



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**INDUCCION DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS EN CULTIVO DE
LINFOCITOS HUMANOS POR DIVERSOS COMPUESTOS DE NIQUEL Y SU RELEVANCIA
EN LA CARCINOGENESIS.**



**BIBLIOTECA
CENTRO DE ECOLOGIA**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

P r e s e n t a :

**VALERIA FRANCISCA EUGENIA LEOPOLDINA
DE MARIA DE GUADALUPE SOUZA SALDIVAR**

INDUCCION DE INTERCAMBIOS DE
CROMATIDAS HERMANAS EN CULTIVO
VO DE LINFOCITOS HUMANOS POR
DIVERSOS COMPUESTOS DE NIQUEL
Y SU RELEVANCIA EN LA CARCINOGENESIS.

Tesis que para obtener
el grado de Maestra en
Ciencias presenta:
Valeria Francisca Eugenia
Leopoldina de Maria de
Guadalupe Souza Saldivar

México D. F. 1985

A Luis a quien cada
día quiero mas...

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la Dra. Sandra Gómez-Arroyo la dirección de esta tesis, así como su apoyo constante a lo largo de la difícil realización del trabajo experimental, también agradezco su amistad y confianza ya que estas me impulsaron a seguir adelante y a ser mejor.

Agradezco a mis sinodales: Dr. Gómez-Lara, Dr. Alfaro, Dr. Piñero, Dra. Rodríguez-Arnaiz y a la M. en C. Sara Frías sus valiosos consejos a lo largo de la elaboración de esta tesis.

Agradezco muy especialmente al Dr. Jorge Soberón las largas horas que pasamos enfrente del pizarón y de la computadora en la realización del modelo matemático, así mismo agradezco su entereza en los momentos difíciles porque esta nos ha enseñado mucho a todos sus amigos.

Agradezco a Dolores Juárez y Mercedes Puig su ayuda, su apoyo y sobre todo su amistad.

Agradezco al Departamento de Ecología del Instituto de Biología de La UNAM las facilidades que prestaron para la realización de esta tesis, en especial a Manuel y a Don Lino su ayuda con la computadora.

II

Agradezco a Carmen Vázquez del Centro de Investigación en Materiales su asesoría técnica .

Agradezco profundamente a Luis sus consejos, su apoyo constante y sobre todo su amor.

Agradezco a mi familia y a todos mis amigos que me han tenido que soportar y escuchar mis discursos sobre el níquel, el cáncer y la salud de los obreros.

Finalmente agradezco a todos mis compañeros del Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis Ambientales su ayuda y su paciencia y pido disculpas por los momentos difíciles que hemos tenido

INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Material y Método.....	14
Resultados.....	22
Discusión y Conclusiones.....	25
Bibliografía.....	47
Tablas y Figuras.....	60

RESUMEN

En este trabajo se estudia la inducción de intercambios de cromátidas hermanas por diversos compuestos de níquel y se presenta un posible modelo de inducción de cáncer por níquel y sus derivados (Fig. 11), considerando la información bibliográfica sobre níquel y cáncer, los resultados obtenidos en este estudio y el modelo general de carcinogénesis química.

Se realizan tratamientos con 5 compuestos de níquel con diferentes solubilidades y potencial carcinogénico: subsulfuro de níquel (Ni_3S_2) (en presencia y ausencia de Manganeso), sulfuro de níquel (NIS) cristalino, óxido de níquel (NiO), Sulfato de níquel (NiSO_4) y acetato de níquel ($\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2$).

Los resultados muestran que dentro de los compuestos solubles de níquel que se estudiaron, tanto el NiSO_4 como el $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ incrementan de manera significativa la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH). Entre los no solubles, el Ni_3S_2 también aumenta significativamente las frecuencias de ICH, mientras que este mismo, en presencia de Mn no induce ICH, lo mismo ocurre con el Mn solo.

El único compuesto de níquel que no produce ICH y que es carcinógeno es el NIS cristalino, esto se debe probablemente a su citotoxicidad. Y por último, en el caso del NiO no se obtienen resultados debido a que esta sustancia no penetra a las células.

INTRODUCCION

Entre los agentes químicos que originan cáncer en el hombre destacan los metales pesados (Martel, 1981), siendo mayor el riesgo en los individuos ocupacionalmente expuestos a los humos metálicos que se producen durante las operaciones industriales de altas temperaturas, ya que los metales se oxidan y aparecen como partículas sumamente finas que se depositan en diversas partes del sistema respiratorio donde pueden acumularse e inducir cáncer (Piscator, 1976).

Los metales pesados se caracterizan por formar complejos iónicos o covalentes llamados quelatos, con una gran variedad de donadores de electrones, especialmente con los derivados de nitrógeno, azufre, fosfato y oxígeno (Martel, 1981); dando lugar a interacciones químicas fuertes que alteran la constitución y la función de las enzimas y las proteínas (Webb, 1977); estos compuestos también se pueden unir a las bases nitrogenadas y a los grupos fosfatos que se encuentran en los ácidos nucleicos, dando lugar a enlaces muy firmes con estos últimos, estabilizando la doble hélice del ADN y haciendo más difícil su replicación y transcripción (Webb, 1977; Rossman, 1981), aunque la mayoría no son directamente mutagénicos ya que no cambian la secuencia de bases (Eichhorn, 1973; Sundaralingan, 1979; y Rossman, 1981).

Muchos metales pesados son conocidos carcinógenos (Hoffman, 1977; Webb, 1977; Rossman, 1981; Squibb y Fowler, 1981), posiblemente debido, entre otros factores, a que los iones

metálicos inhiben la replicación del ADN, además de provocar infidelidad en el apareamiento de bases in vitro, ya que interactúan con el ADN o con la ADN polimerasa (Hoffman, 1977; Rossman, 1981). Sin embargo, los mecanismos involucrados en la carcinogénesis metálica aun no están bien comprendidos, ya que estos compuestos también pueden mediar una serie de procesos celulares que incluyen cambios en la permeabilidad de la membrana al competir con otros iones esenciales. Esto modifica el equilibrio electrostático celular. Además actúan a nivel mitocondrial, alterando el equilibrio energético e intervienen en la actividad enzimática dentro de lisosomas y microsomas (Squibb y Fowler, 1981).

Entre los metales reconocidos como cancerígenos se encuentra el níquel (Ni), ya que se ha demostrado que induce cáncer en animales de laboratorio (National Research Council, 1975; International Agency for Research on Cancer, 1976) e incrementa la probabilidad de que se presente esta enfermedad en los individuos ocupacionalmente expuestos (NIOSH, 1977) por lo que es de suma importancia estudiar sus efectos y el de sus derivados en los seres vivos, ya que anualmente se producen en el mundo más de 825,700 toneladas de níquel, de las cuales cerca de un 47% se utiliza en aleaciones con acero, 21% en otras aleaciones, 13% en electroplateado y el 19% en monedas, compuestos para la catálisis química, cerámica, baterías, circuitos eléctricos, tinciones de vidrio y polipropileno (Stokinger, 1981) así como en incrustaciones dentales (Newman et al., 1982) y en prótesis metálicas para reemplazar articulaciones (Elves et al., 1975).

Recientemente, se ha observado que el níquel es un metal necesario para el metabolismo celular en mamíferos; ya que su ausencia retrasa el crecimiento (Schneegg y Kirchgessner, 1975) y produce anemia, debido a que reduce la concentración de hemoglobina e inhibe la absorción intestinal de hierro en ratas (Sunderman, 1977), también es indispensable para la biosíntesis de enzimas como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Kirchgessner y Schneegg, 1977; Schwarz, 1977) y las deshidrogenasas en la bacteria Desulfovibrio gigas (Tuxeira et al., 1983). Por otra parte, se han descrito varias proteínas que transportan al níquel en el organismo, destacando entre ellas la albúmina (Peters y Blumenstock, 1967; Chen et al., 1971; Soestbergen y Sunderman, 1972; Callan y Sunderman, 1973; Peters, 1977), así mismo se han encontrado sustancias en la fracción ultrafiltrable del suero que transportan al níquel intracelularmente, como son la histidina y el ácido aspártico (Soestbergen y Sunderman, 1972). El níquel que no es utilizado por el organismo es excretado principalmente en heces, orina y sudor.

Sin embargo, el exceso de este elemento en el individuo puede ser sumamente tóxico. Se conoce que el metabolismo del níquel está regulado por un sistema homeostático sumamente estricto, manteniéndose las concentraciones de este compuesto en un rango muy pequeño, que al sobrepasar la cantidad que puede absorber el organismo se producen efectos nocivos como depresión de la síntesis del grupo hemo e inhibición de la ATPasa (Maines y

Kappas, 1977), alterándose el equilibrio energético y la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Joo, 1968); también se ha descrito, que compuestos como el $NiCl_2$ modifican la viscosidad del pulmón e inducen cambios degenerativos del pulmón, testículos y corazón; así como alergias en la piel (Samitz y Katz, 1976). Además se ha demostrado que tanto el $NiCl_2$ como el $NiSO_4$ son potentes inmuno depresores en ratón disminuyendo tanto el número de macrófagos alveolares como su respuesta enzimática (Graham et al., 1975 a, Waters et al., 1975) y finalmente, el problema más grave de la exposición por níquel o por sus derivados, es el cáncer. Se ha detectado que los trabajadores expuestos a este metal, presentan hasta tres veces más cáncer de las vías respiratorias que la población normal (Sutherland, 1959; Tsuchiyva, 1965; Bourasset y Galland, 1966; Mastromatteo, 1967; Tourraine y Rombound, 1968; Doll et al., 1970; Saknyn y Shabynina, 1970; Pedersen et al., 1973; Sunderman, 1973, 1977, 1981, Hogertveit y Barton, 1976), siendo los tipos más comunes en estos obreros, los pólipos nasales, carcinomas epidermoides del pulmón y adenocarcinomas pulmonares (Sunderman, 1981).

Se ha descrito que la actividad carcinogénica de los compuestos de níquel está inversamente relacionada con su solubilidad en el medio acuoso (Payne, 1964; 1965; Sunderman, 1973; Sunderman y Maenza, 1976), ya que los menos solubles son, los más carcinogénicos, posiblemente porque estas sustancias permanecen más tiempo en el interior de la célula, presentándose

un efecto acumulativo, mientras que los solubles son desechados rápidamente mediante el metabolismo celular (Nishimura y Uneda, 1979). Entre los poco solubles presentes en los polvos industriales, están el Ni_3S_2 , el NiO y el NiS; siendo los dos primeros potentes carcinógenos, mientras que el último, se ha descrito que la forma cristalina induce cáncer y el tipo amorfo no (Costa et al., 1981; Sunderman, 1981), debido a que el cristalino es fagocitado selectivamente por la célula, en tanto que el amorfo permanece en el exterior de esta (Costa et al., 1982).

En animales experimentales, se ha observado que el níquel y algunos de sus derivados provocan sarcomas y carcinomas cuando son administrados por diferentes vías (tabla 1) (Sosinski, 1975; Jasmin y Riopelle, 1976; Stoner et al., 1976; Sunderman y Maenza, 1976; Sunderman et al., 1976, 1978, 1979a, b; Damjanov et al., 1978; Jasmin y Solymoss, 1978, Saknyn y Blokhin, 1978; Shimki et al., 1978; Hildebrand y Biserte, 1979a, b; Sunderman, 1979; Albert et al., 1980), encontrándose que aplicado intramuscularmente el NiS cristalino, en un 95% de los individuos tratados se originan sarcomas y con Ni_3S_2 se producen en un 100%, sin embargo, cuando este mismo compuesto es aplicado en presencia de manganeso solo induce 1/14 de carcinomas (International Agency for Research on Cancer, 1976). Con relación a este último fenómeno, Sunderman et al. (1974) y Sunderman (1976) proponen que este efecto posiblemente se deba a la competencia que establece el manganeso por los sitios de unión en la albúmina

y en los ligantes ultrafiltrables del suero, notándose que el manganeso reduce en un 48% la concentración de Ni_3S_2 en la fracción ultrafiltrable del homogenado de músculo de ratas expuestas; obteniéndose estos mismos resultados *in vitro*, donde el manganeso reduce la solubilidad tanto en suero completo como en el ultrafiltrable (Sunderman *et al.*, 1974, 1976). Otros compuestos que causan cáncer en animales experimentales son el NiO , $Ni(CO)_4$, níquel metálico, Ni_3O_2 , Ni_3Se_2 y $NiSe$ (International Agency for Research on Cancer, 1976).

Sin embargo, para comprender la manera por medio de la cual el níquel induce cáncer, es necesario revisar el modelo general de la carcinogénesis química.

Los datos obtenidos de estudios epidemiológicos y con animales de laboratorio, indican que el cáncer se origina en varias etapas, como resultado de un proceso multicausal, donde están involucrados factores tanto hereditarios como ambientales (Beremblum y Shubik, 1947a, b, 1949; Boutwell, 1964; Beremblum, 1979), el primer evento dentro del crecimiento neoplásico es conocido como de iniciación, este implica cambios en el ADN que pueden no desembocar en cáncer, pero que predisponen a la célula al siguiente paso de la oncogénesis. Los eventos que dan lugar a la iniciación son, en el caso de los carcinógenos indirectos, primero la activación enzimática hacia compuestos que interactúen con el ADN, siendo esto innecesario con los mutágenos directos (Miller y Miller, 1976), posteriormente estos reaccionan con el material hereditario dando lugar a alteraciones múltiples.

La mayor parte de los autores consideran que el cáncer se origina por mutaciones (Cairns, 1975) que involucran a un grupo restringido de genes celulares conocidos como proto-oncogenes, que al mutar se transforman en oncogenes celulares (c-onc) (Varmus, 1984).

Se ha observado que algunos de estos proto-oncogenes son genes altamente conservados que se originan en los primeros metazoarios y que están presentes en la mayor parte de los animales, donde tienen un importante papel en el crecimiento y el desarrollo de los organismos (Bishop, 1983) por lo que es probable que estos procesos se alteren durante la neoplasia (Doolittle et al., 1983; Downward et al., 1984; Waterfield et al., 1983). Por otra parte, Cooper y Newman (1980, 1981) encuentran que cada c-onc puede ser específico para cada tipo de tumor y para cada estadio de desarrollo de un linaje celular.

Las últimas investigaciones indican la existencia de gran número de mecanismos que pueden transformar un proto-oncogen en un c-onc; entre ellos se encuentran la recombinación mitótica, la inserción proviral, las no-disyunciones y las translocaciones cromosómicas, la conversión génica y las mutaciones puntuales (Cuypers et al., 1984; Fung et al., 1983; Pincus et al., 1983; Rowley, 1980; 1982; 1983; Santos et al., 1983; Wierenga y Hal , 1983) y aunque todavía se sabe muy poco sobre el origen preciso de las mutaciones somáticas, se piensa que las células que han

sido iniciadas pueden funcionar como "mutadores", es decir que en ellas es más probable que suceda una mutación o un rearrreglo génico que en las células normales (Cifone y Filder, 1981).

Sin embargo, el destino de esta lesión va a estar determinado por los eventos de replicación y reparación del ADN así como por otros mecanismos homeostáticos de la célula, siendo esencial que el daño en el ADN sea persistente para que se lleve a cabo el fenómeno de iniciación (Upton, 1982; International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, 1984).

Debido a que las mutaciones pueden ocurrir en regiones de la heterocromatina o en genes recesivos, es necesario uno o más eventos de promoción que amplifiquen el daño genético, durante el momento de la transformación neoplásica, sucediendo cambios permanentes en el comportamiento proliferativo de la célula alterada dando lugar al patrón de crecimiento de los tumores (Magee et al., 1975).

Se ha observado, que aquellas sustancias que presentan efecto promotor en animales experimentales, no siempre tienen efecto genotóxico, ya que pueden modificar la expresión fenotípica celular, o alterar la dinámica de crecimiento de las células iniciadas (Kroes, 1979; Weisburger y Williams, 1980), de hecho, se piensa que la promoción puede consistir en más de una etapa

(Slaga et al., 1980); de manera que el proceso oncogénico evoluciona mediante la selección sucesiva de clones que cada vez tienen mayor potencial carcinogénico (Foulds, 1969) siendo los diversos pasos influenciados por gran cantidad de variables, que incluyen desde susceptibilidad hereditaria, niveles hormonales, respuesta inmune y nutrición.

Debido a que la mayor parte de los agentes capaces de iniciar el proceso oncogénico se unen covalentemente al ADN, y a que la identificación de los nucleótidos sustituidos que intervienen en la transformación de un proto-oncogen en un c-onc en tumores humanos, permite confirmar la noción de que los mutágenos ambientales pueden funcionar como carcinógenos químicos (Capon et al., 1983; Dhar et al., 1982; Rasheed et al., 1983; Santos et al., 1984; Sukumar et al., 1983; Tabin et al., 1982; Taparowsky et al., 1983). Por lo que es de suma importancia detectar este efecto genotóxico por medio de sistemas biológicos de prueba, para de esta manera determinar el riesgo que representan estas sustancias para la población humana.

Dentro de estos sistemas de prueba destaca el análisis de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos humanos, tanto in vitro como en individuos ocupacionalmente expuestos a mutágenos y/o carcinógenos; ya que se ha demostrado que esta es un prueba sumamente sensible, puesto que es posible determinar incrementos en las frecuencias de ICH con concentraciones hasta diez veces menores que las requeridas para producir aberraciones

cromosómicas, existiendo además una alta correlación entre carcinogénesis e inducción de ICH (Kato, 1974; Lambert et al., 1976; Craig-Holmes, 1977; Wolff, 1977; Latt et al., 1981; Takehisa, 1982).

Sin embargo, para elaborar un modelo de inducción de cancer por níquel, es necesario conocer el comportamiento de este elemento en la célula. Webb y Weinzierl (1972) encuentran que una vez que el níquel se ioniza en el suero, es transportado por moléculas de bajo peso molecular al interior de la célula, donde se incorpora principalmente al núcleo, concentrándose la mayor parte en la región nucleolar. También se ha observado que este metal se asocia a las mitocondrias, produciendo inclusiones cristalinas (Webb y Weinzierl, 1972; Jasmin et al., 1979) y a los lisosomas, donde las partículas cristalinas de los derivados de níquel son disueltas a su forma iónica, siendo este paso equivalente a la activación del proceso neoplásico (Costa et al., 1982; Evans et al., 1982; Lee et al., 1982), ya que este ión es capaz de penetrar a través de la membrana nuclear (Costa et al., 1982; Evans et al., 1982) e interaccionar con el ADN y el ARN (Hui y Sunderman, 1980) reduciendo la fidelidad de la replicación (Sirover y Loeb, 1976), rompiendo hebras sencillas del ADN (Robinson y Costa, 1982; Costa et al., 1982) y puede inducir puentes ADN-proteínas (Ciccarelli et al., 1981; Lee et al., 1982) ya que el níquel se une a las bases nitrogenadas en el sitio N₇

asi como al grupo fosfato a través de las moléculas de agua (Sissoeff et al., 1976; Ciccarelli et al., 1981; Robinson y Costa, 1982).

Por otra parte se ha observado que algunos derivados de este metal son genotóxicos (tabla 2): el Ni_3S_2 inhibe la incorporación de timidina tritiada, retrasa la división celular, provoca mitosis anormales, anafases multipolares y cromosomas retardados (Swierenga y Basrur, 1968). Harald et al. (1981) encuentran que este compuesto aumenta marginalmente las frecuencias de ICH en linfocitos humanos in vitro; por otro lado se ha descrito que en rhabdiosarcomas inducidos por esta sustancia hay cromosomas trirradiados, dicéntricos y en anillo (Yamashiro et al., 1978)

En un estudio realizado por Nishimura y Umeda (1979) reportan que el NiS , el $NiCl_2$ y el $Ni(CH_3COO)_2$ inhiben la incorporación de timidina tritiada y elevan debilmente la frecuencia de aberraciones cromosómicas. Además se observa que el cloruro de níquel, aunque no es mutagénico en bacterias (Green et al., 1976) origina células mutantes en mamíferos (Hsie et al., 1979; Miyaki et al., 1979; Amacher y Paillet, 1982), pero no tiene efecto clastogénico en células de carcinoma mamario de raton (Umeda y Nishimura, 1979) aunque incrementa las frecuencias de ICH en linfocitos humanos y en células de criceto chino (Newman et al., 1982; Ohno et al., 1982).

Por otra parte, el NiSO_4 también induce un aumento en las frecuencias de ICH tanto en linfocitos humanos como en células de criceto chino (Wuelf, 1980; Ohno *et al.*, 1982); mientras que en estudios ocupacionales realizados en una refinera de níquel en Noruega, no hay resultados positivos ni en la producción de ICH ni de aberraciones cromosómicas en los obreros expuestos (Waksvik y Boysen, 1982), esto probablemente se deba a que los linfocitos no son las células blanco de los compuestos de níquel, ya que estos son fagocitados principalmente por los macrófagos pulmonares.

Debido a la importancia carcinogénica del níquel y sus derivados (National Research Council, 1975; International Agency for Research on Cancer, 1976; NIOSH, 1977) y a los pocos estudios citogenéticos que aporten datos sobre su acción a nivel cromosómico y sobre el fenómeno de iniciación neoplásica; en este trabajo se propone investigar el efecto de 5 compuestos de níquel con diferente solubilidad y potencial carcinogénico: Ni_3S_2 , NiS cristalino, NiO , $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ y NiSO_4 , en la inducción de ICH en linfocitos humanos *in vitro*, y con base en los resultados proponer un modelo matemático que explique el comportamiento de los datos en función con la oncogénesis y la solubilidad.

MATERIAL Y METODO

ESTUDIOS CITOGENETICOS

1) Cultivo de linfocitos humanos

Se emplearon muestras de sangre periférica de personas sanas, utilizando al mismo donador en cada experimento y su repetición del mismo tratamiento; se colocaron 8 gotas (0.4 ml) de sangre heparinizada en un frasco de cultivo con 3 ml de medio 5A Mc Coys (Microlab) y 0.12 ml de fitohemaqlutinina (Gibco), se dejaron 24 horas a 37°C en la estufa; transcurrido ese tiempo se agregaron 5 μ l/ml de 5-BrdU (Merck). Los cultivos permanecieron 48 horas en la oscuridad, a las 70 horas de cultivo, se adicionaron 4 μ g/ml de colchicina (Sigma) y se dejaron 2 horas más en la estufa. De cada tratamiento se hicieron dos repeticiones en días distintos, con dos frascos de cultivo por concentración.

2) Cosecha y tinción diferencial

Los cultivos se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, después se apartó el sobrenadante y el botón se resuspendió en una solución hipotónica de KCl (0.075M) y se dejó a 37°C por 20 minutos, a continuación se volvió a centrifugar y se fijó el botón con 4 ml de metanol-acético (3:1) por 20 minutos, se centrifugó nuevamente y el botón se lavó con 4 ml del fijador durante 10 minutos, se centrifugó finalmente el botón y se resuspendió en 0.5 ml de fijador y se realizaron las preparaciones por goteo, dejándolas secar al aire.

Una vez secas las preparaciones, se efectuó la tinción diferencial con Hoechst-33258 por 20 minutos en la oscuridad, después se montaron en KCl (0.075M) y se irradiaron con luz UV y negra durante 1 hora, posteriormente se pusieron en solución salina citratos (2SSC) a 45°C durante 1 hora, se tiñeron después con Giemsa (Merck) diluida 1/10 en agua destilada por 10 minutos.

Para el análisis de ICH, se cuantificaron 50 metafases de segunda división celular, por concentración y testigo de cada tratamiento; registrándose los ICH intersticiales como dos eventos y los terminales como uno.

Para evitar los prejuicios en el registro de los ICH se reetiquetaron todas las preparaciones de tal manera que el observador no tuvo conocimiento de cual concentración estaba registrando.

3) Tratamientos con los compuestos de níquel.

a) Compuestos insolubles

Se emplearon varias concentraciones de cada compuesto (Ni_3S_2 Obtenido por el Dr. Gomez-Lara del Instituto de Química de la UNAM) con y sin Mn (Sigma), NiS cristalino (determinado cristalográficamente por difracción de rayos X en polvos en el Departamento de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química UNAM) y NiO (Merck)), las cuales se eligieron por medio de

estudios preliminares con base en la LD_{50} del cultivo, contando con un testigo por cada tratamiento y cada repetición.

El compuesto a probar se pesó en una balanza analítica y se colocó en los frascos de cultivo, donde fue esterilizado por calor seco a 180°C durante 3 horas; posteriormente, se agregó a cada frasco el medio de cultivo y se sometió a agitación constante a 37°C durante tres días, con la finalidad de solubilizar las partículas metálicas (Sunderman et al., 1974); una vez transcurrido este lapso se sembró la sangre heparinizada y se procedió con el curso normal del cultivo.

b) Compuestos solubles

De igual manera que en los casos anteriores, se utilizaron varias concentraciones de cada sustancia (NiSO_4 y $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (Merck)) así como un testigo por tratamiento y por repetición. Las concentraciones y los tiempos de tratamiento fueron determinados por medio de estudios preliminares.

Se elaboró una solución madre de la cual se tomaron alícuotas esterilizadas por medio de filtros millipore de $42\ \mu\text{m}$ que se agregaron a las 24 horas de iniciado el cultivo en el caso del $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ y a las 48 horas para el NiSO_4 ya que este compuesto inhibe la activación mitótica inducida por la fitohemaglutinina en los linfocitos humanos in vitro (Lewis et al., 1980).

4) Diseño estadístico

Los datos se analizaron por medio de la prueba de "t de student" con una hipótesis nula de que el testigo no difiere significativamente del tratado considerándose un valor significativo a partir de una p<0.05. En el caso de la interacción M-S -Mn se realizó un análisis de varianza de una vía con la finalidad de saber si las diferencias entre tratamientos era significativa. Para conocer la distribución de los intercambios de cromátidas hermanas se determinó la distribución de Poisson por medio de una prueba de "t" modificada (Smith, 1980), siendo en este caso la hipótesis nula igual a que la distribución de los ICH es aleatoria en las diferentes metafases

$$t = \frac{(s^2 / \bar{X}) - 1}{\sqrt{2/(n-1)}}$$

5) Modelo matemático

A continuación se desarrolla el modelo propuesto para la inducción de ICH en cultivo de linfocitos humanos por diversos compuestos de níquel:

Consideremos de una manera simplificada que los tres estadios posibles de un linfocito en cultivo, pueden ser los siguientes (aquí no se toma en cuenta la reparación de los ICH):
N= célula normal con una frecuencia basal de ICH

F=célula con una frecuencia de ICH por arriba de la basal (célula con daño genotóxico)

t=célula muerta

Es claro que al adicionar al cultivo un agente mutagénico como el níquel, se obtiene que tanto F como t dependen de la concentración (C) de la sustancia en el medio. Debido a que estos eventos pueden ocurrir durante dos ciclos de replicación existe F1 (frecuencia de ICH en el primer ciclo) y F2 (frecuencia de ICH en el segundo ciclo) El proceso se puede representar por la sucesiva aplicación de una matriz con las probabilidades de que ocurran cualquiera de los estadios de la célula. Dos aplicaciones se representan elevando la matriz al cuadrado, multiplica la nueva matriz por las condiciones iniciales.

2

$$\begin{array}{c}
 \begin{matrix} N & F1 & F2 & t \\ \hline 1 & 0 & 0 & 0 \end{matrix} \\
 \left[\begin{array}{cccc} 1 & 0 & 0 & 0 \end{array} \right]
 \end{array}
 \times
 \begin{array}{c}
 \begin{matrix} N & F1 & F2 & t \\ \hline N & F1 & F2 & t \end{matrix} \\
 \left[\begin{array}{cccc} P11 & P12 & 0 & P14 \\ 0 & P22 & P23 & P24 \\ 0 & 0 & P33 & P34 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{array} \right]
 \end{array}$$

Esto se desarrolla de la siguiente manera:

$$\left[\begin{array}{cccc} 1 & 0 & 0 & 0 \end{array} \right]
 \times
 \left[\begin{array}{cccc} P11^2 & P11P12+P12P22 & P12P23 & P11P14+P12P24+P14 \\ 0 & P22^2 & P22P23+P23P33 & P22P24+P23P34+P24 \\ 0 & 0 & P33^2 & P33P34+P34 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{array} \right]$$

En ausencia de información más detallada suponemos que las probabilidades son funciones lineales de la concentración del mutágeno:

$P_{11}=1-C(M_1+T_1)$ probabilidad de permanecer sana en el primer ciclo de replicación

$P_{12}=CM_1$ probabilidad de incrementar ICH en el primer ciclo

$P_{14}=CT_1$ probabilidad de morir en el primer ciclo

$P_{22}=1-C(M_2+T_2)$ probabilidad de sufrir daño genético en el primer ciclo y permanecer igual en el segundo ciclo de replicación

$P_{23}=CM_2$ probabilidad de incrementar los ICH en el segundo ciclo

$P_{24}=CT_2$ probabilidad de morir en el segundo ciclo

$P_{33}=1-CT_2$ probabilidad de permanecer con daño en el segundo ciclo

$P_{34}=CT_2$ probabilidad de morir en el segundo ciclo

Aquí se introducen dos nuevos parámetros: M y T, el primero es la constante de proporcionalidad entre la frecuencia de ICH (F) y la concentración (C) y el segundo es la constante de proporcionalidad entre la muerte celular (t) y la concentración (C), por lo que M_1 es la tasa de incremento de ICH en el primer ciclo, M_2 es la tasa de incremento de ICH en el segundo ciclo, T_1 es la tasa de muerte celular en el primer ciclo y T_2 es la tasa de muerte celular en el segundo ciclo.

El resultado de la multiplicación de matrices es:

$$N = P_{11}^2$$

$$F_1 = P_{11}P_{12} + P_{12}P_{22}$$

$$F2 = P12P23$$

$$t = P11P14 + P12P24 + P14$$

Puesto que las alteraciones inducidas en los linfocitos expuestos a níquel durante dos ciclos de replicación son ICH final = $F1 + F2$. Podemos sustituirlo por los valores de $F1 + F2$ para obtener:

$$\begin{aligned} \text{ICH final} &= P12(F11 + P22 + P23) \\ &= M1C(1 - C(M1 + T1)) + 1 - C(M2 + T2) + CM2 \\ &= M1C(2 - C((M1 + T1) + (M2 + T2) - M2)) \end{aligned}$$

$$\text{ICH final} = M1C(2 - C(M1 + T1 + T2))$$

Esta ecuación sugiere que la relación entre ICH final y la concentración del compuesto de níquel debe de tener una forma parabólica, donde:

$F1^*$ = frecuencia de ICH por metafase (\bar{X}) producidos en el 1er ciclo

$F2^*$ = frecuencia de ICH por metafase (\bar{X}) producidos en el 2do ciclo

C = concentración del compuesto en el medio de cultivo ($\mu\text{g/ml}$)

$T1$ = tasa de muerte celular en el 1er ciclo/ C (células muertas/ C)

$T2$ = tasa de muerte celular en el 2do ciclo/ C (células muertas/ C)

$M1$ = tasa de inducción de ICH en el 1er ciclo/ C

* tanto $F1$ como $F2$ son frecuencias por encima de las obtenidas con el testigo, por lo que nos indican alteraciones producidas exclusivamente por el agente mutagénico, por lo que podemos conocer $F1 + F2(\text{max})$ restando a los resultados máximos el testigo.

Al ajustar por medio de una regresión polinomial una ecuación cuadrática del tipo $Y=a+bX+cX^2$ a los datos para cada sustancia, se tiene que:

a =ordenada en el origen (frecuencia de ICH en el testigo)

b =pendiente de la curva en el origen (2M1)

$c=M1(M1+T1+T2)$

con las cuales se puede calcular:

$M1= b/2$

$T(\text{total})=2c/b-M1$

También se puede conocer la concentración máxima esperada y la frecuencia de ICH máxima esperada para cada compuesto al igualar la derivada de la ecuación a cero ($dY/dX=0$).

RESULTADOS

La tabla 3 muestra las frecuencias de intercambios de cromátidas hermanas provocadas por el sulfato de níquel $NiSO_4$, observándose incremento significativo ($p > 0.001$) con relación al testigo a partir de la concentración de $20 \mu g/ml$, se nota un pico de inducción a los $250 \mu g/ml$, siendo este aumento dependiente de la concentración; en esta misma tabla, se nota que la distribución de los intercambios de cromátidas hermanas es aleatorio, salvo en la concentración más alta donde es significativamente agregado. Al realizar una regresión polinomial con los datos para esta sustancia, se obtiene una ecuación de $y = 6.70 + 0.13X - 0.001X^2$ (tabla 9); cuya ordenada al origen es de 6.7 ICH por metafase, una M1 de 0.07 ICH/concentración y una F1+F2 de 4.22 ICH por metafase.

El acetato de níquel (Tabla 4) eleva significativamente las frecuencias de ICH en las concentraciones de $1.25 \mu g/ml$ y $2.5 \mu g/ml$ ($p < 0.001$), descendiendo esta respuesta a los $6.25 \mu g/ml$ debido a la citotoxicidad de este compuesto; aquí la distribución es de tipo Poisson. La ecuación cuadrática a la que se ajusta la respuesta de esta sustancia es $Y = 4.37 + 2.02X - 0.71X^2$ indicando esta que la frecuencia de ICH esperada para el testigo es de 4.35, en cuanto a los otros parámetros M1 es bastante pequeña (1.01 ICH/concentración), T sumamente alta (8.04 células muertas/concentración) y una F1+F2 de 4.35 ICH por metafase (Tabla 9).

En la tabla 5 se evidencia que el Ni_3S_2 induce ICH de manera significativa ($p < 0.001$) en el pico de inducción que va desde 50 $\mu g/ml$ hasta 100 $\mu g/ml$, a los 125 $\mu g/ml$ las frecuencias bajan debido a la muerte celular, siendo que la distribución de los ICH sigue el mismo comportamiento, obteniéndose que en el pico de ICH la distribución es significativamente agregada ($p > 0.001$), mientras que en el resto de las concentraciones es aleatoria. En cuanto al modelo, encontramos que la frecuencia de ICH provocada por el Ni_3S_2 tiene una ecuación de $Y = 4.60 + 4.71X - 0.87X^2$ cuya tasa de ICH en el primer ciclo (M1) de 2.36 ICH/concentración y una $F1+F2$ de 6.36 ICH por metafase; una basal teórica de 4.60 ICH por metafase y una T de 6.05 células muertas/concentración.

Al interaccionar esta sustancia con el manganeso (Mn) (tabla 6), se advierte que tanto en el Ni_3S_2 Mn como el Mn solo, las frecuencias no difieren con respecto a los testigos, esto es muy claro en el análisis de varianza (tabla 7).

Los resultados logrados con el NiS cristalino, demuestran que no hay diferencias significativas con relación al testigo en la producción de ICH (tabla 8); aunque existe la tendencia a un incremento con relación a la concentración, siendo esta respuesta de tipo marginal ($p < 0.02$) debido a la gran toxicidad de este compuesto. También se determinó que la distribución es significativamente ($p > 0.001$) agregada en todos los puntos, esto se debe probablemente al donador y por medio del ajuste

polinomial se encontró la ecuación $Y = 5.80 + 4.89X - 2.12X^2$ la cual predice una ordenada al origen de 5.8 ICH por metafase, una M1 de 2.30 ICH/concentración una T sumamente alta de 11.51 células muertas/concetración y una F1+F2 de 2.47 ICH por metafase (Tabla 9).

No se pudieron aplicar los tratamientos con NiO debido a la falta de solubilidad de esta sustancia.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El hecho de que el sulfato de níquel (NiSO_4) incrementa de manera significativa la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en relación al testigo (tabla 3) concuerda con los resultados obtenidos por Ohno et al. (1982) en cultivo de linfocitos humanos y corrobora la mutagenicidad encontrada por Rodríguez-Arnaiz (comunicación personal) en Drosophila melanogaster, donde este compuesto induce mutaciones letales recesivas ligadas al sexo tanto en la etapa de espermatida como en la de espermatozoide maduro en la prueba de camadas así como pérdida total de cromosomas sexuales en machos tratados con 400ppm.

Al hacer pruebas para conocer la distribución de los ICH se observa que en un principio es de tipo aleatorio, esto es que la probabilidad de que se produzca un ICH es la misma en todas las células pero a medida que se aumenta la concentración, la distribución se vuelve significativamente de tipo agregado en el pico de inducción (Tabla 3), esto puede implicar que al subir la dosis en algunas células penetra más NiSO_4 que otras, por lo que estas son más susceptibles a un mayor daño en el ADN.

Con respecto a la toxicidad de este compuesto, se ha reportado que en perro y en conejo, la dosis letal mínima (LD_{50}) es de 500 mg/kg (NIOSH, 1976), esto se refleja claramente en la curva de respuesta tan amplia que se obtiene con el NiSO_4 , lo

cual posiblemente se deba a su solubilidad (625gr/lit) (Merck, 1976), ya que este compuesto penetra fácilmente y también es excretado con rapidez (Sunderman y Maenza, 1976) por lo que se requiere relativamente poca cantidad para inducir ICH de manera significativa ($p < 0.001$) pero es necesario incrementar 10 veces la concentración para que se eleve la frecuencia de ICH y 20 veces más para llegar a la dosis letal (Fig. 1). Esto tal vez indica la existencia de un adecuado sistema de desintoxicación de los linfocitos para el NiSO_4 , por lo que la citotoxicidad estaría dada por la saturación de este sistema. Esto da lugar a alteraciones importantes de la homeostasis celular, además del efecto genotóxico producido por este compuesto de acción directa (Rodríguez-Arnaiz, comunicación personal).

Se ha reportado que el acetato de níquel ($\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) es un carcinógeno débil (Stoner et al., 1976) que inhibe la incorporación de timidina tritiada e induce aberraciones cromosómicas en células de carcinoma mamario de ratón (Nishimura y Umeda, 1979; Umeda y Nishimura, 1979), siendo esto un indicio de daño al ADN. Esto confirma los resultados obtenidos en este trabajo donde se observa incremento significativo de las frecuencias de ICH con relación al testigo (Tabla 4), encontrándose el pico de inducción en una concentración muy baja (1.25 $\mu\text{g/ml}$). Por otra parte este compuesto es altamente tóxico ya que en ratón presenta una LD_{50} de 32 mg/Kg (NIOSH, 1976) reflejándose esto en los datos ya que se observa una curva de respuesta sumamente angosta (Fig. 1), lo que puede indicar que

aunque el acetato de níquel penetra fácilmente debido a su solubilidad (166gr/lit)(Merck, 1976) se supone que no existen mecanismos de detoxificación para el grupo acetato en linfocitos humanos in vitro, por lo tanto cuando entra el compuesto a la célula no solo altera al ADN produciendo ICH, sino que también daña la homeostasis celular por lo que la célula muere a concentraciones tan bajas como 12.5 $\mu\text{g/ml}$.

Los ICH producidos por esta sal, presentan una distribución aleatoria (Tabla 4), a diferencia del NiSO_4 , donde es de tipo agregado en el pico de inducción. Esto puede indicar que el acetato de níquel actúa tan drásticamente que no se seleccionan en el primer ciclo a aquellas células que presentan más níquel y que por lo tanto son más susceptibles a la producción de ICH, como en el caso del NiSO_4 .

Dentro de los compuestos estudiados, el subsulfuro de níquel (Ni_3S_2) es el más carcinogénico, y también es el único dentro de los compuestos insolubles, que incrementa las frecuencias de ICH de manera significativa ($p < 0.001$) con relación al testigo, obteniéndose un pico de inducción a los 75 $\mu\text{g/ml}$, siendo la curva dosis-respuesta de tipo cuadrático (fig.1).

En cuanto a la distribución de los intercambios, se repite el fenómeno observado con el NiSO_4 , (tabla 5). Esto puede indicar que las células con cierto número de intercambios son más susceptibles de sufrir más ICH; En este caso esto se puede deber a

que el Ni_3S_2 es un compuesto poco soluble (1×10^{-6} gr/lit) (Merck, 1976) que una vez dentro de la célula es difícil de desechar. Las células donde penetra una primera vez este compuesto tienen una fuente constante de daño al ADN, ya que se ha reportado que el Ni_3S_2 puede penetrar por fagocitosis a la célula como otros compuestos cristalinos del níquel (Costa et al., 1982) o entra en forma iónica al ser disuelto en el suero por medio de ligandos ultrafiltrables (Webb y Weinzierberg, 1972., Sunderman et al., 1976) y una vez dentro de ella, las partículas cristalinas de níquel son disueltas por los lisosomas a níquel iónico, el cual es capaz de atravesar la membrana nuclear (Abbracchio et al., 1981) donde daña al material hereditario y por lo tanto induce ICH.

Por otra parte el níquel extranuclear es una fuente potencial constante de alteraciones en el citoplasma (Costa et al., 1982). Debido a esto, el Ni_3S_2 es un potente carcinógeno (Jasmin et al., 1976; 1978; Shimkin et al., 1976; Stoner et al., 1976; Sunderman et al., 1976; 1978; 1979; Damjanov et al., 1978; Yarita y Nettesheim, 1978; Albert et al., 1980) que inhibe la incorporación de timidina tritiada, retrasa la división celular, induce mitosis anormales; anafases multipolares y cromosomas retardados (Swierenga y Basrur, 1968).

Harald et al. (1981) encuentran que esta sustancia incrementa debilmente la frecuencia de ICH, siendo la respuesta independiente de la concentración. Esto no concuerda con los

datos obtenidos en esta investigación debido a que ellos no disuelven previamente el Ni_3S_2 en el medio de cultivo por lo que encuentran una respuesta marginal independiente de la concentración, estos mismos autores describen un efecto "turbagénico" de este compuesto el cual se manifiesta como alteraciones en la estructura del núcleo y de la configuración de los cromosomas, ya que se ha reportado que este metal interfiere con la relación del ADN con las proteínas nucleares (Lee et al., 1982) este fenómeno se nota tanto en este estudio, observándose núcleos picnóticos en la concentración mas alta, como en Vicia faba donde el Ni_3S_2 induce gran cantidad de núcleos picnóticos (con aspecto "aglutinado") y cromosomas pegajosos principalmente en las primeras horas de tratamiento con 1ppm así como aberraciones cromosómicas, cromatídicas y subcromatídicas en todas las horas de tratamiento con 0.1 y 1 ppm (Souza et al., datos no publicados). La presencia de aberraciones cromosómicas y subcromatídicas indican que este compuesto se comporta como agente S-independiente (Evans, 1977) que pueden actuar a lo largo de todo el ciclo celular con un pico de actividad genotóxica en la fase G2 del ciclo celular; manifestándose este efecto como una mayor frecuencia de aberraciones a las 6 horas de tratamiento (Souza et al., datos no publicados) y no así a las 8 horas de tratamiento que corresponden a la fase de síntesis (S), como ocurre con la mayor parte de los agentes alquilantes que tienen un comportamiento S-dependiente (Evans, 1977), esto puede explicar el hecho de que un compuesto S-independiente como el subsulfuro de níquel a pesar de ser sumamente genotóxico no

incrementa aun más las frecuencias de ICH, ya que se ha demostrado que estos eventos ocurren solamente durante S (Taylor, 1957; Wolff et al 1974; Dutrillaux, 1976; Latt et al., 1981), sin embargo, una pequeña actividad en esta fase parece ser suficiente para incrementar significativamente las frecuencias de ICH, dando esto una idea del elevado potencial mutagénico del Ni_3S_2 .

Por otra parte, se ha descrito que el Manganeso (Mn) inhibe fuertemente la carcinogénesis inducida por el Ni_3S_2 (Sunderman et al., 1974), Sunderman et al. (1976) reportan que el Mn reduce la solubilidad del Ni_3S_2 in vitro en suero de rata, esto se debe a una reacción de desplazamiento electromóvil o a la competencia entre el Mn(II) y el Ni(II) por los sitios activos en las albúminas del suero o en los ligandos de la fracción ultrafiltrable del suero, in vivo se ha observado esta competencia a nivel de los sitios activos en las membranas (Donoskik y Mukunov, 1974). Esto concuerda perfectamente con los resultados obtenidos con la interacción Ni_3S_2 -Mn (tabla 6) donde se encuentra que el Mn inhibe totalmente la inducción de ICH del Ni_3S_2 , lo cual se demuestra por medio de un análisis de varianza donde el efecto del Ni_3S_2 solo es significativamente diferente al del Ni_3S_2 - Mn y el Mn solo (tabla 7).

El último compuesto que se analiza es el sulfuro de níquel (NiS), el cual es un fuerte carcinógeno cuando se encuentra en forma cristalina, en tanto que en la amorfa es totalmente inocuo (Sunderman et al., 1979a). Costa et al. (1982) demuestran que es

debido a que el NiS cristalino es ingerido por la célula, mientras que el amorfo permanece fuera de ella. Esta fagocitosis selectiva es producida por las cargas negativas de las partículas cristalinas, ya que se ha observado que las moléculas amorfas con sus cargas positivas (Abbracchio et al., 1982) se desprenden más frecuentemente de la membrana que las cargadas negativamente, las cuales se unen a la membrana de tal manera que se estimula la endocitosis (Evans et al., 1981).

Una vez dentro de la célula, las partículas de NiS cristalino son disueltas por los lisosomas (Evans et al., 1981), formándose iones Ni^{2+} que pueden penetrar la membrana nuclear y alterar la información genética, induciendo rompimientos de una hebra (Robinson y Costa, 1982) y puentes entre el ADN y las proteínas (Ciccarelli et al., 1981) así como infidelidad en la replicación (Sirover y Loeb, 1976) e inhibición en la incorporación de timidina tritjada (Nishimura y Umeda, 1979).

A pesar de que este mutágeno incrementa significativamente las frecuencias de aberraciones cromosómicas (Nishimura y Umeda, 1979; Umeda y Nishimura, 1979), en este trabajo se nota que solo eleva las frecuencias de ICH de manera marginal ($p < 0.02$) (Tabla 8) presentando un comportamiento cuadrático con relación a la concentración (fig. 1). Es evidente que el NiS tiene un fuerte efecto tóxico, ya que esta sustancia altera mortalmente a la célula antes de inducir significativamente ICH.

Considerando que este compuesto es de tipo S-independiente, (como lo indica la producción de aberraciones cromosómicas en células de mamífero (Nishimura y Umeda, 1979) se puede explicar la baja inducción de ICH por el NiS, a pesar de que es un potente carcinógeno que altera al ADN, ya que si este daño ocurre durante otras etapas del ciclo celular, y es menor durante S; cuando se llega a concentraciones suficientes para incrementar significativamente las frecuencias de ICH, la célula se encuentra tan intoxicada que no sobrevive hasta metafase.

Al comparar el efecto de todos los compuestos, se nota que aunque cada uno de ellos tiene una curva de respuesta diferente, todos siguen un mismo patrón de comportamiento parabólico con respecto a la concentración (Fig. 1); por lo que para compararlos entre si se utiliza el modelo matemático.

Al realizar estos cálculos con cada sal de níquel estudiada (tabla 9) se obtiene que el NiSO_4 tiene una ordenada al origen de 6.7 ICH por metafase, que es muy similar a la real de 6.12 ICH por metafase, una M_1 de 0.07 ICH/concentración y una F_1+F_2 máxima de 4.22 ICH por metafase. Siendo ambas variables el reflejo de los ICH producidos por el compuesto en el 2do ciclo de replicación, ya que este solo puede ser aplicado durante las últimas 24 horas de tratamiento (2do ciclo de replicación) debido a que inhibe la estimulación de la división celular por la fitohemaglutinina (Lewis et al., 1980).

El hecho de obtener una M1 tan pequeña tal vez se deba a que en este compuesto, el primer "impulso" es muy lento, incrementándose después al aumentar la concentración, esto puede tener alguna relación con la toxicidad total (ajustada) de 1.57 células muertas/concentración que es la más baja entre todas las sustancias estudiadas, por lo que se obtiene esa parábola tan amplia que caracteriza al NiSO_4 . El hecho de que tanto los ICH máximos esperados como las concentraciones máximas calculadas sean tan parecidos a los reales (tabla 9) habla sobre la robustez del modelo propuesto, a pesar de que la ecuación se logra con los promedios para cada concentración y no así con las frecuencias por metafase, esto hace que las correlaciones sean más bien de carácter cualitativo y no cuantitativo ya que con tan pocos datos no se puede realizar un estudio estadístico con los parámetros alcanzados a partir de las ecuaciones puesto que todavía no hay errores asociados a estos.

En el caso del $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, se muestra que la frecuencia de ICH esperada y la experimental son muy similares (Tabla 4). En cuanto a los otros parámetros, M1 es bastante pequeña (1.01 ICH/concentración); confirmando esto la suposición de que este agente es tan tóxico ($T(\text{total})_{\text{teórica}} = 8.04$ células muertas /concentración) que pocas células con alteraciones sobreviven el primer ciclo por lo que la mayor parte de la mutagénesis ($F1 + F2 = 4.35$ ICH por metafase) tal vez se debe a las células dañadas durante el segundo ciclo celular, en cuanto a las predicciones de ICH máxima y concentración máxima se nota que la primera está

un poco por abajo de la experimental mientras que la segunda es muy cercana a la real.

Para el Ni_3S_2 se obtiene una tasa de ICH en el primer ciclo igual a 2.36 ICH/concentración, que es la más alta entre los compuestos estudiados, y una $F1+F2$ bastante elevada de 6.36 ICH por metafase demostrando esto el carácter acumulativo de esta sustancia poco soluble pero fuertemente genotóxica; la frecuencia de ICH basal teórica es más baja (4.60 ICH por metafase) que la experimental (6.32 ICH por metafase) pero esto tiene poca trascendencia en el modelo que se describe, en cambio los ICH máximos calculados (10.98 ICH por metafase) son muy similares a los reales (12.52 ICH por metafase) al igual que la concentración máxima ajustada (67.5 $\mu\text{g/ml}$).

También con el NiS se nota que el modelo se acerca bastante a los datos observados (tabla 9) ya que predice una ordenada en el origen de 5.8 ICH por metafase y unas frecuencias máximas de ICH calculadas de 8.27 por metafase, siendo ambas variables muy semejantes a las experimentales; en cuanto a la mutagenicidad se muestra que este compuesto poco soluble se comporta muy diferente que todos los demás ya que la frecuencia de ICH en el primer ciclo es bastante alta ($M1=2.30$ ICH/concentración), sin embargo esta tal vez desciende drásticamente en el segundo ciclo de replicación ya que la $F1+F2$ es la más baja entre todos los derivados de níquel (2.47 ICH por metafase). Este fenómeno tal vez se deba a la fuerte toxicidad de este compuesto (11.51 células

muerdas/concentración), reflejándose esto en la inducción marginal de ICH, ya que aparentemente no se llegó a producir suficiente daño genotóxico durante la etapa de síntesis del ADN, aunque si el NiS es de efecto S-independiente se puede explicar su fuerte potencial carcinogénico a partir de alteraciones en el ADN durante otras fases del ciclo celular.

Por otra parte, al graficar M1 contra toxicidad, se encuentra una correlación lineal que implica que el agente que induce mas ICH en el primer ciclo es el mas tóxico (Fig. 2),

Lo anterior no ocurre con F1+F2 (Fig. 3) ya que aqui se observa una curva con un óptimo de mutagénesis a una toxicidad media, ya que cuando las sustancias son demasiado tóxicas durante los dos ciclos de replicación las células mueren antes de manifestar el daño genotóxico en la metafase del segundo ciclo. Por lo que la frecuencia de ICH final no es el mejor parámetro para medir daño genotóxico ya que estos eventos se ven desviados por la toxicidad en el segundo ciclo.

Para poder entender la inducción de intercambios de cromátidas hermanas por los diversos compuestos de níquel es necesario analizar cuidadosamente tanto las hipótesis que se han postulado sobre el origen de este fenómeno como la naturaleza molecular del mismo.

Los ICH representan intercambios entre los productos de la replicación del ADN, sin que se altere ni la polaridad ni la estructura de la doble hélice del ADN; aparentemente estos involucran ruptura y reunión del ADN, aunque no se conoce de manera precisa como se provocan a nivel molecular (Latt et al., 1980). La existencia de los ICH es detectada inicialmente por Mc. Clintock en 1938 al observar cromosomas entrelazados y anillos dobles en Zea mays; sin embargo, Taylor et al. (1957), son quienes al hacer estudios con autoradiografía de cromosomas de Vicia faba marcados con timidina tritiada, demuestran plenamente la existencia de los intercambios de cromátidas hermanas.

Más tarde Kato (1973) es el primero en probar la inducción de ICH por agentes alquilantes, por medio de autoradiografía, y a pesar de la poca resolución de esta técnica, encuentra que dichos agentes incrementan las frecuencias de ICH con dosis mucho menores que las necesarias para producir aberraciones cromosómicas. Latt en 1974a utiliza por primera vez un método que permite diferenciar químicamente a las cromátidas hermanas, lo cual aumenta considerablemente el poder de resolución de esta prueba ya que es posible detectar ICH mucho más pequeños y cercanos que con la técnica anterior. Este nuevo método se basa en la incorporación de un análogo de la timidina, la 5-bromodesoxiuridina (5-BrdU) al ADN durante dos ciclos de replicación; posteriormente se distinguen las cromátidas T-Br y Br-Br por medio de colorantes fluorocromados como el bisbenzimidazol (Hoechst 33258), por medio del análisis en un

microscopio de fluorescencia o con la tinción diferencial fluorescencia más Giemsa (FPG) que permite observarlos ICH en un microscopio normal.

Por otra parte, se ha notado que 5-BrdU, induce por si misma ICH, por lo que es sumamente difícil determinar la frecuencia espontánea real de este evento (Latt, 1974b; Davison et al., 1980) y es por este factor que se parte de cierta frecuencia basal del testigo en los resultados .

A pesar del uso intensivo de la técnica de ICH para la detección de mutágenos , clastógenos y carcinógenos tanto en sistemas in vitro como in vivo, y a los grandes esfuerzos que se han hecho para conocer el mecanismo molecular que los origina; todavía no existe ningun modelo definitivo sobre su origen . Aunque desde un principio, Taylor et al. (1957) proponen que estos se producen por la recombinación entre cadenas sencillas del ADN entre las cromátidas hermanas de un cromosoma, sin que esto altere la polaridad de la doble hélice y mas tarde varios autores (Kato, 1973; Kilhman y Sturelid, 1978) al experimentar con mitomicina-C, luz ultravioleta y cafeína proponen que los ICH estan relacionados con los mecanismos de reparación del ADN, sugiriendo Kato (1974) su teoría sobre la reparación post-replicación para explicar el origen de estos intercambios.

Sin embargo estas dos teorías han sido rechazadas recientemente, ya que algunos autores (Taylor, 1957; Wolff et al.,

1974; Dutrillaux, 1976; Latt et al., 1981) indican que los ICH ocurren exclusivamente durante la fase de síntesis del ADN, por lo que ambas teorías se desechan ya que en caso de realizarse la recombinación de hebras sencillas durante esta etapa, se inducen fuertes alteraciones en la replicación del ADN (Latt et al., 1981) esto mismo sucede con el modelo de reparación propuesto por Kato, ya que este fenómeno no ocurre estrictamente durante la fase de síntesis.

Por otro lado, se ha descrito que los ICH implican rupturas de cadena doble del ADN (Kilhaman, 1975; Yukimasa, 1977) anulando esto, una vez más, ambas teorías ya que las dos involucran rupturas de una sola hebra del ADN (Kato, 1974). Además, De Weerd-Kasteleer et al. (1977) y Wolff (1977) demuestran que no existe correlación sistemática entre la capacidad para reparar el ADN y la inducción de ICH, por medio de estudios en células deficientes en reparación post-replicación (variantes de la enfermedad xeroderma pigmentosa) y en células normales. Además, se ha observado que los ICH suceden preferentemente en las regiones entre la eucromatina y la heterocromatina, correspondiendo esto a los límites entre las bandas Q^+ y Q^- , donde se ha detectado en diferentes organismos, que los ICH se localizan principalmente (Carrano y Wolff, 1975; Bostock y Christie, 1976; Hsu y Pathak, 1976).

Por lo que Painter (1980) propone que las regiones heterocromáticas corresponden a conglomerados de replicones,

siendo que todos los replicones de esta región se duplican casi simultáneamente (Hand, 1978), por lo que Painter sugiere que son estos conglomerados la unidad real de los ICH. En este modelo, se sugiere que las uniones entre la heterocromatina y la eucromatina, son especialmente sensibles a los ICH por medio de rompimientos de doble cadena del ADN, ya que cuando se está dividiendo el conglomerado vecino, la topoisomerasa II puede cortar el ADN para eliminar la tensión que produce el superenrollamiento sobre el ADN en replicación, teniendo una probabilidad finita de equivocarse y producir un ICH (Liu et al., 1980); siendo entonces que aquellos agentes que retrasan la replicación del ADN, los que producen una mayor frecuencia de ICH, ya que aumentan la posibilidad de que la topoisomerasa cometa un error cuando un conglomerado pasa mucho tiempo sin duplicarse mientras que en el conglomerado vecino ya lo hizo, uniendo a las hebras hijas del ADN replicado con las hebras parentales del conglomerado sin replicar (fig. 4), cuando termina de duplicarse todo el ADN, los procesos de ligamiento normales completan el ICH. Debido a las características de esta enzima que corta al ADN de manera sumamente precisa, se puede comprender el porqué los ICH son eventos que no alteran ni la polaridad ni la sobrevivencia de la célula, ya que no cambia la secuencia de nucleótidos en el sitio del ICH (Latt et al., 1980).

Esta hipótesis concuerda con el hecho de que las sustancias que dañan al ADN y hacen mas lenta su replicación son las mejores

inductoras de ICH (como los agentes alquilantes), mientras que aquellos agentes que rompen la doble cadena del ADN, inhiben su división (como los rayos X) no incrementan las frecuencias de ICH; también coincide este modelo con el hecho de que los ICH presentan una relación lineal con respecto a la concentración (Perry y Evans, 1975; Carrano *et al.*, 1978), es decir que en un solo evento se rompe la doble cadena del ADN (Painter, 1982).

Pero surge la interrogante del porque se detectan diferentes respuestas en la inducción de ICH, si en todos los compuestos estudiados el agente activo es el níquel iónico. Para responder a esta pregunta se analizan las diversas "cualidades" de estas sustancias. En la tabla 10 se señala que los dos compuestos solubles incrementan significativamente las frecuencias de ICH, pero el acetato actúa antes que el sulfato (Fig. 1). Esto tal vez se deba a que el ión $\text{CH}_3\text{COO}^{-1}$ es mucho más tóxico que el SO_4^{-2} por lo que el último es fácil de desechar y el primero envenena rápidamente a la célula. En los dos casos el ión níquel penetra por transporte activo, ya sea por sí solo o unido a ligandos ultrafiltrables del suero (Webb y Weinzerberg, 1972), siendo entonces la probabilidad de penetrar al núcleo muy similar en ambos; por lo que las disparidades entre estos agentes genotóxicos se deben exclusivamente a su toxicidad celular. En cambio el Ni_3S_2 aunque también incrementa las frecuencias de ICH es un compuesto poco soluble con toxicidad relativamente baja (tabla 10), que puede penetrar a la célula por fagocitosis o por la misma vía que los anteriores (ya que este metal se disuelve

previamente en el medio de cultivo) pero debido a su solubilidad, tiene un efecto acumulativo cuando es fagocitada la partícula cristalina (Sunderman, 1973), por lo que observamos un fuerte efecto mutagénico y carcinogénico.

Pero es sorprendente que el NiS que tiene una solubilidad y una estructura molecular muy similar al Ni_3S_2 , eleva solo marginalmente la frecuencia de ICH, esto tal vez se deba a la altísima toxicidad de este compuesto, ya que encontramos que en el primer ciclo de replicación aumenta la frecuencia de ICH (tabla 9) pero suponemos que en el segundo ciclo esta respuesta baja considerablemente por la intoxicación acumulativa que sufre la célula expuesta a este compuesto. Posiblemente estas diferentes toxicidades se deban a la estructura del cristal, ya que al ser el NiS más sencillo que el Ni_3S_2 , probablemente puede formar quelatos con más moléculas y por lo tanto alterar más a la célula, o a la accesibilidad de los iones níquel en la partícula cristalina; ya que si estos se desprenden con mayor facilidad en el NiS que en el Ni_3S_2 , entonces esto puede explicar el porque el NiS es tan tóxico.

A pesar de que en todas las sustancias estudiadas el agente activo es el níquel iónico el cual al unirse al ADN (Hui y Sunderman, 1980; Lee et al., 1982) rompe la hebra sencilla del ADN e induce puentes ADN-proteínas (Ciccarelli et al., 1981) provocando esto un retraso en la replicación del ADN, por lo que la topoisomerasa II tiene mayor probabilidad de equivocarse e

inducir ICH. Lo que los separa entre si es la toxicidad y la vía de penetración, la cual esta determinada por la solubilidad; por otra parte, parece ser que es este último factor la clave en la diversidad en el potencial carcinogénico de estos compuestos ya que los menos solubles son los mas oncogénicos (tabla 10, Fig 5) (Payne, 1964; 1965; Sunderman, 1973; Sunderman y Maenza, 1976) y los que inducen mas ICH durante el primer ciclo (M1) (fig.6).

Para poder relacionar los ICH con la solubilidad y la carcinogénesis es necesario profundizar más sobre el proceso neoplásico y en este caso, analizar cuidadosamente el evento de iniciación, ya que la inducción de ICH solo puede reflejar el daño que ocurre en este periodo.

El hecho de que el níquel sea un carcinógeno que altera al ADN e induce intercambios de cromátidas hermanas, puede implicar que parte de este daño se produce en regiones del genoma que contienen proto-oncogenes, por lo que estos se transforman a onc los cuales alteran la expresión fenotípica de la célula dañada, iniciándola al proceso neoplásico, tambien se espera que aquellos compuestos poco solubles sean los más carcinogénicos ya que al acumularse estos dentro de la célula son una fuente constante de níquel iónico que puede penetrar al núcleo e incrementar la probabilidad de que el daño al genoma ocurra en un proto-oncogen.

El hecho de que este ión metálico permanezca tanto tiempo dentro de la célula cuando ésta fagocita una partícula cristalina poco soluble de un derivado de níquel, podría explicar el fuerte potencial carcinogénico de estos compuestos (Ni_3S_2 y NiS cristalino) ya que el Ni^{2+} no solo actúa a nivel del ADN sino que también interviene en procesos celulares tan importantes como la respiración y la permeabilidad de la membrana (Joo, 1968) funcionando estas alteraciones en la homeostasis celular como posibles promotores del proceso oncogénico.

Por otra parte, al graficar la frecuencia de ICH por metafase en el primer ciclo (M1) contra carcinogenesis (fig. 7) se nota una relación lineal positiva entre estos dos eventos, por lo cual se puede decir que los compuestos más carcinogénicos son los que más daño genotóxico producen en el primer ciclo, sin embargo, al graficar la frecuencia máxima de ICH contra la carcinogénesis (fig. 8) se observa que no existe una gran correlación entre estos dos parámetros debido a la toxicidad del NiS

Pero al graficar carcinogenesis contra toxicidad total se observa un máximo de toxicidad muy cerca de un máximo de oncogénesis (fig. 9) a pesar de que el más carcinogénico es medianamente tóxico, esto último tal vez se deba a que la estructura cristalina del Ni_3S_2 hace que los iones de níquel sean menos accesibles que en el cristal de NiS , por lo que este último compuesto los libera con mayor facilidad que el Ni_3S_2 sugiriendo

esto la gran toxicidad del NiS, sin embargo estos resultados hablan de la importancia de la toxicidad en el desarrollo del cáncer; ya que los compuestos citotóxicos son aquellos capaces de alterar el funcionamiento general de la célula atacando varios puntos a la vez (ribosomas, núcleo, mitocondrias etc...), por lo que en estas células descontroladas es mas probable la iniciación de un proceso neoplásico.

Finalmente, cuando se grafica la concentración máxima (la del pico de inducción de ICH) contra carcinogénesis (fig. 10) y se muestra que existe una concentración óptima para la producción de cancer, siendo esta de 50 a 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en la curva real y un poco más amplia en la curva ajustada por regresión polinomial (de 27 a 67 $\mu\text{g}/\text{ml}$); esto indica que ni aquellos agentes sumamente tóxicos (como el acetato) ni los poco tóxicos cuya concentración máxima es muy alta (como el sulfato), pueden producir tumores malignos; ya que los primeros matan a la célula muy rápido, por lo que no da tiempo de que se desarrolle el cáncer y los segundos requieren concentraciones tan altas del carcinógeno que todavía no se han probado experimentalmente.

Todo esto indica que la relación mas directa entre intercambios de cromátidas hermanas e inducción de procesos neoplásicos por derivados de níquel se presenta en el valor de M1 ya que este refleja directamente el daño al ADN antes de que intervenga el factor de toxicidad celular. Por otra parte, es este "primer golpe" al ADN el que probablemente decida el destino



de la célula, siempre y cuando, se considere a los ICH como buen indicador del daño genotóxico y se tomé como válido el modelo general de la carcinogénesis química que se muestra en la introducción, donde el evento de iniciación implica alteraciones genéticas que predisponen a la célula al siguiente paso conocido como de promoción, donde se amplifica este "primer golpe", obteniendo como resultado cambios en el comportamiento proliferativo celular .

Por lo que si el modelo que se presenta en este trabajo funciona de manera general para la inducción de ICH por agentes químicos que tengan una curva de respuesta de tipo parabólico; y si se desea predecir la carcinogénesis de un compuesto dado a partir de frecuencias de ICH es más importante conocer M_1 (a partir de la ecuación obtenida para la sustancia en cuestión) que la frecuencia final de ICH. Pudiendo predecir de esta manera que dentro de un grupo de compuestos con mecanismos de acción similares (por ejemplo agentes alquilantes) aquel que presente una mayor M_1 será el más carcinogénico.

A continuación se proponen una serie de hipótesis sobre el mecanismo seguido por los derivados de níquel para inducir cáncer en animales experimentales (Fig. 11)

Suponiendo que parte de las alteraciones al ADN ocurren en proto-oncogenes transformándolos a c-onc (H1), si este daño persiste en la célula después de la división celular se

expresaran proteínas alteradas (H2) obteniéndose células hijas con un genotipo y un fenotipo diferente a las células iniciales, este nuevo fenotipo se puede detectar a nivel de los antígenos de membrana (H3) por lo que una buena respuesta inmune puede percibir estos cambios y matar a la línea celular dañada. Estas clonas transformadas probablemente presentan una cinética celular acelerada (H4) por lo que tienen una mayor ventaja selectiva sobre las líneas celulares normales.

La transformación neoplásica puede ser amplificada en este estadio por la acción de promotores como el benzo(a)pireno o ser promovida por el mismo níquel (H5) el cual permanece largo tiempo en la célula modificando la homeostasis celular, originando un desequilibrio energético y electroquímico que se puede reflejar en la expresión del genoma y por ende promover la carcinogénesis. Estas líneas celulares transformadas siguen seleccionándose favorablemente por su alta tasa de división celular hasta convertirse en células tumorales, las cuales dependiendo de su capacidad proteolítica dan lugar a tumores benignos o a tumores malignos capaces de invadir otros tejidos.

El hecho de que el níquel deprime la respuesta inmune (H6) (Graham et al., (1975b) demuestran que tanto el NiSO_4 como el NiCl_2 inhiben la respuesta inmune humoral y celular en ratas tratadas) puede explicar la eficacia de estos compuestos en cuanto a la producción de cancer.

BIBLIOGRAFIA

- Abbracchio, M. P., Heck, J. D., Caprioli, R. M., y Costa, M. (1981). Differences in surface properties of amorphous and cristaline metal sulfides may explain their toxicological potency. *Chemosphere* 10, 897-908.
- Abbracchio, M. P., Heck, J. D. y Costa, M. (1982) The phagocytosis and transforming activity of cristalline metal particles are related to their negative surface charge. *Carcinogenesis* 3, 175-180.
- Albert, D. M., Gonder, J. R., Papale, J., Craft, J. L., Dohlman, H. G., Reid, M. C., y Sunderman, F. W. Jr. (1980) Induction of ocular neoplasm in Fisher rats by intraocular injection of nickel subsulfide. En: Nickel Toxicology, Ed. Brown, S. S. y Sunderman, F. W. Jr. Academic Press, Nueva York, pp. 55-58.
- Amacher, D. E. y Paillet, S. C. (1982) Metal induced mutagenesis in mammalian cell point mutation assay. *Toxicol. Appl. Pharm.* 43, 357-362.
- Ames, B. N. (1979) Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* 204, 587-593.
- Berenblum, I. (1979) Theoretical and practical aspects of the two stage mechanism of carcinogenesis. En: Carcinogenesis: Identification and mechanisms of action, Ed. Griffin, A. C. y Shaw, C. R. Raven Press, Nueva York, pp. 25-36.
- Berenblum, I. y Shubik, P. (1947a) The role of croton oil application associated with a single painting of a carcinogen in tumor induction of the mouses skin. *Br. J. Cancer* 1, 379-383.
- Berenblum, I. y Shubik, P. (1947b) A new quantitative approach to the study of stage of chemical carcinogenesis in the mouses skin by a single application of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene. *Br. J. Cancer*, 3, 384-386.
- Berenblum, I. y Shubik, P. (1949) The persistence of latent tumor cells induced in the mouses skin by a single application of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene. *Br. J. Cancer*, 3, 384-386.
- Bishop, J. M. (1983) Cellular oncogenes and retroviruses. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 301-354.
- Bostock, C. K. y Christie, S. (1976) Analysis of the frequency of sister chromatid exchange in different region of chromosomes of the Kangaroo rat. *Chromosoma* 56, 275-287.
- Bourasset, A. y Galland, G. (1966). Cancer des voies respira

toires et exposition aux sels de nickel. Arch. Malad. Prof., 27, 227-229.

Boutwell, R. K. (1964) Some biological aspects of skin carcinogenesis. Prog. Exp. Tumor Res., 4, 207-250.

Cairns, J. (1975) Mutation selection and their natural history of cancer. Nature 255, 197-202.

Cairns, J. (1981) The origin of human cancers. Nature 289, 353-357.

Callan, W. M. y Sunderman, F. W. Jr. (1973) Species variation in binding of $^{63}\text{NiCl}_2$ by serum albumin. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 5, 459-472.

Capon, D. J., Chen, E. Y., Levison, A. D., Seeburg, P. H., y Goeddel, D. B. (1983) Complete nucleotide sequences of the T 24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue Nature 302, 33-37.

Carrano, A. V. y Wolff, S. (1975) Distribution of sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of the Indian Muntjac. Chromosoma 53, 361-369.

Carrano, A. V., Thompson, L. H., Lindl, P. A., y Minkler, J. L. (1978) SCE as an indicator of mutagenesis. Nature 271, 551-160.

Chen, J. K., Haro, R. T. y Furst, A. (1971) Excretion of nickel compounds by the rat: blood and urine levels. Wasman J. Biol 24, 1-15.

Ciccarelli, R. B., Hampton, J. H., y Jennette, K. W. (1981) Nickel carbonate induces DNA-protein cross-links and DNA strand breaks in rat kidney. Cancer Lett., 12, 349-354.

Cifone, M. A. y Fidler, I. J. (1981) Increasing metastatic potential is associated with increasing instability of clones isolated from murine neoplasms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6949-6952.

Cooper, J., y Newman, P. E. (1980) Transforming genes of the neoplasms induced by avian lymphoid leukemia viruses. Nature 287, 656-659.

Cooper, G. M. y Newman, P. E. (1981) Two distinct candidate transforming genes of lymphoid leukemia virus-induced neoplasms. Nature 292, 857-858.

Costa, M., Nye, J. S., Sunderman, F. W. Jr. Allpass, P. R., y Gondo, B. (1978) Induction of sarcomas in nude mice by implantation of Syrian hamster fetal cells exposed in vitro to nickel subsulfide. Cancer Res., 39, 3591-3597.

- Costa, M., Simmons-Hansen, J., Bedrossian, C. W. M., Bonura, J., y Caprioli, R. M. (1981) Phagocytosis, cellular distribution and carcinogenic activity of particulate nickel compounds in tissue culture. *Cancer Res.*, 41, 2868-2876.
- Costa, M., Heck, D. J. y Robinson, S. H. (1982) Selective phagocytosis of crystalline metal sulfide particles and DNA strand breaks as a mechanism for the induction of cellular transformation. *Cancer Res.*, 42, 2757-2763.
- Craig-Holmes, A. D. (1977) Effects of 6 carcinogens on SCE frequencies and cell kinetics in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 46, 375-384.
- Cuyper, H. T., Selten, G., y Quint, W. (1984) Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: Integration of pro virus in a distinct chromosomal region. *Cell* 37, 141-150.
- Damjanov, I., Sunderman, F. W. Jr., Mitchell, J. M., y Allpass, P. R. (1978) Induction of testicular sarcomas in Fisher rats by intratesticular injection of nickel subsulfide. *Cancer Res.*, 38, 268-274.
- Davison, R. K., Kaufman, E. R., Dougherty, G. P., Dullea, A. M., Difalco, C. M. y Latt, S. A. (1980) Induction of sister chromatid exchanges by BrdU is largely independent of BrdU content of DNA. *Nature* 284, 74-76.
- De Weerd-Kastelein, E. A., Keijzer, W., Rainaldi, G. y Bootsma, D. (1977) Induction of sister chromatid exchange in xeroderma pigmentosum cells after U.V. light. *Mutat. Res.* 45, 253-261
- Dhar, R., Ellis, R., Shih, T. Y., Droszlan, S., y Shapiro, B. (1982) Nucleotide sequences of the p21 transforming protein of Harvey murine sarcoma virus. *Science* 219, 934-937.
- Doll, R., Morgan, L. y Speizer, F. (1970). Cancers of the lung and nasal sinuses of nickel workers, *Brit. J. Cancer*, 24, 623-632.
- Donskikh, E. y Mukumov, M. R. (1974) Action of manganese ions on the automatic activity of myocardial fibers induced by nickel ions. *Bull. Exp. Biol. Med. USSR*. 78, 971-974.
- Doolittle, R. F., Hunkapiller, M. W. y Hood, L. E. (1983) Simian sarcoma virus oncogene, v-sis is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science* 221, 275-276.
- Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E. y Stace, G. (1984) Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erbB oncogene protein sequence. *Nature* 307, 521-527.

- Dutrillaux, B. (1976) Modele theorique des exchanges de chromatid etabli apres analyse des endoreduplication. Ann. Genet. 19, 225-228.
- Eichhorn, G. L. (1973). Inorganic biochemistry. Ed. Eichhorn, G. C. Elsevier, Amsterdam, pp. 1210-1243.
- Elves, M. W., Wilson, J. N., Scales, J. T. y Kemp, H. B. (1975). Incidence of metal sensitivity in patients with total joint replacements. Brit. Med. J., 4, 376-378.
- Evans, H. J. (1977) Molecular mechanisms in the induction of chromosome aberrations. Progress in Genetic Toxicology 57-74.
- Evans, R. M., Davies, P. J. y Costa, M. (1981) Visualization of cellular uptake and dissolution of carcinogenic NiS particles by video intensification microscopy. Ann. Soc. Cell Biol. 91, 24053.
- Evans, R. M., Davies, P. J. y Costa, M. (1982) Video time-lapse microscopy of phagocytosis and intracellular fate of cristalline nickel sulfide particles in cultured mammalian cells. Cancer Res. 42, 2729-2785.
- Foulds, L. (1969) Neoplastic development, Vol. 1, Academic press, Nueva York.
- Fung, Y. K., Lewis, W. G., Kung, H., y Crittenden, L. B. (1983) Activation of the cellular oncogene c-erbB by LTR insertion molecular basis for induction of erythroblastosis by avian leukosis virus. Cell 33, 357-368.
- Graham, J. A., Gardner, D. E., Waters, M. D. y Coffin, D. L. (1975a) Effect of trace metals on phagocytosis by alveolar macrophages. Infect. Immun., 11, 1278-1283.
- Graham, J. A., Gardner, D. E., Waters, M. D. y Coffin, D. L. (1975b). Effect of nickel chloride on primary antibody production in the spleen. Environm. Health Perspect. 12, 109-113.
- Green, W. H., Muriel, W. J. y Bridges, B. A. (1976) Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens Mutat. Res. 38, 33-42.
- Groffen, J., Stephenson, J. R., Heisterkamp, N., de Klein, A. y Bartram, C. R. (1984) Philadelphia chromosomal break points are clustered within a limited region, bcr, on the chromosome 22. Cell 36, 93-99.
- Hand, R. (1978) Eucaryotic DNA: Organization of the genome replication. Cell 15, 317.

- Harald, J., Saxholm, K., Recth, A. y Brogger, A. (1981) Oncogenic transformation and cell lysis in C3H/101/2 cells and increased sister chromatid exchange in human lymphocytes by nickel subsulfide. *Cancer Res.* 41, 4136-4139.
- Hayward, W. S., Neil, B. G. y Astrin, S. (1981) Activation of a cellular oncogene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukaemia. *Nature* 209, 475-479.
- Heisterkamp, N., Stephenson, J. R., Groffen, J., Hansen, P. F. y de Klein, A. (1983) Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukemia. *Nature* 306, 239-242.
- Hildebrand, H. F. y Biserte, G. (1979a) Nickel subsulfide induced leiomyosarcomas in rabbit white skeletal muscle. *Cancer* 43, 1358-1360.
- Hildebrand, H. F. y Biserte, G. (1979b) Cylindrical laminated bodies in nickel-subsulfide induced rhabdomyosarcomas in rabbits. *Eur. J. Cell Biol.* 19, 276-279.
- Hoffman, D. J. (1977) Metal mutagens and carcinogens affect DNA synthesis rates in distinct manner. *Science* 198, 513-514
- Hogetvit, A. C. y Barton, R. T. (1976) Preventive health program for nickel workers. *J. Occup. Med.* 18, 805-808.
- Hsie, A., Johnson, N., Couch, B., O'Neil, P. y Forbes, N. (1979) Quantitative mammalian cell mutagenesis and a preliminary study of the mutagenic potential of metals. En: Trace metals in health and disease, Ed. Kharasch, N. Raven Press Nueva York, pp. 55-69.
- Hsu, T. C. y Pathak, S. (1976) Differential rates of sister chromatid exchanges between euchromatin and heterochromatin. *Chromosoma* 56, 269-273.
- Hui, G. y Sunderman, F. W. Jr. (1980) Effects of nickel compounds on incorporation of thymidine 3H into DNA in rat liver and kidney. *Carcinogenesis* 1, 297-298.
- ICPEMC (International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens) (1984) Report of the ICPEMC task group 5 on the differentiation between genotoxic and non-genotoxic carcinogens. *Mutat. Res.* 133, 1-49.
- International Agency for Research on Cancer (1976) Nickel and nickel compounds. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man, Vol. 11, Lyon, pp. 75-112.
- International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens (1984) Report of the ICPEMC task

group 5 on the differentiation between genotoxic and non-genotoxic carcinogens. *Mutat. Res.* 133, 1-49.

- 1470*
 — Jasmin, G., Bonneau, R., y Andre, J. (1979) Etude par goniometrie des inclusions cristallines mitochondriales induites par le subsulfure de nickel chez le rat. *Biol Cellulaire* 35, 81.
- Jasmin, G. y Riopelle, J. L. (1976) Renal carcinomas and erythrocytosis in rats following intrarenal injection of nickel subsulfide. *Lab. Invest.* 35, 71-74.
- Jasmin, G. y Solymoss, B. (1978) The topical effects of nickel subsulfide on renal parenchyma. En: Inorganic and nutritional aspects of cancer, Ed. Schrauzer, G. N., Plenum Press, Nueva York, pp. 69-83.
- Joo, F. (1968) Effect of inhibition of adenosine triphosphatase activity on the fine structural organization of the brain capillaries. *Nature*, 219, 1378-1379.
- Kato, H. (1973) Induction of sister chromatid exchanges by UV light and its inhibition by caffeine. *Exp. Cell Res.* 82, 382-390.
- Kato, H. (1974) Induction of SCE by chemical mutagens and its possible relevance to DNA repair. *Exp. Cell Res.* 85, 239-249.
- Kilhman, B. A. (1975) Sister chromatid exchanges in *Vicia faba* II. Effects of tiotepa, caffeine and 8-ethoxycaffeine in the frequency of SCE. *Chromosoma* 51, 11-18.
- Kilhman, B. A. y Sturelid, S. (1978) Effect of caffeine on the frequencies of chromosomal aberrations and SCE induced by chemical mutagens. *Hereditas* 88, 35-41.
- Kirchgessner, M. y Schnegg, A. (1977) Malate deshydrogenase and glucose-6-phosphate activity in livers of nickel deficient rats. *Bioinorg. Chem.* 18, 343-348.
- Klein, G. (1983) Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell derived tumors in mice and men. *Cell* 32, 311-315.
- Kolbye, A. C. (1980) Impact of short-term test on regulatory action. En: The predictive value of short term screening test in carcinogenicity evaluation. Ed. Williams, G. M., Kroes, R., Wuayens, H. W., y Van de Poll, K. W., Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 311-326.
- Kroes, R. (1979) Animal datas interpretation and consequences, En: Environmental carcinogenesis, Ed. Emmelot, P. y Kriek, E., Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 287-302.

- Lambert, B., Hanson, K., Lindsten, J., Stern, M. y Werelius, B. (1976) Bromodesoxyuridine induced sister chromatid exchange in human lymphocytes. *Hereditas* 83, 163-174.
- Latt, S. A. (1974a) Detection of DNA synthesis in interphase nuclei by fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* 62, 546-550.
- Latt, S. A. (1974b) Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin-C. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 71, 3162-3166.
- Latt, S. A., Shriceck, R. R., Loveday, H. S., Dougherty, Ch. P. y Shuler, Ch. F. (1980) Progress in human genetics, Symposium, Nueva York, pp. 267-331.
- Latt, S. A., Allen, J., Bloom, S. E., Carrano, A., Falke, C. Kram, D., Schneider, E., Schrech, R., Tice, R., Whilfield, B. y Wolff, S. (1981) Sister chromatid exchanges: a report of the genetox program. *Mutat Res.* 87, 17-62.
- Lee, J. E., Ciccarelli, R. B. y Wetterhahn, J. K. (1982) Solubilization of the carcinogen nickel subsulfide and its interaction with deoxiribonucleic acid and proteins. *Biochem.* 21, 771-778.
- Lewis, W. R., Dattner, A. M. y Tanner, D. J. (1980) Immunogenetic principles apply to clinical contact sensitivity: Autologous factors are required for in vitro lymphocyte activation to nickel. *J. Invest. Dermatol.* 74, 254.
- Liu, L. F., Lui, C. C. y Alberts, B. M. (1980) Type II DNA polimerases: enzymes that can unknot a topologically knotted DNA. *Cell* 19, 697-699.
- Magee, P. N., Pegg, A. E. y Swann, P. F. (1975) Molecular mechanism of chemical carcinogenesis. En: Handbuch der allgemeinen pathologie, Ed., Altmann, H. W., Buchner, F., Cottier, H., Grundmann, E., Holle, G., Letterer, E. y Siebert, G., Springer, Berlin, pp. 329-419.
- Maines, M. D. y Kappas, A. (1977) Nickel mediated alterations in the activity of hepatic and renal enzymes of heme metabolism and heme dependent cellular activities. En: Clinical Chemistry and Chemical Toxicology, Ed. Brown, S. S., Elsevier, Nueva York, pp. 75-81.
- Martel, A. E. (1981) Chemistry of carcinogenic metals. *Environ. Health Perspect.* 40, 207-226.
- Mastromateo, E. (1967) Nickel: A review of its occupational health aspects. *J. Occup. Med.* 9, 127-136.
- Mc. Clintock, B. (1938) The production of homozygous deficient

tissues with mutant characteristics by means of aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes. *Genetics* 23, 315-376.

- Merck Index (1976) 9th edition. Merck & Co. Inc. USA.
- Miller, E. C. y Miller, J. A. (1976) The metabolism of chemical carcinogens to reactive electrophiles and their possible mechanisms of action in carcinogenesis. En: Chemical Carcinogenesis, Ed. Searle, C. E. ACS Monograph No 173, pp. 737-762
- Miyaki, M., Akamatsu, N., Ono, T. y Koyama, H. (1979) Mutagenicity of metal cations in cultured cells from chinese hamster. *Mutat. Res.* 68, 259-263.
- (NIOSH) National Institute for Occupational Safety and Health (1977) Criteria for recommended standard: Occupational exposure for inorganic nickel. DHEW/NIOSH Pu. No. 77-164, U.S. Gov. Printing Office, Washington, D. C., pp. 1-282.
- National Research Council (Committee on medical and biological effects of environmental pollutants). (1975) Nickel. *Nat. Acad. Scie.* Washington D. C., pp. 144-188.
- Newman, Sh., Summitt, R. L. y Nunez, L. J. (1982) Incidence of nickel induced sister chromatid exchange. *Mutat. Res.* 101, 67-75.
- Nishimura, M. y Umeda, M. (1979) Induction of chromosomal aberrations in cultured mammalian cells by nickel compounds. *Mutat. Res.* 104, 141-145.
- Ohno, H., Hanaoka, F. y Yamada, M. (1982) Inductibility of sister chromatid exchanges by heavy metal ions. *Mutat. Res.* 104, 141-145.
- Painter, R. (1980) A replication model for sister chromatid exchange. *Mutat. Res.* 70, 337-341.
- Painter, R. (1982) Replication model for sister chromatid exchange. En: Sister chromatid exchange. Ed. Alan, R., Liss Inc. Nueva York, 115-121 pp.
- Payne, W. W. (1964) Carcinogenicity of nickel compounds in experimental animals. *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* 5, 50-65.
- Payne, W. W. (1965) Retention and excretion of nickel compounds in rats and relation to carcinogenicity. Presentado en la reunion de: American Industrial Hygiene Assoc. Houston, Texas, Mayo 6, 1975.
- Payne, G. S., Bishop, J. M. y Varmus, H. (1982) Multiple arrangements of viral DNA and activated host oncogene (c-myc) in bursal lymphomas. *Nature* 295, 209-217.

- ✓ Pedersen, E., Hogetveit, A. C. y Andersen, A. (1973) Cancer of respiratory organs among workers at a nickel refinery in Norway. *Inst. J. Cancer* 12, 32-41.
- Perry, P. y Evans, H. J. (1975) Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by SCE. *Nature* 258, 121-124.
- Peters, T. Jr. (1977) Serum albumin: recent progress in the understanding of its structure and biosynthesis. *Clin. Chem.* 23, 5-12.
- Peters, T. Jr. y Blumenstock, F. A. (1967) Copper binding properties of bovine serum albumin and its amino-terminal peptide fragment. *J. Biol. Chem.* 242, 1574-1578.
- Pincus, M. R., Van Reswoude, J., Harford, J. B., Chang, E. H., Carty, R. P., Klausner, R. D. (1983) Prediction of the three dimensional structure of the transforming region of the EJ/T 24 human bladder oncogene product and its normal cellular homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 80, 5253-5257.
- Piscator, M. (1976) Health hazards from inhalation of metal fumes *Environm. Res.* 11, 268-270.
- ← Rasheed, S., Norman, G. L. y Heidecker, G. (1983) Nucleotide sequence of the Rasheed rat sarcoma virus oncogene: New mutations. *Science* 221, 155-157.
- Robinson, S. H. y Costa, M. (1982) The induction of DNA strand breakage by nickel compounds in cultured chinese hamster ovary cells. *Cancer Lett.* 15, 35-40.
- Rossman, T. G. (1981) Effect of metals on mutagenesis and DNA repair. *Environm. Health Perspect.* 40, 189-193.
- Rowley, J. D. (1980) Chromosome abnormalities in human leukemia. *Ann. Rev. Genet.* 14, 17-39.
- Rowley, J. D. (1982) Identification of the constant chromosome regions involved in human hematologic malignant disease. *Science* 216, 749-751.
- Rowley, J. D. (1983) Human oncogene locations and chromosome aberrations. *Nature* 301, 290-291.
- Samitz, M. H. y Katz, S. A. (1976) Nickel epidermal interactions: Diffusion and binding. *Environm. Res.* 11, 34-39.
- Santos, E., Martin-Anca, D., Reddy, E. P., Pierotti, M. A., Della Porta, G. y Barbacid, M. (1984) Malignant activation of K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient. *Science* 223, 661-664.

Santos, E., Reddy, E. P., Piluani, S., Feldman, R. J. y Barbaud, M. (1983) Spontaneous activation of a human protooncogene. Proc Natl. Acad. Sci. (USA) 80, 4679-4683.

Saknyn, A. V. y Blokhin, V. A. (1978) Development of malignant tumors in rats exposed to nickel containing aerosols. Vopr. Onkol. 24, 44-46.

→ Saknyn, A. V. y Shabynina, N. K. (1970) Some statistical data on carcinogenous hazards for workers engaged in the production of nickel from oxidized ores. Liq. Iryd. Prof. Zabol. 14, 10-13.

Schnegg, A. y Kirchgessner, M. (1975) Essentiality of nickel for the growth of animals. Z. Tierphysiol. Tierneh. Intermittel. Futlerrnitherkonde 36, 63-74.

Schwarz, K. (1977) essentiality versus toxicity of metals. En: Clinical chemistry and chemical toxicology of metals. Ed. Brown, S. S. Elsevier, Nueva York, pp. 3-26.

— Shimkin, M. B., Stoner, G. D. y Theiss, J. C. (1978) Lung tumor response in mice to metals and metals salts. En: Inorganic and nutritional aspects of cancer, Ed. Schrauzer, Plenum Press, Nueva York, pp. 85-91.

— Sirover, M. A. y Loeb, L. A. (1976) Infidelity of DNA synthesis in vitro screening for potential metal mutagens or carcinogens. Science. (Wash.) 194, 1434-1436.

Sissoeff, T., Grisvar, J. y Guille, E. (1976) Studies on metal ions-DNA interactions: specific behavior of reiterative DNA sequences. Proc. Biophys. Mol. Biol. 31, 165-199.

Slaga, T. J., Fisher, S. M., Nelson, K. y Gleason, G. L. (1980) Studies on the mechanisms of skin promotion, several stages in promotion. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77, 3659-3663.

Smith, R. L. (1980) Ecology and field biology. 3era ed. Harper & Row, Publishers, Nueva York pp. 701-702.

Soestbergen, M. Van y sunderman, F. W. Jr. (1972) 63Ni Complexes in rabbit serum and urine after injection of 63NiCl_2 . Cli. Chem. 18, 1478-1484.

Sosinski, E. (1975) Morphological changes in rat brain and skeletal muscle in the region of nickel oxide implantation. Neuropathol. Pol. 13, 479-482.

Squibb, K. S. y Fowler, B. A. (1981) Relationship between metal toxicity to subcellular systems and the carcinogenic response. Environm. Health Perspect. 40, 181-188.

- Stokinger, H. E. (1981) The metals. En: Pattys Industrial hygiene and toxicology. 3th edit. John Willey & Sons. Nueva York. pp. 1820-1841.
- Stoner, G. D., Shimkin, M. B., Troxell, M. C., Thompson, T. L. y Terry, L. S. (1976) Test for carcinogenicity of metallic compounds by the pulmonary tumor response in strain A mice. *Cancer Res.* 36, 1744-1748.
- Sukumar, S., Notario, V., Martin-Zanca, D. y Barbaud, M. (1983) Induction of mammary carcinomas in rats by nitroso-methyl urea involves malignant activation of H-ras locus by single point mutations. *Nature*, 306, 658-661.
- Sundaralingan, V. S. M. (1979) The crystal structure of metal complexes of nucleic acids and their constituents. *Crit. Rev Biochem.* 6, 245.
- Sunderman, F. W. Jr. (1973) The current status of nickel carcinogenesis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 3, 156-180.
- Sunderman, F. W. Jr. (1976) A review of the carcinogenicities of nickel, chromium and arsenic compounds in man and animals. *Preventive Med.* 5, 279-294.
- Sunderman, F. W. Jr. (1977) The metabolism and toxicology of nickel. En: Clinical chemistry and chemical toxicology of metals. Ed. Brown, S. S. Elsevier, Nueva York. pp. 231-259.
- Sunderman, F. W. Jr. (1979) Carcinogenicity and anticarcinogenicity of metal compounds. En: environmental carcinogenesis, Ed. Emmelot, P. y Kriek, E. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 165-192.
- Sunderman, F. W. Jr. (1981) Recent research on nickel carcinogenesis. *Environm. Health Perspect.* 46, 131-141.
- Sunderman, F. W. Jr. y Maenza, R. M. (1976) Comparisons of carcinogenicities of nickel compounds in rats. *Res. Communic Chem. Pathol. Pharmacol.* 14, 319-330.
- Sunderman, F. W. Jr., Lau, T. J. y Cralley, L. J. (1974) Inhibitory effect of manganese upon muscle tumorigenesis by nickel subsulfide. *Cancer Res.* 34, 92-95.
- Sunderman, F. W. Jr., Taubman, S. B., y Allpass, P. R. (1979a) Comparisons of the carcinogenicities of nickel compounds following intramuscular administration. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 9, 441-452.
- Sunderman, F. W. Jr., Maenza, R. M., Allpass, P. R., Mitchell, J. M., Damjanov, I., y Goldblatt, P. J. (1978) Carcinogenicity of nickel subsulfide in Fisher rats and Syrian hamsters after administration by various routes. En: Inorganic and

Nutritional Aspects of Cancer, Ed. Schrauzer, G. N. Plenum Press, Nueva York, pp. 57-67.

- Sunderman, F. W. Jr., Maenza, R. M., Hopfer, S. M., Mitchell, J. M., Allpass, P. R. y Damajanov, I. (1979) Induction of renal cancers in rats by intrarenal injection of nickel subsulfide. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 2, 1511-1517.
- Sunderman, F. W. Jr., Kasprzak, K. S., Lau, T. J., Minghetti, P. P., Maenza, R. M., Becker, N., Ohkelin, X. C., y Golblatt, P. (1976) Effects of manganese on carcinogenicity and metabolism of nickel subsulfide. *Cancer Res.* 36, 1790-1800.
- Sutherland, R. B. (1959) Summary report on respiratory cancer mortality at the INCO Port Colborne refinery. Dept. of Health, Toronto, Ontario, pp.153.
- Swierenga, A. K. y Basrur, P. K. (1968) Effect of nickel on cultured rat embryo muscle cells. *Lab. Invest.* 19, 663-674.
- Swierenga, S. H. (1970) The role of nickel in the induction of muscle tumors, Tesis doctoral, Univ. de Guelph, Ontario Canada, pp. 1-61.
- Tabin, C. I., Bradley, S. M., Barqmann, C. I., Weinberg, R. A., y Papageorge, A. G. (1982) Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300, 143-149.
- Takehisa, Sh. (1982) Induction of sister chromatid exchange by chemical agents. En. Sister chromatid exchange. Ed. Wolff, S Wiley, Nueva York, pp. 87-148.
- Taparowsky, E., Shimizu, K., Goldfarb, M. y Wigler, M. (1983) Structure and activation of the human N-ras gene. *Cell* 34, 581-586.
- Taylor, J. H., Woods, P. S. y Hughes, W. L. (1957) The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium labelled chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 43, 122-129.
- Tourraine, R. y Rambaund, G. (1968) Les cancers bronchique primitifs a localisation double unilaterale. *J. Franc. Med. Chirurg. Thorac.* 22, 757-767.
- Tsuchiya, K. (1965) The relation of occupation to cancer, especially cancer of the lung. *Cancer* 18, 136-144.
- Tuxeira, M., Moura, i., Xavier, A. V., Dervantanian, D. V., Legal J., Peck, H., Huynh, B. H. y Moura, J. J. G. (1983) Desulfovibrio gas hydrogenase: Redox properties of the nickel and crom-sulfur centers. *Eur. J. Biochem.* 130, 481-484.

- Umeda, M. y Nishimura, M. (1979) Inductibility of chromosomal aberrations by metal compounds in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.* 67, 221-229.
- Upton, A. C. (1982) Principles of cancer biology: etiology and prevention of cancer. En: Principles and Practice of Oncology, Ed: De Vita, V. T., Hellman, S. y Rosenberg, S. A. Lippincott, Philadelphia, PA, pp. 33-58.
- Varmus, H. E. (1982) Recent evidence for oncogenesis by insertion mutagenesis and gene activation. *Cancer Surv.* 2, 301-319.
- Varmus, H. E. (1984) The molecular genetics of cellular oncogenes. *Ann. Rev. Genet.* 18, 553-612.
- Waksvik, H. y Boysen, M. (1982). Cytogenetic analyses of lymphocytes from workers in a nickel refinery. *Mutat. Res.* 103, 185-190.
- Waterfield, M. D., Scrace, G. J., White, N., Stoobant, P., Johnson, A. (1983) Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28 sis of simian sarcoma virus. *Nature* 304, 35-39.
- Waters, M. D., Gardner, D. E., Arandi, C. y Coffin, D. L. (1975) Metal toxicity for rabbit alveolar macrophages in vitro. *Environm. Res.* 9, 32-47.
- Webb, M. (1977) Metabolic targets of metals toxicity. En: Clinical chemistry and chemical toxicology of metals. Ed. Brown, S. S. Elsevier, Nueva York, pp. 51-64.
- Webb, M. y Weinzierl, S. M. (1972) Uptake of $^{63}\text{Ni}^{2-}$ from its complexes with proteins and other ligands by mouse dermal fibroblasts in vitro. *Brit. J. Cancer* 26, 292-298.
- Weisburger, J. H. y Williams, G. M. (1980) Chemical carcinogens. En: Toxicology, the basic science of poisons, 2th ed. Ed. Doull, J., Klassen, C. D. y Amdur, M. O. Macmillan, Nueva York, pp.84-138.
- Wierenga, R. K. y Hal, W. G. J. (1983) Predicted nucleotide-binding properties of p21 protein and its cancer associated variants. *Nature* 302, 842-844.
- Wolff, S. (1977) Chromosome effects induced by low levels of mutagens. Research in photobiology. Plenum, Nueva York, pp. 721-732.
- Wolff, S. (1982) Chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, and lesions that produce them. En: Sister chromatid exchanges, John Wiley Nueva York, pp. 41-58.
- Wolff, S., Bodycote, J. y Painter, R. (1974) sister chromatid

exchanges induced in chinese hamster cells by UV irradiation at different stages of the cell cycle: the necessity of cells to pass through S. Mutat. Res. 25, 73-81.

Wuelf, C. H. (1980) Sister chromatid exchanges in human lymphocytes exposed to nickel and lead. Dan. Med. Bull. 27, 40-42.

Yamashiro, S., Gilman, J. P., Basrur, P. K. y Abandowitz, H. M. (1978) Growth and cytogenetic characteristics of nickel sub sulfide induced rhabdomyosarcomas in rats. Acta Pathol. Japan 28, 435-439.

Yarita, T. y Nettesheim, P. (1978) Carcinogenicity of nickel sub sulfide for respiratory tract mucosa. Cancer Res. 38, 3140-3149.

Yukimasa, S. (1977) Some critical studies on the sister chromatid exchanges in human lymphocytes. Proc. Japan Acad. 53, 272-275.

Yunis, J. J. (1983) The chromosomal basis of human neoplasia. Science 221, 227-235.

Tabla 1

INDUCCION DE CANCER EN ANIMALES EXPERIMENTALES POR DIVERSOS COMPUESTOS DE NIQUEL

vía de administración	organismo	compuesto	tiempo exp.	dosis máx.	tiempo latencia	tipo de cáncer	carcino génesis (%)	autores
inhalación	ratas albinas	polvo indust. (NiS, NiO, Ni)	6 meses	70 mg/m ³	17 meses	carcinoma escamoso pulmonar	40	Saknyn y Blohkin, 1978
	" "	NiO	1 dosis	40 mg/rata	17 meses	"	3.85	Saknyn y Blohkin, 1978
	" "	Ni+metilcloruro	1 dosis	10 mg/rata	12 semanas	"	60	Mubuko, 1978
intratraqueal	ratas fisher	Ni ₃ S ₂	1 dosis	3 mg/rata	20 meses	fibrosarcomas fibromiosarcomas	70	Varita y Netteshum, 1978
oral	hamster sirio	Ni ₃ S ₂	18 semanas	10 mg/rata	24 meses	_____	0	Sunderman et al., 1978
intra muscular	ratas fisher	Ni ₃ S ₂	1 dosis	14 mg/rata	100 semanas	sarcomas	100	Sunderman et al., 1979
	" "	Ni	"	"	"	"	65	" " "
	" "	Ni ₃ Se	"	"	"	"	91	" " "
	" "	NiSe	"	"	"	"	50	" " "
	" "	NiScrist.	"	"	"	"	95	" " "
	" "	NiSamorf.	"	"	"	"	0	" " "
	" "	Ni ₃ S ₂	"	1.2 mg/rata	"	"	90	Sunderman et al., 1976
" "	Ni ₃ S ₂ +Mn	"	+1 mg/rata Mn	"	"	7	" " "	
intra peritoneal	ratón A	NiCH ₂ COOH	8 semanas	360 mg/kg	30 semanas	tumor pulmonar	30	Stoner et al., 1976, Shimkin et al., 1978
intra renal	ratas Sprague -	Ni ₃ S ₂	1 dosis	10 mg/rata	12 meses	carcinoma renal	55	Jasmin et al., 1976
	Dawley ratas fisher	Ni ₃ S ₂	1 dosis	10 mg/rata	2 años	carcinoma renal	60	Sunderman et al., 1979
intra testicular	" "	Ni ₃ S ₂	1 dosis	10 mg/rata	20 meses	fibrosarcoma	84	Damjanov et al., 1978
intra ocular	" "	Ni ₃ S ₂	1 dosis	0.5 mg/rata	8 meses	neoplasia ocular	93	Albert et al., 1980
intra cerebral	ratas Wistar	Ni ₂ O ₃	1 dosis	3 mg/rata	21 meses	glioma	10	

Tabla 2

EFFECTO TOXICO DE LOS COMPUESTOS DE NIQUEL

COMPUESTO	SISTEMA DE PRUEBA														
	procariontes				eucariontes										
	<u>E. coli</u>	bacteriό fago T ₄	rompimiento 1 hebra	incorporaci3n T3H <u>in vivo</u> <u>in vitro</u>	reparaci3n ADN	uni3n ADN	mutantes resistentes			aberraciones cromos3micas y alteraciones mit3ticas			ICH		
						AG	TFT	TG	CMR	CER	VF	CC	LH		
Ni(CO) ₄				+											+
Ni Cl ₂	-		+	+	+		+	+	+	+	+	+	+		
Ni ₃ S ₂										+	+				+
NiS cristal amorfo			+							+					+
NiCH ₂ COOH										+					
NiSO ₄	-	-	-							+	+	+			+
Ni (NO ₃) ₂											+				
Ni									+						

- abreviaturas
 AG azaguanina
 TFT trifluorotimina
 TG tioguanina
 CMR carcinoma mmario rat3n
 CER c3lulas embrionarias rata
 VF Vicia faba
 ICH intercambio de crom3tidas hermanas
 CC criceto chino
 LH linfocitos humanos
 * en presencia de benzo a pireno

Tabla 3

INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR SULFATO DE NIQUEL (NiSO_4) EN
 LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	ICH ^a $\bar{X}^b \pm \text{E.E.}$	prueba de "t"	distribución ^c de Poisson
0	6.12 \pm 0.36	-	0.18 N.S.
12.5	6.00 \pm 0.41	1.63 N.S.	1.85 N.S.
20	8.76 \pm 0.37	6.57 *	1.85 N.S.
25	9.16 \pm 0.28	6.31 *	2.90 N.S.
250	11.41 \pm 0.26	16.22 *	3.71 *
500	MUERTE CELULAR		

a) frecuencia por metafase

b) promedio de 50 metafases en dos experimentos con un mismo donador

c) analizada por medio de la prueba de "t de student" donde $t = (s^2/\bar{X})^{-1/\sqrt{2/(n-1)}}$ (Smith, 1980)

siendo en este caso un valor significativo igual a una distribución de tipo agregado

N.S. no significativo

* $p < 0.001$

Tabla 4

INTERCAMBIOS DE CRÓMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR ACETATO DE NIQUEL ($\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) EN
 LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO

Concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ICH ^a $\bar{X}^b \pm \text{E.E.}$	prueba de "t"	distribución ^c de Poisson
0	4.37 \pm 0.21	-	2.35 N.S.
1.25	11.08 \pm 0.39	11.18*	1.46 N.S.
2.50	10.70 \pm 0.33	11.72*	2.42 N.S.
6.20	5.58 \pm 0.21	2.88 N.S.	2.95 N.S.
12.50	MUERTE CELULAR		

a) frecuencia por metafase

b) promedio de 50 metafases en dos experimentos con un mismo donador

c) analizada por medio de la prueba de "t de student" donde $t = (s^2/\bar{X}) - 1/\sqrt{2/(n-1)}$ (Smith, 1980), siendo en este caso un valor significativo igual a una distribución de tipo agregado.

N.S. no significativo

* $p < 0.001$

Tabla 5

INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR SUBSULFURO DE NIQUEL (Ni_3S_2) EN
 LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	ICH ^a $\bar{X}^b \pm \text{E.E}$	prueba de "t"	distribución ^c de Poisson
0	6.32 \pm 0.33	-	0.78 N.S.
25	5.90 \pm 0.21	0.77 N.S.	3.16 N.S.
50	10.34 \pm 0.35	5.19*	2.09 N.S.
75	12.52 \pm 0.22	11.27*	4.05 *
100	11.40 \pm 0.33	7.69*	2.66 N.S.
125	8.34 \pm 0.30	3.20 N.S.	2.35 N.S.
150	MUERTE CELULAR		

a) frecuencia por metafase

b) promedio de 50 metafases en dos experimentos con un mismo donador

c) analizada por medio de la prueba de "t de student" donde $t = (s^2/\bar{X}) - 1/\sqrt{2/(n-1)}$ (Smith, 1980)

siendo en este caso un valor significativo igual a una distribución de tipo agregado

N.S. no significativo

* $p < 0.001$

Tabla 6

INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS OBTENIDOS DE LOS TRATAMIENTOS CON SUBSULFURO DE NIQUEL MAS MANGANESO, SUBSULFURO DE NIQUEL Y MANGANESO EN LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Ni_3S_2	$\text{Ni}_3\text{S}_2+\text{Mn}$	Mn
	ICH ^a $\bar{X}^b \pm \text{E.E}$	ICH ^a $\bar{X}^b \pm \text{E.E}$	ICH ^a $\bar{X}^b \pm \text{E.E}$
0	6.32 \pm 0.33	4.72 \pm 0.32	4.60 \pm 0.28
25	5.90 \pm 0.21	4.74 \pm 0.23	4.72 \pm 0.16
50	10.34 \pm 0.35	4.39 \pm 0.21	4.32 \pm 0.18
75	12.52 \pm 0.22	4.32 \pm 0.36	4.54 \pm 0.25
100	11.40 \pm 0.33	4.12 \pm 0.22	4.66 \pm 0.17
125	8.34 \pm 0.30	5.40 \pm 0.28	4.66 \pm 0.32

a) frecuencia por metafase

b) promedio de 50 metafases en dos experimentos con un mismo donador

Tabla 7

ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA PARA LA INDUCCION DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS

POR Ni_3S_2 , Ni_3S_2+Mn y Mn

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F
TRATAMIENTOS	2	83	41.5	56.08*
ERROR	51	38.15	0.78	
TOTAL	53	121.15	2.28	

Tabla 8

INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR SULFURO DE NIQUEL (NiS) EN
 LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO

Concentración (ug/ml)	ICH ^a $\frac{b}{\bar{X}}$ + E.E	prueba de "t"	distribución ^c de Poisson
0	6.34 ₊ 0.66	-	11.71**
25	6.58 ₊ 0.64	0.18 N.S.	10.25**
50	8.00 ₊ 0.53	1.39 *	3.60**
65	MUERTE CELULAR		

a) frecuencia por metafase

b) promedio de 50 metafases en dos experimentos con un mismo donador

c) analizada por medio de la prueba de "t de student" donde $t = (s^2/\bar{X}) - 1/2 / (n-1)$ (Smith, 1980)
 siendo en este caso un valor significativo igual a la distribución de tipo agregado

N.S. no significativo

* $p < 0,02$

** $p < 0.001$

Tabla 9

PARAMETROS OBTENIDOS A PARTIR DEL MODELO PARA DIVERSOS COMPUESTOS DE NIQUEL

Compuesto	ecuación ajustada ^a por regresión (datos normalizados)	ICH basal ^b		M1 ^c	T ^c	F1+F2 ^d	ICH máxima		Concentración		Solubilidad ^e log ₁₀ (gr/lt)
		real	ajustado				real	ajus* tada	real	ajus* tada	
NiSO ₄	$y=0.067+0.0013x+0.00001x^2$	6.12	6.70	0.07	1.57	4.22	11.41	10.92	100	162	2.6
NiCH ₂ COOH	$y=0.043+0.0202x+0.0071x^2$	4.37	4.35	1.01	8.04	4.35	11.08	8.70	1.25	1.42	2.2
Ni ₃ S ₂	$y=0.046+0.0471x+0.0087x^2$	6.32	4.60	2.36	6.05	6.38	12.52	10.98	75	67.5	-6
NiS crist.	$y=0.058+0.046x+0.0212x^2$	6.34	5.80	2.30	11.51	2.47	8.00	8.27	50	27.0	-5

a) por regresión polinomial a partir de los promedios de 50 metafases por concentración, ecuación del tipo $y=a+bx+cx^2$.

b) equivalente a la ordenada en el origen (a) en la ecuación y a la frecuencia en el testigo en los datos reales

c) valores obtenidos a partir de la ecuación, donde $M1=b/2$ y representa la tasa de inducción de ICH en el 1er ciclo/concentración y $T=2c/b$ donde T es la toxicidad total durante los dos ciclos de replicación

d) $F1+F2=ICH_{maxima}$ después de los dos ciclos de replicación menos el testigo (obtenida a partir de ICH ajustada)

* obtenida de la derivada $dy/dx=0$

e) (Merck, 1976)

Tabla 10

CUALIDADES DE LOS DIVERSOS COMPUESTOS DE NIQUEL ESTUDIADOS

Compuesto	Grado de solubilidad	Inducción ^a de ICH	M1 ^b	F1+F2	T(tot) ^b	Carcinogenesis ^c grado	frec. ^d	Iones en solución	Via de penetración a la célula
NiSO ₄	alto	signific.	bajo	medio	muy bajo	ninguno	0	Ni ⁺² , SO ₄ ⁻²	Los iones en solución penetran a la célula por transporte activo o unidos a ligandos ultrafiltrables del suero
NiCH ₂ COOH	medio	signific.	medio	alto	alto	baja	0.3	Ni ⁺² , CH ₂ COOH ⁻²	
Ni ₃ S ₂	muy bajo	signific.	alto	muy alto	medio	muy alta	1	Ni ⁺² , S ⁻³	Por fagocitosis de las partículas cristalinas y penetración de los iones disueltos en el suero unidos a ligandos ultrafiltrables.
NiS	bajo	marginal	alto	bajo	muy alto	alta	0.95	Ni ⁺² , S ⁻²	

a) Significativamente diferente al testigo p 0.001 en prueba de "t de student"

b) Obtenidos de las ecuaciones ajustadas para cada compuesto

c) en rata fisher por inyección intramuscular de 14mg/rata durante 100 semanas (una dosis) Sunderman et al., 1979

d) frecuencia s obtenida a partir de la carcinogenesis en el experimento de Sunderman et al., 1979

Figura 1

INDUCCION DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS POR DIVERSOS COMPUESTOS DE NIQUEL

- NiSO₄
- Ni(CH₃COO)₂
- ▲ NiS
- ▲ Ni₃S₂

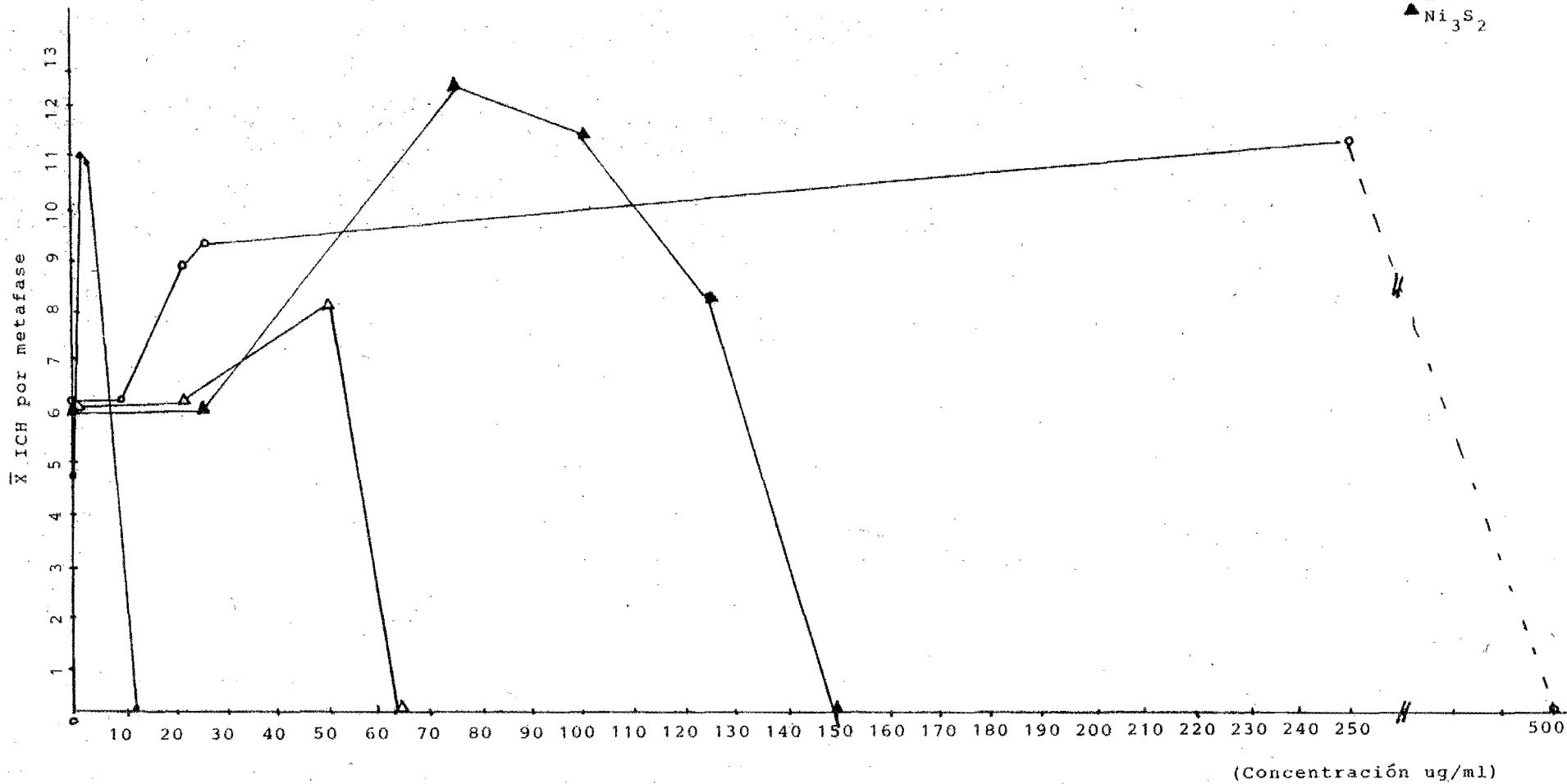
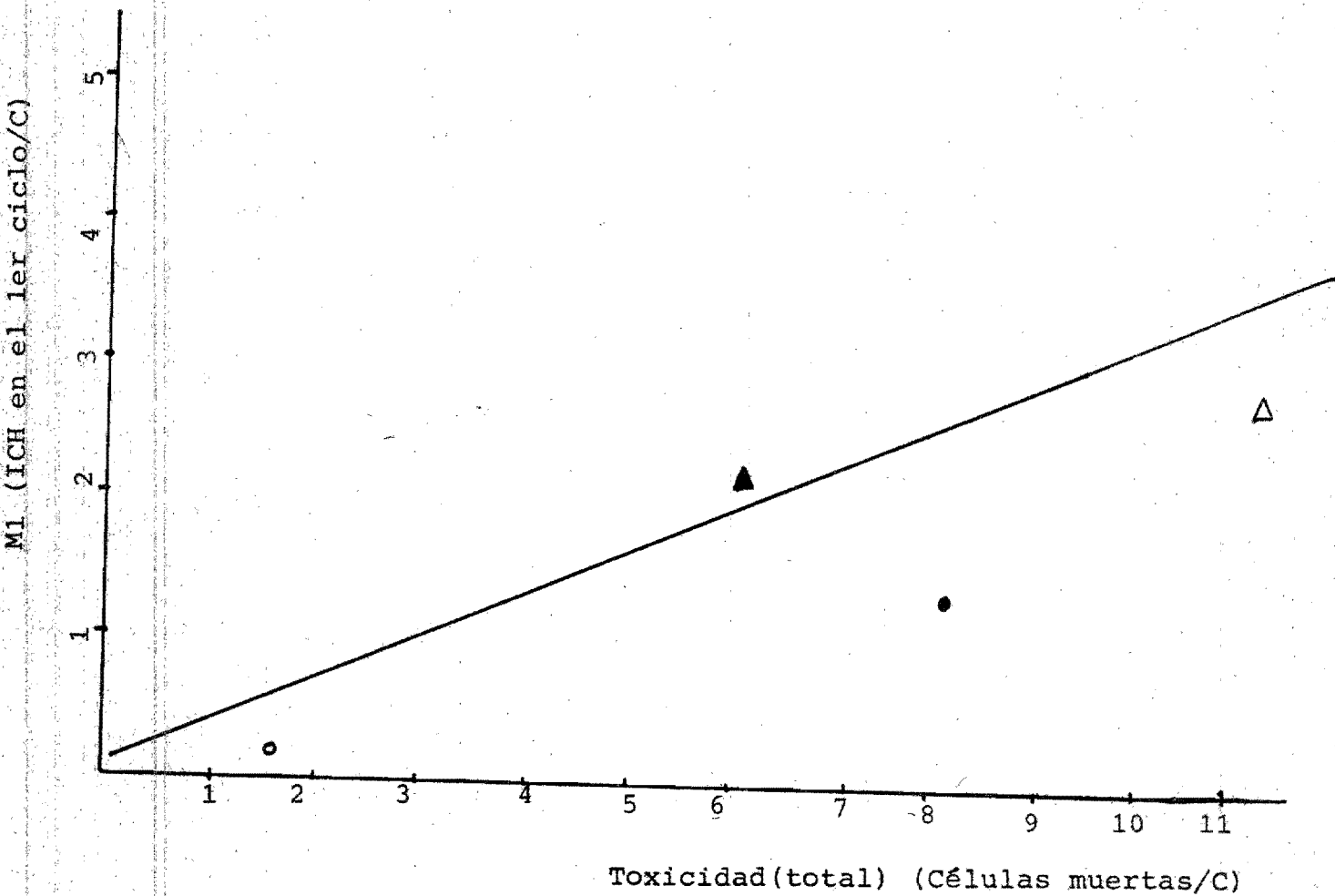


Figura 2

TASA DE ICH/C EN EL PRIMER CICLO (M1) CONTRA TOXICIDAD TOTAL
PARA LOS DIVERSOS COMPUESTOS DE NIQUEL



- NiSO₄
- Ni(CH₃COO)₂
- △ NiS
- ▲ Ni₃S₂

Figura 3

ICH MAXIMO DESPUES DE DOS CICLOS DE REPLICACION (-TESTIGO)
CONTRA TOXICIDAD TOTAL POR LOS DIVERSOS COMPUESTOS DE NIQUEL

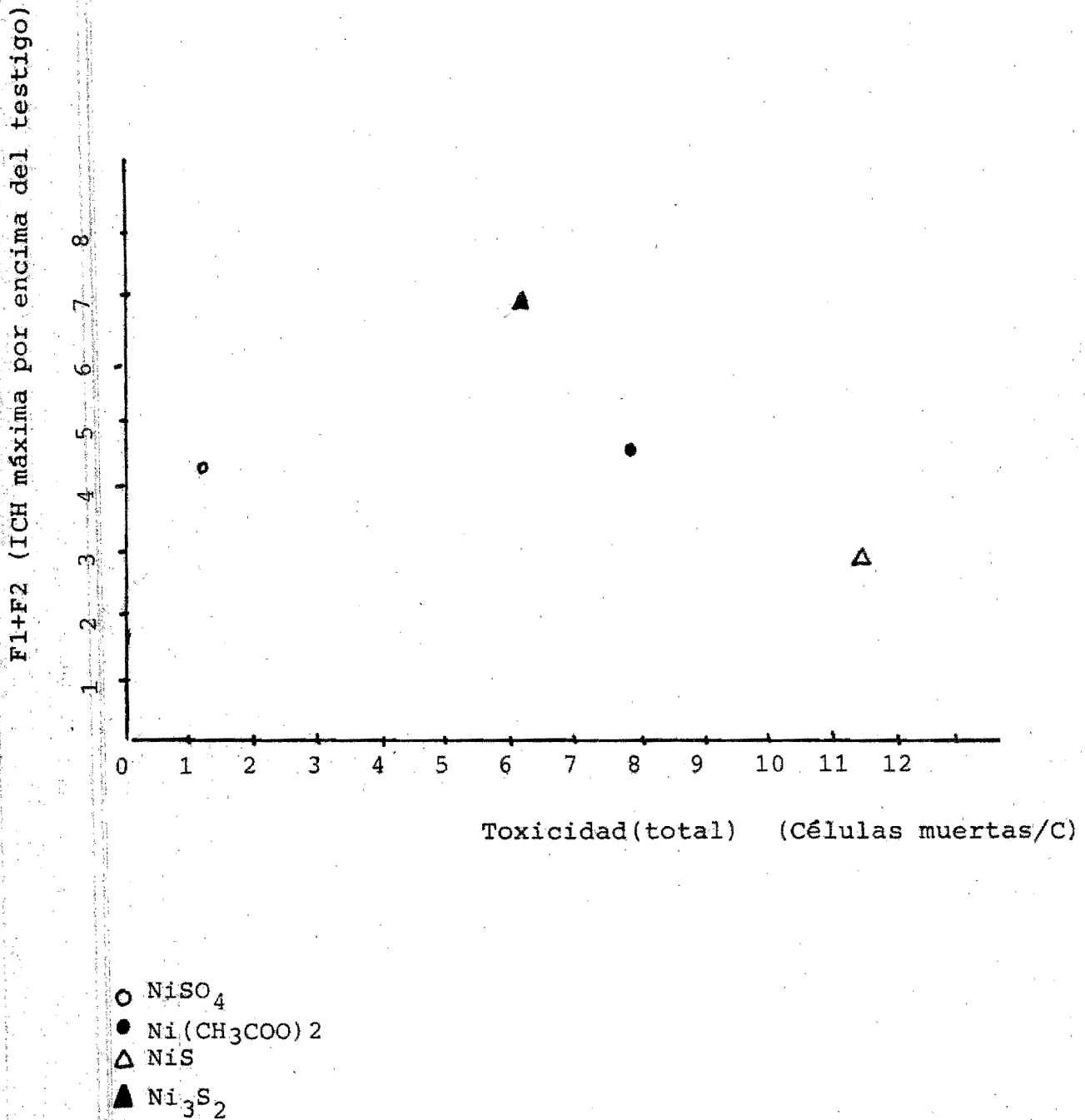


Figura 4

MODELO DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (Painter, 1982)

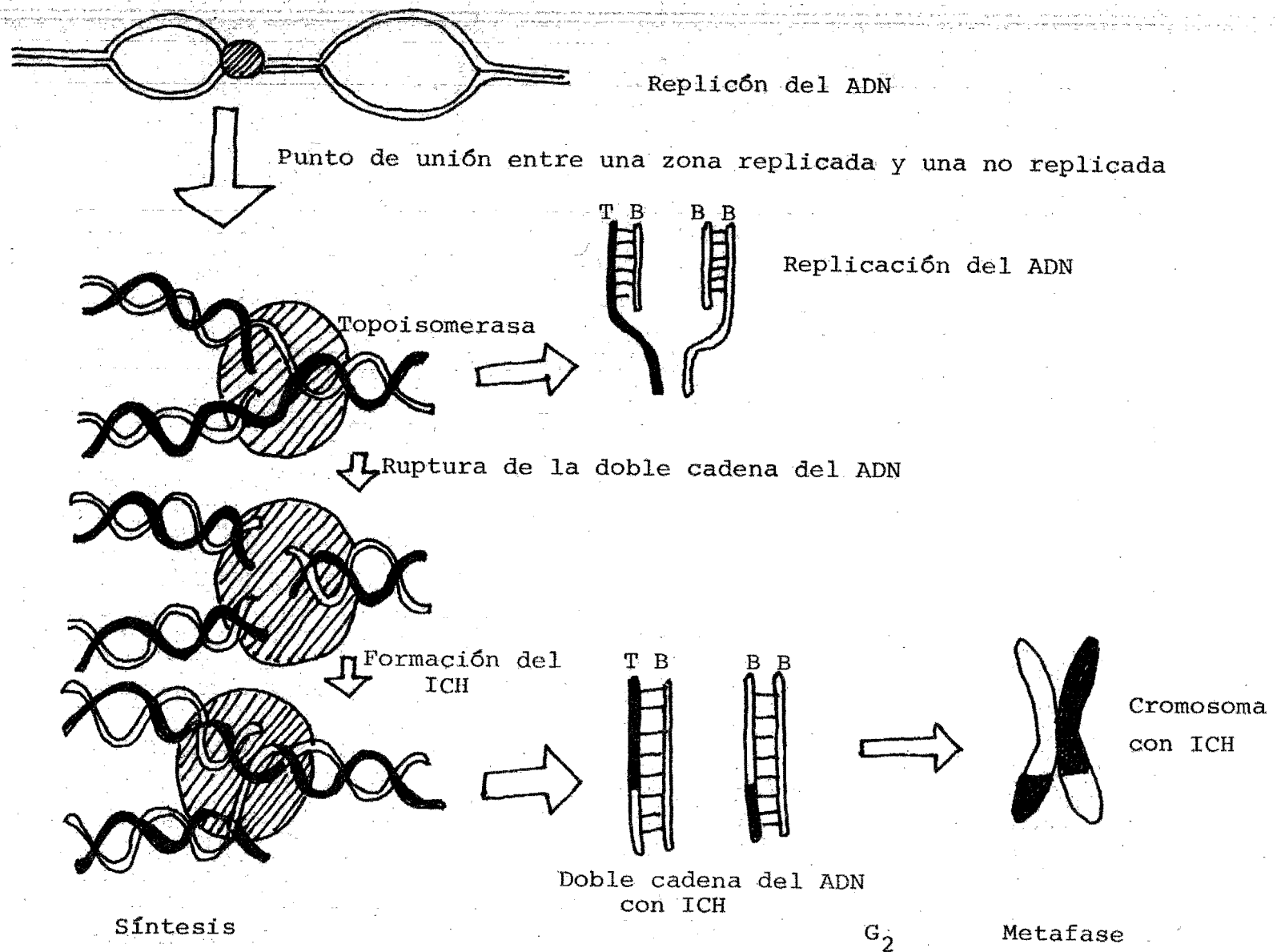
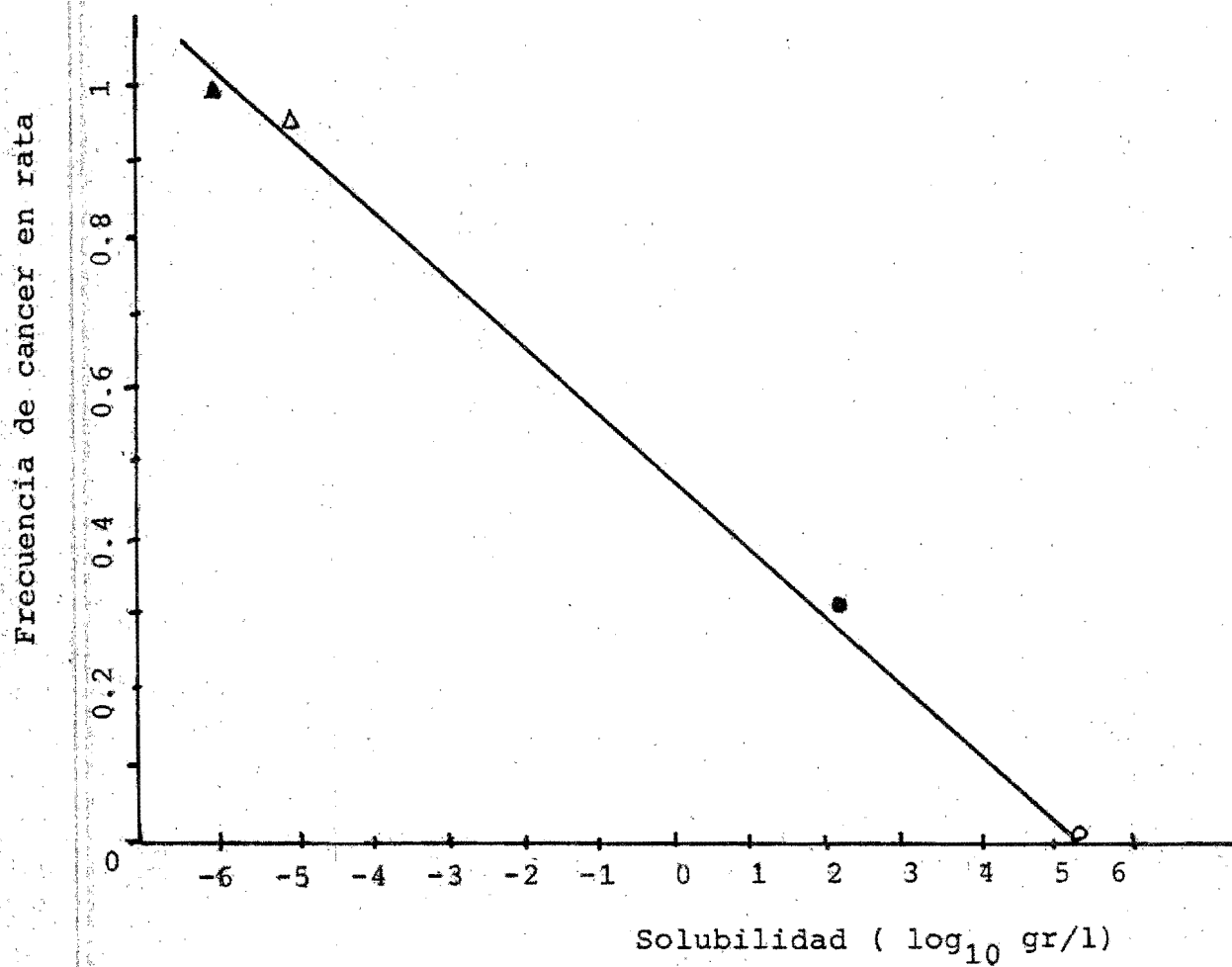


Figura 5

RELACION ENTRE CARCINOGENESIS* Y SOLUBILIDAD PARA VARIOS
COMPUESTOS DE NIQUEL

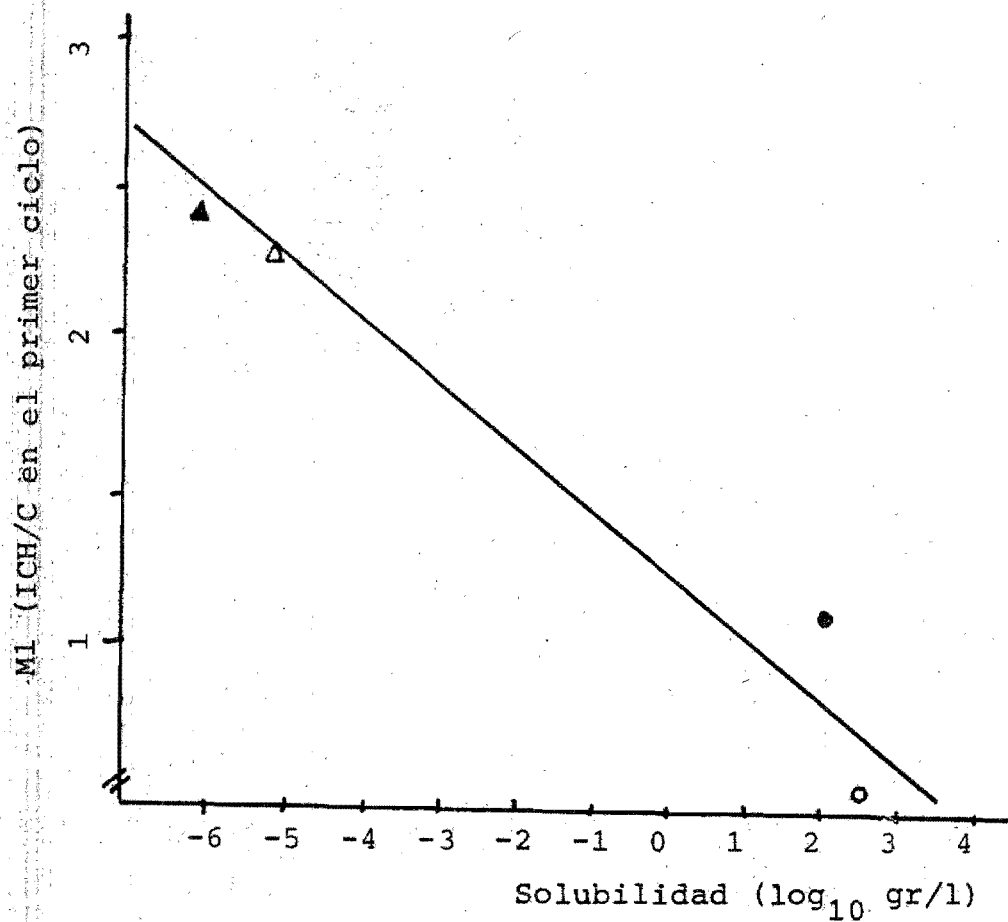


- NiSO_4
- $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2$
- △ NiS
- ▲ Ni_3S_2

* datos tomados de Sunderman et al., 1979

Figura 6

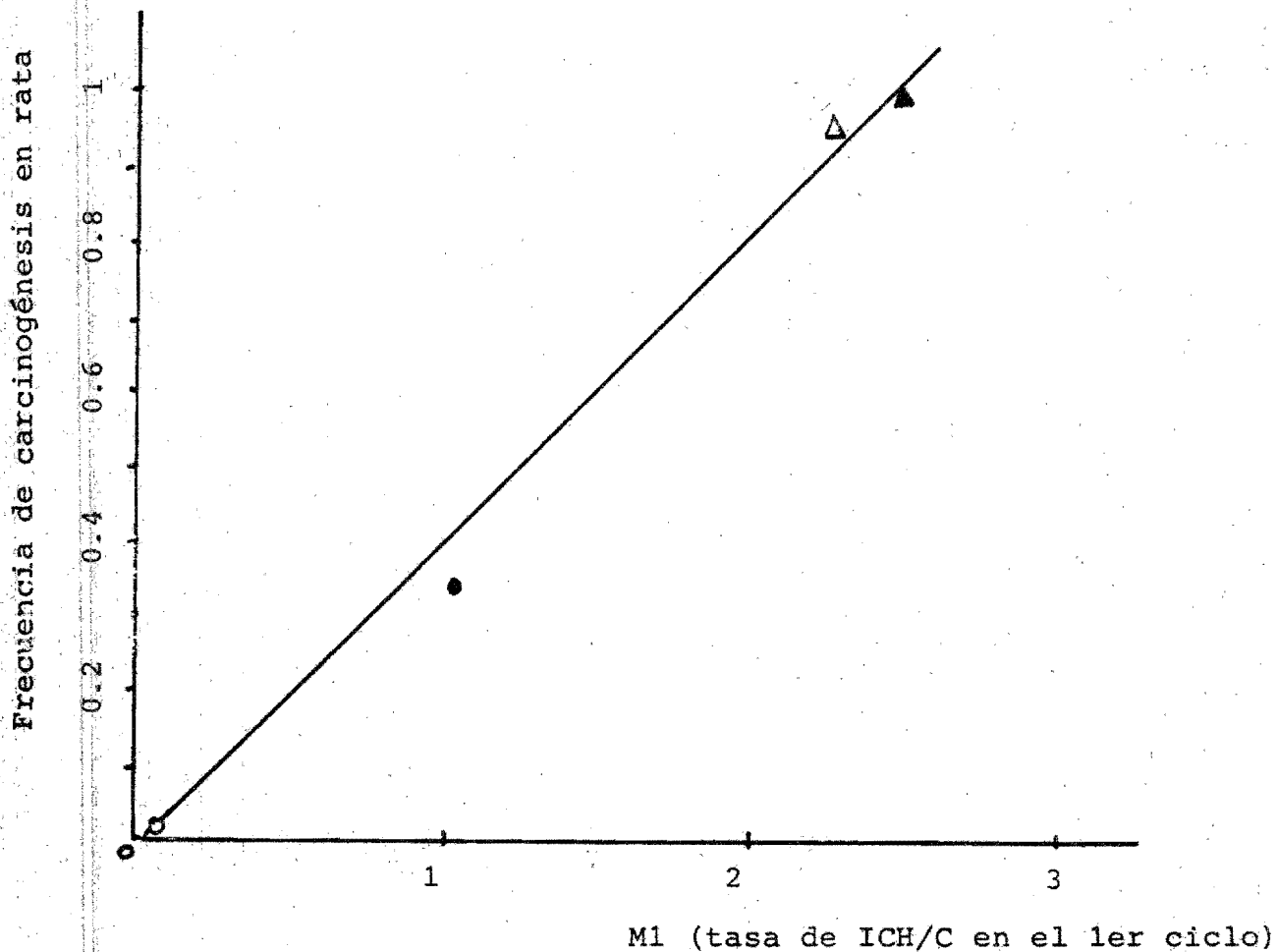
RELACION ENTRE M1 (TASA DE ICH/C EN EL 1ER CICLO) Y SOLUBILIDAD PARA LOS DIVERSOS COMPUESTOS DE NIQUEL



- Ni(CH₃COO)₂
- NiSO₄
- △ NiS
- ▲ Ni₃S₂

Figura 7

CORRELACION ENTRE CARCINOGENESIS* Y LA TASA DE ICH EN EL 1ER CICLO (M1) DE VARIOS DERIVADOS DE NIQUEL

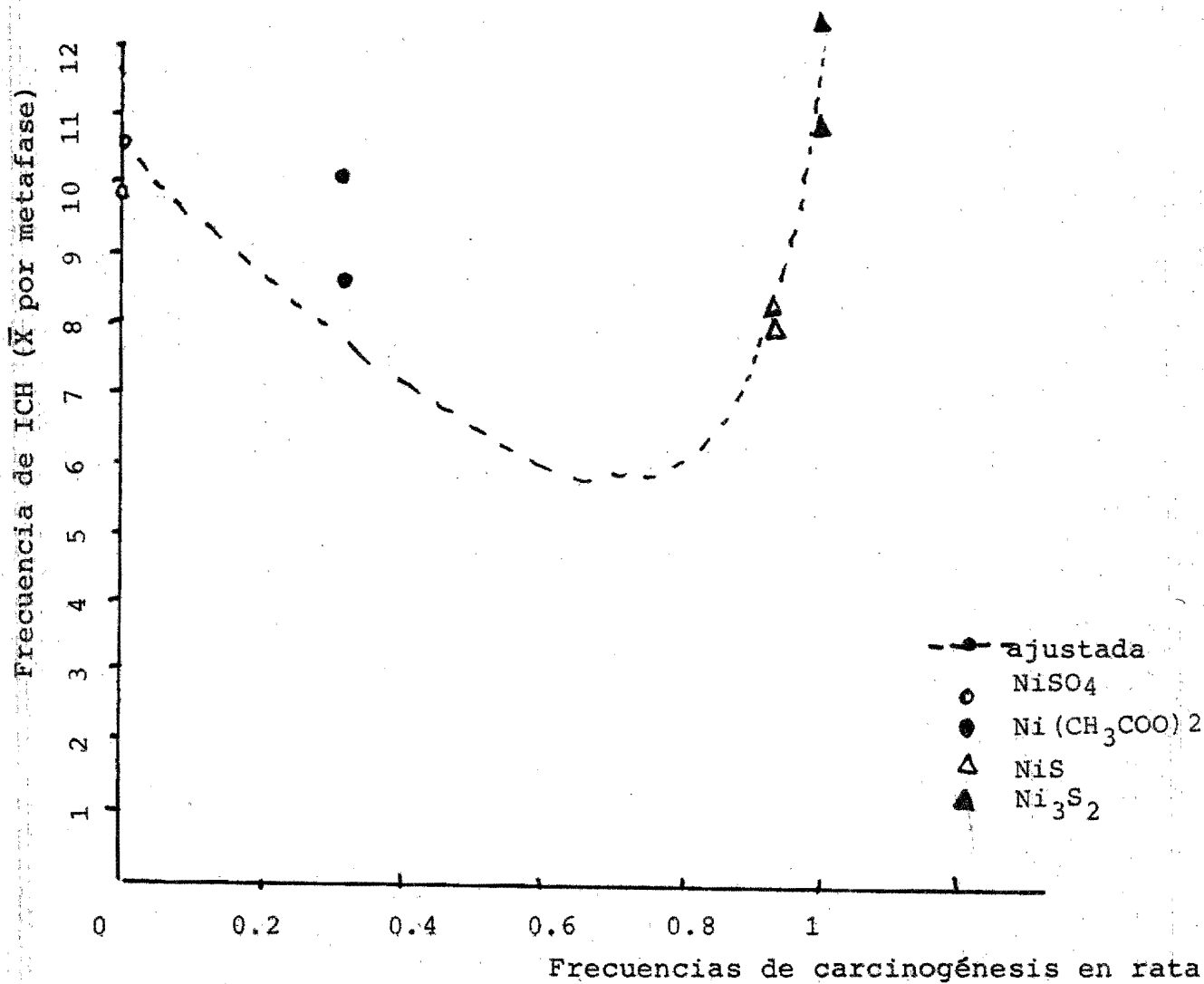


- NiSO₄
- Ni(CH₃COO)₂
- △ NiS
- ▲ Ni₃S₂

* datos tomados de Sunderman et al., 1979

Figura 8

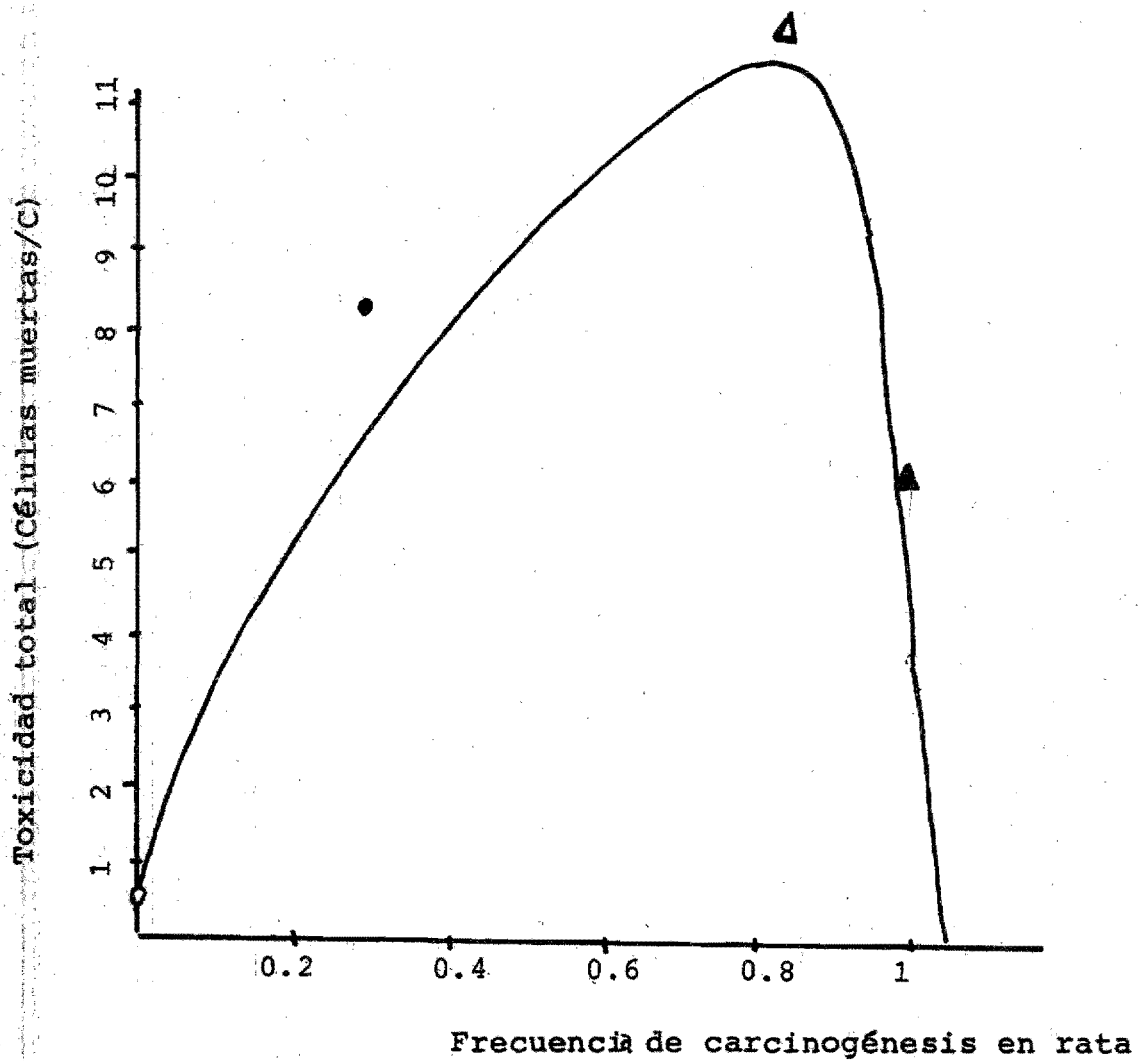
FRECUENCIAS DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS MAXIMAS
(REALES Y AJUSTADAS) CONTRA CARCINOGENESIS* POR COMPUESTOS
DE NIQUEL



* datos tomados de Sunderman et al., 1979

Figura 9

RELACION ENTRE TOXICIDAD Y CARCINOGENESIS* POR LOS
DIVERSOS COMPUESTOS DE NIQUEL

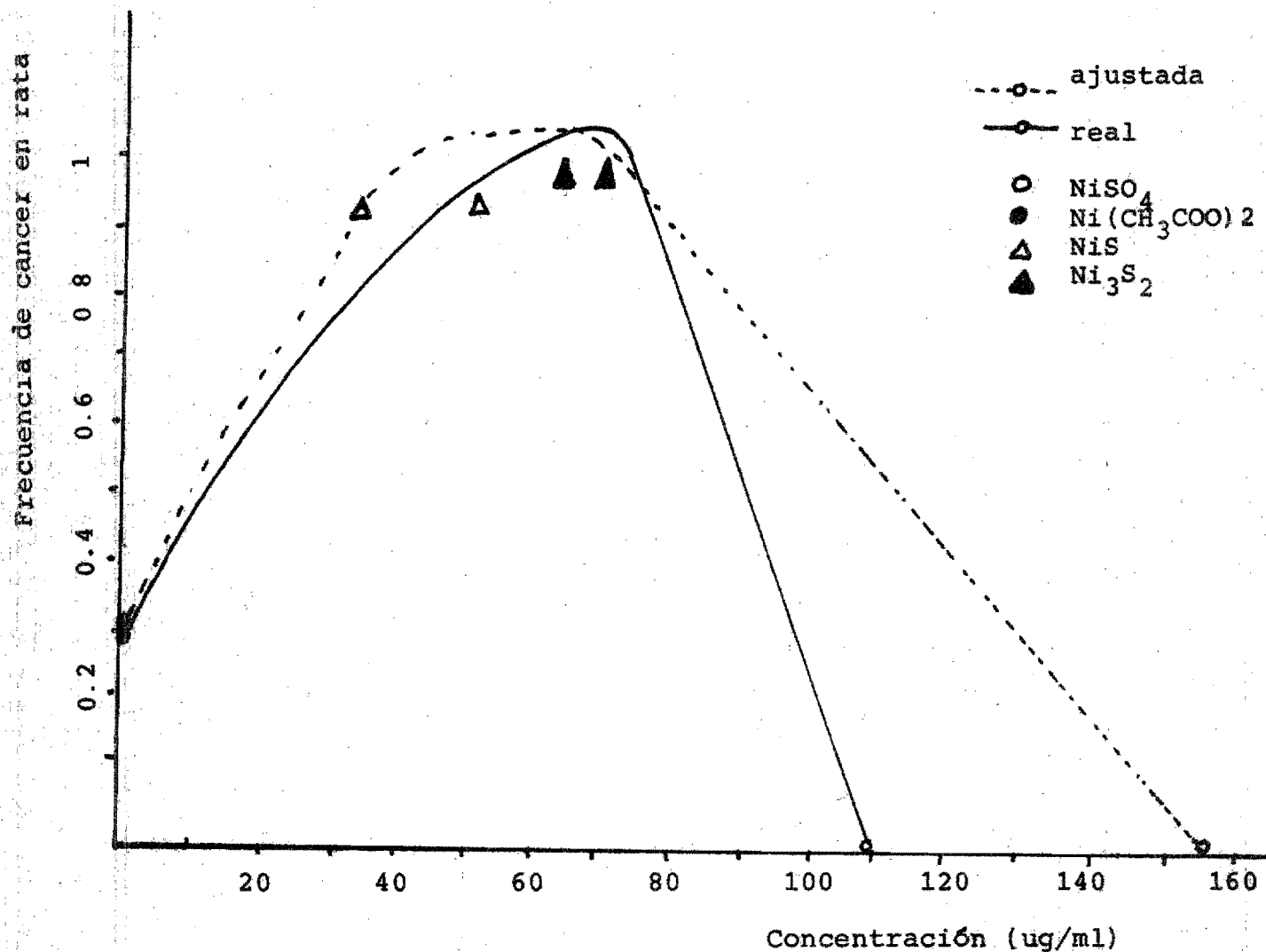


- \circ NiSO_4
- \bullet $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2$
- Δ NiS
- \blacktriangle Ni_3S_2

* datos tomados de Sunderman et al., 1979

Figura 10

RELACION ENTRE CARCINOGENESIS* Y CONCENTRACION MAXIMA (REAL Y AJUSTADA)
A LA QUE INDUCEN UN MAXIMO DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS LOS
DIVERSOS COMPUESTOS DE NIQUEL



* datos tomados de Sunderman et al., 1979

Figura 11

