

INDUCCIÓN DE ANEUPLOIDÍA POR METALES PESADOS: SU EVALUACIÓN A TRAVÉS DE TÉCNICAS CITOGÉNÉTICAS EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS

A. Seoane¹, F. Dulout²

¹Jefe de Trabajos Prácticos. ²Profesor Titular
Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA).
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN: Entre las alteraciones que puede sufrir el complemento cromosómico de una especie, la aneuploidía (pérdida o ganancia de uno o varios cromosomas) reviste particular importancia por su relación etiológica con abortos espontáneos, malformaciones congénitas y transformación neoplásica. Sin embargo, no existen pruebas para la identificación de agentes aneugénicos (capaces de inducir aneuploidía) que hayan sido convalidados a nivel internacional mediante ensayos coordinados entre varios laboratorios. El presente trabajo analiza las diversas pruebas que han sido propuestas en años recientes y desarrolla el análisis crítico de uno de ellos –el de anafase-telofase– describiendo experimentos llevados a cabo con sales de metales pesados. Así, se evidencia que la prueba tiene suficiente sensibilidad como para diferenciar efectos de sustancias que, si bien poseen un modo de acción semejante, no actúan de la misma manera sobre el material genético. Por ejemplo, el cadmio (II) y el cromo (VI) fueron aneugénicos y clastogénicos mientras que el níquel (II) fue sólo aneugénico. Lo mismo puede decirse con respecto a la citotoxicidad ya que en la prueba se pudieron discriminar los efectos de las diferentes sales en función de su velocidad de ingreso a las células y de las reacciones involucradas en la formación de reactivos intermedios. Además, en todos los casos se pudieron establecer claras relaciones dosis-respuesta. Finalmente, dada su sencillez y bajo costo en términos de infraestructura necesaria y tiempo de análisis, el test puede ser recomendable para el abordaje inicial del estudio de sustancias de sospechada genotoxicidad.

Palabras Clave: aneuploidía, ensayos breves, metales pesados.

ANEUPLOIDY INDUCTION BY HEAVY METALS: EVALUATION USING CYTOGENETIC TECHNIQS IN MAMMALIAN CELLS

ABSTRACT: Among the alterations that can be induced in the chromosome complement of any specie the aneuploidy (loss or gain of one or more chromosomes) has a high relevance due to its ethiological relation with spontaneous abortus, congenital malformations and neoplastic transformation. Nevertheless, the tests proposed to identify aneugenic agents (agents able to induce aneuploidy) had no been convalidated internationally through interlaboratory coordinate assays. This work analyze the different tests proposed in recent years and develop a critical analysis of one of them –the anaphase-telophase test– describing the experiments carried out with heavy metal salts. Results obtained showed that the test has sensitivity enough to differentiate the effects of compounds that, having similar mechanisms of action do not act in the same way on the genetic material. For example, whereas cadmium (II) and chromium (VI) were aneugenics and clastogenics, nickel (II) was only aneugenic. Similarly, this test discriminated the different cytotoxic effects of the heavy metal salts in relation with the different uptake of each one by the cells and the reactions involved in the formation of reactive intermediates. Moreover, in all the cases it was possible to clearly establish dose-response relationships. Finally, due to its simplicity and low cost in terms of the necessary infrastructure and time consuming, the test can be recommended for the primary screening of suspected genotoxicants.

Key Words: aneuploidy, short term tests, heavy metals.

Fecha de recepción: 03/11/98

Fecha de aceptación: 02/09/99

Dirección para correspondencia:

Seoane Analía CC 296 (B1900AVW) La Plata, Argentina Fax: 0221-4211799.

E-mail: aseoane@fcv.medvet.unlp.edu.ar

CONSIDERACIONES GENERALES

Los seres vivos están expuestos a agentes físicos, químicos o biológicos a lo largo de toda su vida. Cuando la exposición de un organismo a un agente determinado tiene como consecuencia efectos nocivos se dice que el efecto es tóxico (del latín *toxicum* y éste del griego *toxicon*: veneno) (1). Los efectos de los agentes tóxicos sobre los animales pueden variar según la naturaleza del agente, la ruta de exposición, la duración de la exposición y la dosis recibida. Se llaman agentes genotóxicos a aquellas sustancias que producen efectos tóxicos, letales y heredables sobre el material hereditario nuclear o extranuclear en células germinales y somáticas (2).

Uno de los tipos posibles de daño al material genético es la aneuploidía, que consiste en la pérdida o ganancia de uno o más cromosomas enteros en las células de un organismo y que se origina en la no disyunción de uno o más cromosomas en anafase. La aneuploidía es una de las principales causas de mortalidad prenatal y de trastornos congénitos en los seres vivos, tal como la fertilidad y además, parece jugar un papel importante en la patogénesis de la transformación celular, es decir en el desarrollo de tejido tumoral (3).

La aneuploidía se produce por la no disyunción de uno o más cromosomas durante la división celular. Los mecanismos que la originan pueden ser diversos: por un lado, pueden ocurrir alteraciones en el huso acromático debido a trastornos en la polimerización de las tubulinas o la división errónea de los centríolos. Ejemplos clásicos de estos efectos están representados por la colchicina, un alcaloide que inhibe la polimerización de las tubulinas o por el taxol, un compuesto que acelera la polimerización de las tubulinas. Dosis muy bajas de colchicina hacen que uno o varios cromosomas no puedan migrar hacia los polos, permaneciendo en la placa ecuatorial. Otra causa de aneuploidía puede ser la no separación de las cromátidas hermanas a nivel del centrómero al comenzar la anafase, en este caso parece existir una relación con la aparición de alteraciones a nivel de los cinetocoros.

Los ensayos tradicionales de genotoxicidad, que constituyen esencialmente el análisis de aberraciones cromosómicas estructurales o intercambios de cromátidas hermanas, evalúan la capacidad de los productos químicos para causar daño en el ADN, mutaciones génicas, o rotura y rearrreglos cromosómicos. Por ello es importante el desarrollo de tests que permitan evaluar con certeza la capacidad aneugénica de agentes físicos y químicos.

PRUEBAS DE ANEUGÉNESIS

A pesar de que la identificación de agentes aneugénicos es de gran importancia, no existe ningún ensayo convalidado a nivel internacional que pueda ser utilizado de manera estándar. Un ejemplo de ello es que entre las pruebas recomendadas por la Comisión de la Comunidad Europea no se incluye ninguna para aneugénesis (4). Por ello es necesario comprobar los métodos hasta ahora propuestos y, al mismo tiempo, desarrollar ensayos nuevos que con el tiempo puedan ser convalidados.

Las pruebas propuestas para analizar la inducción de aneuploidía se basan en el conteo de cromosomas en células diploides (5, 6) o, más recientemente, en el empleo de la técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*). En el primer caso es necesario utilizar líneas celulares diploides, ya que la mayoría de las líneas celulares establecidas tienen un considerable nivel basal de aneuploidía que disminuye la sensibilidad de los ensayos. Por ese motivo se emplean los primeros pasajes de líneas originadas en cultivos primarios de embriones, como por ejemplo la línea CHED (*Chinese hamster embryonic diploid*) (6). En el ensayo propuesto las células se cultivan en monocapa sobre cubreobjetos colocados en cajas de Petri. Dado que la no disyunción de los cromosomas se produce en la primera mitosis después del tratamiento con el agente que se ensaya, el análisis se hace en la segunda mitosis. Por ello es necesario determinar la duración del ciclo celular con exactitud. El tratamiento hipotónico se hace con cloruro de sodio al 0,17% a fin de lograr una dispersión tal de los cromosomas que permita el conteo en forma rápida y exacta. Con esta solución hipotónica se consigue además que la membrana plasmática se mantenga intacta, lo que da la seguridad de que la falta de uno o más cromosomas se ha originado por fenómenos de no disyunción durante la mitosis precedente.

Mediante este ensayo se estudió la acción aneugénica de rayos X y del estrógeno sintético dietilestilbestrol (6), del acetaldehído (7), del aldehído propiónico y del hidrato de cloral (8).

Un inconveniente que presentan los ensayos de aneugénesis que se basan en el conteo de cromosomas es que las líneas empleadas al cabo de un cierto número de subcultivos comienzan a incrementar la frecuencia de cambios cromosómicos numéricos. Por otra parte, estos ensayos son costosos en términos del tiempo necesario para contar los números cromosómicos de una cantidad significativa de metafases por cada punto experimental.

La técnica de FISH se basa en el empleo de sondas fluorescentes de ADN para cromoso-

mas específicos. Generalmente se colorean de esta manera tres o cuatro pares de cromosomas contabilizando como un evento de aneuploidía la presencia de más de dos cromosomas por par, o la ausencia de uno o ambos miembros del par. Considerando el contenido de DNA de los cromosomas coloreados con las sondas se pueden extrapolar los resultados al complemento cromosómico total (9). Un ejemplo de la aplicación de esta técnica fue el estudio de alteraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica de individuos expuestos a arsénico en forma crónica (10).

Una alternativa promisoriosa como ensayo breve de aneugénesis es el análisis de alteraciones en anafase-telofase de la mitosis. Se basa en la observación de células que se encuentran entre la parte final de la anafase y el comienzo de la telofase en las que es posible detectar anomalías tales como puentes de cromatina, fragmentos cromosómicos rezagados o cromosomas rezagados. La técnica es sumamente sencilla y consiste en cultivar células en monocapa sobre cubreobjetos adheridos con una pequeña gota de grasa siliconada al fondo de cajas de Petri de 9 cm de diámetro. La siembra se hace a partir de una suspensión celular en medio de cultivo (aproximadamente 50.000 células/ml) colocando una gota que abarque todo el cubreobjeto o lo exceda ligeramente. Al cabo de una hora, cuando las células se han adherido al cubreobjetos, se agrega medio de cultivo hasta llegar a 10 ml. Es importante determinar en ensayos piloto el lapso entre la siembra y la fijación en el que se obtiene la mayor cantidad de células en anafase-telofase, esto depende de la línea celular empleada y de la duración del ciclo celular. Con células de la línea CHO (*Chinese hamster ovary*), que tiene un ciclo celular de 12-15 horas, los cultivos se fijan a las 30 horas. Con células de la línea MRC5 (fibroblastos humanos), que tiene un ciclo celular de 22-24 horas, las células se cultivan durante 60 horas. La fijación se inicia agregando a los cultivos 1 ml de fijador (metanol-ácido acético glacial 3:1). Al cabo de 15-20 minutos se reemplazan 5 ml del contenido de la caja por 5 ml de fijador. La operación se repite a los 5 min y, transcurrido el mismo lapso, se reemplaza la totalidad del contenido de la caja. Luego de tres cambios más de fijador, los cubreobjetos se dejan secar al aire sobre papel de filtro y luego se colorean con carbol-fucsina y se montan sobre portaobjetos con DPX (11).

Las anomalías que se pueden observar en anafase-telofase son consecuencia de distintas alteraciones cromosómicas. Los puentes de cromatina pueden originarse en aberraciones tipo intercambio que dan lugar a cromátidas dicéntricas cuyos centrómeros migran hacia

polos distintos. Los fragmentos rezagados son consecuencia de fracturas de cromátidas y permanecen en la placa ecuatorial por carecer de cinetocoros. Los cromosomas rezagados, que serían los indicadores de inducción de aneuploidía, se producirían por alteraciones en los cinetocoros que impiden la correcta migración hacia los polos celulares.

Un dato interesante que avala indirectamente el concepto de que los cromosomas rezagados constituyen eventos de aneuploidía fue la evaluación del acetaldehído como agente aneugénico. Tratando células de la línea CHED con distintas dosis del compuesto, y analizando la inducción de aneuploidía por conteo de cromosomas, se comprobó que incrementaba la frecuencia de células hipodiploides sin el concomitante incremento de células hiperdiploides (como sería de esperar si la aneuploidía se originase por no disyunción de los cromosomas). Paralelamente se observó un aumento significativo de cromosomas rezagados en células CHO analizadas en anafase tardía-telofase temprana con lo cual quedaría demostrado que esta última técnica es útil para la evaluación de posibles agentes aneuploidizantes (11).

GENOTOXICIDAD DE METALES PESADOS

Los metales elegidos para realizar los estudios son ampliamente utilizados en la industria: fundiciones, fábricas de pigmentos y cubiertas metálicas, industria electrónica y fertilizantes en el caso de cadmio; fundición y refinación, fundiciones pesadas, fábricas de acero inoxidable, etc. el níquel; y en curtiembres, plantas de aleación e industria de joyería con plata el cromo. Los mismos han sido ampliamente evaluados en cuanto a su capacidad genotóxica (12, 13, 14, 15, 16, 17) pero no hay datos concluyentes en cuanto a sus mecanismos de acción que es uno de los puntos de mayor interés.

En la tecnología moderna el cadmio tiene un amplio espectro de aplicaciones, tal como en fundiciones, fábricas de pigmentos y cubiertas metálicas, en la industria electrónica y en fertilizantes, inclusive se lo puede encontrar en varios componentes de la dieta. Desde su descubrimiento a principios de siglo, el empleo de cadmio se ha incrementado dando como resultado la contaminación ambiental en ciertas áreas.

Según la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (18) hay limitada evidencia sobre la carcinogenicidad del cadmio en humanos pero hay suficiente evidencia de su carcinogenicidad en animales.

El cloruro de cadmio induce tumores testiculares y sarcomas locales en ratas inyectadas

subcutáneamente (19) y produce un aumento dosis-dependiente en la incidencia de carcinomas pulmonares en ratas luego de una exposición por inhalación (20, 21). Además, se vio que el tratamiento continuo de células con cloruro de cadmio origina anormalidades mitóticas tales como formación de micronúcleos, y puentes de cromatina entre los juegos de cromosomas en separación, siendo los cambios más significativos, la aparición de células gigantes multinucleadas, núcleos heteroploídicos y degeneración de células (22). Selyes y colaboradores (23) informaron la inducción de aneuploidía por cloruro de cadmio en ratones. En nuestro laboratorio se comprobó el mismo tipo de daño en células CHO en concentraciones entre 0,5 a 4 mM (11). También se ha informado la capacidad de esta sal de producir inhibición en el ensamblaje de microtúbulos en dosis entre 10 y 1000 mM (24, 25).

En el caso del sulfato de cadmio, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (18) informa la producción de sarcomas testiculares cuando es inyectado en forma subcutánea en ratas y también produce aberraciones cromosómicas "in vivo". No hay evidencia de que produzca aneuploidía "in vivo" en ratones pero sí en hámster.

La toxicidad del níquel se ha transformado en un tema de gran interés debido a su amplia aparición en el ambiente. La exposición ocurre principalmente por inhalación e incluye los procesos de minería, fundición y refinación del mismo a partir de sulfuros y óxidos minerales.

Se han realizado numerosos estudios para evaluar la toxicidad y genotoxicidad del níquel y se ha encontrado una gran evidencia acerca de su genotoxicidad. Puede producir: rotura de DNA, puentes DNA-proteína, aberraciones cromosómicas e intercambios de cromátidas hermanas (26, 27, 28), también provoca mutagénesis en células CHO, lesiones cromosómicas, principalmente "gaps" en células de carcinoma mamario de ratón C3H (29) y en otras células de mamífero, tanto "in vivo" como "in vitro", y en células vegetales. Se han obtenido evidencias de la toxicidad del níquel en estudios epidemiológicos en individuos expuestos ocupacionalmente (30, 31) y se ha observado incremento del riesgo de contraer cáncer de pulmón y sinusal (17).

Una de las sales que ha sido ampliamente estudiada en distintos sistemas experimentales es el cloruro de níquel. Se ha observado la inducción de un aumento en el número de focos displásicos inducidos por N-etil-N-hidroxi-etilnitrosamina en ratas F344 (17), con mitosis dispersas o con un huso parcialmente desarrollado en raíces de allium, nefro y hepatotoxicidad (32, 33).

El sulfato de níquel cuenta con abundantes antecedentes de genotoxicidad (17, 34, 35, 36). Christie y colaboradores (37) observaron su capacidad de inducir transformación celular en células de hámster sirio, y su efecto mutagénico en células CHO en dosis de 0,1 mM al actuar en combinación con radiación UV. También se ha informado el aumento de la frecuencia de roturas de ADN de cadena simple y la inducción de puentes cruzados ADN-proteína (27, 38).

El cromo es un metal utilizado en una amplia variedad de industrias tales como: producción de pigmentos, curtido de cueros, elaboración de productos refractarios, preservantes de madera, anticorrosivos y fungicidas, también se utiliza en la industria metalúrgica y en fundiciones (39). Puede actuar como Cr III o Cr VI, pero la mayoría de los resultados positivos en ensayos de genotoxicidad han sido obtenidos empleando Cr VI, probablemente debido a su mayor poder oxidante o a su transporte a través de membrana. Según la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) la evidencia de la carcinogenicidad en animales y humanos es inadecuada para el cromo en general pero suficiente para los cromatos en particular.

Hay una gran evidencia acerca de la clastogenicidad (intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas estructurales) del Cr VI (23, 34, 40, 41, 42, 43, 44, 45) aunque no específicamente de su capacidad aneugénica. Sora y colaboradores (46) informaron la inducción de aneuploidía en *Saccharomyces cerevisiae* con dosis que iban de 0,07 a 0,85 mM, y Biederman (47) encontró que dicha sal era capaz de inducir transformación celular con dosis de hasta 10 mM.

Se sabe que el dicromato de potasio es mutagénico en *Salmonella* sp. y en *Escherichia coli* (48), y que produce citotoxicidad, mutagenicidad y clastogénesis "in vitro" (49). También se conoce su capacidad de aumentar la frecuencia de micronúcleos tanto "in vitro", en células CHO (40) como "in vivo", en ratas y hámster chino (50). Tsuda (51) encontró que puede producir transformación morfológica en dosis de 0,1-0,3 mg Cr/ml como también aberraciones y citotoxicidad.

EVIDENCIAS EXPERIMENTALES

Tipo celular

Se utilizaron células CHO (Chinese Hamster Ovary) obtenidas de la American Type Culture Collection. Las mismas se cultivan en medio Ham F10 (Gibco) suplementado con 10% de suero bovino fetal y antibióticos (penicilina 50 UI y estreptomycin 50 mg/ml).

Metodología. Ensayo de anafase-telofase

El análisis citogenético de células en anafase-telofase ha sido propuesto por diversos autores para estudiar el daño cromosómico o citológico inducido por productos químicos (52, 53, 54, 55, 56). Consiste en el análisis de la presencia de cromosomas o fragmentos rezagados y de puentes de cromatina en dichos períodos de la división celular.

Las células se cultivan en monocapa sobre cubreobjetos de 24 x 36 mm, en cajas de Petri, desarrollándose el cultivo en estufa con atmósfera controlada con 5% de CO₂ a 37°C durante 30 h. El medio de cultivo utilizado es HAM F10 suplementado con suero bovino fetal y antibióticos. Cuando las células están en su fase logarítmica de crecimiento, 8 horas antes de sacrificar el cultivo se realiza el tratamiento con la droga a probar.

Las dosis se obtienen buscando la mayor concentración del agente a ensayar que permita la sobrevivencia de un número adecuado de células de modo de poder llevar a cabo el análisis. Las otras dos dosis se obtiene diluyendo a la mitad la inmediata superior. Cada experimento se realiza por cuadruplicado.

Para fijar las células se utiliza la mezcla metanol:ácido acético 3:1 en forma gradual y luego se guardan a 4° C durante 24 horas. La coloración se realiza con carbol fucsina y, luego de un secado suave, los cubreobjetos se montan con DPX sobre portaobjetos limpios.

El análisis se realiza con microscopio óptico. Se observan aproximadamente 1000 células por tratamiento. Se analiza la primera mitosis después del tratamiento y se observan solamente las células que se hallan cursando la anafase tardía-telofase temprana; no se analizan en anafase temprana porque pueden con-

fundirse los brazos de los cromosomas con puentes de cromatina o cromosomas rezagados.

El análisis estadístico se realiza con el método "G" Sokal y Rohlf (57) para comparar las frecuencias de células con aberraciones en los distintos tratamientos (dosis) y en el control sin tratar. Las variaciones del índice mitótico (células en división de cada mil) con las distintas dosis se evaluaron a través de un análisis de regresión.

RESULTADOS**Cloruro de cadmio**

Se observaron aumentos en la incidencia de puentes de cromatina y fragmentos y cromosomas rezagados en las células tratadas respecto a los controles (Tabla 1). En cuanto a cromosomas rezagados se observaron diferencias significativas $G = 14,55$ ($P < 0,01$) especialmente entre las dosis 4 (4 μM) y el control $G = 8,45$ ($P < 0,01$). Para las otras dosis las diferencias no fueron significativas $G = 0,04$ ($P > 0,75$), $G = 0,15$ ($P > 0,5$) y $G = 0,18$ ($P > 0,5$) para las dosis 1, 2, y 3, respectivamente.

Las diferencias en cuanto a puentes de cromatina fueron significativas $G = 12,15$ ($P < 0,025$) lo cual puede atribuirse a la dosis 4 $G = 9,86$ ($P < 0,01$) mientras que para las otras dosis los resultados fueron $G = 0,6$ ($P > 0,25$), $G = 2,05$ ($P > 0,1$) y $G = 4,77$ ($P > 0,25$) para las dosis 1, 2 y 3 respectivamente.

En el caso de los fragmentos rezagados también hubo diferencias significativas $G = 9,74$ ($P < 0,025$) atribuibles a las dosis 2, $G = 5,55$ ($P < 0,025$) y 4, $G = 8,95$ ($P < 0,01$), para las dosis 1 y 3 el resultado fue $G = 2,66$ ($P > 0,01$).

La evaluación del índice mitótico mostró una disminución dosis-dependiente con un valor de $R = 0,96$ ($P < 0,01$).

Tabla 1. Alteraciones en anafase-telofase inducidas por cloruro de cadmio en células CHO. El error estándar se indica entre paréntesis debajo de los valores correspondientes.

Table 1. Anaphase-telophase alterations induced by cadmium chloride in CHO cells. Standard error is indicated between parentheses below the corresponding values.

Tratamiento	Alteraciones en anafase-telofase cada	
	Puentes de cromatina	Cromosomas rezagados
--	0,66 (0,08)	1,33 (0,11)
CC 0,5 μM	1,00 (0,09)	1,44 (0,11)
CC 1,0 μM	1,33 (0,11)	1,55 (0,12)
CC 2,0 μM	1,77 (0,14)	1,11 (0,10)
CC 4,0 μM	2,44 (0,15)	3,33 (0,17)

CC: Cloruro de Cadmio (CdCl₂)

Sulfato de cadmio

Se observaron aumentos en la incidencia de todas las aberraciones analizadas: puentes de cromatina y cromosomas y fragmentos rezagados (Tabla 2). Las diferencias entre las células tratadas respecto a los controles sin tratar fueron significativas en cuanto a la incidencia de cromosomas rezagados $G = 11,6$ ($P < 0,025$) esto fue ocasionado únicamente por la mayor de las dosis utilizadas: $G = 9,7$ ($P < 0,01$).

Con respecto a los fragmentos rezagados también hubo diferencias significativas entre las distintas dosis y los controles sin tratar $G = 15,95$ ($P < 0,01$) siendo éstas atribuibles a la mayor de las dosis utilizadas: $G = 6,88$ ($P < 0,01$).

Finalmente, considerando los puentes de cromatina, también se hallaron diferencias significativas entre la células tratadas con sulfato de cadmio y las no tratadas $G = 9,08$ ($P < 0,05$); estas diferencias son atribuibles únicamente a

la dosis mayor: $G = 8,41$ ($P < 0,01$) al igual que lo observado en el análisis de los otros tipos de alteraciones.

La disminución del índice mitótico fue dosis-dependiente lo que queda demostrado por el $R = 0,93$ ($P < 0,1$).

Cloruro de níquel

Se observaron aumentos en la incidencia de cromosomas y fragmentos rezagados pero no así en la frecuencia de puentes de cromatina en las células tratadas con respecto a los controles sin tratar (Tabla 3).

En el caso de los cromosomas rezagados las diferencias fueron significativas entre las 3 dosis mayores y los controles sin tratar: $G = 9,73$ ($P < 0,01$), $G = 5,05$ ($P < 0,025$) y $G = 7,78$ ($P < 0,01$), respectivamente.

En cuanto a los fragmentos rezagados, su incremento no fue significativo $G = 2,09$ ($P > 0,5$).

Con respecto al índice mitótico, el mismo

Tabla 2. Alteraciones en anafase-telofase inducidas por sulfato de cadmio en células CHO. El error estándar se indica entre paréntesis debajo de los valores correspondientes.

Table 2. Anaphase-telophase alterations induced by cadmium sulfate in CHO cells. Standard error is indicated between parentheses below the corresponding values.

Tratamiento	Alteraciones en anafase-telofase cada	
	Puentes de cromatina	Cromosomas rezagados
--	0,66 (0,07)	1,00 (0,09)
SC 0,033 M	1,84 (0,13)	1,07 (0,10)
SC 0,067 M	2,00 (0,14)	1,60 (0,12)
SC 0,0134 M	4,28 (0,20)	5,71 (0,23)

SC: Sulfato de Cadmio (SO_4Cd)

Tabla 3. Alteraciones en anafase-telofase inducidas por cloruro de níquel en células CHO. El error estándar se indica entre paréntesis debajo de los valores correspondientes.

Table 3. Anaphase-telophase alterations induced by nickel chloride in CHO cells. Standard error is indicated between parentheses below the corresponding values.

Tratamiento	Alteraciones en anafase-telofase cada	
	Puentes de cromatina	Cromosomas rezagados
--	0,40 (0,06)	0,40 (0,06)
CN 0,013 mM	0,30 (0,05)	1,00 (0,09)
CN 0,027 mM	0,20 (0,04)	1,80 (0,13)
CN 0,040 mM	0,40 (0,06)	1,30 (0,11)
CN 0,054 mM	0,50 (0,07)	1,60 (0,12)

CN: Cloruro de Níquel ($NiCl_2$)

disminuyó con las dosis utilizadas pero no lo hizo en forma estadísticamente significativa $R = 0,70$ ($P > 0,5$).

Sulfato de níquel.

Se observaron aumentos en la incidencia de todas las aberraciones analizadas (Tabla 4). Las diferencias fueron significativas en el caso de los cromosomas rezagados $G = 13,8$ ($P < 0,01$) y de los puentes de cromatina $G = 15,24$ ($P < 0,01$). Las dosis a las que pueden atribuirse dichas diferencias fueron las dos más altas en el caso de los cromosomas rezagados $G = 6,61$ ($P < 0,025$) y $G = 14,7$ ($P < 0,001$), respectivamente, y todas en el caso de los puentes de cromatina $G = 15,24$ ($P < 0,01$); $G = 5,85$ ($P < 0,025$); $G = 6,90$ ($P < 0,01$) y $G = 15,08$ ($P < 0,001$).

Con respecto a los fragmentos rezagados el análisis estadístico de la totalidad de los datos mostró valores de probabilidad cercanos al

límite de significancia. Cuando comparamos separadamente cada dosis con el control sin tratar observamos que sólo había diferencias significativas entre la primera dosis y el mismo $G = 5,82$ ($P < 0,025$), mientras que las otras dosis si bien mostraban una frecuencia aumentada, carecían de significancia estadística.

El análisis de regresión del índice mitótico mostró una disminución dosis-dependiente estadísticamente significativa $R = 0,97$ ($P < 0,05$).

Dicromato de potasio.

Se observaron aumentos en la incidencia de todas las aberraciones analizadas: puentes de cromatina y cromosomas y fragmentos rezagados (Tabla 5).

Las diferencias entre las células tratadas respecto a los controles sin tratar fueron altamente significativas en cuanto a la incidencia de cromosomas rezagados $G = 25,8$ ($P < 0,001$) y

Tabla 4. Alteraciones en anafase-telofase inducidas por sulfato de níquel en células CHO. El error estándar se indica entre paréntesis debajo de los valores correspondientes.

Table 4. Anaphase-telophase alterations induced by nickel sulfate in CHO cells. Standard error is indicated between parentheses below the corresponding values.

Tratamiento	Alteraciones en anafase-telofase cada	
	Puentes de cromatina	Cromosomas rezagados
--	0,20 (0,04)	0,70 (0,08)
SN 0,2 mM	1,00 (0,09)	1,30 (0,11)
SN 0,4 mM	1,10 (0,10)	2,00 (0,14)
SN 0,8 mM	1,40 (0,11)	2,00 (0,14)

SN: Sulfato de Níquel (SO_4Ni)

Tabla 5. Alteraciones en anafase-telofase inducidas por dicromato de potasio en células CHO. El error estándar se indica entre paréntesis debajo de los valores correspondientes.

Table 5. Anaphase-telophase alterations induced by magnesium dichromate in CHO cells. Standard error is indicated between parentheses below the corresponding values.

Tratamiento	Alteraciones en anafase-telofase cada	
	Puentes de cromatina	Cromosomas rezagados
--	0,99 (0,09)	1,10 (0,10)
DP 1 μ M	1,40 (0,11)	3,10 (0,17)
DP 2 μ M	1,60 (0,12)	3,90 (0,19)
DP 3 μ M	2,60 (0,15)	3,60 (0,18)
DP 4 μ M	4,60 (0,20)	4,50 (0,20)

DP: Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$)

esto ocurrió con todas las dosis utilizadas: $G=10,12$ ($P<0,01$) para la dosis 1; $G = 17,02$ ($P<0,001$) para la dosis 2; $G = 14,32$ ($P<0,001$) para la dosis 3 y $G = 22,74$ ($P<0,001$) para la dosis 4.

Con respecto a los fragmentos rezagados también hubo diferencias significativas entre las distintas dosis y los controles sin tratar $G = 12,74$ ($P<0,025$) siendo estas atribuibles a las 4 dosis utilizadas: $G = 6,22$ ($P<0,025$) para la dosis 1; $G = 11,03$ ($P<0,001$) para la dosis 2; $G = 7,39$ ($P<0,01$) para la dosis 3; $G = 9,80$ ($P<0,01$) para la dosis 4.

Finalmente, considerando los puentes de cromatina, también hallamos diferencias altamente significativas entre las células tratadas y las no tratadas $G = 36,48$ ($P<0,001$); estas diferencias son atribuibles únicamente a las 2 dosis mayores: $G = 8,76$ ($P<0,01$) para la dosis 3 y $G = 27,92$ ($P<0,001$) para la dosis 4.

La disminución del índice mitótico en relación a la concentración de cromo arrojó un $R = 0.90$ ($P<0.05$).

DISCUSIÓN

Asumiendo que el incremento de las frecuencias de cromosomas rezagados en anafase-telofase puede ser indicativo de habilidad aneugénica (11), este ensayo puede ser considerado útil para distinguir compuestos aneugénicos de clastogénicos, siendo los fragmentos rezagados y los puentes de cromatina indicadores de actividad clastogénica.

La carcinogenicidad y genotoxicidad del cadmio, cromo y níquel dependen en gran medida del ligando al que estén unidos lo cual modifica la biodisponibilidad y reactividad con los eventuales blancos celulares. De acuerdo con Beyersman (58), los compuestos metálicos son levemente genotóxicos, con excepción del cromo hexavalente. A pesar de esta aseveración nosotros encontramos que los tres cationes son genotóxicos: el cadmio y el cromo son clastogénicos y aneugénicos, y el níquel sólo es aneugénico.

En el caso de las sales de cadmio, podemos inferir que el cloruro es más tóxico que el sulfato ya que fue efectivo en concentraciones menores.

El dicromato de potasio fue utilizado en una concentración molar mayor que las sales de cadmio y su capacidad genotóxica se observó en dosis mayores que las necesarias para inducir aneuploidía en *Saccharomyces cerevisiae* (46) y similares o menores que las que ocasionan transformación celular en células de hámster sirio y en fibroblastos BHK (59).

Los compuestos de níquel indujeron aumento de la frecuencia de cromosomas rezagados, y sólo en el caso del sulfato, de la de puen-

tes de cromatina. Ninguna de las dos sales probadas tuvo efecto sobre la frecuencia de fragmentos rezagados. Estos resultados indican que o bien estos compuestos no son clastogénicos, o tienen un efecto muy débil que no pudo apreciarse bajo las condiciones experimentales empleadas. De todas maneras otros autores han encontrado resultados positivos utilizando dosis mayores de cloruro de níquel (0,5 - 2 mM por 5 h) (60) o combinando el sulfato de níquel con radiación UV o benzo-a-pireno. Littlefield y colaboradores (28) encontraron que el ion Ni^{+2} fue menos tóxico que el Cd^{+2} en la misma concentración.

La disminución del índice mitótico, estadísticamente significativa en todos los casos, excepto uno, indica que estos compuestos metálicos tienen actividad citotóxica dosis-dependiente. El cloruro de níquel fue el único compuesto que no arrojó un R significativo probablemente debido a que si bien tiene actividad citotóxica, las dosis más bajas fueron poco efectivas.

La principal causa de aneuploidía es la no-disyunción, aunque hay otras causas que también deben ser tenidas en cuenta como el retraso cromosómico, la segregación errónea de las cromátidas y las divisiones monopares (61). Aún no sabemos cuáles son el o los mecanismos utilizados por los metales pesados. Se sabe que el cloruro de cadmio (tal como otros inductores de aneuploidía) produce modificaciones en la morfología de los microtúbulos en *Hordeum vulgare* (62). El cromo VI entra rápidamente a la célula por canales aniónicos, formándose reactivos intermedios durante su reducción intracelular que podrían ser responsables de su genotoxicidad (43, 42, 47). Sin embargo hay más de una explicación posible para la aneugénesis del cromo. Li y colaboradores (63) sugieren que la misma podría estar relacionada con el daño en la síntesis de proteínas de citoesqueleto. Otra explicación fue propuesta por Bridgewater y colaboradores que sugieren que el cromo puede inducir uniones DNA-DNA interfiriendo en la replicación y originando eventualmente cromosomas rezagados cuando esto ocurre a nivel del centrómero.

Finalmente podemos afirmar que los resultados descritos contribuyen a validar la prueba de anafase-telofase para la evaluación de agentes aneugénicos y clastogénicos de acuerdo a las siguientes evidencias: la prueba es lo suficientemente sensitiva como para detectar relaciones dosis-respuesta, es útil para diferenciar compuestos aneugénicos de clastogénicos, los resultados obtenidos con otros compuestos (datos no mostrados) concuerdan con los del conteo de cromosomas por ejemplo en el caso del aldehído propiónico (11).

BIBLIOGRAFÍA

1. Dulout FN. Mutagénesis y carcinogénesis ambiental. En: Elementos de política ambiental. F. Goñi y R. Goñi (Eds.) Honorable Cámara de Diputados de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, 1993; pp. 693-704.
2. Ehrenberg L, Brookes P, Druckrey H, Lagerlof B, Litwin J, Williams G. The relation of cancer induction and genetic damage. En: Evaluation of genetic risks of environmental chemicals, Ramel, C. (De.) Ambio Special Report N°3, Royal Swedish Academy of Sciences, Universitetsforlaget, Estocolmo, 1973; pp. 15-25.
3. Epstein C. Mechanisms of the effects of aneuploidy in mammals. Annual Reviews of Genetic 1988; 22: 51-75.
4. OECD/OCDE. Ninth addendum to the OECD guidelines for the testing of chemicals. (ISBN 92-64-16054-X) 1998.
5. Danford N. Tests for chromosome aberrations and aneuploidy in Chinese hamster fibroblast cell line CH1-L. In Ashby J, De Serres F, Draoer M, Ishidate M Jr, Margolin B, Matter B y Shelby M (eds), Progress in Mutation Research, Elsevier, Amsterdam, 1985; vol. 5 pp 397-411.
6. Dulout F, Olivero O. Anaphase-telophase analysis of chromosomal damage induced by chemicals. Environ Mutagen 1984; 6: 299-310.
7. Dulout F, Furnus C. Acetaldehyde-induced aneuploidy in cultured Chinese hamster cells, Mutagenesis 1987; 3: 207-211.
8. Furnus C, Ulrich M, Terreros M, Dulout F. The induction of aneuploidy in cultured Chinese cells by propionaldehyde and chloral hydrate. Mutagenesis 1990; 5: 323-326.
9. Natarajan AT, Boei JJ, Darroudi F, Van Diemen P, Dulout F, Hande M, Ramalho A. Current cytogenetic methods for detecting exposures and effects of mutagens and carcinogens. Environ. Health Perspect. 1996; 104 (Suppl.3): 445-448.
10. Dulout FN, Grillo CA, Seoane AI, Maderna CR, Nilsson R, Vahter M, Darroudi F, Natarajan AT Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes from Andean women and children from Northwestern Argentina exposed to arsenic in drinking water. Mutation Research 1996; 370: 151-158.
11. Seoane AI y Dulout FN. Use of anaphase-telophase test to detect aneugenic compounds: effects of propionaldehyde and cadmium chloride. Bull Environ Contam Toxicol 1994; 53: 924-929.
12. Anttila S. Biological effects of occupational and environmental exposure to chromium. Metal Ions in Biology and Medicine 1990; pp. 315-319.
13. De Flora S y Wetterhahn K. Mechanisms of chromium metabolism and genotoxicity. Life Chemical Report 1989; 7: 169-244.
14. Hansen J, Gron P, Jespersen B, Voigt J, Simonsen J, Dalgaard J y Hansen E. Cadmium exposure in Denmark, Danish Medical Bulletin 1989; 36: 499-502.
15. Oberdorster G. Pulmonary toxicity and carcinogenicity of cadmium. Journal Amer Coll Toxicol 1989; 8 (7): 1251-1263.
16. Sunderman F. Recent advances in metal carcinogenesis. Annals on Clinical and Laboratory Science 1989; 14 (2): 93-122.
17. Coogan T, Bare R, Waalkes M. Cadmium-induced DNA strand damage in cultured liver cells: reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment. Toxicol Appl Pharmacol 1992; 113(2): 227-233.
18. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk to humans. Supplement 7. Lyon, France. 1987.
19. Reddy J, Svoboda S, Azarnoff D y Dawar R. Cadmium-induced cell tumors of rat testis: morphologic and cytochemical study, J. Natl. Cancer Inst. 1973; 51: 891-903.
20. Takenaka S, Oldiges H, Konig H, Hochrainer D y Oberdorster G. Carcinogenicity of cadmium chloride aerosols in W rats, J. Natl. Cancer Inst. 1983; 70: 367-373.
21. Oldiges H, Hochrainer D, Takenaka S, Oberdorster G y Konig H. Lung carcinomas in rats after low level cadmium inhalation, Toxicology and Environmental Chemistry, 1984; 9: 41-51.
22. Lakkad B, Nigam S, Karnik A, Thakore K y Chaterjee B. Effect of cadmium chloride on cell division and chromosomes in Chinese hamster ovary cells. Bull Environ Contam Toxicol 1984; 36: 342-349.
23. Selyes A, Serényi P, Boldog F, Bokros F, Takács S. Acute and long term genotoxic effects of CdCl₂ on testes of mice. J Toxicol Environ Health 1992; 36: 401-409.
24. Wallin M, Fridén B, Billger M. Studies of the interaction of chemicals with microtubule assembly in vitro can be used as an assay for detection of cytotoxic chemicals and possible inducers of aneuploidy. Mutation Research 1985; 201: 303-311.
25. Andersen O, Ronne M. Spindle-inhibiting effects of metal compounds studied by chromosome length measurement. Scandinavian Cell Toxicology Congress 1990; 2: 163-167.
26. Klein C, Frenkel K, Costa M. The role of oxidative processes in metal carcinogenesis. Chem Res Toxicol 1991; 4: 592-604.
27. Patierno SR, Costa M. DNA-protein cross-links induced by nickel compounds in intact cultured mammalian cells. Chem. Biol. Interact. 1985; 55:75-91.
28. Littlefield N, Hass B, James S y Poirier S. Protective effects of magnesium on DNA strands breaks induced by nickel or cadmium. Cell Biol Toxicol 1984; 10: 127-135.
29. Sharma A y Talukder G. Effects of metals on chromosomes of higher organisms. Environmental Mutagenesis 1987; 9:191-193.
30. Barret J. Annual Report of the Chief inspector of factories for the year 1948. Her's Majesty's Stationary Office, London 1949 pp.158.
31. Doll R, Matthews J y Morgan L. Cancers of the lung and nasal sinuses in nickel workers. British Journal of Industrial Medicine 1977; 34:102-105.
32. Foulkes E y Blanck S. The selective action of nickel on tubule function in rabbit kidneys. Toxicology 1984; 33: 245-247.
33. Donskoy E, Donskoy M, Faripour F, Gillies C,

- Marzouk A, Reid M, Zaharia O y Sunderman F Jr. Hepatic toxicity of nickel chloride in rats. *Annals of Clinical Laboratory Sciences* 1986; 16: 108-117.
34. Costa M. Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacol Toxicol* 1991; 31: 321-337.
35. Dunnick J, Elwell M, Benson J, Hobbs C, Hahn F, Haly P, Cheng YS y Eidson A. Lung toxicity after 13-week inhalation exposure to nickel oxide, nickel subsulfide, or nickel sulfate hexahydrate in F344/N rats and B6C3F₁ mice. *Fundamental and Applied Toxicology* 1988; 12: 584-594.
36. Benson J, Burt D, Cheng YS, Hahn J, Haley P, Henderson R, Hobbs C, Pickkrell J y Dunnick J. Biochemical responses of rat and mouse lung to inhaled nickel compounds. *Toxicology* 1989; 57: 255-266.
37. Christie NT, Sen P y Costa M. Chromosomal alterations in cell lines derived from mouse rhabdomyosarcomas induced by crystalline nickel sulfide. *Biol. Metals* 1988; 1: 43-45.
38. Patierno SR, Sugiyama M, Basilion JB y Costa M. Preferential DNA-protein cross-linking by NiCl₂ magnesium-insoluble regions of fractionated Chinese hamster ovary cell chromatin. *Cancer Research* 1985; 45: 5787-5794.
39. Baruthio F. Toxic effects of chromium and its compounds. *Biological Trace Element Research* 1991; 32: 145-153.
40. Howard W. Induction of chromosome changes by metal compounds in cultured CHO cells. *Toxicol Letters* 1991; 56: 179-186.
41. Elías Z, Poirot O, Pezerat H, Suquet H, Schneider O, Daniere M, Terzetti F, Baruthio F, Fournier M, Cavalier C. Cytotoxic and neoplastic transformation effects of industrial hexavalent chromium pigments in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 1989; 10: 2043-2052.
42. Katz S y Salem H. The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. *Journal of Applied Toxicology* 1993; 13 (39): 217-224.
43. De Flora S, Bagnasco M, Serra D, Zancacchi P. Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutation Research* 1990; 238: 90-172.
44. Gao M, Binks S, Chipman J, Levy L, Braithwaite R y Brown S. Induction of DNA strand breaks in peripheral lymphocytes by soluble chromium compounds. *Human and Experimental Toxicology* 1992; 11: 77-82.
45. Gao M, Binks S, Chipman S y Levy L. Hexavalent chromium produces DNA strand breakage but not unscheduled DNA synthesis at sub-cytotoxic concentrations in hepatocytes. *Toxicology* 1993; 77: 171-180.
46. Sora S, Agosti Carbone ML, Pacciarini M, Magni G. Disomic and diploid meiotic products induced in *Saccharomyces cerevisiae* by the salts of 27 elements. *Mutagenesis* 1996; 1: 21-28.
47. Biederman K, Landolph J. Role of valence state and solubility of chromium compounds on induction of cytotoxicity, mutagenesis and anchorage independence in diploid human fibroblasts. *Cancer Research* 1990; 50:7835-7842.
48. Petrilli F y De Flora S. Interpretation on chromium mutagenicity and carcinogenicity. *Mutagens in our environment*. Alan R. Liss, New York 1982; pp. 453-464.
49. Venier P, Montaldi A, Majone F, Bianchi V y Levis A. Cytotoxic, mutagenic and clastogenic effects of industrial chromium compounds. *Carcinogenesis* 1982; 3 (11): 1331-1338.
50. Chorvatovicova D, Ginter E, Kosinova A y Zloch Z. Effects of vitamins C and E on toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium in rat guinea pig. *Mutation Research* 1991; 262: 41-46.
51. Tsuda H, y Kato K. Chromosomal aberrations and morphological transformation in hamster embryonic cells treated with potassium dichromate in vitro. *Mutation Research* 1977; 46: 87-94.
52. Coutiño E. Determinación del daño genético mediante análisis de anafases en células de mamíferos. *Manual de métodos para identificación de mutágenos y carcinógenos químicos ambientales* 1980; pp.119-132.
53. Hsu T, Collie C, Lusby A y Johnston D. Cytogenetic assays of chemical clastogens using mammalian cells in culture. *Mutation Research* 1977; 45: 233-247.
54. Mc Gill M, Pathak S y Hsu T. Effects of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: a possible material basis for chromosome stickness. *Chromosoma* 1974; 47: 157-167.
55. Nichols W, Moorhead P y Brewen G. Chromosome methodologies in mutation testing. Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1972; 22: 269-275.
56. Dulout F y Olivero O. Anaphase-telophase analyses of chromosomal damage induced by chemicals. *Environmental Mutagenesis* 1984; 6: 299-310.
57. Sokal R y Rohlf F. *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. Madrid, H. Blume eds. 1979.
58. Beyersman D. Interactions in metal carcinogenicity. *Toxicology Letters* 1984; 72 (1-3): 333-338.
59. Lanfranchi G, Paglialunga S y Levis L. Mammalian cell transformation induced by chromium (VI) compound in the presence of nitrilotriacetic acid. *Journal of Toxicol Environ Health* 1988; 24: 251-260.
60. Hartwig A y Beyersmann S. Enhancement of UV-induced mutagenesis and sister-chromatid exchanges by nickel ions in V79 cells: evidence for inhibition of DNA repair. *Mutation Research* 1989; 217: 65-73.
61. Ford J y Correl A. Chromosome errors at mitotic anaphase. *Genome* 1991; 35: 702-705.
62. Voutsinas G, Zarani F y Kappas A. The effect of environmental aneuploidy-inducing agents on the microtubule architecture of mitotic meristematic root cells in *Hordeum vulgare*. *Cell Biol Int* 1997; 21(7): 411-418.
63. Li W, Zhao Y and Chou I. Cytoskeletal injury induced by hexavalent chromate. *Toxicology in vitro* 1992; 6 (5): 433-444.