	5	7	1
00019	56/F	1	2	0	2
44105	62/F	1	103	45	3

¹BIOPRECED. ²CAMBIOS. ³CAMBIOS. ⁴TELLAS PENETRADAS

TABLA 9. FRECUENCIA DE ATIPIAS NUCLEARES EN 1000 CÉLULAS DE EPITELIO BUCAL DE INDIVIDUOS EXPUESTOS A AC (SANTA ANA, COMARCA LAGUNERA)

CODIGO	EDAD/ SEXO	BEGG ¹	CR ²	CL ³	BN ⁴
81463	28/M	0	9	19	2
94771	32/M	7	28	9	6
67079	32/M	1	9	5	7
00741	30/M	0	4	3	0
22554	34/M	2	26	19	1
05999	38/M	2	30	113	5
42866	38/M	2	65	9	3
47366	38/M	3	164	7	5
76999	40/M	1	7	14	8
64620	41/M	1	36	17	2
66892	42/M	1	16	14	2
15345	43/M	1	30	56	4
85436	44/M	16	72	30	5
58212	46/M	0	11	11	0
39765	49/M	2	1	8	9
00742	58/M	3	39	4	4
67382	68/M	1	19	43	3
54463	24/F	1	38	15	2
81019	27/F	0	3	2	2
13858	28/F	0	3	6	0
01432	30/F	0	3	17	13
65978	31/F	1	3	4	8
05437	33/F	1	22	18	1
39220	35/F	0	7	25	8
82995	37/F	0	3	4	0
00015	42/F	2	1	4	2
16777	42/F	1	23	8	3
72640	42/F	0	8	6	7
80222	43/F	1	10	21	4
84318	44/F	2	6	4	3
97017	47/F	0	1	6	2
47361	47/F	2	33	19	0
39693	66/F	0	6	7	8

1. BARRIOS DE ATIPICIDAD; 2. CÉLULAS BARRIOS DE ATIPICIDAD; 3. CÉLULAS BARRIOS DE ATIPICIDAD; 4. CÉLULAS BARRIOS DE ATIPICIDAD

TABLA 10. PROMEDIO \pm ERROR ESTÁNDAR DE ATIPIAS NUCLEARES EN 1000 CÉLULAS DEL EPITELIO BUCAL DE INDIVIDUOS CONTROL Y EXPUESTOS A As. (COMARCA LAGUNERA)

POBLACION	BEGG	CR	CL	BN
NAZARENO n=32	5.7 \pm 2.22	104.93 \pm 17.43	53.71 \pm 9.36	6.62 \pm 0.78
STA. ANA n=33	4.15 \pm 0.69	82.78 \pm 18.98	48.03 \pm 10.01	6.84 \pm 1.04

t-test $p < 0.05$

TABLA II. MARCADORES DE EXPOSICIÓN DE LAS POBLACIONES ESTUDIADAS (CHILE).

	PROMEDIO \pm D.E.	
	TOCONAO	SAN PEDRO
As total en el agua de bebida ($\mu\text{g/l}$) n=4	19.1 \pm 0.95	528 \pm 2.38
As total en orinas ($\mu\text{g/l}$)	91.0 \pm 17.0 n=8	605.0 \pm 81.0* n=10
As inorgánico ($\mu\text{g/l}$)	1.55 \pm 0.21	102.85 \pm 14.8*
MMA ¹ ($\mu\text{g/l}$)	1.09 \pm 0.21	90.75 \pm 15.4*
DMA ² ($\mu\text{g/l}$)	64.6 \pm 1.60	417.45 \pm 69.3*
Edad promedio (años)	44.5	42.5

*t-test, $p < 0.05$

¹ As monometilado, ² As dimetilado

TABLA 12. FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS DE EPITELIO BUCAL DE INDIVIDUOS TESTIGO (CHILE).

CODIGO	SEXO	MNs/1000 CELS.³	No. DE CÉLULAS ANALIZADAS
RM	F	2.5	1939
IC	F	0	1326
JC	F	0	748
MLPP	F	0.68	1456
SMA	F	0.95	3137
EC	M	0	560
LR	M	0	2982
EF	M	0	541

3 frecuencia de micronúcleos por 1000 células.

TABLA 13. FRECUENCIA DE MICRÓNÚCLEOS EN CÉLULAS DE EPITELIO BUCAL DE INDIVIDUOS EXPUESTOS A A_s (CHILE).

CODIGO	SEXO	MNs/1000 CELS.³	No. DE CÉLULAS ANALIZADAS
LA	M	2.00	1000
DB	M	4.89	1021
HS	M	2.53	1183
MLBE	F	3.00	2336
EM	F	0.74	1349
RC	F	2.61	1531
EP	F	1.93	1036
GS	F	1.02	977
JVV	F	0	953
GGP	F	0.89	1123

³ frecuencia de micronúcleos por 1000 células

TABLA 14. PROMEDIO \pm ERROR ESTÁNDAR DE MN \pm /1000 CÉLULAS EPITELIALES (CHILE).

Población	Promedio \pm E.E.
Toconao (n=8)	0.52 \pm 0.31
San Pedro (n=10)	1.96 \pm 0.42*

*t-test $p < 0.05$

TABLA 15. FRECUENCIA DE ATIPIAS EN CÉLULAS EPITELIALES DE INDIVIDUOS TESTIGO (CHILE).

CODIGO	SEXO	BEGG ¹	CR ²	CL ³	CC ⁴	PK ⁵	BN ⁶	NO. DE CÉLULAS ANALIZADAS
RM	F	0	32	110	80	4	7	1939
IC	F	1	21	61	1	0	5	1326
JC	F	0	20	29	0	0	3	748
MLPP	F	0	4	453	0	0	3	1456
SMA	F	2	18	192	35	6	10	3137
EC	M	0	1	1	0	0	1	560
LR	M	1	282	786	135	6	16	2982
EF	M	0	7	78	20	0	2	541

¹BIOPLENÓGL. ²CARBOHIDR. ³CARBOHIDR. ⁴CRÓMATINA CONDENSADA. ⁵ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA. ⁶CÉLULAS POSITIVADAS

TABLA 16. FRECUENCIA DE ATIPIAS EN CÉLULAS EPITELIALES DE INDIVIDUOS EXPUESTOS A As (CHILE).

CODIGO	SEXO	BEGG ¹	CR ²	CL ³	CC ⁴	PIC ⁵	BN ⁶	NO. DE CÉLULAS ANALIZADAS
LA	M	0	2	21	23	2	3	1000
DB	M	0	131	149	42	7	4	1021
HS	M	0	32	388	97	9	5	1183
MLBE	F	0	110	217	53	4	0	2336
EM	F	2	11	70	104	8	2	1349
RC	F	1	63	122	53	3	6	1531
EP	F	0	75	294	45	5	4	1036
GS	F	0	28	174	93	5	2	977
JVV	F	2	29	185	42	9	2	953
GGP	F	0	40	240	25	5	1	1123

¹ BRUNO; ² CUBO; ³ CUBO; ⁴ CUBO; ⁵ CUBO; ⁶ CUBO

TABLA 17. PROMEDIO \pm ERROR ESTÁNDAR DE ATIPIAS NUCLEARES EN CÉLULAS DEL EPITELIO BUCAL DE INDIVIDUOS CONTROL Y EXPUESTOS A A₁ (CHILE).

POBLACIÓN	BEGG	CR	CL	CC	PIC	BN
TOCONAO n=8	0.50 \pm 0.75	48.12 \pm 33.71	213.75 \pm 96.38	33.87 \pm 17.51	2.00 \pm 1.00	5.87 \pm 1.78
SN. PEDRO n=10	0.50 \pm 0.25	52.10 \pm 12.69	186.0 \pm 32.06	57.70 \pm 8.89	5.70 \pm 0.73	2.90 \pm 0.55

t-test $p < 0.05$

TABLA 18. VALORES DE JI Y PROBABILIDAD DEL TOTAL ABSOLUTO DE CADA UNA DE LAS ATIPIAS Vs. EL TOTAL ABSOLUTO DE CÉLULAS ANALIZADAS EN LAS POBLACIONES ESTUDIADAS.

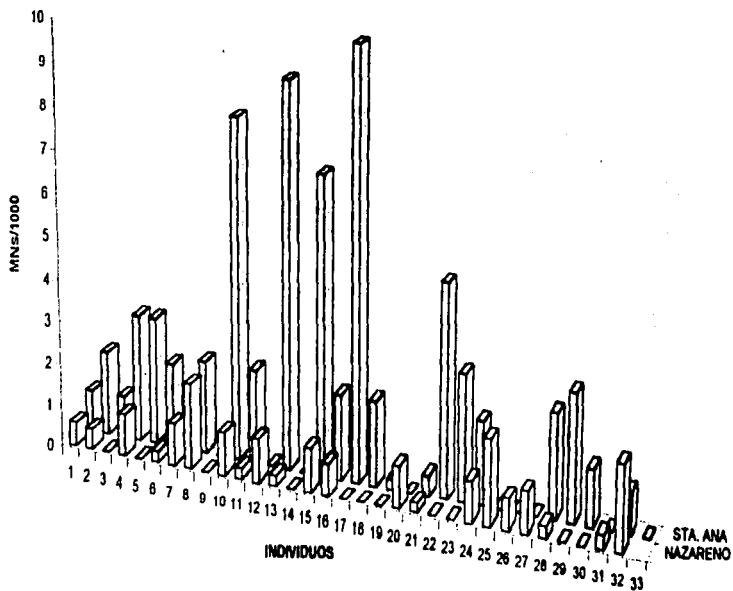
POBLACIÓN	MNs	BEGG	CR	CL	CC	PIG	BIN	
MEXICO	Ji	43.36	0.0582	4.55	26.61	N.A *	N.A.	11.71
	p	0.0001	0.8047	0.0049	0.0001			0.001
CHILE	Ji	7.147	0.0005	21.626	26.61	111.098	23.54	3.998
	p	0.0076	0.9808	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.430

*N.A.= no se analizó

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

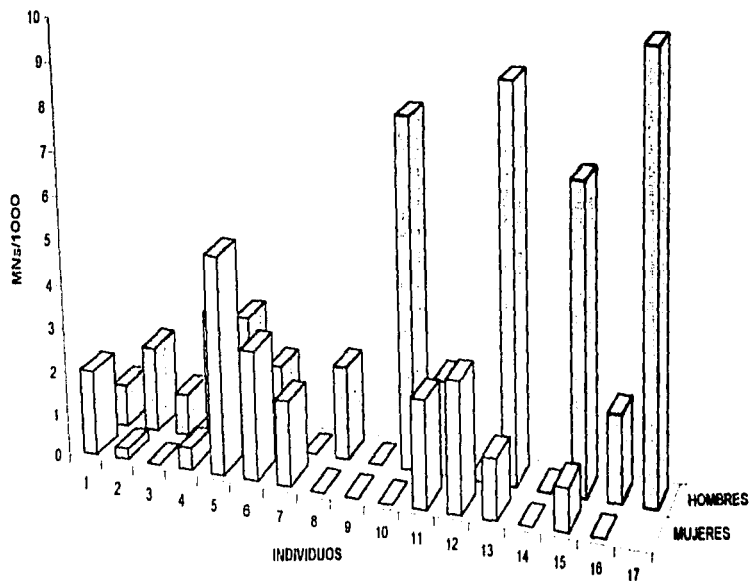
GRÁFICA 1

FRECUENCIA DE MNs EN CÉLULAS BUCALES (COMARCA LAGUNERA)



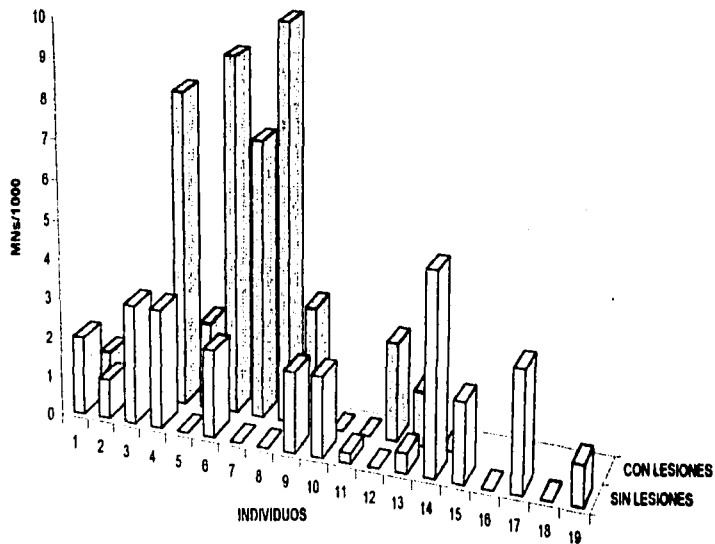
GRÁFICA 2

FRECUENCIA DE MNs POR SEXO EN INDIVIDUOS EXPUESTOS (COMARCA LAGUNERA)



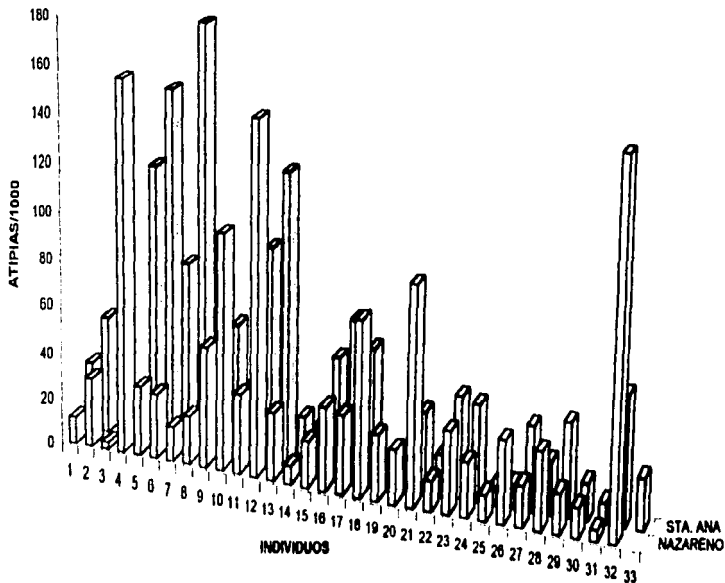
GRÁFICA 3

FRECUENCIA DE MNs EN CÉLULAS BUCALES DE INDIVIDUOS CON Y SIN LESIONES EN LA PIEL
(COMARCA LAGUNERA)



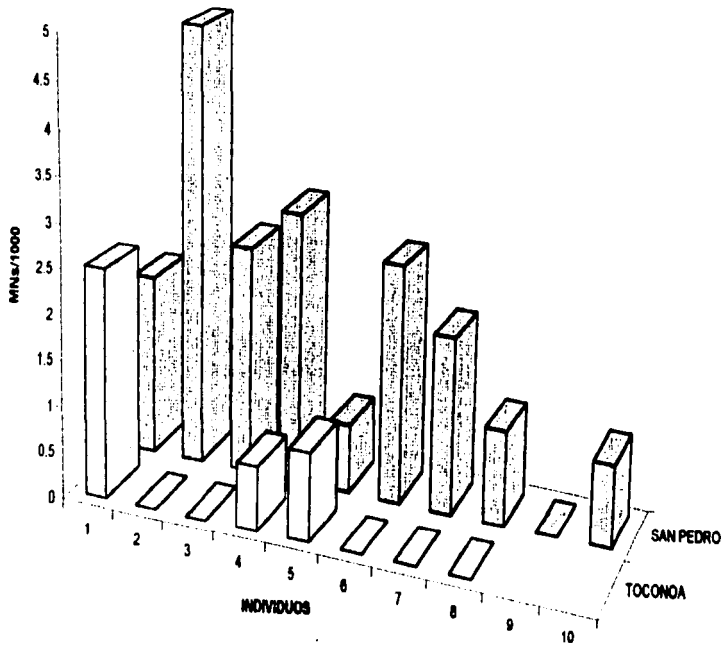
GRÁFICA 4

FRECUENCIA DE ATIPIAS EN CÉLULAS BUCALES (COMARCA LAGUNERA)



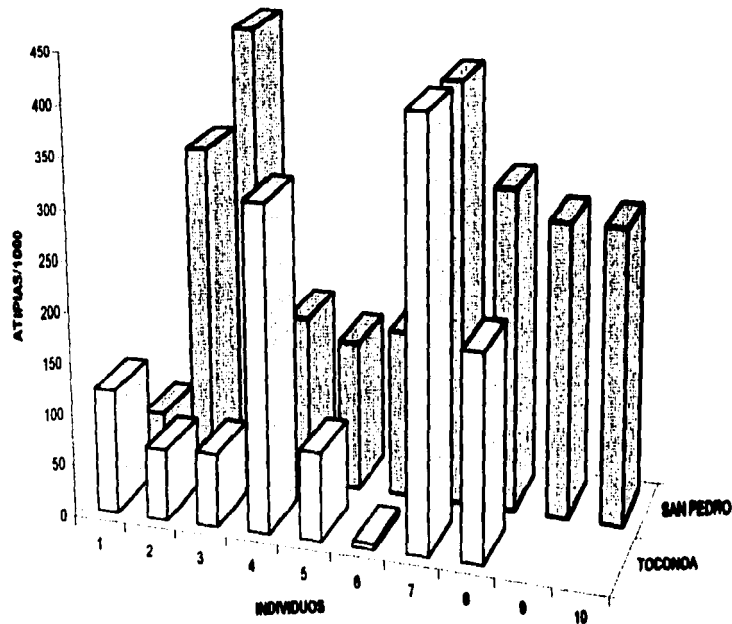
GRÁFICA 5

FRECUCENCIA DE MNs EN CÉLULAS BUCALES (CHILE)



GRÁFICA 6

FRECUENCIA DE ATIPIAS EN CÉLULAS BUCALES (CHILE)



Cytogenetic effects in human exposure to arsenic

M.E. Gensebatt ^{a,*}, L. Vega ^a, A.M. Salazar ^a, R. Montero ^a, P. Guzmán ^a, J. Blas ^a,
L.M. Del Razo ^b, G. García-Vargas ^b, A. Albores ^b, M.E. Cebrián ^b, M. Kelsch ^c,
P. Ostrosky-Wegman ^a

^a Instituto de Investigaciones Biológicas, Departamento de Genética y Toxicología Ambiental UNAM, AP 70228, Ciudad Universitaria, México DF 04510, México

^b CINVESTAV-IPN, Mérida, México

^c Esomatrix Inc., CA, USA

Abstract

The cytogenetic effects of arsenic exposure were studied among rural populations that live in the same geographical area and have similar socioeconomic status, but different degree of exposure to inorganic arsenic (As) via drinking water. A group of inhabitants of Santa Ana (46/817 µg/l of As in drinking water) were considered the exposed individuals and a group of inhabitants of Nazareno (29 µg µg/l) were considered as controls. Blood and urine samples were obtained from volunteers. Past and current exposure, health, and nutritional status as well as the presence of arsenic skin lesions were ascertained in study participants through questionnaires and physical examination. The frequencies and types of chromosomal aberrations in first-division metaphases were studied in whole blood lymphocyte cultures while the presence of micronuclei (MN) was studied in exfoliated epithelial cells obtained from the oral mucosa and from urine samples. Total arsenic (TAs) content, and the relative proportions of inorganic arsenic (iAs), and the metabolites monomethylarsonic (MMA) and dimethylarsonic (DMA) acid were determined in urine samples. Exposed individuals showed a significant increase in the frequency of chromatid and isochromatid deletions in lymphocytes and of MN in oral and urinary epithelial cells. Males were more affected than females, and a higher number of micronucleated oral cells were found among those individuals with skin lesions. The type of cytogenetic damage observed gives evidence of arsenic as a clastogenic/aneuploidogenic carcinogen.

Keywords: Micronuclei; Chromosomal aberrations; Lymphocytes; Arsenic; Exfoliated epithelial cells

1. Introduction

Arsenic and arsenic compounds are considered human carcinogens. The types of cancer more frequently associated with arsenic ingestion are skin and bladder cancers, while the inhalation of arsenic compounds is associated with lung cancer [1,2].

Among the genetic events important in tumor initiation and progression are the chromosomal aberrations [3,4]. Several studies suggest that in vitro arsenic is either inactive or extremely weak inducer of gene mutations, while an active inducer of SCE and chromosomal aberrations in cultured cells [5-9]. Moreover, Eastmond and Tucker [7] and Vega et al. [9] observed the generation of significant proportions of aneuploid lymphocytes after arsenite treatments.

* Corresponding author.

suggesting that arsenicals may also pose a hazard through the induction of aneuploidy. Increased frequencies of chromosomal aberrations (CA) have been reported in exposed individuals [5], although these earlier studies have limitations and must be interpreted with caution according to EPA, [10], IARC [11] and ATSDR [2].

This type of damage is generally estimated *ex vivo* in humans by determining the frequency of chromosomal aberrations or of micronuclei in cultured peripheral blood lymphocytes. Also, cytogenetic damage as the presence of micronuclei (MN) in exfoliated epithelial cells from the oral mucosa or from the bladder, have been observed in individuals exposed to known carcinogens or to factors associated with increase cancer risks such as smoking, chewing tobacco or being exposed to ionizing radiation [12-14].

In Comarca Lagunera, Mexico, communities co-exist with different degrees of exposure to inorganic arsenic (mostly pentavalent As) via drinking water. Individuals life-time exposed to arsenic develop classical symptoms of arsenic poisoning such as skin lesions and blackfoot disease [15]. Biomarkers of genetic damage were evaluated among a group of individuals that lived in the same geographical area and had similar socioeconomic status, but different levels of exposure. Those considered as exposed had as a source of drinking water, a well that showed a concentration of As of 408.17 $\mu\text{g}/\text{l}$. The mean level

Table 2

Average frequency (percentage) of chromosomal aberrations \pm standard error in cultured lymphocytes

	Nazareno	Santa Ana
Total	2.96 \pm 0.54	7.12 \pm 1.00
Males	2.63 \pm 0.76	8.85 \pm 1.04
Females	3.06 \pm 0.77	5.70 \pm 2.21
With skin lesions		7.88 \pm 2.46
Without skin lesions	2.96 \pm 0.54	6.94 \pm 1.43

χ^2 Test, $p < 0.015$

of As in the drinking water of the controls was 29.88 $\mu\text{g}/\text{l}$. Frequencies and types of chromosomal aberrations were evaluated in whole blood lymphocyte cultures and frequency of micronuclei (MN) were evaluated in exfoliated cells obtained from the oral mucosa and from the urine. The percentages of cells with aberrations and of cells with MN were correlated with the presence of cutaneous signs of arsenic poisoning and with the concentrations of arsenic determined in urine.

2. Materials and methods

Two populations from the Comarca Lagunera a region with endemic (natural) hydroarsenicism in Mexico [15], were selected. Inhabitants from Santa Ana, Coahuila were considered as the exposed group, because data on As concentration history available since the year of 1981 in their well water shows a mean As concentration of 408.17 $\mu\text{g}/\text{l}$ (range 239-725 $\mu\text{g}/\text{l}$). Inhabitants of Nazareno, Durango were chosen as control subjects, because they drink from other water supplies and the As level during the past 2 years has been between 19 and 26 $\mu\text{g}/\text{l}$ (mean 29.88 $\mu\text{g}/\text{l}$). The consumed arsenic is mostly pentavalent [15].

2.1. Group selection

Two groups of 30-35 healthy individuals were selected from Santa Ana and Nazareno. The distribution of age (between 20-60 years old) and of sexes among both groups was intended to be similar. Half of the exposed population were chosen to have cuta-

Table 1
Selected characteristics of study population

	Nazareno	Santa Ana
As in drinking water ($\mu\text{g}/\text{l}$, $n = 4$)	29.88 (7.40-62.00)	408.17 (136.10-435.00)
Total As in urines ($\mu\text{g}/1.25\text{SD}$)	34.0 \pm 15.3 $n = 34$	739.8 \pm 361.4 $n = 35$
Inorganic As ($\mu\text{g}/1.25\text{SD}$)	2.6 \pm 2.38	235.2 \pm 135.8
MMA ($\mu\text{g}/1.25\text{SD}$)	1.78 \pm 1.38	101.3 \pm 86.2
DMA ($\mu\text{g}/1.25\text{SD}$)	29.6 \pm 33.9	403.3 \pm 195
Mean age \pm SD (years)	40.6 \pm 10.6	39.0 \pm 9.7
Smokers (%)	33	29

neous signs of arsenism like hyperpigmentation, hypopigmentation, papulopilar, papulopilar, hyperkeratosis, papular keratosis or ulcerative lesions, according to the classification of Yeh [16]. The objectives of the sampling design was to select healthy individuals from the exposed and control communities so that factors such as medical treatments, smoking, alcoholism, and chronic disease would not confound the potential associations between arsenic exposure and genetic damage, therefore the following exclusion criteria were used: (1) individuals exposed to pesticides, fertilizers and/or hormonal or medical treatments known to be mutagenic and/or porphyrogenic during the last 3 months before the sample was

taken; (2) individuals who were suffering chronic generalized degenerative diseases (such as diabetes, autoimmune diseases); (3) individuals who suffered alcoholism (daily intake of spirit or more than 700 ml of beer) and/or individuals who had taken alcohol during the 5 days previous to the study survey.

2.2. Blood and urine sampling

Blood samples were obtained by venipuncture in heparinized Vacutainer sterile tubes, early in the day, coded and immediately sent by air to the laboratory where they were immediately processed. Urine samples (first void urine samples) were collected, coded, kept at 2–4 °C in a cooling device and shipped to the

Table 3
Unirradiated dicentric in controls

Code	Age	Sex	Years	Skin lesion	Dichroms		T exchanges		CA per cell	CA % ^a
					Chr 1	1+4-5 ^b	Chr 1	Chrom 2 ^c		
08236	36	M	37	No					0.00	0
08629	37	M	37	No	2				0.02	2
02111	39	M	39	No	6	1			0.07	7
34833	39	M	39	No	9				0.09	9
12479	43	M	22	No	8	6	2		0.12	4
26914	45	M	45	No	4	1			0.05	4
49925	46	M	36	No	1				0.01	1
13426	45	M	45	No	1	1			0.02	2
17916	47	M	47	No	1				0.00	0
29081	52	M	52	No	1				0.01	1
97978	66	M	47	No	1	1			0.02	2
06069	68	M	68	No	1	1			0.02	2
53342	22	F	22	No					0.00	0
83991	24	F	24	No	3		1		0.04	4
91798	26	F	26	No			1		0.01	1
53754	32	F	32	No					0.00	0
78248	33	F	10	No	4				0.04	4
87894	34	F	34	No	6	1	1		0.08	8
63760	34	F	34	No	0				0.00	0
13851	36	F	36	No	3				0.03	3
37231	35	F	20	No	2				0.02	2
67670	39	F	39	No	2				0.02	2
99847	40	F	40	No	1				0.01	1
01412	44	F	43	No	0				0.00	0
62580	44	F	44	No	4	1			0.05	5
80982	45	F	23	No	3		4		0.08	8
42626	45	F	44	No	5	4			0.08	8
Mean					2.22	0.81	0	0.14	0.03	2.96
S.E.					0.38	0.28	0	0.08	0.00	0.54

^a Years of residence. ^b Chromatid. ^c Isochromatid. ^d Chromosome. ^e Chromosome aberrations per cell. ^f Percentage of cells with aberrations.

laboratory, where they were centrifuged to obtain the bladder cells (200 × g for 15 min) and then kept frozen (-20 °C) until the arsenic analysis was performed.

2.3. Lymphocyte cultures and harvesting

Replicate lymphocyte cultures were prepared as follows: 0.5 ml of blood were placed in sterile conical plastic tubes containing 6 ml of RPMI 1640

supplemented with 0.01 ml/ml of L-glutamine and non-essential amino acids (Gibco, USA), 0.2 ml of PHA (MicroLab, México), 32 µM of BrdU (Sigma, USA) were added after 24 h of incubation at 37 °C and harvested at 48, 60 and 72 h. Two hours before harvesting, 0.2 ml of Colcemid (10 µg/ml; MicroLab) were added to each culture tube. Cells were centrifuged at approximately 200 × g for 10 min. Culture media was removed and 5 ml of a pre-

Table 4
Chromosomal aberrations observed

Code	Age (years)	Sex	Years of residence	Skin lesion ^a	Deletion		ES changes		CA per cell ^c	CMA ^b
					1 (p)	2 (q)	1 (p)	2 (q)		
94465	28	M	30	1, 4	1				0.21	11
94774	42	M	42	Nil	11	4			0.06	22
67079	32	M	28	Nil	1	5			0.02	2
22554	34	M	34	Nil	2	6		1	0.13	10
05066	38	M	38	2, 3	14	16			0.33	18
42866	38	M	36	Nil	3	2			0.05	4
47366	36	M	36	Nil	2	2			0.04	4
76966	40	M	40	4	9	5			0.14	14
64620	41	M	41	1, 5	6	1		1	0.08	7
96492	42	M	19	2, 3, 4, 5	4	3			0.07	7
15458	43	M	43	Nil	2	1			0.04	4
45436	44	M	17	1, 4, 6	4	3			0.07	7
39765	49	M	49	2, 3	10	5			0.15	9
67362	68	M	65	2, 3, 4	1	1			0.02	2
54463	24	F	3	Nil	3			1	0.04	4
13856	28	F	28	Nil				1	0.01	1
82627	29	F	13	Nil	2			1	0.02	2
01432	30	F	30	Nil	2	4			0.12	11
65974	31	F	15	Nil	2			1	0.03	3
19437	33	F	33	4	1			1	0.02	2
03116	33	F	9	Nil	4	9			0.09	6
39220	35	F	7	Nil	4	2		1	0.07	7
82665	37	F	29	Nil	20	2		1	0.23	20
16466	38	F	20	Nil	6	6		2	0.14	12
04915	42	F	42	4	7	1		1	0.11	10
16772	42	F	42	2, 3, 4	1	1			0.02	2
29465	43	F	26	Nil	3	1			0.04	4
84318	44	F	44	4	2			1	0.03	3
97017	47	F	47	Nil	5	1			0.06	6
47361	47	F	30	Nil	2				0.02	2
39693	66	F	36	4	2	2			0.04	2
Mean					5.83 ^d	2.80 ^e	0.16	0.29	0.08 ^f	7.12 ^g
S.D.					1.19	0.59	0.06	0.09	0.01	1.00

^a Years of residence.

^b Types of skin lesions: 1, hyperhidrosis; 2, hypopigmentation; 3, hyperpigmentation; 4, palmoplantar hyperkeratosis; 5, papular keratosis; 6, cutaneous horns [10].

^c Chromatid⁺ / karyonid⁺ / chromosome⁺ / chromosome aberrations per cell⁺ / Percentage of cells with aberrations⁺. ^d Test, *p* < 0.05.

warmed (37°C) KCl hypotonic solution (0.07 M), was added. Cells were resuspended and incubated in the culture tubes, in a 37°C water bath, for 20 min. After incubation, the cell suspension was centrifuged again for 10 min. Supernatant was removed and 5 ml of fixative (methanol:glacial acetic acid, 3:1) was added. Fixative was removed by centrifugation and two more changes of fixative were performed. Cells were kept at 4°C overnight. To make slides for cytogenetic analysis of chromosomal aberrations, five drops of the fixed cell suspension were laid on clean glass slides and flame dried. Microscopic preparations were stained with a modification of the fluorescence plus Giemsa (FPG) technique [17]. Slides were stained for 20 min in a 0.05% Hoechst 33248 solution, then they were rinsed with tap water and covered with a few drops of Sorensen's phosphate buffer (pH 6.8) and a coverslip. They were placed under a near ultraviolet lamp for 90 min, rinsed again with tap water and stained with a 2% Giemsa solution in Sorensen's phosphate buffer (pH 6.8) for 5 to 7 min. The analysis of chromosomal aberrations was performed for each individual in a 100 consecutive well-spread, first-division metaphases, all with 46 chromosomes. The types of aberrations were classified as chromatid gaps, isochromatid gaps (gap-achromatic lesion with a width less than that of a chromatid), chromatid and isochromatid deletions, chromatid exchanges (triradials, quadriradials) and chromosomal exchanges (dicentric, rings and translocations). The criteria follow the recommendations of the EHC-46 for Environmental Monitoring of Human Populations [18].

2.4. Buccal and urothelial exfoliated cells

Samples were obtained by scraping the buccal mucosa with a wooden spatula, cells were smeared in a clean glass slide and fixed with methanol/acetic acid (3:1). Bladder cells were recovered by centrifuging urine samples, as mentioned above. The cell pellet was washed at least twice with isotonic saline solution, fixed and dropped in clean glass slides. Cells were Feulgen stained and counterstained with Fast Green. Buccal cells were analyzed according to Tolbert [19], while for urothelial cells analysis the criteria suggested by Reali [12] was followed. At least 1000 cells were scored per individual.

2.5. Urine arsenic analysis

Arsenic was measured in urine by atomic absorption spectrometry using hydride generation after column chromatographic separation of inorganic arsenic and its metabolites. Quantification is based on the measurement of light absorbed at 193.7 nm by ground state atoms of arsenic from an electrodeless discharge lamp source. Freeze dried urine standard reference material for toxic metals (SRM 2670) was analyzed for total arsenic content (TAA). To assess the reliability of separation procedures, we analyzed urine samples spiked with known amounts of inorganic arsenic (IAS), monomethylarsonic (MMA) and dimethylarsonic (DMA) (20, 20, 600) resulting in three different concentrations of IAs: 45, 420 and 1150 µg/l [20,21]. Creatinine in urine was measured according to Lim [22]. The total As values obtained in urine were corrected by creatinine excretion.

2.6. Statistical analysis

Mean, standard deviation and standard error were calculated for chromosomal aberrations and micronuclei. Also, Fisher's exact tests for evaluating contingency table differences and *t*-test comparisons of chromosomal aberration and MN frequencies were used to compare exposed and control communities. Chromosomal aberrations and MN frequencies were correlated with age, sex and urine arsenic concentrations using SAS[®] statistical program package (SAS Institute). The concentrations of As, the percentage of cells with aberrations and the frequency of MN/1000 were logarithmically transformed.

Average frequency ± standard error of MN/1000 epithelial cells	Oral mucosa	Urothelial cells
Non-smokers (Total)	2.21 ± 0.47	2.22 ± 0.99
Males	1.08 ± 0.60	4.18 ± 2.38
Females	1.28 ± 0.37	1.24 ± 0.72 **
With skin lesions	3.28 ± 0.96	4.64 ± 2.59 **
Without skin lesions	1.41 ± 0.32	1.09 ± 0.57
Non-smokers (Total)	0.56 ± 0.13	0.48 ± 0.10
Males	0.55 ± 0.15	0.58 ± 0.17
Females	0.57 ± 0.15	0.43 ± 0.12

* *t* Test, *p* < 0.05. ** Mann-Whitney U test, *p* < 0.1.

3. Results

Table 1 shows the concentration of inorganic arsenic in the drinking water, the total arsenic and the inorganic arsenic as well as the methylated forms found in urines. The average (±2) of the study population is also presented.

3.1. Chromosomal aberrations in lymphocytes

Twenty-seven successful lymphocyte cultures were analyzed in the control group (12 males and 15

females, age range 22-69, average 40.4 ± 10.8 years) and 31 from the exposed group (14 males and 17 females, age range 24-68, average 39.2 ± 9.7 years). Exposure was compared by town and sex with non-town, also smoking and herbicide/fertilizer/misicide exposure (occurring before the last 3 months) within towns, taken from questionnaires, were examined using 2 × 2 tables for the Fisher's Exact test (results not shown). Smoking was not significantly associated with the percentage of chromosomal aberrations. Only the town comparison had less than a 5% probability of obtaining a

Table 2
Frequency of micronuclei per lymphocytes from controls

Code	Age (y)	Sex	Years of residence	Smoking habit	MIS ^a (1000 cells)	N ₁ (10 ⁴ cells)	MIS ^a (10 ⁴ cells)	# of towns ^b	No. of cells scored
00236	36	M	1	No	0	0	0.0%	1	1449
86679	57	M	27	No	0	0	0.0%	1	1033
96667	38	M	16	No	0.04	257	0.009	1	1056
02111	31	M	1	No	0.07	117	0.006	1	1180
34633	37	M	12	No	0.04	200	0.003	1	1399
12479	43	M	22	No	0	0	0.0%	1	1025
46614	35	M	45	No	0	0	0.0%	1	980
90945	46	M	36	No	0	0	0.0%	1	2180
13426	45	M	45	No	0.03	1364	0.006	1	9946
17018	47	M	47	No	1.80	1367	0.007	1	4683
20681	52	M	42	No	0.13	907	0.005	1	4091
97976	66	M	47	No	0.04	1449	0.006	1	4093
60600	64	M	64	No	0.04	1010	0.004	1	4010
08020	62	M	62	No	0.04	1000	0.004	1	4036
53342	22	F	22	No	0.04	1037	0.004	1	4080
83093	24	F	24	No	0.70	1026	0.007	1	4033
93756	20	F	20	No	0.04	1025	0.004	1	3265
17626	28	F	28	No	0.13	1035	0.005	1	4080
55764	32	F	32	No	0.04	1000	0.004	1	4080
78256	33	F	33	No	0.04	1000	0.004	1	1080
87044	34	F	34	No	0.04	1027	0.004	1	4106
63700	34	F	34	No	0.13	1014	0.005	1	4016
33861	36	F	36	No	0.04	1034	0.004	1	4085
37231	35	F	20	No	0.04	1046	0.004	1	1080
67879	36	F	36	No	0	0	0.0%	1	4080
99547	40	F	40	No	0.70	2764	0.007	1	4080
08010	40	F	40	No	1.10	1041	0.009	1	1080
10142	44	F	43	No	0.04	1140	0.004	1	3650
62800	44	F	44	No	0.02	1077	0.002	1	4080
80964	45	F	45	No	0.13	1058	0.005	1	1015
23001	45	F	45	No	1.84	1063	0.015	1	0
20812	46	F	46	No	0.04	1080	0	1	4080
14010	56	F	56	No	0.04	1072	0.004	1	4080
44105	62	F	62	No	1.10	2521	0.009	1	1080
Mean ± SD					0.48 ± 0.01		0.00 ± 0.13		

^a Years of residence^b Frequency of micronuclei per 1000 cells^c Number of cells scored

more extreme result (2-tail result, $p = 0.00731$), suggesting that living in Santa Ana increased the probability of chromosomal aberrations. *t*-Test results were consistent with the Fisher's Exact tests.

Chromid deletions were the most frequent type of chromosomal aberration observed in first division metaphases, isochromatid deletions were the next most common. The means of aberrations frequencies were higher in the exposed than in controls for all

type of aberrations and across age and sex groups. Among the Santa Ana residents (exposed), two trends were evident: younger individuals tended to have a higher frequency of aberrations and males tended to have more than females. This pattern was not apparent among Nazaretes residents (controls). Tables 2–4 summarize the chromosomal aberration data results (gap excluded) by town, age, sex, years of residence, presence of skin lesions and type of aberration.

Table 7
Frequency of micronuclei in epithelial cells from exposed

Code	Age/sex	Y of res. ^a	Skin lesion ^b	MS/1000 cells ^c	No. of C scored ^d	MS/1000 cells ^c	No. of C scored ^d
53453	26/M	10	1,4	19.20	1350	1.00	5000
94371	32/M	12	No		0	2.00	1000
67570	32/M	28	No	10.00	1718	1.00	1000
00323	30/M	30	No		0	3.00	1000
22554	34/M	34	No		0	3.00	1000
19499	36/M	38	2,3	1.50	1116	2.00	3000
42869	38/M	19	No		1.12	1778	4072
47366	38/M	38	No		0	2.20	4124
79999	40/M	40	4		0	0.00	3733
64020	41/M	41	1,5	1.33	9012	5.00	1000
66492	42/M	19	2,3,4,5		0	2.21	3619
15345	43/M	43	No	3.85	1816	0.00	3000
84436	44/M	17	1,4,6		0	9.00	1000
58212	46/M	46	No	2.23	1343	0.00	1000
30765	49/M	49	2,3		0	7.00	1000
00742	56/M	58	No		0	2.00	1000
67382	60/M	65	2,3,4		0	10.00	1000
54463	24/F	3	No	0.00	3072	2.00	3000
81619	27/F	27	No	0.00	2754	0.25	4000
13558	28/F	28	No	0.35	3037	0.00	3000
01432	30/F	15	No	0	0	0.50	4000
65978	31/F	15	No	0.00	3018	5.00	1000
14437	33/F	33	4	0.60	2503	3.00	1000
63116	33/F	0	No	0.00	3000		0
30220	35/F	7	No		1.06	3018	3000
82995	37/F	20	No	3.00	3000	0.00	3000
00468	38/F	20	No	0.00	3000		0
10015	42/F	42	4	0.00	3000		1000
16777	42/F	42	2,3,4	10.27	3018	0.00	4000
72640	42/F	42	1,4	0.00	3000	2.47	3733
60222	43/F	43	No	0	0	3.00	1000
84378	44/F	44	4	0.00	3011	1.36	2920
07017	47/F	47	No	2.80	1070		2719
47361	47/F	30	No	0.96	3006	1.00	1000
30693	60/F	36	4		0	0.00	3148

Mean \pm SE

2.23 \pm 0.99

2.21 \pm 0.47

^a Years of residence. ^b Types of skin lesions: 1, hyperpigmentation, 2, hyperpigmentation, 3, hyperpigmentation, 4, palmoplantar hyperkeratosis, 5, papular keratosis, 6, cutaneous horns [10]. ^c Frequency of micronuclei per 1000 cells. ^d Number of cells scored

3.2. MN in exfoliated cells

A similar analysis was conducted with the data obtained in exfoliated cells samples. The frequency of micronuclei in 32 (14 males, 18 females) control buccal smears were compared with that evaluated in 33 (17 males, 16 females) buccal smears from individuals living in Santa Ana. For urothelial cells only 2% control (9 males and 19 females) and 21 exposed (7 males and 14 females) urine samples provided sufficient number of cells for MN evaluation. Individuals living in Santa Ana had higher frequencies of micronucleated cells than those living in Nazareno. This was true for buccal and for bladder cells (Table 5). These differences were statistically significant using a *t* test ($p < 0.05$). Also, when exposure was computed as for chromosomal aberrations, by town and sex within town, smoking and herbicide/fertilizer/insecticide exposure within towns, using 2 × 2 tables for the Fisher's Exact test only the town comparison was significant. Smoking was not significantly associated with the presence of MN. Similar to CA, exposed males had higher frequencies of micronucleated cells than females. The presence of MN in buccal and in urothelial cells did not correlate within the same individual ($r = -0.18$, $p > 0.45$), or with the presence of chromosomal aberrations in lymphocytes. Smoking was not significantly associated with a higher incidence of CA or of MN.

Table 5
Correlation coefficients

Cytogenetic endpoints	TOWN		SEX	
	CA	MN	CA	MN
CA, MN*				
Males	0.38	0.66	0.68	0.80
Females	0.38	0.63	0.14	0.43
Buccal MN (1000)				
Males	0.42	0.63	0.28	0.22
Females	0.35	0.64	0.28	0.69
Urothelial MN (1000)				
Males	0.24	0.31	0.49	0.65
Females	0.20	0.35	0.25	0.14

* Percentage of cells with aberrations.

† Pearson's correlation coefficient.

3.3. Correlation of cytogenetic endpoints with skin lesions and arsenic in urine

Individuals bearing skin lesions did not show higher percentages of lymphocytes with aberrations but showed significantly higher frequencies of MN in buccal and bladder cells (Tables 6 and 7). CA and MN were correlated with the total amount of arsenic (TAs = IAs + MMA + DMA), and also with the proportion of IAs, in urines (Table 8). The strongest association observed was among males, when the percentage of lymphocytes with aberrations and the frequency of MN in bladder cells were plotted against the percentage of IAs ($r = 0.68$, $p = 0.00$ and $r = 0.49$, $p = 0.05$, respectively).

4. Discussion

Exposure to arsenic by drinking water in this group of individuals has been associated with an impaired proliferative response of blood lymphocytes [23], and with the presence of cytogenetic damage in lymphocytes and in epithelial cells obtained from the oral mucosa and from the bladder. The observation of higher frequencies of chromatid and chromosomal aberrations in lymphocytes of exposed individuals is in agreement with the earlier reports of Nordenson and Beckman [24] in smelter workers. These are considered S-dependent alterations, frequently observed in human chronic exposure to chemical mutagens [18,25]. It should be noted that the addition of arsenite and arsenate to lymphocyte cultures induced not only a high frequencies of dose-related chromatid and isochromatid deletions [26,8,9], but also significant proportions of aneuploid lymphocytes were observed after arsenite treatments. Both chromatid and isochromatid deletions and also lagging chromosomes can produce the MN observed in exfoliated epithelial cells. Since these cells originate by cell division of the epithelium basal layer, the damage observed occurs *in vivo*, while in lymphocytes, it originates during the first *in vitro* division. We cannot rule out the possibility that arsenic in the blood is carried over into the culture, inducing DNA damage when the lymphocytes are stimulated to divide *in vitro*.

Exposed individuals doubled, on average, the proportion of cells with aberrations observed in control lymphocyte cultures, while the frequency of MN in exposed individuals was fourfold that observed in controls. This could be due to the fact that exfoliated cells are in direct contact with the carcinogen, especially those obtained from urine, where the arsenic concentration, in its inorganic or methylated forms, is higher than the amount of arsenic measured in water (Table I). Among the exposed individuals only, males showed more aberrations and higher MN frequencies than females. These differences were marginally significant for urothelial cells (Table 6). Interestingly, Houch et al. [27] have reported a higher prevalence of skin cancer among men that drank high-arsenic artesian well water. They attributed this difference to the fact that males drank more water, or to a higher susceptibility to skin cancer than women. In Comarca Lagunera men work at the fields and due to the dry climate, do not drink more water than women. Also, the strongest association between the cytogenetic endpoints and the proportion of IAs excreted in urines was observed among males. A number of multivariate regression models using a multiple linear regression analysis are being performed to further analyze the data.

We also observed that individuals with skin lesions showed higher frequencies of MN, but due to the fact that the proportion of individuals with skin lesions was chosen to represent half of the exposed group with equal proportions of males and females, we cannot conclude that skin lesions were more frequent in either gender.

Interindividual differences in sensitivity to the clastogenic and co-clastogenic effects of arsenite have been reported in lymphocyte cultures [9,28]. The presence of damage among the exposed group varied among individuals and among tissues. Since lymphocytes have a longer life-span than epithelial cells, the chromosomal aberrations observed in this tissue should not necessarily correlate with the MN observed in cells that have a different turnover [29]. The lack of correlation between urothelial and buccal epithelial cells could be to different tissue and individual sensitivity, related to the fact that with respect to ingestion, arsenic-induced carcinogenicity does not show any organotropism [30].

In a pilot study, Ostrosky-Wegman et al. [31]

compared the frequency of chromosomal aberrations between 11 highly exposed (two males, nine females) and 13 (two males, eleven females) individuals with lower exposure, from Comarca Lagunera. Genetic damage was not significantly associated with higher exposure. The small sample size and the fact that individuals were predominantly females who, as reported here, presented lower frequencies of chromosomal aberrations and of MN than males, could explain the lack of significant differences in this earlier study. Arsenic levels in urine were similar in both studies.

High percentages of chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes have been associated to increased cancer risk and mortality [32,33]. Therefore, the observation of a high prevalence of CA and MN among individuals that drink water with high arsenic concentrations further supports the importance of these cytogenetic endpoints in human health risk assessment. In addition, our data give strong evidence of arsenic as a clastogenic/aneugenic carcinogen.

Acknowledgements

This work was partially supported by the Electrical Research Institute (RP 3370-10, 11) and CONACYT.

References

- [1] MN, Ibanez, M.E., Smith, C., Hoppenhay, R.S. Arsenic ingestion and internal cancers. *Am. J. Epidemiol.* 135 (1992) 462-476.
- [2] ATSDR Agency for Toxic Substances and Disease Registry 1989. *Toxicological Profile for Arsenic*. US Public Health Service, Atlanta, GA.
- [3] Nowell, P.C. (1991) Origins of human leukemia: An overview. In: J. Brugge, T. Curran, F. Harlow and F. McCormick (Eds.), *Origins of Human Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainville, NY, pp. 411-520.
- [4] Knudson, A. (1981) Genetic events in human cancer genesis. In: J. Brugge, T. Curran, F. Harlow and F. McCormick (Eds.), *Origins of Human Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainville, NY, pp. 17-25.
- [5] D. Jacobson-Kram, D. Montalbano, the reproductive effects assessment group's report on the mutagenicity of inorganic arsenic. *Environ. Mutagen.* 7 (1985) 287-304.
- [6] T.C. Lee, R.Y. Huang, K.Y. Jan. Sodium arsenite enhances

- the cytotoxicity, clastogenicity and 8-hydroxyguanine residual mutagenicity of ultraviolet light in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Res.* 148 (1985) 83-89.
- [7] D. Eastmond, J. Tucker. Identification of areophyllin inducing agents using a sensitive blocked human lymphocyte and an antikinease herbicide. *Environ. Mol. Mutagen.* 13 (1990) 4-11.
- [8] A.S. Paal, M. Saitoh, R. Nilsson, A.T. Narayagan. Genotoxic effects of ashmum arsenite on human cells. *Mutation Res.* 247 (1992) 215-221.
- [9] I. Vega, M.E. Gusev, P. Chirakos, Wegman. Arsenite, effect of ashmum arsenite on human lymphocytes *in vitro*: an individual susceptibility effect detected. *Mutation Res.* 334 (1995) 165-171.
- [10] EPA (1984). Environmental Protection Agency. Health Assessment Document for Inorganic Arsenic. final report. Research Triangle Park, NC. EPA 600/8-83/013.
- [11] IARC (1987). Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans. International Agency for Research on Cancer, Lyon, Suppl. 6, 71-76.
- [12] D. Reale, F.D. Malone, S. Ratanaratnong, A. Cardenas, R. Buzale, N. Lapierre. Mutagenicity in isolated cells and mice mutagenicity in smokers. *Mutation Res.* 197 (1987) 145-149.
- [13] Rivett, M. (1983). Antigenotoxic activity of carcinogens in carcinogen exposed populations. In: Y. Kuroda, D.M. Shankel and M.D. Waters (Eds.), Mechanisms of Antimutagenic and Anticarcinogenic Therapy. Plenum, New York, pp. 43-60.
- [14] F. Saito, R. Tomatsu, I. Giammusci, A. Canova, F. Ramondelli, C. Chiofalo, M.V. Fiorentino. Evaluation of chromosomal aberrations in lymphocytes and mononuclear cell lymphocytes of normal and hair row cells of patients under antibiotic therapy. *Mutation Res.* 228 (1989) 157-169.
- [15] Cebrian, M.E., S. Albores, G. Garcia-Vargas, E. M. Del Razo and P. Chirakos-Wegman (1994). Chronic arsenic poisoning in humans: the case of Mexico. In: J.C. Nriagu (Ed.), Arsenic in the Environment. Part II: Human and Ecosystem Effects. John Wiley & Sons, New York, pp. 91-107.
- [16] S. Yeh. Skin cancer in humans, arsenic. *Human Pathol.* 4 (1973) 469-485.
- [17] P. Perry, S. Wolff. New Gormia method for differential staining of sister chromatids. *Nature* 201 (1974) 156-161.
- [18] WHO (1985). Guidelines for the study of genetic effects in human populations. *Env. Health Criteria* 46, Geneva.
- [19] P.E. Tolbert, C.M. Shy, J.W. Allen. Microtubule and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Res.* 271 (1992) 69-77.
- [20] M. Vaher, B. Lind. Concentrations of arsenic in urine of the general population in Sweden. *Sci. Tot. Env.* 54 (1986) 1-12.
- [21] P. M. Del Razo, J.L. Hernandez, G. Garcia-Vargas, P. Chirakos-Wegman, M.E. Gusev, M.E. Cebrian. Urinary excretion of arsenic species in a human population chronically exposed to arsenite in drinking water: a pilot study. *Environ. Geochem. Health* 10 (1995) 91-101.
- [22] Liu, C.K. (1982). Some routine applications of high performance liquid chromatography in clinical chemistry. In: F. Kaiser, E. Gabl, M.E. Mader and M. Bayer (Eds.), 3rd International Congress of Clinical Chemistry. Walter de Gruyter and Co., Berlin, p. 987.
- [23] M.E. Gusev, E. Vega, R. Monero, G. Garcia-Vargas, E. M. Del Razo, S. Albores, M.E. Cebrian, P. Chirakos-Wegman. Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenite via drinking water. *Mutation Res.* 311 (1994) 263-269.
- [24] E. Nordstrom, G. Beckman. Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. *Hereditas* 88 (1978) 47-50.
- [25] K. M. Sato, T. H. Lind, A. S. Edwards, P. Nogawa. A survey of lymphocyte chromosomal damage in Shiohara workers exposed to occupational chlorine. *Mutation Res.* 280 (1992) 215-223.
- [26] M. Nakamura, N. Saitoh. Comparative studies of chromosomal aberrations induced by trivalent and pentavalent arsenic. *Mutation Res.* 88 (1981) 13-20.
- [27] Y. M. Hsu, C. N. Chang, M. M. Wu, H. S. Yu, T. L. Su, C. J. Chen. Multiple risk factors associated with arsenite-induced skin cancer: effect of chronic liver disease and nutritional status. *Br. J. Cancer* 71 (1995) 109-114.
- [28] J.K. Wauson, J.W. Yager. Specificity of arsenite in promoting cytogenetic damage induced by the DNA crosslinking agent diethylstilbestrol. *Environ. Mol. Mutagen.* 19 (1992) 195-201.
- [29] H. Mich, R. Van, M. Rivin. Adaptation of the DNA repair and mutagenicity tests to human cell suspension and cultured cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 407 (1981) 61-105.
- [30] C. J. Chen, C. M. Wu, M. M. Wu, T. L. Kuo. Carcinogenic potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. *Br. J. Cancer* 66 (1992) 883-892.
- [31] P. Chirakos-Wegman, M.E. Gusev, R. Monero, E. Vega, H. Barba, J. Espinosa, A. Palao, C. Cortinas, G. Garcia-Vargas, E. M. Del Razo, M. Cebrian. Lymphocyte polychromatemia and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenite in Mexico. *Mutation Res.* 250 (1991) 477-482.
- [32] J. Hagmar, A. Brigger, E. E. Hansen, S. Heim, B. Hovstad, I. Knudsen, B. Lambert, K. Ennemaas, E. Arntsen, J. Nordmark, C. Renander, S. Salomon, S. Skerfving, M. Sorsa. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes. Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage. *Cancer Res.* 54 (1994) 1016-1022.
- [33] S. Bonassi, A. Abbondandolo, I. Camuri, I. Dal-Pa, M. De Feltri, E. Degraas, A. Iwari, E. Lambert, C. Landi, P. Paganoni. Are chromosomal aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? The Iritary results of an Italian cohort study in Cancer. *Genet. Cytogenet.* 79 (1993) 133-135.

Reprinted from

MUTATION RESEARCH

Reviews in Genetic Toxicology

Mutation Research 330 (1997) 219-228

Cytogenetic effects in human exposure to arsenic

M.E. Gonsbatt ^{a,*}, L. Vega ^a, A.M. Salazar ^a, R. Montero ^a, P. Guzmán ^a, J. Blas ^a,
L.M. Del Razo ^b, G. García-Vargas ^b, A. Albores ^b, M.E. Cebrián ^b, M. Kelsh ^c,
P. Ostrosky-Wegman ^a

^a Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Genética y Toxicología Ambiental, UNAM, AP 70228, Ciudad Universitaria,

México DF 04510, México

^b CIVELSTAT, IPN, México, México

^c Ecological, Inc., CA, USA



Aims and scope

MUTATION RESEARCH. Reviews in Mutation Research publishes timely, comprehensive and critical reviews on the potential genetic hazards of environmental agents and, periodically, on methodologies and inter-comparison of test results with different batteries of assays for mutagenicity. Additionally, this section will consider papers on new technologies in genetic toxicology and their application to mutation research.

Managing Editors

Dr. F.J. de Serres, Toxicology Branch, Environmental Health Program, National Institute of Environmental Health Sciences, P.O. Box 12233, MD 19-02, Research Triangle Park, NC 27709, USA.

Mr. J.S. Wasson, Human Genome and Toxicology, Oak Ridge National Laboratory, 1060 Commerce Park MS-6640, Oak Ridge, TN 37830, USA

Prof. K. Sankaranarayanan, Department of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis, State University of Leiden, Sylvius Laboratories, Wassenaarseweg 72, P.O. Box 9503, 2300 RA Leiden, The Netherlands

M.D. Waters, N.H.E.E.R.L., U.S.E.P.A., Research Triangle Park, NC 27711, USA

Editorial Board

D. Anderson, *Gartholton, UK*

W. Au, *Galveston, TX, USA*

J.C. Barrett, *Research Triangle Park, NC, USA*

M.A. Bendet, *Upton, NY, USA*

J.B. Bishop, *Research Triangle Park, NC, USA*

A. Bloom, *Burlington, VT, USA*

B.A. Bridges, *Brighton, UK*

P. Buffet, *Berkeley, CA, USA*

N. Caricello, *Research Triangle Park, NC, USA*

G.R. Douglas, *Ottawa, Canada*

J. Favor, *Unterföhring, Germany*

R. Holliday, *North Ryde, NSW, Australia*

M. Ishidate Jr., *Tokyo, Japan*

A. Léonard, *Brussels, Belgium*

H.V. Malling, *Research Triangle Park, NC, USA*

D. McGregor, *Lyon, France*

J.T. McGregor, *Menlo Park, CA, USA*

M. Mendelsohn, *Livermore, CA, USA*

S.M. Morris, *Jefferson, AR, USA*

D. Nebert, *Cincinnati, OH, USA*

G. Omenn, *Seattle, WA, USA*

J. Savage, *Dudcot, UK*

E.S. von Halle, *Oak Ridge, TN, USA*

C. Wild, *Leeds, UK*

We are grateful to Prof. G. Junghietu, Dept. of Chemistry, ULIM, Moldova, for the cover picture from the Russian periodic table.

Publication information: *Mutation Research, Reviews in Mutation Research* (ISSN 1383-5742). For 1997 volumes 386-387 are scheduled for publication. Subscription prices are available upon request from the Publisher. Subscriptions are accepted on a prepaid basis only and are entered on a calendar year basis. Issues are sent by surface mail except to the following countries where air delivery via SAL mail is assured: Argentina, Australia, Brazil, Canada, Hong Kong, India, Israel, Japan, Malaysia, Mexico, New Zealand, Pakistan, P.R. China, Singapore, South Africa, South Korea, Taiwan, Thailand USA. For all other countries airmail rates are available upon request. Claims for missing issues should be made within six months of our publication (mailing) date.

Orders, claims, and product enquiries: please contact the Customer Support Department at the Regional Sales Office nearest you

New York, Elsevier Science, P.O. Box 985, New York, NY 10156-0985, USA, Tel (+1) 212 633-3730. (For free information for North American Customers: 1-800-455-INFO (437-4636)) Fax (+1) 212 633-3690. E-mail usinfo@elsevier.com
Amsterdam, Elsevier Science, P.O. Box 211, 1000 AE Amsterdam, The Netherlands, Tel (+31) 20-485-3757. Fax (+31) 20-485-3432. E-mail ninfo@elsevier.nl
Tokyo, Elsevier Science, 9-15, Higashi-Azabu 1-chome, Minato-ku, Tokyo 106, Japan. Tel (+81) 3 5561-5033. Fax (+81) 3-5561-5047. E-mail: ky0035@rnh.yes.or.jp
Singapore, Elsevier Science, No 1 Temasek Avenue, #17-01 Milenia Tower, Singapore 039192. Tel (+65) 434-3727. Fax (+65) 337-2230. E-mail: asainfo@elsevier.com.sg

Enquiries concerning manuscripts and proofs: questions arising after acceptance of the manuscript especially those relating to proofs, should be directed to the Publisher, Elsevier Science B.V., Log in Department, P.O. Box 2759, 1000 CT Amsterdam, The Netherlands. (Tel: 31-20-4853629. Fax: 31-20-4853239)

Advertising information: Advertising orders and enquiries may be sent to International, Elsevier Science Advertising Department, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK, Tel (+44)(0)1865 843565. Fax (+44)(0)1865 843978. USA and Canada: Weston Media Associates, Daniel Lipner, P.O. Box 1110, Greens Farms, CT 06436 1110, USA, Tel (+1)(203)261-7500. Fax (+1)(203)261-0101. Japan: Elsevier Science Japan, Marketing Services, 1-9-15 Higashi-Azabu, Minato-ku, Tokyo 106, Japan, Tel (+81)3-5561-5033. Fax (+81)3-5561-5047.

Electronic manuscripts: Electronic manuscripts have the advantage that there is no need for the rekeying of text, thereby avoiding the possibility of introducing errors and resulting in reliable and fast delivery of proofs.

For the initial submission of manuscripts for consideration, hardcopies are sufficient. For the processing of accepted papers, electronic versions are preferred. After final acceptance, your disk plus one, final and exactly matching printed version should be submitted together. Double density (DD) of high density (HD) diskettes (3 1/2 or 5 1/4 inch) are acceptable. It is important that the file saved in is the native format of the wordprocessor program used. Label the disk with the name of the computer and wordprocessing package used, your name, and the name of the file on the disk. Further information may be obtained from the Publisher.

US mailing notice — *Mutation Research, Reviews in Mutation Research* (ISSN 1383-5742) is published 6 times yearly by Elsevier Science B.V. (Elsevier), P.O. Box 211, 1000 AE Amsterdam, The Netherlands. Annual combined subscription price for the full set in the U.S.A.: US\$7278.00 (valid in North, Central and South America only), including air speeded delivery. Periodicals postage is paid at Jamaica, NY 11431.

USA POSTMASTERS: Send address changes to MUTATION RESEARCH, Publications Expediting, Inc., 200 Meacham Avenue, Elmont, NY 11003.

Airfreight and mailing in the U.S.A. by Publications Expediting.

Authors in Japan please note: Upon request, Elsevier Science Japan will provide authors with a list of people who can check and improve the English of their manuscripts (before submission). Please contact our Tokyo office: Elsevier Science Japan, 1-9-15 Higashi-Azabu, Minato-ku, Tokyo 106, Tel. (03) 5561-5032; Fax (03) 5561-5045.

Manuscripts can be submitted to a Managing Editor of the appropriate section (for addresses see the Instructions to Authors, last pages of the issue).

The Journal has adopted the ADONIS System: Copies of individual articles can be printed out from CD-ROM on request. An explanatory leaflet can be obtained by writing to ADONIS B.V., P.O. Box 17005, 1001 JA Amsterdam, The Netherlands.

Mutation Research has no page charges

Printed in The Netherlands

© The paper used in this publication meets the requirements of ANSI/NISO Z39.48-1992 (Permanence of Paper)