



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y DE MICROBIOLOGÍA



APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA MOLECULAR
PARA LA DETECCIÓN DE ANEUPLOIDÍA Y CLASTOGENICIDAD
EN CÉLULAS HUMANAS EXPUESTAS A ARSÉNICO



MAGALY J. CHÁVEZ DELGADO

SEPTIEMBRE, 2006

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ARSÉNICO EN EL AMBIENTE

El arsénico es un elemento que se encuentra comúnmente en la atmósfera, rocas y aguas, y desde su aislamiento por Albertus Magnus en 1250, ha sido objeto de controversia en la historia de la humanidad, debido a su utilización en distintos campos de la actividad humana: agricultura, medicina, ganadería, electrónica y metalurgia (Mandal *et al.*, 2002; Lillo, 2005). En la actualidad se conoce que el arsénico, aún en concentraciones bajas, es capaz de inducir carcinogénesis en seres humanos y es por ello que el interés en este compuesto aún continúa vivo (Pradosh *et al.*, 2002).

Las diferentes actividades humanas han tenido un efecto notable sobre la presencia del arsénico en la naturaleza incrementando en forma significativa el riesgo de exposición de los seres humanos (Figura 1.1) (Tabla 1.1). Entre las actividades industriales que suponen una exposición al arsénico están: minas de carbón, fundidoras de metales, plantas de energía térmica por combustión de carbón y las fábricas de pesticidas; otras exposiciones vienen determinadas por su uso en fármacos y en venenos (un ejemplo clásico es la relación del arsénico con la muerte de Napoleón Bonaparte) (Mandal *et al.*, 2002).

Los compuestos arsenicales presentes en concentraciones elevadas en los reservorios naturales de las aguas suponen los casos de intoxicación más comunes, debido al uso del agua para el consumo humano. Existen estudios epidemiológicos de la contaminación por arsénico ocurridos en muchos países, los cuales revelan que el arsénico es capaz de producir multiplicidad de alteraciones en la salud humana como: lesiones en la piel (melanosis y queratosis),

cáncer en la piel, afecciones en el sistema nervioso central, diabetes, malformaciones congénitas, así como otras enfermedades (DeSesso 2001; Mandal *et al.*, 2002; Pradosh *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2003; Lillo, 2005).

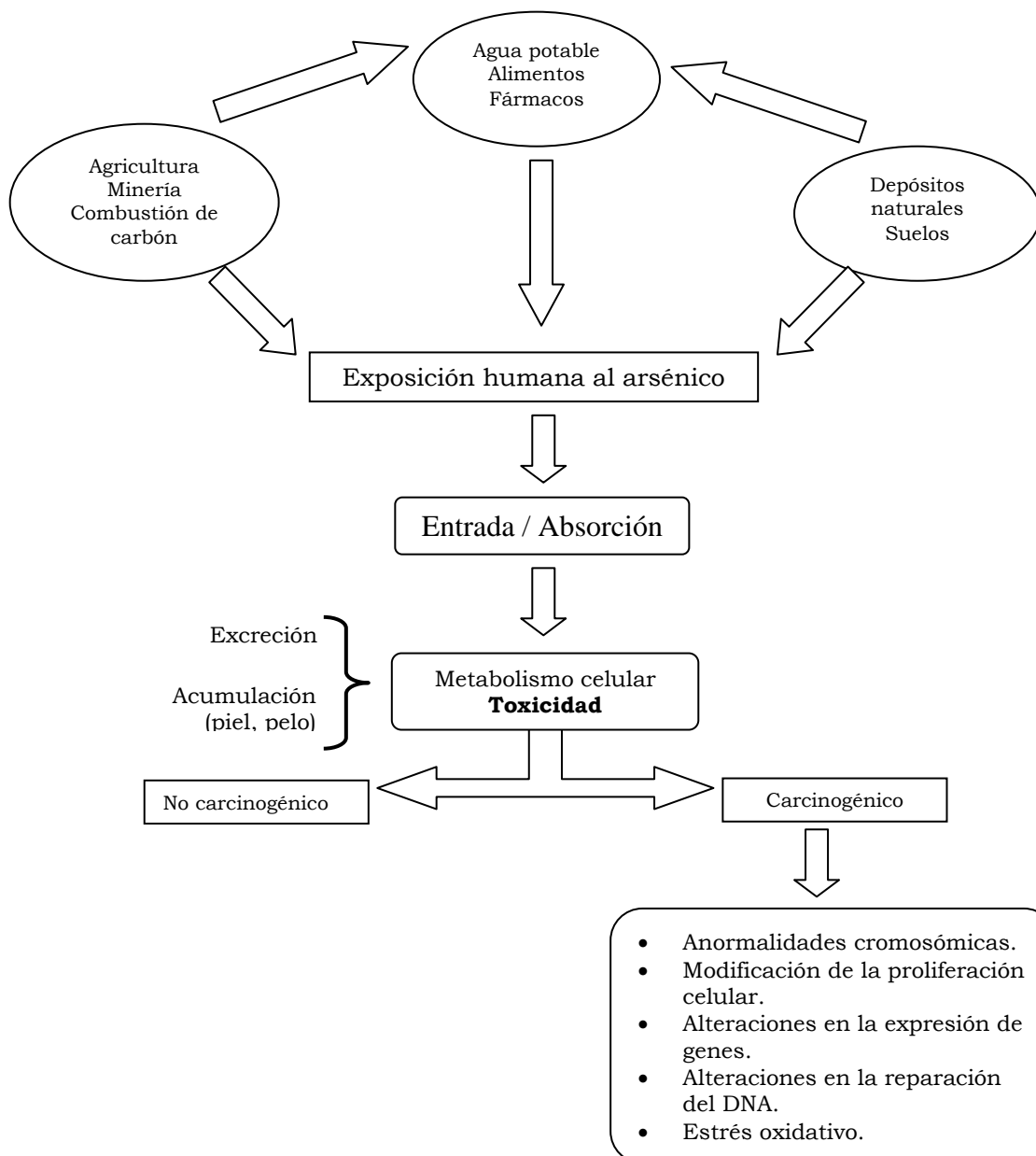


Figura 1.1. Fuentes de exposición al arsénico y algunas vías para su toxicidad (Pradosh *et al.*, 2002).

Tabla 1.1. Concentraciones de arsénico en diferentes ambientes de la Unión Europea (Mandal *et al.*, 2002).

Ambiente	Concentración	Área
Aire	0,2 – 1,5 ng/m ³ 0,5 – 3 ng/m ³ > 50 ng/m ³	Rural Urbana Industrial
Suelos	1,6 – 4 mg/Tn 5 – 70 mg/Tn	Agrícola Industrial
Aguas	2 – 300 mg/Tn 5 – 4000 mg/Tn	Ríos Lagos

1.1.1. Toxicidad del arsénico

El arsénico es capaz de entrar en los seres vivos por medio de diferentes vías o rutas, la más frecuente es la vía *oral* que involucra la presencia de los arsenicales en el agua y otras bebidas, alimentos y suelos; los polvos y humos provenientes de las industrias representan el particulado fino que puede ingresar al cuerpo por vía *respiratoria*, mientras que el contacto con la piel (percutánea) describe la vía *dérmica* (Mandal *et al.*, 2002).

Las rutas de salida (o de excreción) se clasifican comúnmente como principales y secundarias, las rutas *principales* están representadas por la excreción de los metabolitos arsenicales por medio de las heces y la orina, mientras que las *secundarias* incluyen la leche materna, saliva, sudor, uñas, pelos y tejidos con queratina (Silbergeld 2001; Mandal *et al.*, 2002). La toxicidad del arsénico depende principalmente de la forma química y del estado de oxidación en el cual está presente; sin embargo, existen otros factores a tomar en

cuenta: el estado físico (gas, solución, tamaño de partícula del polvo), la tasa de eliminación, la naturaleza de los sustituyentes químicos en el compuesto tóxico, si la persona había estado previamente expuesta; debido a que estos factores son capaces de modificar el grado de toxicidad del arsénico en sus diferentes formas químicas (Mandal *et al.*, 2002).

Las reacciones químicas en las interfases roca/sedimento y atmósfera/agua/suelo influyen el transporte, distribución y disponibilidad del arsénico en el ambiente mientras que la disponibilidad del oxígeno controla las reacciones redox del arsenato/arsenito, que son las dos formas en las que el arsénico inorgánico normalmente se encuentra en el ambiente.

La adsorción y precipitación del arsenato y arsenito inmovilizan el arsénico en el sedimento, sin embargo, mediante la metilación realizada por los microorganismos (al igual que los mamíferos) el arsenito se convierte en ácido monometilarsénico (*MMA*) y ácido dimetilarsénico (*DMA*) seguido por otros compuestos organoarsenicales (Figura 1.2).

Está generalmente aceptado que la metilación es la principal ruta biológica en el ciclo del arsénico no sólo en el medio ambiental, sino en la destoxicación ocurrida en los seres vivos, sin embargo, se han vinculado los metabolitos metilados, como monometilarsénico (*MMA*) y el dimetilarsénico (*DMA*) con los efectos adversos asociados con la exposición al arsénico (Vega *et al.*, 1995; Mandal *et al.*, 2002; Borrás *et al.*, 2004; Akerman *et al.*, 2005).

Entre los seres humanos existen amplias diferencias en la intensidad de la respuesta a las sustancias químicas potencialmente tóxicas, y existen variaciones en la susceptibilidad de un individuo a lo largo de

su vida; esto puede atribuirse a diversos factores que pueden afectar a la velocidad de absorción, la distribución en el cuerpo y la velocidad de biotransformación y/o excreción de una determinada sustancia (Christensen 1995; Hopenhayn *et al.*, 1996; Herce *et al.*, 1998; Basu *et al.*, 2001; Hughes 2002; Drobna *et al.*, 2004).

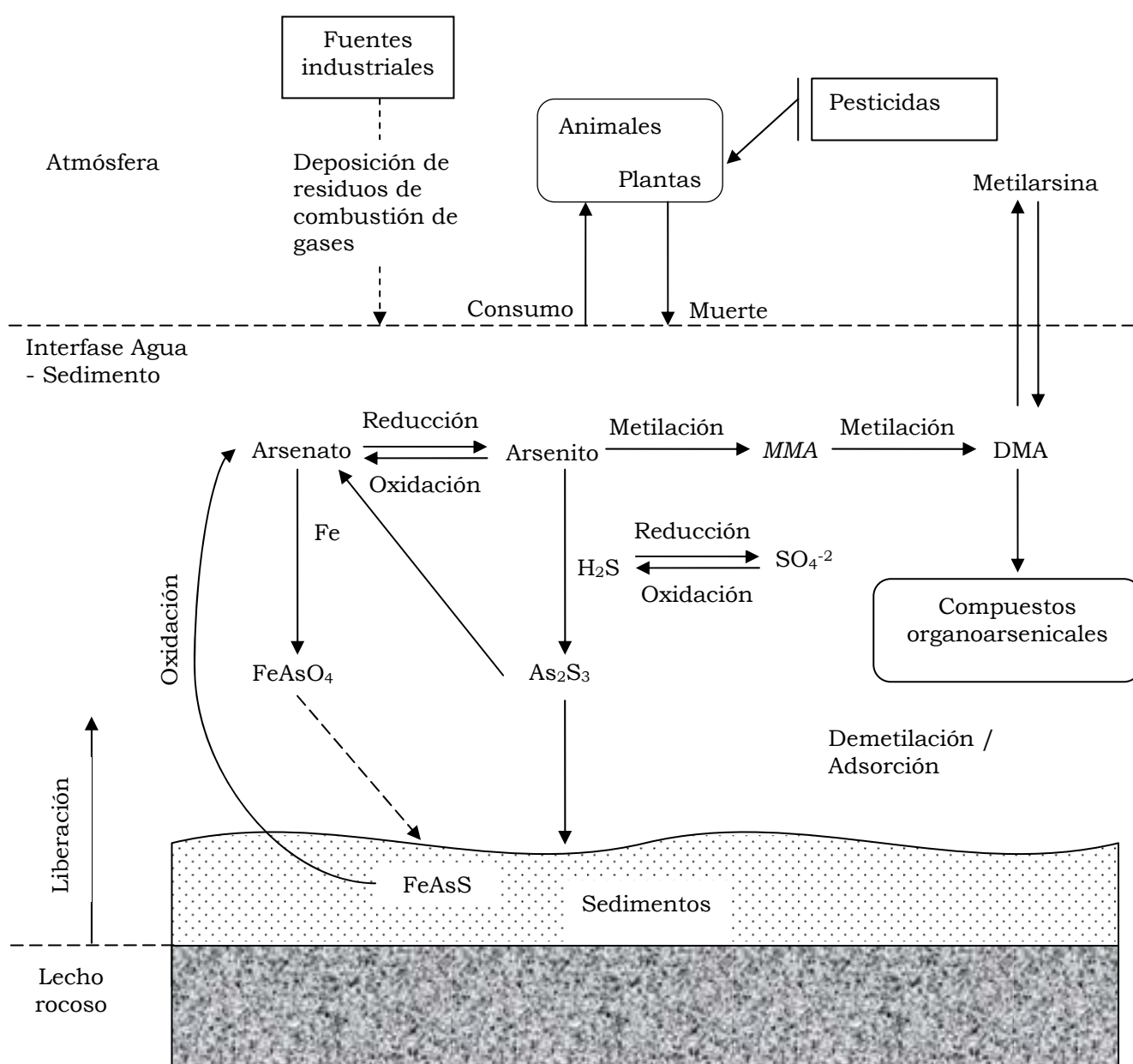


Figura 1.2. Ciclo del arsénico en el ambiente (Pradosh *et al.*, 2002).

Los factores hereditarios pueden modular la susceptibilidad a la toxicidad química, así como otros factores como las características constitucionales relacionadas con la edad y el sexo, los estados patológicos preexistentes o un deterioro de la función de un órgano (no hereditario), los hábitos alimentarios, el hábito de fumar, el consumo de alcohol, el empleo de fármacos, la exposición relevante a biotoxinas (liberadas por diversos microorganismos), factores físicos (radiación, humedad, temperaturas muy bajas o elevadas, o presiones barométricas especialmente idóneas para la presión parcial de un gas determinado) y las exposiciones anteriores de tipo profesional o ambiental a una determinada sustancia (Goering *et al.*, 1999; Gebel, 2000; Silbergeld, 2001).

En la Tabla **1.2**, se presenta un conjunto de efectos sobre la salud humana relacionados con la exposición crónica al arsénico inorgánico como afecciones en el tracto gastrointestinal, tracto respiratorio, piel, hígado, sistema cardiovascular, hematopoyético y nervioso (Hopenhayn *et al.*, 1996; Manssur, 1996; Schaumlöffel *et al.*, 1998; Kaltreide *et al.*, 2001; Hall, 2002; Walmod *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2003; Rosenkranz, 2003; Rossman *et al.*, 2004; Tseng, 2004; Wanabuchi *et al.*, 2004).

1.1.2. Episodios de contaminación en seres humanos

La presencia natural y antropogénica del arsénico en el agua potable ha sido reconocida como el principal tema de salud pública en algunas regiones del planeta en la últimas tres décadas. Algunas áreas pobladas han sido afectadas por exposiciones, natural- o accidentalmente, por el arsénico, por ejemplo, Taiwán, Bangladesh, India, China, México, Argentina, España, Chile y Estados Unidos.

Tabla 1.2. Resumen de los efectos sobre la salud inducidos por la exposición al arsénico a varios órganos internos y externos (Mandal *et al.*, 2002).

Órganos / Sistemas	Efectos vinculados con la exposición al arsénico, en seres humanos
Respiratorios	Laringitis, bronquitis traqueal, rinitis, faringitis, acortamiento de respiración, sonidos en el pecho (crepitación y/o ronquido), congestión nasal, perforación del septo nasal.
Pulmonarios	Hiperpigmentación, enfermedad de pulmón restrictiva, enfermedad de pulmón obstructiva.
Cardiovasculares	BFD, anormalidades cardiovasculares, enfermedad de Raynaud, oclusión de vasos sanguíneos, hipertensión, infarto miocárdico, arritmias cardíacas, adelgazamiento de vasos sanguíneos.
Gastrointestinales	Boca y garganta seca, ardor de estómago, dolores y calambres abdominales, diarrea moderada, irritación gastrointestinal sintomática, esofagitis, gastritis, colitis, malestar abdominal, anorexia, mala absorción de nutrientes, pérdida de peso.
Hematológicos	Anemia, leucopenia, depresión de médula ósea, disminución de GSH intracelular.
Hepáticos	Cirrosis, hipertensión portal sin cirrosis, neoplasia hepática primaria, varices en esófago, ictericia, perjuicio de funciones hepáticas - metabolismo de porfirinas, hinchamiento y ablandamiento del órgano.
Renales	Proteinuria, deshidratación, necrosis, cáncer.
Dérmicos	Melanosis, queratosis, hiperqueratosis, enfermedad de Bowen, cáncer, papilomatosis, pruritis generalizada, carcinoma celular basal y escamoso, uñas de manos y pies con manchas blancas transversales.
Neurológicos	Injuria neural, encefalopatía con síntomas como dolor de cabeza, letargo, confusión mental, alucinación, apoplejías, coma.
Desarrollo	Infarto de aorta, malformaciones congénitas, disminución del peso al nacer, abortos.
Reproductivos	Incremento en la mortalidad fetal, neonatal y postnatal, elevación en la prevalencia de recién nacidos con bajo peso, altas tasas de abortos espontáneos, incrementos en malformaciones congénitas, elevada frecuencia de complicaciones durante el embarazo, en tasas de mortalidad en el nacimiento y bajo peso en recién nacidos.
Inmunológicos	Perjuicio de la respuesta inmune.
Genotóxicos	Inhibición del mecanismo de reparación para la cocarcinogénesis y comutagénesis, induce altas frecuencias en aberraciones cromosómicas, arresto mitótico, células tetraploides, disrupción sobre la organización microtubular de las células.
Mutagénicos	Inducción de daño en el <i>DNA</i> , cambios en estructura o número de cromosomas, clastogénesis, daño genético transmisible a generaciones posteriores, cáncer.
Carcinogénicos	Alta incidencia de carcinomas celular escamoso y basal de la piel, neoplasias internas, arsenicismo, riesgo de cáncer en pulmón, piel, vejiga, riñón e hígado.
Diabetes	Vinculada con exposición al arsénico en el agua potable.
Bioquímicos	Inhibidor de más de 200 enzimas en humanos, como colinesterasa, glutamilpiruvato transaminasa, glutatión peroxidasa, glucosa-6-fosfatasa, flujo de Na ⁺ y K ⁺ , inhibición de grupos ditioles y sulfidrilos.

Como ejemplo de esto, en el año 1998, en Madrid (España) se detectaron concentraciones naturales de arsénico superiores a 50 $\mu\text{g/L}$ (concentración máxima permisible España) en las aguas destinadas al consumo de la población. En una fase inicial, las muestras de aguas provenientes de 353 líneas de distribución de Madrid fueron analizadas, mientras que en una segunda fase, después de 6 meses, los análisis fueron repetidos en 35 líneas de distribución de agua potable que fueron consideradas con un posible riesgo para la salud pública. El 74 % de las fuentes de aguas estudiadas en la fase inicial tuvieron una concentración de arsénico menor a 10 $\mu\text{g/L}$, un 22,6 % tuvo niveles entre 10 y 50 $\mu\text{g/L}$ y un 3,7 % presentaron más de 50 $\mu\text{g/L}$.

Muchas de las fuentes de aguas que presentaron niveles de arsénico superiores a 10 $\mu\text{g/L}$ fueron localizadas en la misma área geográfica. En la segunda fase, 26 de las 35 líneas de distribución presentaron el mismo rango (10 – 50 $\mu\text{g/L}$) igual que el primer estudio; 6 tuvieron menos de 10 $\mu\text{g/L}$ y tres presentaron más de 50 $\mu\text{g/L}$. Se estableció que el contenido de arsénico presente en las aguas subterráneas de esa región proviene de la composición natural, con lo cual en la actualidad, menos del 2 % de la población de la ciudad de Madrid, consume agua proveniente de las fuentes de aguas subterráneas (Aragonés *et al.*, 2001).

1.2. TOXICOLOGÍA GENÉTICA

La toxicología genética, tiene como objetivo el estudio de la forma en la cual los agentes químicos o físicos afectan al complejo proceso de la herencia. Las sustancias químicas consideradas como potencialmente genotóxicas son compuestos capaces de modificar el material hereditario de las células vivas.

La probabilidad de que una determinada sustancia cause un daño genético depende inevitablemente de diversas variables, como el nivel de exposición del organismo a la sustancia, la distribución y retención de ésta una vez que ha penetrado en el organismo, la eficiencia de los sistemas de activación metabólica y/o detoxificación en los tejidos diana y la reactividad de la sustancia o de sus metabolitos con macromoléculas críticas de las células.

La probabilidad de que el daño genético produzca una enfermedad depende en última instancia de la naturaleza del daño, la capacidad que posee la célula de reparar o amplificar el daño genético, la oportunidad de expresar cualquier alteración que se haya inducido y la capacidad del cuerpo de reconocer y suprimir la multiplicación de células aberrantes (Bustamante *et al.*, 1997; Bae *et al.*, 2001; Silbergeld, 2001; Borrás *et al.*, 2004).

1.2.1. Genotoxicidad

La genotoxicidad de los agentes químicos es una característica química intrínseca, basada en el potencial electrofílico del agente químico (como es el caso del arsénico) para unirse con puntos nucleofílicos de macromoléculas como enzimas, proteínas y *DNA* (Yager *et al.*, 1997; Decordier *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2004; Waters *et al.*, 2004).

La genotoxicidad es, por tanto, la capacidad tóxica que se manifiesta en el material genético de las células e incluye efectos directos e indirectos sobre el *DNA*, entre los cuales se puede mencionar la inducción de mutaciones (genéticas, cromosómicas y genómicas), que a nivel molecular son similares a los acontecimientos que se sabe están implicados en la carcinogénesis (Menzel *et al.*, 1998, Lauwerys 2001; Liu *et al.*, 2001; Nagar *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005).

Para que la estructura del cromosoma resulte alterada es necesario que se produzca, al menos, una rotura en la molécula del *DNA* y que no sea reparada o que ocurra una reparación incorrecta. La capacidad de inducir tales roturas se denomina clastogenicidad y los agentes son denominados clastógenos. Cuando un agente clastogénico produce las roturas en la fase *S* del ciclo celular, se denominan *S*-dependiente, y aquellos que no necesitan pasar por la fase *S* para generar una rotura son denominados *S*-independientes.

Un ejemplo de agente *S*-dependiente es la mitomicina - *C* (*MMC*), la cual es una sustancia utilizada ampliamente en la terapia antitumoral, pues es capaz de producir la muerte de las células que se dividen al bloquear su replicación; este es un agente alquilante que se une covalentemente a la molécula de *DNA*, la base que se une preferentemente con la *MMC* es la guanina formando enlaces intra- o intercatenarios y como resultado se presenta una rotura de tipo cromatídico, sin embargo, la *MMC* también es capaz de inducir aneuploidía y producir un retraso en el ciclo de división celular en los cultivos de células de mamíferos.

La capacidad como agente aneunógeno de la *MMC* parece ser debido al daño que se produce en la estructura trilaminar del cinetocoro, impidiendo la correcta unión de los cromosomas al huso mitótico (Ortiz *et al.*, 2004).

Por otro lado, la disminución/aumento del número de cromosomas presentes en el cariotipo de una especie, se conoce como aneuploidía y los agentes capaces de inducir este efecto son denominados aneunógenos, por medio de la acción indirecta en la molécula del *DNA*, las regiones diana de estos compuestos suelen encontrarse en los microtúbulos, cinetocoros, centriolos, cuerpos polares o membranas nucleares y citoplasmáticas, produciendo una

distribución alterada de los cromosomas en las células hijas, dando como resultado la mala segregación de los mismos. Estos provocan la desorganización del huso mitótico, o impiden la unión del cromosoma con el huso, o producen fallos en la segregación cromosómica o cromatídica en la transición de la metafase y anafase. Los telómeros también juegan un papel importante puesto que mantienen unidas las cromátidas hasta el momento de la anafase, evitando la pérdida de cromosomas (Parry *et al.*, 2002).

La griseofulvina (*GF*) es una sustancia derivada de la coumarina, de fórmula molecular $C_{17}H_{17}ClO_6$, utilizada como eficaz agente antifúngico y es ampliamente usada en ensayos genotóxicos debido a la producción de micronúcleos derivados de la pérdida de cromosomas completos, lo cual aporta el carácter aneugénico y la alteración del ciclo de proliferación celular (Kalweit *et al.*, 1999; Kersten *et al.*, 1999; Norppa *et al.*, 2003).

Este compuesto tiene la capacidad de perturbar el movimiento de los cromosomas debido a su habilidad de bloquear la producción de los microtúbulos con las proteínas asociadas y esenciales para la función de movimiento de los cromosomas durante la división celular.

1.2.2. Ensayos *in vitro*

Los efectos genotóxicos se miden mediante los denominados ensayos de genotoxicidad, que se pueden utilizar tanto *in vitro* como *in vivo*. Los ensayos que miden la mutación *génica* son los que detectan la sustitución, adición o supresión de nucleótidos en un gen. Los ensayos que miden la mutación *cromosómica* son los que detectan roturas o reordenaciones cromosómicas en las que intervienen uno o varios cromosomas. Los ensayos que miden la mutación *genómica* son los que detectan cambios en el número de cromosomas,

fenómeno que se denomina aneuploidía. Entre las lesiones cromosómicas identificables al microscopio se encuentran las aberraciones cromosómicas, los intercambios entre cromátidas hermanas y los micronúcleos que pueden derivarse de fragmentos de cromosomas acéntricos o de la falta de cromosomas completos (Gonsebatt *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1998; Goering *et al.*, 1999; Gil, 2000; Huang *et al.*, 2000; Basu *et al.*, 2001; Lauwerys, 2001; Hughes, 2002; IARC, 2004).

Los ensayos de genotoxicidad *in vitro* se utilizan en la actualidad porque cuestan relativamente poco, son fáciles de realizar y han demostrado que detectan el efecto carcinogénico en roedores y en células humanas, por lo cual se consideran una evidencia confiable de las principales alteraciones ocurridas en el material genético de las células eucariotas (Léonard, 1988; Krishnaha *et al.*, 1991; Christensen, 1995; Hartwig *et al.*, 1997; Fenech 2000; Huff *et al.*, 2000; Parry *et al.*, 2002; Ochi *et al.*, 2003; Filipic *et al.*, 2004; Marcos *et al.*, 2006).

1.2.2.1. Ensayo para la detección de micronúcleos en células eucariotas

El ensayo de micronúcleos (*MN*) *in vitro* ha sido desarrollado como una robusta prueba para evaluar el daño genético con amplias aplicaciones:

- Ecotoxicología (Gebel *et al.*, 1996; Mansour *et al.*, 1996; Herce *et al.*, 1998; Yeşilada, 2001; Baez *et al.*, 2003; Castañé *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2003; Richardson, 2003; Raisuddin *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Wanibuchi *et al.*, 2004).
- Nutrición (Silbergeld, 2001).
- Pruebas de sensibilidad a las radiaciones en la evaluación de

riesgo del cáncer (Champion *et al.*, 1995; Kligerman *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1996; Hartwig *et al.*, 1997; Kersten *et al.*, 1999; Burns *et al.*, 2004; Akerman *et al.*, 2005; Al-Baker *et al.*, 2005).

- Biomonitorio de las poblaciones humanas (Krishnaja *et al.*, 1991; Köteles *et al.*, 1993; Christensen 1995; Radack *et al.*, 1995; Hopenhayn *et al.*, 1996; Mansour *et al.*, 1996; Gonsebatt *et al.*, 1997; Mäki *et al.*, 1998; Fenech, 2000; Gil, 2000; Basu *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001; Hall, 2002; Barraqué 2003; Le *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2003; Mahata *et al.*, 2004; Tseng, 2004; Vega *et al.*, 2004; Marcos *et al.*, 2006).
- Pruebas de farmacéuticos y agroquímicos (Mandal *et al.*, 2002; Schuler *et al.*, 2003; Celik *et al.*, 2005).

Los micronúcleos se presentan como pequeñas masas de cromatina dentro de la célula que son distintos del núcleo principal. Se producen durante la transición de la metafase-anafase de la mitosis en la división celular, mediante la rotura cromosómica (clastogenicidad) o la pérdida de cromosomas completos (aneuploidia) y que son incapaces de moverse a través de los husos mitóticos. Durante la telofase, se forma la membrana nuclear alrededor de los cromosomas no disyuncionados y de los fragmentos acéntricos, con lo cual asumen la morfología de los núcleos en interfase con la excepción de que son más pequeños que el núcleo principal dentro de la célula (Vian *et al.*, 1993; Champion *et al.*, 1995; Fenech, 2000; Kirsch-Volders *et al.*, 2000; Fenech *et al.*, 2003; Norppa *et al.*, 2003).

Esta técnica presenta la ventaja de la facilidad al momento de contar los micronúcleos en comparación con el tedioso recuento de las aberraciones cromosómicas. Estudios recientes indican, que los agentes genotóxicos inducen tanto aberraciones cromosómicas en la médula ósea de ratones vivos como micronúcleos en este tejido por lo

que sus efectos se pueden evaluar de manera indistinta con los dos ensayos. Actualmente es habitual utilizar el recuento de los micronúcleos como un indicador de la capacidad de un agente (como por ejemplo el arsénico) para inducir mutaciones cromosómicas, (Kligerman *et al.*, 1995; Kalweit *et al.*, 1999; Kersten *et al.*, 1999; Fenech, 2000; Gil, 2000; Huang *et al.*, 2000; Mourón *et al.*, 2001; Silbergeld 2001; Fenech, 2003; Dopp *et al.*, 2004; Guillaumet *et al.*, 2004; Zalacain *et al.*, 2005).

Este ensayo sólo puede usarse eficientemente o cuantitativamente en poblaciones de células eucariotas en las cuales se pueda distinguir con facilidad cada división celular, por lo cual, no es conveniente en poblaciones celulares con cinéticas de división descontroladas o desconocidas. Para disminuir esta limitación, se desarrolló el ensayo de micronúcleos con la adición de citocalasina - *B* (cyt-*B*), en donde las células que han completado una división nuclear son bloqueadas para evitar el proceso de citoquinesis y como consecuencia, las células son fácilmente identificables por su apariencia binucleada.

La cyt-*B* es una sustancia inhibidora de la polimerización de la proteína actina, extraída de *Helminthosporium dematioideum*, requerida para la inhibición de la formación de los microfilamentos que constriñen el citoplasma entre los núcleos hijos durante la citoquinesis, por lo cual el uso de esta sustancia permite la acumulación de todas las células en división en el estado binucleado, sin considerar su grado de sincronía y la proporción de las células en división (Channarayappa *et al.*, 1990; Pascoe *et al.*, 1990; Lindholm *et al.*, 1991; Ellard *et al.*, 1993; Falck *et al.*, 1997; Fenech *et al.*, 2000; Rosefort *et al.*, 2004). Así, los micronúcleos son contados en las células binucleadas, lo cual posibilita la comparación confiable del daño cromosómico entre diferentes poblaciones celulares con cinéticas de división distintas. Existe una gran variedad de criterios

que incrementan la fiabilidad y validez de este ensayo, lo que pone de manifiesto el esfuerzo en el desarrollo del potencial de esta técnica con múltiples aplicaciones, como se indica en la Tabla **1.3**.

Tabla **1.3**. Resumen de ventajas y limitaciones de la técnica para la inducción de micronúcleos en sistemas *in vitro* (Fenech, 2000).

Ventajas	Limitaciones
Técnica sencilla de realizar.	No hay distinción posible entre los posibles clastógenos y aneunógenos.
Rapidez de análisis.	
Tamaño de muestra grande.	No detecta la pérdida de cromosomas por no disyunción.
Análisis estadístico potente.	
Capacidad potencial para la automatización	

A continuación se presentan los criterios para seleccionar las células binucleadas a incluir en un ensayo de micronúcleos (Channarayappa *et al.*, 1990; Szirmai *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1994; Fenech 2000; Kirsch-Volders *et al.*, 2000; Fenech *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2003):

- Los dos núcleos en una célula binucleada deben tener intactas las membranas nucleares y estar situados dentro de la membrana citoplasmática.
- Los dos núcleos en la célula binucleada deben ser aproximadamente iguales en el tamaño e intensidad de tinción.
- Los dos núcleos dentro de la célula binucleada pueden estar unidos por un puente nucleoplásmico, el cual no debe ser más ancho que 1/4 del diámetro nuclear.
- Los dos núcleos principales en la célula binucleada pueden tocarse pero idealmente no solaparse entre ellos. Una célula con dos núcleos solapados puede ser contada sólo si las

membranas nucleares de cada núcleo son claramente distinguibles.

- La membrana citoplasmática de una célula binucleada debe estar intacta y claramente distinguible de las membranas citoplasmáticas de las células adyacentes.

Los micronúcleos son morfológicamente idénticos pero más pequeños que los núcleos, como se observa en la Figura **1.3**, y deben presentar las siguientes características (Channarayappa *et al.*, 1990; Szirmai *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1994; Fenech 2000; Kirsch-Volders *et al.*, 2000; Fenech *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2003):

- El *MN* en linfocitos humanos usualmente varía entre 1/16 y 1/3 del diámetro medio del núcleo principal.
- Los *MNs* son no-refráciles y pueden ser distinguidos fácilmente de los artefactos, como residuos de tinción.
- Los *MNs* no deben estar enlazados o conectados a los núcleos principales.
- Los *MNs* pueden tocar pero no solapar los núcleos principales y la membrana del *MN* debe ser claramente distinguible.
- Los *MNs* usualmente tienen la misma intensidad de tinción como el núcleo principal pero ocasionalmente pueden ser más intensos.

Cada sustancia química puede tener un efecto tóxico potencial en cada estadio del ciclo celular. Las células son más sensibles a los posibles efectos genotóxicos durante las fases *S*, *G₂* y *M*, razón por la cual es importante exponer los cultivos celulares cuando están dividiéndose. Puesto que la expresión de los *MNs* requiere que se lleve a cabo una división nuclear completa, el período entre el tratamiento y la colección de las células, debe ser suficiente, para que se cubra un ciclo celular (Kligerman *et al.*, 1995; Fenech 2000).

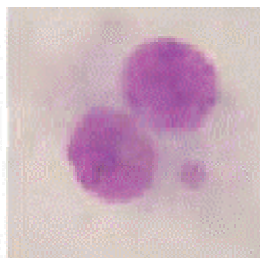


Figura **1.3**. Célula binucleada con micronúcleo.

Entre las diferentes técnicas de tinción, el uso de la coloración con Giemsa es la más común, sin embargo, los avances recientes en el campo de la genética molecular constituyen un complemento importante para los investigadores, ya que enriquecen la información que aporta el estudio citogenético, con lo cual el desarrollo de nuevos métodos que contribuyan a la monitorización de los efectos que producen los compuestos químicos de relevancia medioambiental en los organismos y poblaciones expuestas, es actualmente una prioridad (Johnson *et al.*, 1998; Maierhofer *et al.*, 2002; Le *et al.*, 2003; Schuler *et al.*, 2003).

1.2.3. Técnica de hibridación *in situ* fluorescente

La utilización de la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (*FISH*) ha sido muy útil acoplada al ensayo de micronúcleos, dado que ha permitido discriminar el origen de los *MN*. La base metodológica de esta técnica requiere la desnaturalización (rotura de los enlaces que unen la doble hélice del *DNA*) tanto del *DNA* de la muestra como del *DNA* de la sonda a utilizar (complementaria al fragmento de *DNA* que se desea estudiar) (Figura **1.4**).

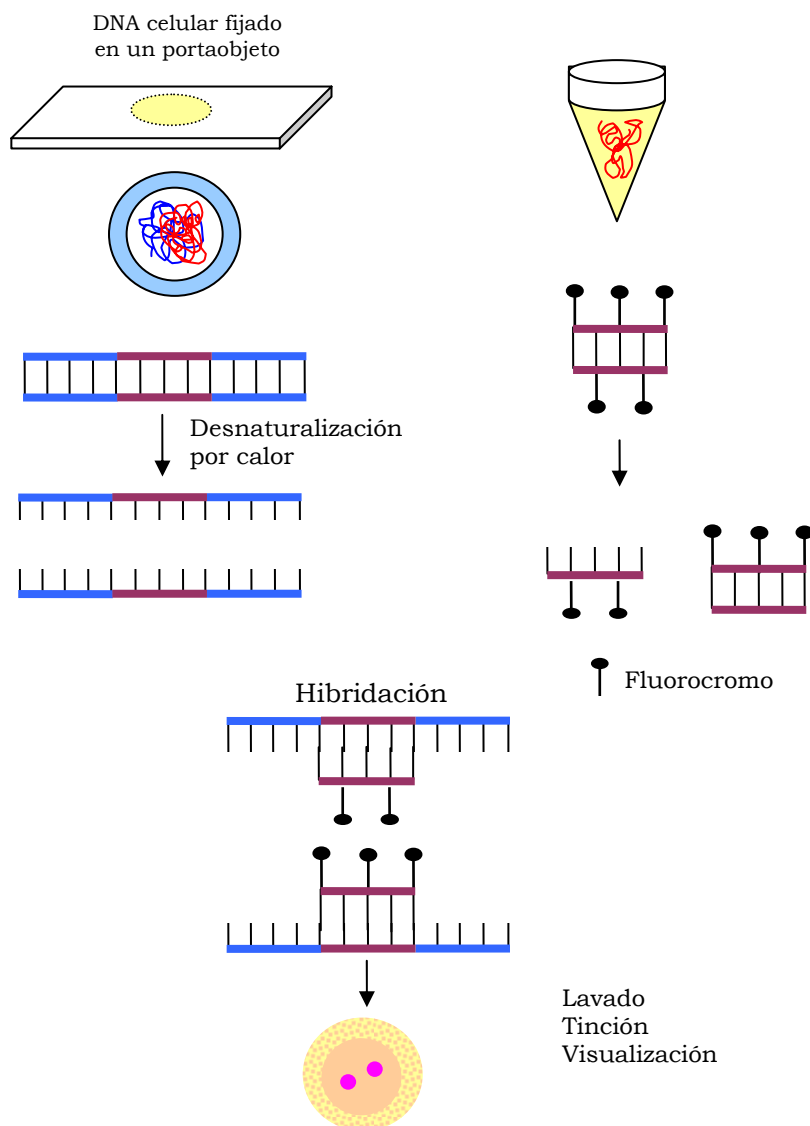


Figura 1.4. Esquema de la técnica de hibridación *in situ* fluorescente.

Las sondas se marcan mediante el método de desplazamiento de mella (*nick translation*, en inglés) utilizando nucleótidos que generalmente tienen incorporada una molécula de digoxigenina. Las sondas marcadas se hibridan con el *DNA* que se encuentra fijado en el portaobjeto y posteriormente, se trata con una solución que contiene la proteína antidigoxigenina unida a un fluorocromo. Esta proteína reconoce la digoxigenina uniéndose a ella. La preparación

microscópica se analiza en un microscopio de fluorescencia, que posee filtros específicos para cada fluorocromo, el más utilizado es el isotiocianato de fluoresceína (*FITC*, siglas en inglés). Actualmente existen fluorocromos (como fluoresceína, rodamina y hidroxycumarina) que se encuentran incorporados a los nucleótidos, con lo que la visualización de la hibridación es directa, cada uno de ellos con espectros de excitación y emisión característicos.

La intensidad de la luz fluorescente emitida por un determinado fluorocromo va disminuyendo a lo largo del tiempo, lo que se denomina pérdida de intensidad (*fade*, en inglés), en algunos casos es tan intenso que da la sensación de que la muestra se quema rápidamente (Johnson *et al.*, 1998; Maierhofer *et al.*, 2002; Le *et al.*, 2003; Schuler *et al.*, 2003).

Existen varias causas que explican este fenómeno, la principal es la formación de radicales libre de oxígeno (anión superóxido) que, dependiendo de la cantidad de energía que transmiten a las moléculas cercanas, cambian la estructura del fluorocromo a una forma no fluorescente, y son capaces de romper el débil enlace entre el antígeno y el anticuerpo. La pérdida de intensidad es una limitación para la observación en microscopios confocales, en donde se realizan múltiples barridos sobre la misma muestra.

Para retrasar el pérdida de intensidad, se utilizan algunos compuestos que suelen ser mezclas de inhibidores de radicales libres, denominados *antifade* (en inglés), son fórmulas comerciales, como por ejemplo Vecta Shield, sujetas a patentes con lo cual la composición exacta no es bien conocida, sin embargo, se conocen algunos componentes como el fluoróforo, 4´6-diamidino-2-fenil-indol-dihidroclorhidrato y el yoduro de propidio (*DAPI* y *PI*, siglas en inglés). La separación mínima necesaria en *FISH* para visualizar cada sonda

como un punto independiente cuando la hibridación se realiza sobre cromosomas en metafase es de 5 – 7 megabases (mb), mientras que si se realiza sobre núcleos interfásicos puede discernirse entre sondas separadas por 50 – 1000 kilobases (kb). Mediante esta técnica pueden detectarse deleciones de pocas kb de *DNA*, aneuploidías y translocaciones. Los tipos de sonda utilizadas rutinariamente han sido las sondas convencionales que abarcan: las sondas *centroméricas*, las cuales marcan toda la región correspondiente al centrómero; las sondas de *pintado cromosómico*, constituidas por un conjunto de sondas que marcan todo el cromosoma; y las sondas de *secuencia única*, altamente específicas para un locus determinado y marcan regiones cromosómicas muy concretas.

Las sondas centroméricas están formadas por una secuencia repetitiva de *DNA* que hibrida con el *DNA* de la región centromérica del cromosoma, permitiendo la detección de alteraciones cromosómicas numéricas, observando metafases o núcleos en interfase, además de la capacidad de diferenciar entre los agentes con potencial clastogénico y aneugénico. El desarrollo ventajoso de las técnicas moleculares ha introducido una nueva dimensión en el estudio y comprensión del papel de los cambios cromosómicos observables, sin embargo, presentan algunas limitaciones (Tabla **1.4**) (Johnson *et al.*, 1998; Maierhofer *et al.*, 2002; Paz-Miño *et al.*, 2002; Le *et al.*, 2003; Schuler *et al.*, 2003).

La combinación del ensayo de micronúcleos con la adición de *cyt-B* y la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (*FISH*) con una sonda de marcaje para la zona peri-centromérica de los cromosomas permite la detección simultánea de no disyunción entre los dos núcleos de una célula binucleada y la pérdida cromosómica, representada por el *MN*, así como la discriminación entre los micronúcleos que contienen cromosomas completos (micronúcleo con centrómero positivo) y

aquellos que poseen solo fragmentos de cromosomas acéntricos (micronúcleo con centrómero negativo). Todas estas ventajas han ampliado en gran manera el potencial de uso de esta técnica en diferentes campos de la investigación médica, ecotoxicológica y genética, entre otros (Moore *et al.*, 1996; Maierhofer *et al.*, 2002; Parry *et al.*, 2002; Paz-Miño *et al.*, 2002; Le *et al.*, 2003; Schuler *et al.*, 2003; Rosefort *et al.*, 2004). El uso de células de diversos organismos ha impulsado el desarrollo de una cantidad considerable de ensayos *in vitro* con los cuales se ha favorecido en control de las variables involucradas. Los linfocitos de sangre periférica y los linfoblastoides *TK6* son las líneas celulares usadas con más frecuencia en los ensayos citogenéticos *in vitro*.

Tabla 1.4. Ventajas y limitaciones de la técnica de citogenética convencional y de hibridación *in situ* (Paz-Miño *et al.*, 2002).

Técnica	Ventajas	Limitaciones
Citogenética convencional	Aporta información de todos los cromosomas. Bajo coste económico.	Requiere células en división Interpretación difícil en caso de obtener cromosomas de mala calidad. Baja sensibilidad.
Hibridación <i>in situ</i>	Aplicable tanto sobre metafases como sobre núcleos en interfase. Permite el análisis de un mayor número de células Mayor sensibilidad.	Aporta información concreta dependiendo del tipo de sonda utilizada. Alto coste económico.

1.2.4. Líneas celulares utilizadas en la detección de mutaciones cromosómicas

Los tipos celulares más utilizados en los ensayos para la detección de las mutaciones cromosómicas son aquellos que presentan cariotipos estables, tasas de mutación estables, tienen una dotación cromosómica diploide normal y provienen directamente de los tejidos de algún organismo; estas son consideradas como cultivos celulares primarios. Además, cuando a partir de cultivos primarios, se han modificado algunas condiciones de cultivo que permitan el mantenimiento durante algunas semanas o en forma indefinida, los cultivos resultantes son agrupados como cultivos celulares secundarios. Entre los tipos celulares empleados en los ensayos para la detección de mutaciones, los linfocitos humanos de sangre periférica y linfoblastos de la línea *TK6* están entre los más usados (Channarayappa *et al.*, 1990; Borrás *et al.*, 2004; Drobna *et al.*, 2004; Akerman *et al.*, 2005; Honma 2005).

1.2.4.1. Linfocitos humanos de sangre periférica

Los linfocitos forman parte de la línea linfoide del sistema inmune y juegan un papel importante en la defensa del organismo frente a agentes externos, se encuentran en circulación permanente y poseen una amplia distribución en el organismo, con lo cual se han considerado excelentes indicadores de los procesos que ocurren dentro de cada organismo. Se cultivan fácilmente en condiciones *in vivo* e *in vitro*. En estudios de genotoxicidad los linfocitos presentan algunas ventajas, reflejan más confiablemente la situación *in vivo*, como consecuencia de la presencia de los componentes de la sangre, los cuales juegan un papel importante en la activación metabólica de los promutágenos o en la degradación del posible agente genotóxico (Köteles *et al.*, 1993; Radack *et al.*, 1995; Borrás *et al.*, 2004).

1.2.4.2. Línea celular TK6

La línea celular linfoblastoide *TK6*, aunque inicialmente fue utilizada para el ensayo de mutación génica en el locus timidina quinasa, luego, se ha utilizado para la detección de mutaciones cromosómicas. Esta línea fue desarrollada a partir de una línea celular parenteral, la línea WI – L2 transformada por el virus Epstein – Barr, la cual fue originalmente derivada a partir del hígado de un niño de 5 años con esferocitosis hereditaria. Primero fue aislado el agente *HH4*, el cual tuvo una elevada eficiencia para la formación de colonias sin la presencia de una capa alimentadora (o sustrato), y se mutagenizó con el clon *ICR191* produciendo una línea celular heterocigota denominada *TK6*. Las células *TK6* son casi diploides y el cariotipo representativo es 47, XY, 13+, t(14;20), t(3, 21), el gen *TK* está localizado en la región subtelomérica del cromosoma 17q.

Esta línea celular presenta una frecuencia de mutación espontánea de $3,3 \times 10^{-6}$, por lo cual se convierte en una población celular conveniente para los estudios de genotóxicos debido a su estabilidad genética, facilidad en el cultivo, especialmente en suspensión y presenta una frecuencia espontánea de *MN* estimada cerca de 1,1%, muy parecida a la de los linfocitos humanos (Menzel *et al.*, 1999; Guillamet *et al.*, 2004; Schwartz *et al.*, 2004; Akerman *et al.*, 2005).

2. OBJETIVOS

El desarrollo de técnicas rápidas, fiables y sencillas es muy importante para estudiar los posibles efectos mutagénicos y detectar la capacidad aneugénica y clastogénica, producidos por la exposición a agentes ambientales físicos y/o químicos; ambos procesos están causalmente relacionados con abortos espontáneos, retardo mental, desarrollo del cáncer y otras anomalías de la salud humana.

El arsénico es un agente químico relacionado con los incrementos en la incidencia de diversos tipos de cáncer; sin embargo, no se conocen muy bien los mecanismos involucrados en su génesis, por lo cual los objetivos de esta investigación son:

1. Determinar la potencialidad genotóxica de diversos compuestos de arsénico (incluyendo inorgánicos y sus formas metiladas) con el ensayo de micronúcleos utilizando cultivos de células humanas.
2. Estudiar la posible acción aneugénica y clastogénica de los compuestos analizados, determinando el origen de los micronúcleos inducidos mediante la técnica *FISH*, utilizando sondas pancentroméricas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. COMPUESTOS

Se utilizaron los siguientes compuestos arsenicales: Arsenito de sodio (*iAS*) (Sigma, Referencia PS429), Acido dimetilarsénico (*DMA*) (Sigma, Referencia C-0125), ácido monometilarsénico (*MMA*) (Sigma, Referencia 3141-12-6); Mitomicina C (*MMC*) (Sigma, Referencia M-0503) y Griseofulvina (*GF*) (Sigma, Referencia 126-07-8).

Para el ensayo de micronúcleos en células *TK6* y linfocitos de sangre periférica: Citocalasina *B* (proveniente de *H. dematioideum*, 98 %, Sigma, Referencia C6762), Medio líquido *RPMI* 1640 (con 25 MM *HEPES* buffer con *L*-glutamina, Lab Clinics, Referencia E-15-842), Suero fetal bovino (*FBS*, probado para micoplasma y virus, Lab Clinics, Referencia A15-043), *L*-glutamina (200 mM-100x, Lab Clinics, Referencia M11-004), Fitohemaglutinina (liofilizada, Gibco, Referencia 10576-056) para linfocitos de sangre periférica; y los antibióticos Penicilina/Estreptomina (solución 500 unidades-5000 µg/mL, Lab Clinics, Referencia P11-010) y Anfotericina *B* (250 UG/mL, Lab Clinics, Referencia P11-001).

Para la tinción de las células se utilizó Trypan blue (solución 0,4 %, Sigma, Referencia T8154) y el colorante Giemsa (azul-eosina / azul de metileno en solución para microscopia, Merck, Referencia 1.09204.0500) diluido en solución fosfatada con Sodio fosfato dibásico 12-hidrato (PA, Panreac, Referencia 131678) y Potasio fosfato monobásico (Panreac, Referencia 122018).

Para la técnica de hibridación *in situ* fluorescente: Sonda pericentromérica (α satélite), Esperma de arenque (liofilizado, Boehringer), los anticuerpos Monoclonal *anti-digoxigenina* clone *DI-22*

(Sigma, Referencia D-8156), *Anti-mouse IgG FITC* (Sigma, Referencia F 2883), *Anti-sheep IgG FITC* (Sigma, Referencia F-7634) y el Reactivo de bloqueo (Roche, Referencia 1096176).

3.2. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN LA LÍNEA CELULAR TK6

El cultivo de las células linfoblastoides *TK6*, se lavó dos días antes de comenzar la prueba de micronúcleos, centrifugando el cultivo durante 10 minutos a 1200 rpm y resuspendiendo las células en medio *RPMI* suplementado (Tabla 3.1); luego se determinó la densidad celular con una cámara de *Newbauer* usando *Trypan blue* como colorante; este cultivo fue mantenido durante dos días, con recambio de medio a las 24 horas, a 37 °C en una cámara con 5% de CO₂.

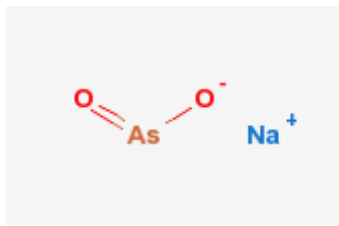
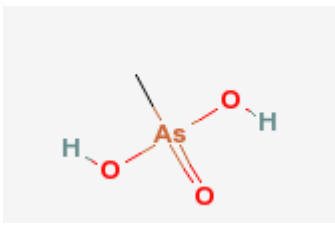
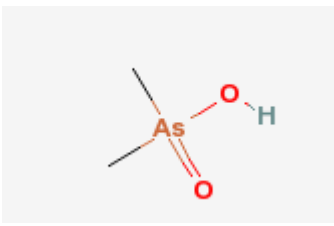
Este cultivo fue utilizado para el ensayo de micronúcleos en células *TK6* de la siguiente manera: En frascos de cultivo estériles se colocaron alícuotas de cultivo celular correspondiente a una concentración celular final de 0,5 x10⁶ cel/mL añadiendo medio de cultivo nuevo hasta alcanzar un volumen total de 3 mL.

Tabla 3.1. Composición del medio de cultivo para la línea *TK6*.

Componente	Cantidad (mL/ 100 ml volumen final)
Medio <i>RPMI</i> 1640 con <i>HEPES</i>	88,5
Suero fetal de bovino (<i>FCS</i>)	10
<i>L</i> -glutamina (200 nM)	1,0
Penicilina/Estreptomicina (500 U/mL)	0,5
Anfotericina <i>B</i> (250 U/mL)	1,0

Al inicio del cultivo se adicionaron 30 μL de arsenito sódico (*iAs*), monometilarsénico (*MMA*), o dimetilarsénico (*DMA*) (Tabla **3.2**) y citocalasina C, respectivamente, a cada frasco de cultivo. Los frascos se agitaron cuidadosamente y se colocaron en un incubador con atmósfera de 5 % de CO_2 a 37 °C durante un tiempo de 48 horas.

Tabla **3.2**. Concentraciones de *iAs*, *MMA*, *DMA* (μM) utilizadas en el ensayo de núcleos con las células *TK6*.

<i>iAs</i>	<i>MMA</i>	<i>DMA</i>
		
0,01	0,01	10
0,05	0,05	50
0,1	0,1	100
0,5	0,5	500
1	1	1000
5	2,5	5000
10	5	10000

Posteriormente, se realizó la fijación de las células, preparación de los portaobjetos, tinción con Giemsa (10% en tampón fosfato, pH 6,8) y codificación para la posterior evaluación en el microscopio óptico, con un aumento de 1000x, siguiendo los criterios publicados por Fenech (2000).

Como control positivo para clastogenicidad se utilizó una concentración de la mitomicina C de 0,3 μM y como control para aneugenicidad se utilizó una concentración de 40 μM de griseofulvina.

Se contaron hasta 500 células para determinar la distribución de células según el número de núcleos y hasta 1000 células binucleadas según el número de micronúcleos, con un microscopio óptico (Leitz Aristoplan), utilizando un ocular de 10x y un objetivo de 100x; tomando nota de la localización en cada portaobjetos al inicio y al final de cada recuento. Los valores fueron registrados en una plantilla y se usaron para calcular el porcentaje de células binucleadas y el índice de proliferación celular (CBPI), una vez descodificadas las preparaciones.

El CBPI fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{CBPI} = \text{M1} + 2\text{M2} + 3(\text{M3} + \text{M4}) / \text{N}$$

En donde:

M1: número de células mononucleadas.

M2: número de células binucleadas.

M3: número de células trinucleadas.

M4: número de células tetranucleadas.

N: número total de células contadas.

3.3. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS CON LINFOCITOS HUMANOS

El protocolo básico para el recuento de *MN* en sangre periférica fue seguido de acuerdo con Ramírez *et al.*, (1997). Se colocó 0,5 mL de sangre en medio de cultivo *RPMI* 1640 suplementado (Tabla **3.1**) y con fitohemaglutinina (1%), para la estimulación del crecimiento de los linfocitos y se incubó en estufa a 37°C con 5% CO_2 . Al cumplirse las primeras 24 horas se añadió el tratamiento (50 μL) y después de 44 horas, el cultivo celular se sometió a la acción de la citocalasina-B (concentración final 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Al término de 72 horas se finalizaron

los cultivos mediante un centrifugado inicial a 800 rpm durante 8 minutos y, luego de descartar el sobrenadante y resuspender el botón celular, se sometieron las células a un choque hipotónico con cloruro de potasio (*KCl*, 0,075 M) a 4°C, agitando en un vórtex, favoreciendo la turgencia de los citoplasmas mediante un proceso osmótico donde la concentración de iones del medio es menor que en el interior de la célula y eliminando el resto de componentes celulares. Se realizó otro centrifugado en las condiciones iniciales y luego se descartó el sobrenadante y se resuspendió el nuevo botón celular.

Luego, se fijaron las células con tres lavados sucesivos con una solución fresca de metanol: ácido acético glacial (3:1) y se tiñeron las preparaciones con Giemsa (10% Giemsa en solución tampón de fosfato (pH 6,8) durante 10 min. Las preparaciones se sellaron con cubreobjetos y Entellan. Posteriormente se visualizaron al microscopio óptico (1000x). El conteo fue realizado de acuerdo con el protocolo para las células *TK6*.

3.4. TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE

La técnica de hibridación *in situ* fluorescente (*FISH*) con sonda pancentromérica se llevó de acuerdo con Ramírez *et al.*, (1999). El material fijado fue goteado sobre portaobjetos, secados a temperatura ambiente *overnight* y almacenados a -20°C hasta el desarrollo de la técnica. Los portaobjetos se deshidrataron en lavados sucesivos de etanol al 70, 90 y 100 % durante 3 minutos cada lavado. Luego, los portaobjetos fueron desnaturalizados en formamida (70% en solución salina de citrato de sodio, SSC, 20x), durante 5 minutos a una temperatura de 70 °C en un baño de María. Luego, se lavaron los portaobjetos en etanol frío al 70% durante 5 minutos y se deshidrataron con lavados secuenciales con etanol 90 y 100 % y se dejaron secar al aire. Posteriormente, se adicionó la mezcla de

hibridación (sonda de *DNA* y *DNA* de esperma de arenque en SSC 20x). La sonda de *DNA* utilizada para distinguir los micronúcleos conteniendo cromosomas completos o solo fragmentos acéntricos fue una sonda oligomérica sintética pancentromérica (SO- α All Cen) con la secuencia 5'GTTTTGAAAC¹⁰ACTCTTTTGG²⁰TAGAATCTGC-3' (MWG-Biotech), marcado con digoxigenina, la cual hibrida con la región centromérica de todos los cromosomas humanos.

Los portaobjetos con la mezcla de hibridación se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron con pegamento, se colocaron en una cámara húmeda y se llevaron a una estufa a 37°C *overnight*. Luego de la hibridación *overnight* se realizaron lavados en SSC 6x, tres lavados a temperatura ambiente por 10 minutos cada uno y luego una vez a 40 – 42 °C durante 5 minutos. Posteriormente, los portaobjetos se lavaron en SSC4x-Tween 20 (0,1%) a temperatura ambiente por 5 minutos y se incubaron con reactivo de bloqueo (1%) en cámara húmeda durante 15 minutos a 37 °C.

Luego de un lavado en SSC 4x-Tween 20 a temperatura ambiente durante 5 minutos con agitación, la sonda marcada con digoxigenina se inmunodetectó usando un anticuerpo antidigoxigenina monoclonal de ratón, seguido de un anti-ratón conjugado con FITC de oveja y un anticuerpo secundario anti-oveja conjugado con FITC de burro. Luego de cada incubación, se realizaron tres series de lavados en SSC 4x-Tween 20 durante 5 minutos. Finalmente los portaobjetos se lavaron con PBS y el material nuclear se contratiñó con solución *antifade* Vectashiel (Vector Lab) conteniendo 4',6'-diamidino-2-fenilindol (*DAPI*) más yoduro de propidio (*PI*).

Todos los portaobjetos se almacenaron a 4°C hasta el análisis microscópico, el cual se realizó con un microscopio Olympus BX-50 equipado con una lámpara de mercurio de 100 W y con un objetivo

de 1000x con apertura de iris. Se contaron 100 células con micronúcleos, en cada portaobjeto replicado, para los cultivos control y tratamientos. Los micronúcleos se clasificaron como centrómero positivo (*MNC+*) o negativo (*MNC-*), considerando la relación de señales centroméricas observadas.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos en la detección de micronúcleos se analizaron con pruebas de análisis estadístico, Chi cuadrado (X^2) ($p < 0,001$) para detectar diferencias entre las distribuciones de las células (de acuerdo con el número de núcleos) expuestas y control, y la prueba de Fisher para evaluar las diferencias entre el número de micronúcleos producidos en las células tratadas con arsénico, mitomicina C como agente clastógeno y la griseofulvina como agente aneunógeno, y el control. Ambas pruebas están incluidas en el Programa de análisis estadístico G-Stat versión 2.0 (Letón *et al.*, 2002).

4. RESULTADOS

4.1. CÉLULAS TK6 EXPUESTAS AL ARSENITO DE SODIO

La Tabla **4.1** presenta la distribución de las células *TK6* expuestas a diferentes concentraciones de arsenito de sodio (*iAs*), 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5 y 10 μM , expresada en porcentajes, así como el control negativo (agua destilada estéril) y control positivo mitomicina *C* (*MMC*, 0,3 μM). Los porcentajes de células mono-, bi-, tri- y tetranucleada, se expresan como porcentaje de células binucleadas o como el índice de proliferación celular con bloqueo de citocinesis (CBPI). Los resultados indicaron una tendencia similar entre las distribuciones de las células expuestas a diferentes concentraciones de *iAs* y el control positivo (*MMC*) al ser comparados con el control negativo (H_2O). El porcentaje de células binucleadas (% BN) observado para el control negativo fue de 51,8, este valor ha sido utilizado como Referencia para establecer las comparaciones entre el control positivo y las diferentes concentraciones de *iAs* utilizadas en esta investigación, el porcentaje de células mono-, tri- y tetranucleadas fue de 11,2, 7,4 y 29,8 %, respectivamente.

La concentración más elevada (10 μM) se consideró como tóxica debido a que no se observaron células completas en las preparaciones. Las células *TK6* expuestas a la concentración 5 μM presentaron un porcentaje de mononucleadas de 71,2 % y no se observó la presencia de células tri- y tetranucleadas, lo que indica la detención en el ciclo celular por parte del *iAs*. Un comportamiento similar se observó con las células expuestas a la *MMC* (control positivo) con un 35,8 % de células mononucleadas y un valor muy bajo de tri- y tetranucleadas, 1,4 y 0,6 %, respectivamente. Los resultados obtenidos con las concentraciones de 0,01 a 1 μM presentaron valores cercanos al observado en el control negativo con

respecto al porcentaje de células mono-, tri- y tetranucleadas, lo cual indica que el *iAs* a estas concentraciones no induce la detención del ciclo celular. Respecto a la significación de los efectos inducidos por el *iAs*, la distribución de las células de acuerdo con el número de núcleos mostró diferencias significativas con la prueba de Chi cuadrado (X^2) para todas las concentraciones ensayadas de *iAs* en comparación con el control negativo.

También se observó la disminución del valor de CBPI con respecto al aumento de las concentraciones de *iAs*, lo cual puede indicarse como evidencia de la detención del ciclo de división en las células *TK6* expuestas. La distribución porcentual de las células binucleadas de las *TK6* de acuerdo con el número de micronúcleos (*MN*), expuestas a diferentes concentraciones de arsenito de sodio, teniendo como control positivo de micronúcleos, los inducidos por la *MMC*, se presenta en la Tabla **4.2**. Puede observarse el incremento significativo ($p \leq 0,001$) de *MN* con el control de *MMC*, con un 7,7 %, en comparación con el control negativo (agua destilada estéril) con 1,7 % de *MN* en las células binucleadas. Todas las concentraciones de *iAs* ensayadas presentan porcentajes inferiores al valor alcanzado por la *MMC*. La concentración de 0,01 μM de *iAs* obtuvo el valor más bajo, de 0,1 % y la concentración de 5 μM presentó un 2,6 % de *MN*, y no hubo diferencias significativas con respecto al control negativo. Con la concentración más alta de *iAs* ensayada, 10 μM , no se observaron células binucleadas completas, por lo que no aparece registrada en la tabla. La exposición de las células *TK6* al *iAs* en las condiciones ensayadas en esta investigación no indujeron la producción de micronúcleos en un número significativamente mayor que el valor observado para el control negativo, esto parece indicar que las éstas células son capaces de resistir el efecto producido por el arsenito de sodio.

Tabla 4.1. Distribución porcentual de células *TK6*, expuestas a *iAs* según el número de núcleos.

Tratamiento	Concentración (μM)	N1	N2	N3	N4	% BN	CBPI	P
C+	0	11,2	51,8	7,4	29,6	51,8	2,258	
C-	0,3	35,8	62,2	1,4	0,6	62,2	1,662	***
<i>iAs</i>	0,01	12,2	37,6	9,8	40,4	37,6	2,38	***
	0,05	9,8	51	4,2	35	51	2,294	*
	0,1	7	50,6	5,2	37,2	50,6	2,354	*
	0,5	12,2	62,4	4,4	21	62,4	2,132	***
	1	11,6	62,4	4,8	21,2	62,4	2,144	***
	5	71,2	28,8	0	0	28,8	1,288	***
	10	0	0	0	0	0	0	Tóxico

C+: Control negativo, agua.

C-: Control positivo, *MMC*.

N1: Células mononucleadas.

N2: Células binucleadas.

N3: Células trinucleadas.

N4: Células tetranucleadas.

%BN: Porcentaje de células binucleadas.

CBPI: Índice de proliferación celular con bloqueo de citocinesis.

P: Significación estadística.

*: $p \leq 0,05$.

***: $p \leq 0,001$.

Tabla 4.2. Distribución de células *TK6* binucleadas expuestas a *iAs*, de acuerdo al número de *MN*.

Tratamiento	Concentración (μM)	MN0	MN1	MN2	MN3	MN>3	MNt	BNMN	P
C-H ₂ O	0	98,3	1,7	0	0	0	1,7	1,7	
C-MMC	0,3	92,7	6,9	0,4	0	0	7,7	7,3	***
<i>iAs</i>	0,01	99,9	0,1	0	0	0	0,1	0,1	NS
	0,05	98,8	1	0,2	0	0	1,4	1,2	NS
	0,1	99	0,9	0,1	0	0	1,1	1	NS
	0,5	98,1	1,8	0	0	1	2,2	1,9	NS
	1	98,7	1,2	0,1	0	0	1,4	1,3	NS
	5	97,4	2,3	0,2	0	1	3,1	2,6	NS

C-: Control negativo, agua.

C+: Control positivo, *MMC*.

MN0: Células binucleadas sin micronúcleos (*MN*).

MN1: Células binucleadas con 1 *MN*.

MN2: Células binucleadas con 2 *MN*.

MN3: Células binucleadas con 3 *MN*.

MN>3: Células binucleadas con más de 3 *MN*.

MNt: Número de *MN* totales.

BNMN: Número de células binucleadas con *MN*.

P: Significación estadística.

NS: no significativo.

***: $p \leq 0,001$.

4.2. CÉLULAS TK6 EXPUESTAS AL MONOMETILARSÉNICO

En la Tabla **4.3**, se presenta la distribución de células *TK6* de acuerdo con el número de núcleos, expuestas a las concentraciones de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5 y 5 μM de monometilarsénico (*MMA*), así como los valores correspondientes al control negativo y positivo (*MMC*, 0,3 μM). Las células *TK6* correspondientes al control negativo alcanzaron una distribución de 14,8 % de mononucleadas, 57,4 % de binucleadas, y un 7,8 y 20 % de células tri- y tetranucleadas, respectivamente. La distribución para las células *TK6* pertenecientes al control positivo presentaron una distribución de 44,8 % de mononucleadas, 53,6 % de binucleadas, 1,6 y 0 % de tri- y tetranucleadas, lo que indica la detención significativa del ciclo de división celular de este cultivo. Las concentraciones de 0,01, 0,05 y 0,1 μM presentaron una distribución celular similar a la presentada por el control negativo.

Sin embargo, existen diferencias significativas ($p < 0,001$) al observar el *CBPI* el cual incrementa con el aumento de la concentración del *MMA*, indicando que estas concentraciones no produjeron la detención del ciclo celular. Las concentraciones 0,5 a 5 μM de *MMA* resultaron tóxicas para las células *TK6*, lo cual fue evidenciado por la ausencia de células con citoplasmas completos en las preparaciones.

Puede observarse en la Tabla **4.4** que las concentraciones de 0,01, 0,05 y 0,1 μM de *MMA* son capaces de producir mayor cantidad de micronúcleos en las células binucleadas, de 1,9, 2,8 y 1,2 %, respectivamente con diferencias significativas para las concentraciones de 0,01 y 0,05 μM , sólo la concentración de 0,1 μM no presentó diferencias significativas en relación con los *MN* registrados en el control negativo (0,8 % de *MN* en las células binucleadas).

Tabla 4.3. Distribución porcentual de células según el número de núcleos, expuesta al *MMA*.

Tratamiento	Concentración (μM)	N1	N2	N3	N4	% BN	CBPI	P
C-	0	14,8	57,4	7,8	20	57,4	2,13	
C+	0,3	44,8	53,6	1,6	0	53,6	1,568	***
<i>MMA</i>	0,01	10	55,8	7	27,2	55,8	2,242	*
	0,05	8,6	48,6	7,4	35,4	48,6	2,342	***
	0,1	8	38,2	8,2	45,6	38,2	2,458	***
	0,5	0	0	0	0	0	0	Tóxico
	1	0	0	0	0	0	0	Tóxico
	2,5	0	0	0	0	0	0	Tóxico
	5	0	0	0	0	0	0	Tóxico

C-: Control negativo, agua.

C+: Control positivo, *MMC*.

N1: Células mononucleadas.

N2: Células binucleadas.

N3: Células trinucleadas.

N4: Células tetranucleadas.

%BN: Porcentaje de células binucleadas.

CBPI: Índice de proliferación celular con bloqueo de citocinesis.

P: Significación estadística.

*: $p \leq 0,05$.

***: $p \leq 0,001$.

Tabla 4.4. Distribución de células *TK6* binucleadas expuestas a *MMA*, de acuerdo al número de *MN*.

Tratamiento	Concentración (μM)	MN0	MN1	MN2	MN3	MN>3	MNt	BNMN	P
C-	0	99,2	0,7	0,1	0	0	0,9	0,8	
C+	0,3	81,2	14,1	4,5	0,2	0	23,7	18,8	***
<i>MMA</i>	0,01	98,1	1,9	0	0	0	1,9	1,9	*
	0,05	97,2	2,5	0,3	0	0	3,1	2,8	***
	0,1	98,8	1,2	0	0	0	1,2	1,2	NS

C-: Control negativo, agua.

C+: Control positivo, *MMC*.

MN0: Células binucleadas sin micronúcleos (*MN*).

MN1: Células binucleadas con 1 *MN*.

MN2: Células binucleadas con 2 *MN*.

MN3: Células binucleadas con 3 *MN*.

MN>3: Células binucleadas con más de 3 *MN*.

MNt: Número de *MN* totales.

BNMN: Número de células binucleadas con *MN*.

NS: no significativo.

P: Significación estadística.

*: $p \leq 0,05$

***: $p \leq 0,001$

4.3. CÉLULAS TK6 EXPUESTAS AL DIMETILARSÉNICO

En la Tabla **4.5**, se presenta la distribución de las células *TK6* de acuerdo con el número de núcleos presentes, expuestas al dimetilarsénico (*DMA*) en concentraciones de 10, 50, 100, 500, 1000, 5000 y 10000 μM , el control negativo y el control positivo (*MMC*, 0,3 μM), expresados en porcentajes.

Las células correspondientes al control negativo presentaron un 10,6 % de mononucleadas, 39 % de binucleadas, 14 % de trinucleadas y 36,4 de tetranucleadas. Para el control positivo se obtuvo un 16,6 % de células mononucleadas, 71,4 % de binucleadas, 3,8 % de trinucleadas y 36,4 % de tetranucleadas, encontrándose diferencias significativas respecto a los resultados obtenidos para los controles, en las condiciones de este ensayo.

Las concentraciones de 10, 50, 100, 500 y 1000 μM de *DMA* indujeron una distribución de células similar al observado en el control negativo. Los valores correspondientes al CBPI para cada concentración ensayada también son semejantes al índice de proliferación de células del control negativo y no presentaron diferencias significativas como resultado de la prueba X^2 .

Las concentraciones de 5000 y 10000 μM resultaron tóxicas para las células *TK6*, puesto que no se logró observar células contables en las preparaciones. Los resultados del *DMA* sobre la producción de micronúcleos en las células *TK6* binucleadas puede observarse en la Tabla **4.6**. El control negativo presenta un valor de 1,8 %, a partir del cual se realizaron las comparaciones con el resto de tratamientos realizados con la *MMC* como control positivo y las diferentes concentraciones de dimetilarsénico (*DMA*).

Tabla 4.5. Distribución de células según el número de núcleos, expuesta a *DMA*.

Tratamiento	Concentración (μM)	N1	N2	N3	N4	%BN	CBPI	P
C-	0	10,6	39	14	36,4	39	2,398	
C+	0,3	16,6	71,4	3,8	8,2	71,4	1,954	***
<i>DMA</i>	10	9,4	46,8	8,6	35,2	46,8	2,344	NS
	50	7	38,8	17	37,2	38,8	2,472	NS
	100	7,6	43,2	14,6	34,6	43,2	2,416	NS
	500	7,4	42	10,4	40,2	42	2,432	NS
	1000	10,2	42	9,4	38,4	42	2,376	NS
	5000	0	0	0	0	0	0	Tóxico
	10000	0	0	0	0	0	0	Tóxico

C-: Control negativo, agua.

C+: Control positivo, *MMC*.

N1: Células mononucleadas.

N2: Células binucleadas.

N3: Células trinucleadas.

N4: Células tetranucleadas.

%BN: Porcentaje de células binucleadas.

CBPI: Índice de proliferación celular con bloqueo de citocinesis.

P: Significación estadística.

NS: No significativo.

***: $p \leq 0,001$

Tabla 4.6. Distribución de células *TK6* binucleadas expuestas a *DMA*, de acuerdo al número de *MN*.

Tratamiento	Concentración (μM)	MN0	MN1	MN2	MN3	MN>3	MNt	BNMN	P
C-	0	98,2	1,6	0,2	0	0	2,0	1,8	
C+	0,3	94,5	5,1	0,3	0,1	0	6,0	5,5	***
<i>DMA</i>	10	97,9	1,9	0,2	0	0	2,3	2,1	NS
	50	96,7	3,1	0,2	0	0	3,5	3,3	NS
	100	98,1	1,8	0,1	0	0	2	1,9	NS
	500	97,6	2,2	0,1	0,1	0	2,7	2,4	NS
	1000	98,3	1,7	0	0	0	1,7	1,7	NS

C-: Control negativo, agua.

C+: Control positivo, *MMC*.

MN0: Células binucleadas sin micronúcleos (*MN*).

MN1: Células binucleadas con 1 *MN*.

MN2: Células binucleadas con 2 *MN*.

MN3: Células binucleadas con 3 *MN*.

MN>3: Células binucleadas con más de 3 *MN*.

MNt: Número de *MN* totales.

BNMN: Número de células binucleadas con *MN*.

NS: no significativo.

P: Significación estadística.

***: $p \leq 0,001$

Puede observarse que el control positivo alcanzó un valor de 5,5 % de *MN* en las células binucleadas, al cual es significativamente mayor que el valor obtenido por el control negativo ($p \leq 0,001$). Al comparar los resultados obtenidos con las diferentes concentraciones de *DMA* aplicadas y el control negativo se observa que no hubo una producción de *MN* significativamente superior, con lo cual se puede indicar que bajo las condiciones de esta investigación, las células *TK6* resisten el posible efecto genotóxico del *DMA*.

4.4. LINFOCITOS DE SANGRE HUMANA EXPUESTAS AL ARSENITO DE SODIO

Debido a la poca producción de micronúcleos inducidos por las concentraciones aplicadas en esta investigación de arsenito de sodio, monometilarsénico y dimetilarsénico en las células *TK6*, se emplearon linfocitos de sangre humana para la detección de *MN* inducidos por el arsenito de sodio, utilizando la concentración de 4 μM , reportada en la literatura como suficiente para alcanzar un número significativo de *MN* y los controles positivo y negativo (Tabla 4.7).

Puede observarse que la cantidad de células *TK6* binucleadas presenta una distribución porcentual significativamente mayor (60,6) en comparación con el control negativo (31%), sin embargo, con relación con el control positivo (70,4 %) es menor. Con la exposición de linfocitos a la misma concentración de arsenito de sodio (4 μM) se obtuvo un valor de BN de 13 %, el cual resultó significativamente menor (13 %) que el valor observado con el control negativo (34,5 %) y en comparación con el control positivo (5%) resultó mayor.

Tabla 4.7. Distribución porcentual de linfocitos y *TK6*, según el número de núcleos, expuestas a *iAs*.

Cultivo celular	Tratamiento	Concentración (μM)	N1	N2	N3	N4	% BN	CBPI	P
<i>TK6</i>	C-	0	6,2	31	17	45,8	31	2,566	
	C+	0,3	17,6	70,4	5,4	6,6	70,4	1,944	***
	<i>iAs</i>	4	37,6	60,6	1,2	0,6	60,6	1,642	***
Linfocitos	C-	0	10,6	34,5	1,2	2,8	34,5	1,426	
	C+	0,3	95,6	5	0,4	0	5	1,02	***
	<i>iAs</i>	4	61,4	13	0	0	13	1,13	***

C-: Control negativo, agua.

C+: Control positivo, *MMC*.

N1: Células mononucleadas.

N2: Células binucleadas.

N3: Células trinucleadas.

N4: Células tetranucleadas.

%BN: Porcentaje de células binucleadas.

CBPI: Índice de proliferación celular con bloqueo de citocinesis.

P: Significación estadística.

NS: No significativo.

***: $p \leq 0,001$

Mientras que no se observan células tri- y tetranucleadas en ambos casos. Se observa asimismo, que el índice de proliferación disminuye en ambos casos en forma significativa. Sin embargo, al comparar el porcentaje de células *TK6* BNMN con el control negativo (3,7 %) y con el control positivo (9%)se observa un valor inferior de 2 %, el cual resultó no significativo y pone de manifiesto el poco efecto que ejerce el arsenito de sodio en las *TK6* para la inducción de los *MN*. Al comparar el valor obtenido en los linfocitos se observa un 7,8 %, significativamente superior a los arrojados en el control negativo (0,3 %) y en el control positivo (6,7 %). Este comportamiento indica que los linfocitos son susceptibles a la capacidad que tiene el arsenito de sodio para la producción de *MN*, como puede observarse en la Tabla **4.8**.

4.5. MECANISMO GENOTÓXICO DEL ARSENITO DE SODIO

Para la determinación del mecanismo genotóxico del arsenito de sodio se empleó el ensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre humana y en células *TK6* expuestas a una concentración de 4 μM , mitomicina C (0,3 μM) y griseofulvina (40 μM) y luego se aplicó la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (*FISH*) para la discriminación entre los *MN* producidos por mecanismos clastogénicos y aquellos inducidos por mecanismos aneugénicos.

La mitomicina C (*MMC*) fue empleada como control capaz de producir roturas de cromosomas (agente clastogénico) y la griseofulvina (*GF*) como control inductor de pérdidas de cromosomas completos (agente aneugénico) durante el ciclo de división celular. La presencia de señales fluorescentes en los *MN* se consideró como indicadora de la presencia de cromosoma completo (*MNC+*), mientras que la ausencia de señal fue tomada como indicio de que el *MN* estaba conformado solo por fragmentos de cromosomas (*MNC-*).

Tabla 4.8. Distribución porcentual de células *TK6* y linfocitos con *MN*, expuestas a *iAs*.

Cultivo de células	Tratamiento	Concentración (μM)	MN0	MN1	MN2	MN3	MN>3	MNt	BNMN	P
<i>TK6</i>	C-	0	96,3	3,5	0,2	0	0	3,9	3,7	
	C+	0,3	91	8	0,8	0,2	0	10,2	9	NS
	<i>iAs</i>	4	98	2	0	0	0	2,0	2	NS
Linfocitos	C-	0	99,7	3	0	0	0	0,3	0,3	
	C+	0,3	95,1	4,7	2	0	0	9,8	6,7	***
	<i>iAs</i>	4	92,2	6,7	1,1	0	0	8,9	7,8	***

C-: Control negativo, agua.

C+: Control positivo, *MMC*.

MN0: Células binucleadas sin micronúcleos (*MN*).

MN1: Células binucleadas con 1 *MN*.

MN2: Células binucleadas con 2 *MN*.

MN3: Células binucleadas con 3 *MN*.

MN>3: Células binucleadas con más de 3 *MN*.

MNt: Número de *MN* totales.

BNMN: Número de células binucleadas con *MN*.

NS: no significativo.

P: Significación estadística.

***: $p \leq 0,001$

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.9. Se observa que cuando las células *TK6* han sido expuestas a la *MMC* se observó una tendencia de clastogenicidad, debido a que alcanzó un 60 % de MNC- y 40 % de MNC+. Con respecto a la *GF*, el porcentaje de *MN* con señal positiva fue 92,5 % y para las *MN* con señal negativa fue 7,5 %, indicando una clara tendencia a la capacidad de inducir la pérdida completa de los cromosomas (papel aneugénico) y el *iAs* produjo un tendencia clara hacia la clastogenicidad. Mientras que los linfocitos expuestos a la *MMC* y a la *GF* produjeron un 32 y 97 % de aneugenicidad y con respecto a la clastogenicidad se observó un 68 y 3 %, respectivamente, en relación al arsenito de sodio mostraron un 53,7 % de *MN* con señal negativa y un 46,3 % de *MN* con señal positiva, lo cual indica una tendencia casi igual a la clastogenicidad que a la inducción de aneuploidía, en la literatura se encuentran tantos datos que clasifican al *iAs* como agente capaz de inducir la pérdida de cromosomas completos como de producir clastogenicidad.

Tabla 4.9. Distribución porcentual de micronúcleos presentes en linfocitos humanos expuestos a *iAs* y células *TK6* expuestas a *MMC* y *GF*, usando la técnica *FISH*.

Cultivo de células	Tratamiento	MNC +	MNC -
<i>TK6</i>	<i>iAs</i>	26	74
	<i>MMC</i>	40	60
	<i>GF</i>	92,5	7,5
Linfocitos	<i>iAs</i>	53,7	46,3
	<i>MMC</i>	32	68
	<i>GF</i>	97	3

MNC+: Micronúcleos que presentan centrómero con señal positiva.
MNC-: Micronúcleos que presentan centrómero con señal negativa.

5. DISCUSIÓN

El arsénico es un elemento identificado como carcinógeno para los seres humanos (Grupo 1; IARC, 2004) sobre la base de la evidencia existente del incremento de riesgo al cáncer en la piel entre pacientes expuestos al arsénico inorgánico por medio de tratamiento médico, y por el cáncer de pulmón, entre trabajadores de mineras y fundición de metales que inhalaban arsénico inorgánico. Este agente es capaz de inducir daños indirectos al *DNA* mediante la inhibición de mecanismos de reparación del *DNA*, aunque no se conoce con exactitud los procesos involucrados; asimismo los resultados de ensayos citogenéticos y moleculares realizados en condiciones *in vivo* e *in vitro* pueden reflejar el comportamiento del arsénico como un agente potencialmente genotóxico.

La exposición de células *TK6* a la concentración más elevada de *iAs* (10 μM) condujo a la muerte celular, con lo cual fue imposible encontrar células en condiciones aceptables de acuerdo con los criterios estandarizados (Fenech, 2000).

La misma situación se presentó para el tratamiento con *MMA* (0,5, 1, 2,5, 5 μM) y *DMA* (5000 y 10000 μM), indicando la distinta susceptibilidad del cultivo a las diferentes especies de arsénico en función de cada concentración aplicada. En relación al efecto ejercido por el *IAs* se observa la disminución significativa ($p \leq 0,001$) del ritmo de división celular en relación con el aumento de la concentración aplicada al cultivo; así, la concentración con el CBPI más baja (1,288) fue 5 μM que es a la concentración donde la disminución del CBPI es más drástica.

El *MMA* tiene un comportamiento extraño ya que todas las concentraciones ensayadas indujeron incrementos significativos del CPBI; sin embargo, al pasar de 0,1 a 0,5 μM se produce una toxicidad

completa. Un comportamiento similar se observa con el *DMA*, que aunque no indujo variaciones significativas en el índice de proliferación celular en el rango del 10 – 1000 μM , la concentración de 500 μM se observa una toxicidad completa con ausencia de división celular.

Se conoce que la proliferación celular incide sobre la formación de *MN*, por tanto la disminución en la frecuencia de *MN* podría ser una consecuencia de la detención del ciclo celular, como lo han reportado algunos autores (Seoane *et al.*, 1999, Ramírez *et al.*, 2003), relacionando al *iAs* con un efecto citostático, mediante el cual el arsenito es capaz de alterar negativamente la división celular, a través de la metilación del *DNA*, conduciendo a la reducción de células viables en los tratamientos (Basu *et al.*, 2001, Liu *et al.*, 2005). Hornhardt (2006) encontró resultados similares a los presentados en esta investigación, donde el arsenito sódico (10 μM) es capaz de inducir la muerte de células *TK6*, debido a la elevada toxicidad que representa esta sustancia, conduciendo la inhibición de la capacidad proliferativa.

La exposición de las células *TK6* al *MMA* resultó tener consecuencias más citotóxicas y genotóxicas que frente al *iAs* y al *DMA*, puesto que la concentración más alta en la cual pudieron realizarse los recuentos fue 0,1 μM . El *MMA* se ha citado como una sustancia muy tóxica desde el punto de vista citotóxico y genotóxico y un potente inhibidor de las enzimas involucradas en el mantenimiento del potencial redox (Sakurai *et al.*, 2004; Tapio *et al.*, 2005) en comparación con el arsenito, en condiciones similares a las realizadas en esta investigación, en donde la aplicación de 1 μM provocó la desaparición completa de las células.

El *DMA* es considerado como el metabolito final, producto de la metilación del arsenito, siendo capaz de ser detoxificado por la célula, sin la formación de daños graves. A bajas dosis este compuesto estimula la proliferación celular y a concentraciones tan elevadas como 1000 μM es capaz de no causar alteraciones significativas en el índice de proliferación celular (Sakurai *et al.*, 2004), de forma similar con los resultados obtenidos en esta investigación. Hughes *et al.*, (2002) citan que el *DMA* es un metabolito que no causa el arresto celular en concentraciones bajas (100 μM).

De nuestros resultados se deduce que la toxicidad de los compuestos de arsénico depende de su formulación, aunque se ha sugerido que el daño producido por el arsénico sobre la molécula de *DNA*, viene inducido principalmente, por la conversión metabólica inicial de las formas inorgánicas a especies metiladas (dimetilarsenicales) (Yamanaka *et al.*, 1997).

La técnica de inducción de micronúcleos es una de las herramientas más eficaces en la evaluación del efecto genotóxico de los diversos agentes, debido a que es capaz de ofrecer resultados confiables que aportan información sobre el daño directo en la molécula de *DNA* (Léonard, 1988; Champion *et al.*, 1995; Seoane *et al.*, 2000; Basu *et al.*, 2001; Lauwerys, 2001; Silbergeld, 2001; Mandal *et al.*, 2002; Baez *et al.*, 2003; Fenech *et al.*, 2003; Borrás *et al.*, 2004; Rosefort *et al.*, 2004; Zalacain *et al.*, 2005)

La exposición de las células *TK6* a *iAs*, *MMA* y *DMA* no produjeron efectos significativos para la inducción de micronúcleos, en relación los valores obtenidos en el control negativo indicando que, bajo las condiciones de esta investigación, la línea celular *TK6* es en cierta forma resistente al efecto genotóxico del arsénico y por lo tanto, la

cantidad de *MN* inducida en el ensayo no sobrepasa significativamente al valor que se alcanza con el control negativo.

Con la finalidad de explicar la poca inducción de *MN* en las *TK6* por parte del arsenito de sodio, se realizó un ensayo con linfocitos de sangre periférica, utilizando una concentración de 4 μM (Tablas **4.7** y **4.8**) en relación a la distribución de células de acuerdo con el número de núcleos y al número de *MN* presentes. Los resultados muestran que las *TK6* son efectivamente más resistentes que los linfocitos al efecto del arsenito, en las condiciones de esta investigación, indicando que cada tipo celular tiene una capacidad de respuesta diferente ante la exposición de cada agente potencialmente tóxico.

Hornhardt *et al.* (2006) trata de explicar este fenómeno, puesto que a diferencia de otros tipos celulares como linfocitos de sangre humana, células HeLa y HL-60, las células linfoblastoides *TK6* no sufren alteraciones sino a concentraciones de arsénico superiores a 10 μM . Una posible explicación para la acción del arsénico puede ser la influencia diferencial del estado redox del glutatión y de las enzimas antioxidativas, lo cual puede interferir con el efecto del arsénico, sugiriendo que el proteoma de las células *TK6* puede tener el rol de degradar las proteínas oxidadas especialmente bajo condiciones de estrés oxidativo.

Los posibles tipos de daño al material genético detectados por el ensayo de micronúcleos son la aneuploidía, que consiste en la pérdida de uno o más cromosomas completos en las células, originado por la no disyunción de uno o varios cromosomas en anafase, y la clastogenicidad, lo que implica rotura y la pérdida de fragmentos cromosómicos.

Este daño se evidencia fácilmente mediante la prueba de inducción de *MN* con bloqueo de la citocinesis vinculado con el empleo de la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (Moore *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1998; Seoane *et al.*, 1999; Maierhofer *et al.*, 2002; Le *et al.*, 2003; Schuler *et al.*, 2003)

El tratamiento de linfocitos humanos con arsenito sódico para la detección de *MN* con la técnica de hibridación *in situ* fluorescente para evidenciar el efecto aneugénico y/o clastogénico potencial de este agente, indica incrementos significativos en la frecuencia de micronúcleos (Tabla **4.9**); la evaluación del origen de los micronúcleos no indica una tendencia clara hacia la aneugenicidad, ni la clastogenicidad, con valores que se separan significativamente de los observados en los controles, por lo que no parece que el arsenito sódico tenga propiedades aneugénicas, como se ha citado a veces en la literatura.

En la literatura existe una abundante información relacionada con el papel genotóxico del arsenito sódico (Stybo *et al.*, 2000; Basu *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001; Basu *et al.*, 2002; Mandal 2002; Thomas *et al.*, 2002; Dopp *et al.*, 2004; Mourón *et al.*, 2005; Tapio *et al.*, 2005), en las cuales se presenta que este agente induce principalmente un efecto clastogénico (Hartwig *et al.*, 1997; Mäki-Paakkanen *et al.*, 1998; Mahata *et al.*, 2004).

Sin embargo, también numerosas investigaciones indican que el arsenito sódico es capaz de mostrar ambos efectos, de acuerdo con el tipo de estudio realizado (Vega *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1996; Gonsebatt *et al.*, 1997; Yih *et al.*, 1999; Ho *et al.*, 2000; Basu *et al.*, 2001; Rossman 2003; Raisuddin *et al.*, 2004; Rossman *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que el efecto aneugénico o clastogénico está relacionado en forma directa con el protocolo del ensayo, es decir, cuando el arsenito sódico es aplicado en un rango de dosis bajo (por ejemplo, 1,25 – 10 μM durante 24 hr) se observa la inducción de *MN* con señal positiva (MNC+), mientras que con el uso de un rango de dosis elevado (por ejemplo, 5 – 80 μM durante 4 hr) es capaz de inducir *MN* con señal negativa (MNC-) (Ho *et al.*, 2000; Rossman 2003; IARC, 2004; Rossman *et al.*, 2004).

Probablemente este comportamiento se relaciona con el daño en el *DNA* causado por el arsenito sódico y podría explicarse considerando la evidencia experimental de su efecto genotóxico, por medio de la inhibición de algunas enzimas y proteínas involucradas en la reparación y expresión del *DNA*; así como por la inducción de especies de oxígeno reactivas (ROS) capaces de intervenir en el daño potencial sobre la molécula del *DNA* (Moore *et al.*, 1996; Saleha *et al.*, 2001; Raidussin *et al.*, 2004). Ambas características contribuyen significativamente a la carcinogénesis (Yih *et al.*, 1999).

CONCLUSIONES

De los resultados discutidos en esta investigación se deducen las siguientes conclusiones:

1. Los datos obtenidos con las células *TK6* expuestas a las distintas formas químicas del arsénico no presentaron resultados concluyentes, con respecto al ensayo de detección de micronúcleos.
2. Los linfocitos presentaron una mejor respuesta al efecto producido por el arsenito de sodio, en la producción de micronúcleos.
3. El uso de la técnica de hibridación *in situ* fluorescente acoplada con la prueba de micronúcleos no produjo resultados concluyentes con relación al papel aneugénico y clastogénico de las formas químicas del arsénico.

LITERATURA

- Agreda, O., Rojas, M. Sarmiento, A. Evaluación diagnóstica del contenido de arsénico en las fuentes de abastecimiento de agua potable del Estado Carabobo, Venezuela. *Gaceta Médica de Caracas*, 113: 58 – 64 (2005).
- Akerman, G., Rosenzweig, B., Domon, O., Isai, C., Bishop, M., McGarrity, L., MacGregor, J., Sistare, F., Chen, J., Morris, S. Alterations in gene expression profiles and the DNA - damage response in ionizing radiation - exposed *TK6* cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45: 188 – 205 (2005).
- Al - Baker, E., Oshin, M., Hutchison, C., Kill, I. Analysis of UV - induced damage and repair in young and senescent human dermal fibroblasts using the comet assay. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126: 664-672 (2005).
- Aragonez, N., Palacios, M., Avello, M., Gomez, P., Martinez, M., Rodriguez, M. Nivel de arsénico en abastecimientos de agua de consumo de origen subterráneo en la comunidad de Madrid. *Revista Española de Salud Pública*, 75; 421 – 432 (2001).
- Bae, S., Gennings, C., Carter, W., Yang, R. Campain, J. Toxicological interactions among arsenic, cadmium, chromium, and lead in human keratinocytes. *Toxicological Sciences*, 63: 132 – 142 (2001).
- Baez, O., Prieto, F. Genotoxic damage in zebra *FISH (Danio rerio)* by arsenic in waters from Zimapán, Hidalgo, México. *Mutagenesis*, 20: 291 – 295 (2003).

- Barraqué, B. Past and future sustainability of water policies in Europe. *Natural Resources Forum*, 27: 200 – 211 (2003).
- Basu, A., Mahata, J., Gupta, S., Giri, A. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutation Research*, 488: 171 – 194 (2001).
- Borràs, M., Nadal, J. Biomarkers of genotoxicity and other end – points in an integrated approach to environmental risk assessment. *Mutagenesis*, 19: 165 – 168 (2004).
- Brendler, S., Czich, A., Epe, B., Gocke, E., Kaina, B., Muller, L., Pollet, D., Utesch, D. (2004) Photochemical genotoxicity: principles and test methods report of a GUM task force. *Mutation Research*, 566: 65 - 91.
- Burns, F., Uddin, A., Wu, F., Nádas, A., Rossman, T. Arsenic – induced enhancement of ultraviolet radiation carcinogenesis in mouse skin: a dose – response study. *Environmental Health Perspectives*, 112:599 – 603 (2004).
- Bustamante, J., Dock, L., Vahter, M., Fowler, B., Orrenius, S. The semiconductor elements arsenic and indium induce apoptosis in rat thymocytes. *Toxicology*, 118:129 – 136 (1997).
- Canela, M., Griful, E., Riva, M., Vallés, B. Evaluación de la toxicidad a través de los parámetros de un modelo estadístico. *Revista de Toxicología*, 15: 125 – 132 (1998).
- Carnell, A., Goodman, J. The long (LINEs) and the short (SINEs) of it: altered methylation as a precursor to toxicity. *Toxicological Sciences*, 75: 229 – 235 (2003).

- Carr, G., Gorelick, N. A place for statistics in the generation and analysis of genetic toxicity data: a response to 'rodent mutation assay data presentation and statistical assessment'. *Mutation Research*, 357: 257 – 260 (1996).
- Castañé, P., Topalián, M., Cordero, R., Salibián, A. Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante de su toxicidad. *Revista de Toxicología*, 20: 13 – 18 (2003).
- Celik, A., Mazmanci, B., Camlica, Y., Askin, A., Comelekoglu, U. Induction of micronuclei by lambda - cyhalothrin in Wistar rat bone marrow and gut epithelial cells. *Mutagenesis*, 20: 125 - 129 (2005).
- Champion, A., Hanson, J., Court, J., Venables, S. The micronucleus assay: an evaluation of its use in determining radiosensitivity in vitro. *Mutagenesis*, 10: 203 – 208 (1995).
- Channarayappa, J., Ong, T. Micronuclei assay in cytokinesis-blocked binucleated and conventional mononucleated methods in human peripheral lymphocytes. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 10: 273 – 279 (1990).
- Christensen, J. Human exposure to toxic metals: factors influencing interpretation of biomonitoring results. *The Science of the Total Environment*, 166: 89 – 135 (1995).
- Cooper, K., Myers, T., Rosenberg, M., Chavez, M., Hudson, L. Roles of mitogen activated protein kinases and EGF receptor in arsenite-stimulated matrix metalloproteinase-9 production. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 200: 177 – 185 (2004).

- Decordier, I., Cundari, E., Kirsch, M. Influence of caspase activity on micronuclei detection: a possible role for caspase - 3 in micronucleation. *Mutagenesis*, 20: 173 - 179 (2003).
- DeSesso, J. Teratogen update: inorganic arsenic. *Teratology*, 63: 170 - 173 (2001).
- Dopp, E., Hartmann, L., Florea, A., von Recklinghausen, U., Pieper, R., Shokouhi, B., Rettenmeier, A., Hirner, A., Obe, G. Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 201: 156 - 165 (2004).
- Drobna, Z., Waters, S., Walton, F., LeCluyse, E., Thomas, D., Styblo, M. Interindividual variation in the metabolism of arsenic in cultured primary human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 201: 166 - 177 (2004).
- Ellard, S., Parry, E. A modified protocol for the cytochalasin B *in vitro* micronucleus assay using whole human blood or separated lymphocyte cultures. *Mutagenesis*, 8: 317 - 320 (1993).
- Falck, G., Catalán, F., Norppa, H. Influence of culture time on the frequency and contents of human lymphocyte micronuclei with and without cytochalasin B. *Mutation Research*, 392: 71 - 79 (1997).
- Fenech, M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, 455: 81 - 95 (2000).

- Fenech, M., Chang, W., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis – block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 534: 65 – 75 (2003).
- Filipic, M., Hei, T. Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative *DNA* damage. *Mutation Research*, 546: 81 – 91 (2004).
- Gebel, T. Confounding variables in the environmental toxicology of arsenic. *Toxicology*, 144: 155 – 162 (2000).
- Gebel, T., Kevekordes, S., Schaefer, J., von Platen, H., Dunkelberg, H. Assessment of a possible genotoxic environmental risk in sheep bred on grounds with strongly elevated contents of mercury, arsenic and antimony. *Mutation Research*, 368: 267 – 274 (1996).
- Gil, H. El papel de los biomarcadores en toxicología humana. *Revista de Toxicología*, 17: 19 – 26 (2000).
- Goering, P., Vasken, H., Mass, M., Cebrián, M., Beck, B., Waalkes, M. The enigma of arsenic carcinogenesis: rol of metabolism. *Toxicological Sciences*, 49: 5 – 14 (1999).
- Gonsebatt, M., Vega, L., Salazar, A., Montero, R., Guzmán, P., Blas, J., Del Razo, L., García-Vargas, G., Albores, A., Cebrián, M., Kelsh, M., Ostrosky-Wegman. Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutation Research*, 386: 219 – 228 (1997).

- González, M., Martínez, M, Aguilar, M. Distribución tisular del arseniato en función del tiempo: influencia de la concentración y del anión dicromato. *Revista de Toxicología*, 13: 21 – 25 (1996).
- Guillamet, E., Creus, A., Ponti, J., Sabbioni, E., Fortaner, S., Marcos, R. In vitro *DNA* damage by arsenic compounds in a human lymphoblastoid cell line (*TK6*) assessed by the alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 19: 129 - 135 (2004).
- Gustavino, B., Degrassi, F., Filipponi, R., Modesti, D., Tanzarella, C., Rizzoni, M. Mitotic indirect non-disjunction in phytohemagglutinin stimulated human lymphocytes. *Mutagenesis*, 9: 17 – 21 (1994).
- Hall, A. Chronic arsenic poisoning. *Toxicology Letters*, 128: 69 – 72 (2002).
- Hartwig, A. Carcinogenicity of metal compounds: possible role of *DNA* repair inhibition. *Toxicology Letters*, 102 - 103: 235 – 239 (1998).
- Hartwig, A., Gröblichhoff, U., Beyersmann, D., Natarajan, A., Filon, R., Mullenders, L. Interaction of arsenic (III) with nucleotide excision repair in UV – irradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis*, 18: 399 – 405 (1997).
- Herce, C., Cameán, A., Repetto, M. Interés toxicológico de la especiación de arsénico. *Revista de Toxicología*, 15: 3 - 11 (1998).
- Honma, M. Generation of loss of heterozygosity and its dependency on p53 status in human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45: 162 – 176 (2005).
- Hopenhayn, C., Bigg, M., Smith, A., Kalman, D., Moore, L. Methylation study of a population environmentally exposed to arsenic in

drinking water. *Environmental Health Perspectives*, 104: 620 – 628 (1996).

Hu, Y., Su, L., Snow, E. Arsenic toxicity is enzyme specific and its effects on ligation are not caused by the direct inhibition of *DNA* repair enzymes. *Mutation Research*, 408: 203 – 218 (1998).

Huang, S., Huang, C., Lee, T. Induction of mitosis - mediated apoptosis by sodium arsenite in HeLa S3 cells. *Biochemical Pharmacology*, 60: 771 – 780 (2000).

Huff, J., Chan, P., Nyska, A. Is the human carcinogen arsenic carcinogenic to laboratory animals? *Toxicological Sciences*, 55: 17 – 23 (2000).

Hughes, M. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters*, 133: 1 – 16 (2002).

Johnson, K., Tucker, J., Nath, J. Frequency, distribution and clonality of chromosome damage in human lymphocytes by multi - color *FISH*. *Mutagenesis*, 13: 217 – 227 (1998).

Kaltreide, R., Davis, A., Lariviere, J., Hamilton, J. Arsenic alters the function of the glucocorticoid receptor as a transcription factor. *Environmental Health Perspectives*, 109: 245 – 251 (2001).

Kalweit, S., Utesch, D., von der Hude, W., Madle, S. Chemically induced micronucleus formation in V79 cells - comparison of three different test approaches. *Mutation Research*, 439: 183 – 190 (1999).

- Kersten, B., Zhang, J., Brendler, S., Kasper, P., Muller, L. The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug - induced photogenotoxicity. *Mutation Research*, 445: 55 – 71 (1999).
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W., Wakate, A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 167 – 172 (2000).
- Kligerman, A., King, S. Frequency of micronucleated – binucleated lymphocytes is not significantly affected by the harvest time following G0 exposure to X – radiation. *International Journal Radiation Biology*, 68: 19 – 23 (1995).
- Köteles, G., Bojtor, I., Szirmai, S., Bérces, J., Ótos, M. Micronucleus frequency in cultured lymphocytes of an urban population. *Mutation Research*, 319: 267 – 271 (1993).
- Krishnaja, A., Sharma, N. Baseline frequencies of spontaneous chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei in human newborns. *Cytology*, 56: 653 – 658 (1991).
- Lauwerys, R. Control biológico. Capítulo 27. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Organización Internacional del Trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. España. Pp. 27.1 – 27.28 (2001).
- Le, L., Puech, L., Fessard, V., Poul, J., Dragacci, S. Aneugenic potential of akadaic acid revealed by the micronucleus assay combined with

- the *FISH* technique in CHO – K1 cells. *Mutagenesis*, 18: 293 – 298 (2003).
- Lee, T., Wiley, A., Means, J., Biggs, L. Preservation of cytoplasm in the human lymphocyte micronucleus assay. *Mutagenesis*, 9: 559 – 562 (1994).
- Léonard, A. Mechanisms in metal genotoxicity: the significance of in vitro approaches. *Mutation Research*, 198: 321 – 326 (1988).
- Letón, E., Marino, A. G-Stat 2.0 Programa de análisis estadístico. www.g-stat.es (2002).
- Lillo, J. Peligros geoquímicos: arsénico de origen natural en las aguas. http://www.ucm.es/info/crismine/Ambiente_Serena/Tema_As.Htm (2005).
- Lindholm, C., Norppa, H., Hayashi, M., Sorsa, M. Induction of micronuclei and anaphase by cytochalasin B in human lymphocytes cultures. *Mutation Research*, 260: 369 – 375 (1991).
- Liu, J., Waalkes, M. Focal adhesion kinase as a potential target in arsenic toxicity. *Toxicological Sciences*, 84: 212 – 213 (2005).
- Liu, S. Athar, M., Lippai, I., Waldren, C., Hei, T. Induction of oxyradicals by arsenic: implication for mechanism of genotoxicity. *Proceeding of the Nacional Academy of Science*, 98: 1643 – 1648 (2001).
- Mahata, J., Ghosh, P., Sarkar, J., Ray, K., Natarajan, A., Giri, A. Effect to sodium arsenite on peripheral lymphocytes in vitro: individual susceptibility among a population exposed of arsenic through the drinking water. *Mutagenesis*, 19: 223 – 229 (2004).

- Maierhofer, Ch., Jentsch, I., Lederer, G., Fauth, C., Speicher, M. Multicolor *FISH* in two and three dimensions for clastogenic analyses. *Mutagenesis*, 17: 523 – 527 (2002).
- Mäki, J., Kurttio, P., Paldy, A., Pekkanen, J. Association between the clastogenic effect in peripheral lymphocytes and human exposure to arsenic through drinking water. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 32: 301 – 313 (1998).
- Mandal, B., Suzuki, K. Arsenic round the world: a review. *Talanta*, 58: 201 – 235 (2002).
- Mansour, S. Third congress of toxicology in developing countries: together for human and environmental welfare. *Environmental Health Perspectives*, 104: 324 – 325 (1996).
- Marcos, R., Martínez, V., Hernández, A., Creus, A., Sekaran, C., Tokunaga, H., Quinteros, D. Metabolic profile in workers occupationally exposed to arsenic: role of GST polymorphisms. *Journal of Occupational Environmental Medicine*, 48: 341 (2006).
- Menzel, D., Hamadeh, H., Lee, E., Meacher, D., Said, V., Rasmussen, R., Greene, H., Roth, R. Arsenic binding proteins from human lymphoblastoid cells. *Toxicology Letters*, 105: 89 – 101 (1999).
- Menzel, D., Rasmussen, R., Lee, E., Meacher, D., Said, B., Hamadeh, H., Vargas, M., Greene, H., Roth, R. Human lymphocyte heme oxygenase-1 as a response biomarker to inorganic arsenic. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 250: 653 – 656 (1998).

- Moore, L., Warner, M., Smith, A., Kalman, D., Smith, M. Use of the fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effect of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27: 176 – 184 (1996).
- Mourón, S., Golijow, D., Dulout, F. *DNA* damage by cadmium and arsenic salts assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research*, 489: 47 – 55 (2001).
- Nagar, S., Smith, L., Morgan, W. Mechanisms of cell death associated with death – inducing factors from genomically unstable cell lines. *Mutagenesis*, 18: 549 – 560 (2003).
- Ng, J., Wang, J., Shraim, A. A global health problem caused by arsenic from natural sources. *Chemosphere*, 52: 1353 – 1359 (2003).
- Norppa, H., Falck, G. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*, 18: 221 – 233 (2003).
- Ochi, T., Suzuki, T., Isono, H., Schlagenhafen, C., Goessler, W., Tsutsui, T. Induction of structural and numerical changes of chromosome, centrosome abnormality, multipolar spindles and multipolar division in cultured Chinese hamster V79 cells by exposure to a trivalent dimethylarsenic compound. *Mutation Research*, 530: 59 – 71 (2003).
- Ortiz, R., Medina, H., Rodríguez, L., González, H., Cortés, E. Spontaneous and mitomycin C-induced micronuclei in peripheral blood reticulocytes from severely malnourished rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 43: 179 – 185 (2004).

- Parry, E., Parry, M., Corso, C., Doherty, A., Haddad, E., Hermine, T., Johnson, G., Kayani, M., Quick, E., Warr, T., Williamson, J. Detection and characterization of mechanisms of action on aneugenic chemicals. *Mutagenesis*, 17: 509 – 521 (2002).
- Pascoe, S., Stemp, G. A modified method and staining technique for the in vitro micronucleus test in human lymphocytes using cytochalasin B. *Mutation Research*, 234: 253 – 255 (1990).
- Paz-y-Miño, C., Creus, A., Cabré, O., Leone, P. *Genética Toxicológica y Carcinogénesis*. Ed. Laboratorio de Genética Molecular y Citogenética Humana. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Ecuador. Pp 189 (2002).
- Pradosh, R., Saha, A. Metabolism and toxicity of arsenic: a human carcinogen. *Current Science*, 82: 38 – 45 (2002).
- Qu, W., Kasprzak, K., Kadiiska, M., Liu, J., Chen, H., Maciag, A., Mason, R., Waalkes, P. Mechanisms of arsenic – induced cross – tolerance to nickel cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis in rat liver epithelial cells. *Toxicological Letters*, 63: 189 – 193 (2001).
- Radack, K., Pinney, S., Livingston, G. Sources of variability in the human lymphocyte micronucleus assay: a population – based study. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 26: 26 – 36 (1995).
- Raisuddin, S., Jha, A. Relative sensitivity of *FISH* and mammalian cells to sodium arsenate and arsenite as determined by alkaline single – cell gel electrophoresis and cytokinesis – block micronucleus assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44: 83 – 89 (2004).

- Ramírez, T., García, V., Wise, C., Cea, R., Poirier, L., Herrera, L. S-adenosyl-L-methionine is able to reverse micronucleus formation induced by sodium arsenite and other cytoskeleton disrupting agents in cultured human cells. *Mutation Research*, 528: 61 – 74 (2003).
- Richardson, S. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, 75: 2831 – 2857 (2003).
- Rodríguez, V., Jiménez, M., Giordano, M. The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicology Letter*, 145: 1 – 18 (2003).
- Rosefort, C., Fauth, E., Zanki, H. Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleated and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis*, 19: 277 – 284 (2004).
- Rosenkranz, H. Synergy between systemic toxicity and genotoxicity: relevance to human cancer risk. *Mutation Research*, 529: 117 – 127 (2003).
- Rossman, T. Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutation Research*, 533: 37 – 65 (2003).
- Rossman, T., Uddin, A., Burns, F. Evidence that arsenic acts as a cocarcinogen in skin cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198: 394 – 404 (2004).
- Saleha, B., Danadevi, K., Jamil, K., Ahuja, Y., Visweswara, K., Ishaq, M. In vivo genotoxic effect of arsenic trioxide in mice using comet assay. *Toxicology*, 162: 171 – 177 (2001).

Scarfi, M., Prisco, F., Versan, F., Lioi, M., Zeni, O., Di Pietro, R., Franceschi, C., Motta, M., Iafusco, D., Stoppoloni, G. Spontaneous and mitomycin-C-induced micronuclei in lymphocytes from subjects affected by Turner's syndrome. *Mutation Research*, 357: 183 – 190 (1996).

Schaumlöffel, N., Gebel, T. Heterogeneity of the *DNA* damage provoked by antimony and arsenic. *Mutagenesis*, 13: 281 – 286 (1998).

Schuler, M., Muehlbauer, P., Guzzie, P., Eastmond, D. Noscapine hydrochloride - induced numerical aberrations in cultured human lymphocytes: a comparison of *FISH* detection methods and multiple end - points. *Mutagenesis*, 18: 235 – 242 (2003).

Schwartz, J., Jordan, R., Evans, E., Lenarczyk, M., Liber, H. Baseline levels of chromosome instability in the human lymphoblastoid cell *TK6*. *Mutagenesis*, 19: 477 – 482 (2004).

Seoane, A., Dulout, F. Inducción de aneuploidía por metales pesados: su evaluación a través de técnicas citogenéticas en células de mamíferos. *Analecta Veterinaria*: 19: 30 - 39 (1999).

Seoane, A., Güerci, A., Dulout, F. Mechanisms involved in the induction of aneuploidy : the significance of chromosome loss. *Genetics and Molecular Biology*, 23: 1077 – 1082 (2000).

Shi, H., Hudson, L., Liu, K. Oxidative stress and apoptosis in metal ion – induced carcinogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*, 37: 582 – 593 (2004).

Silbergeld, E. Toxicología. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Organización Internacional del Trabajo. Ministerio de Trabajo y

Asuntos Sociales. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. España. pp. 33.1 – 33.83 (2001).

Stybło, M., Del Razo, L., Vega, L., Germolec, D., LeCluyse, E., Hamilton, G., Reed, W., Wang, C., Cullen, W., Thomas, D. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Archives of Toxicology*, 74: 289 - 299 (2000).

Szirmai, S., Bérces, J., Köteles, G. Computerized image analysis for determining micronucleus frequency. *Environmental Health Perspectives Supplements*, 101: 57 – 60 (1993).

Thomas, D., Stybło, M., Lin, S. The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 176: 127 – 144 (2000).

Thomas, D., Waters, S., Stybło, M. Elucidating the pathway for arsenic methylation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198: 319 – 326 (2004).

Thomas, P., Umegaki, K., Fenech, M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis – block micronucleus assay. *Mutagenesis*, 18: 187 – 194 (2003).

Tice, R., Yager, J., Andrews, P., Crecelius, E. Effect of hepatic methyl donor status on urinary excretion and DNA damage in B6C3F1 mice treated with sodium arsenite. *Mutation Research*, 386: 315 – 334 (1997).

- Tseng, C. The potential biological mechanisms of arsenic-induced diabetes mellitus. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 197: 67 – 83 (2004).
- Vanderkerden, D., Vanparys, P., Verschaeve, L., Kirsch, M. The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. *Mutagenesis*, 4: 6 – 11 (1989).
- Vega, L., Gonsebatt, M., Ostrosky, P. Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes in vitro: an individual susceptibility effect detected. *Mutation Research*, 334: 365 – 373 (1995).
- Vega, L., Montes, P., Saavedra, R., Ostrosky, P. Helper T cell subpopulations from women are more susceptible to the toxic effect of sodium arsenite in vitro. *Toxicology*, 199: 121 – 128 (2004).
- Vian, L., Bichet, N., Gouy, D. The in vitro micronucleus test on isolated human lymphocytes. *Mutation Research*, 291: 93 – 102 (1993).
- Walmod, P., Berezin, A., Gallagher, H., Gravemann, U., Lepekhn, E., Belman, V., Bacon, C., Nau, H., Regan, C., Berezin, V., Bock, E. Automated in vitro screening to teratogen. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 181: 1 – 15 (2002).
- Walton, F., Waters, S., Jolley, S., LeCluyse, E., Thomas, D., Styblo, M. Selenium compounds modulate the activity of recombinant rat As III - methyltransferase and the methylation of arsenite by rat and human hepatocytes. *Chemical Research Toxicology*, 16: 261 – 265 (2003).

- Wang, Y., Chaung, R., Tung, L. Comparison of the cytotoxicity induced by different exposure to sodium arsenite in two *FISH* cell lines. *Aquatic Toxicology*, 69: 67 – 79 (2004).
- Wanibuchi, H., Salim, E., Kinoshita, A., Shen, J., Wei, M., Morimura, K., Yoshida, K., Kuroda, K., Endo, G., Fukushima, S. Understanding arsenic carcinogenicity by the use of animal models. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198: 366 – 376 (2004).
- Waters, S., Devesa, V., Del Razo, L., Styblo, M., Thomas, D. Endogenous reductants support the catalytic function of recombinant rat *cyt19*, an arsenic methyltransferase. *Chemical Research in Toxicology*, 17: 404 - 409 (2004).
- Wiencke, J., Yager, J., Varkonyi, A., Hultner, M., Lutze, L. Study of arsenic mutagenesis using the plasmid shuttle vector *pZ189* propagated in *DNA* repair proficient human cells. *Mutation Research*, 386: 335 – 344 (1997).
- Yager, J., Wiencke, J. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase by arsenite. *Mutation Research*, 386: 345 – 351 (1997).
- Yamanaka, K., Hayashi, H., Tachikawa, M., Kato, K., Hasegawa, A., Oku, N., Okada, S. Metabolic methylation is a possible genotoxicity – enhancing process of inorganic arsenics. *Mutation Research*, 394: 95 – 101 (1997).
- Yeşilada, E. Genotoxicity testing of some metals in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 66: 464 – 469 (2001).

Yih, L., Lee, T. Effects of exposure protocols on induction of kinetochore - plus and -minus micronuclei by arsenite in diploid human fibroblasts. *Mutation Research*, 440: 75 – 82 (1999).

Zalacain, M., Sierrasesúmaga, L., Patiño, A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28: 227 - 236 (2005).