

CH-FC
MA6-B
P424

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
BASICAS Y FARMACEUTICAS

EFFECTO DE ARSENICO PENTAVALENTE SOBRE EL CICLO
PROLIFERATIVO DE CELULAS MERISTEMATICAS DE LA RAIZ DE
ALLIUM CEPA L.

LEONOR INES PEPPER BERGHOLZ

- 1 9 8 4 -



UCH-FC
M26-B
P424

EFFECTO DE ARSENICO PENTAVALENTE SOBRE EL CICLO
PROLIFERATIVO DE CELULAS MERISTEMATICAS DE LA RAIZ DE
ALLIUM CEPA L

TESIS
ENTREGADA A LA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y FARMACEUTICAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS
PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN CIENCIAS BIOLOGICAS
CON MENCION EN BIOLOGIA CELULAR

POR
LEONOR INES PEPPER BERGHOLZ

PATROCINANTE DE TESIS : DR. NORBEL GALANTI GARRONE

- 1 9 8 4 -

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por la candidata

LEONOR INES PEPPER BERGHOLZ

ha sido aprobada por la comisión informante de Tesis como requisito de Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Biología Celular.

Director de Tesis:

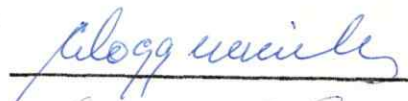
Norbel Galanti



A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Norbel Galanti', written over a horizontal line.

Comisión informante de Tesis:

Carlos Doggenweiler



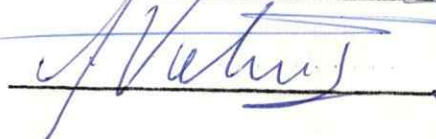
A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Carlos Doggenweiler', written over a horizontal line.

Liliana Cardemil



A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Liliana Cardemil', written over a horizontal line.

Alfonso Valenzuela



A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Alfonso Valenzuela', written over a horizontal line.

AGRADECIMIENTOS

Al concluir esta tesis, quiero expresar mi más sin cero reconocimiento a todas aquellas personas que, directa o indirectamente colaboraron en su realización.

Al Prof. Dr. NORBEL GALANTI G., maestro y amigo un agradecimiento muy especial por su confianza, enseñanzas y constante interés.

A mi colega y amigo JORGE SANS P., quien me introdujo en el mundo de *Allium cepa* L, compartiendo conmigo sus conocimientos teóricos y prácticos acerca de este modelo.

A REMIGIO LOPEZ y MARIA LUISA LOPEZ, por su valiosa cooperación.

A todos los integrantes del departamento de Biología Celular y Genética, quienes me brindaron su apoyo, cooperación y amistad.

A los Profesores Dr. JORGE LOPEZ SAEZ y MATILDE NAVARRETE por su calida acogida y valiosa cooperación durante mi estadía en el C.S.I.C. de Madrid, así como a los miembros de dicho Instituto.

A la Directora Dra. MARIA DIAZ A. y personal del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina por haberme conferido facilidades para trabajar en este estudio.

A la Sra. MARTHA RUZ por haber efectuado la transcripción mecanográfica de este trabajo.

Esta Tesis se desarrollo en el Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, División Norte y en el Instituto de Biología Celular C.S.I.C., Madrid, España.

Fue financiada por los Proyectos 1/82 PNUD/UNESCO, B-1245/8321 de la Universidad de Chile, por el convenio de Cooperación Científica y Tecnológica entre la Universidad de Chile y el C.S.I.C., España y por el proyecto 1088 del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Consejo Superior de Ciencia, Chile.

A Miguel

A Susana y Klaus

INDICE DE MATERIAS

	PAGS.
INDICE DE MATERIAS	i
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCION	1
II. MATERIALES Y METODOS	10
a) Material biológico	10
b) Compuestos químicos	10
c) Método de cultivo	11
d) Tratamientos	11
e) Métodos de estudio	12
1. Crecimiento longitudinal de la raíz	12
2. Períodos del ciclo celular	12
2.1. Frecuencia de células en mitosis	12

	PAGS.
2.2. Frecuencia de células en los períodos de la <u>inter</u> fase	13
2.2.1. Frecuencia de <u>cé</u> lulas en el pe - ríodo S	14
2.2.2. Frecuencia de <u>cé</u> lulas en los pe - ríodos G_1 y G_2 del ciclo celu - lar	16
2.2.3. Frecuencia de <u>cé</u> lulas en tres <u>sub</u> compartimentos del período S	18
3. Determinación de la duración de la interfase mínima en una población sincrónica de células	19
4. Determinación de la velocidad de flujo a través de la <u>telofa</u> se y <u>metafase</u>	21
5. Efecto de arsénico sobre la <u>in</u> corporación de leucina tritiada	22

	PAGS.
6. Determinación de la <u>concentra</u> ción intracelular de ATP	25
RESULTADOS	27
DISCUSION	39
BIBLIOGRAFIA	63

LISTA DE TABLAS

PAGS.

TABLA N° 1 : Efecto de 2 ppm de arsénico pentavalente sobre el tiempo de inter-fase.

TABLA N° 2 : Efecto de arsénico pentavalente sobre la velocidad de tránsito metafasico en meristema radicular.

LISTA DE FIGURAS

- FIG. N° 1 : Efecto de arsénico pentavalente sobre el incremento longitudinal diario de la raíz.
- FIG. N° 2 : Efecto de arsénico pentavalente sobre el crecimiento radicular.
- FIG. N° 3 : Efecto de arsénico pentavalente sobre la tasa de crecimiento radicular.
- FIG. N° 4 : Reversión de la inhibición del crecimiento radicular producido por arsénico pentavalente.
- FIG. N° 5 : Efecto de la concentración de arsénico pentavalente sobre índice mitótico de la zona meristemática de la raíz.
- FIG. N° 6 : Efecto de arsénico pentavalente sobre índice mitótico de la zona meristemática de la raíz. Primeras diez horas de tratamiento.
- FIG. N° 7 : Efecto de arsénico pentavalente sobre la distribución de células en las fases de la mitosis.

- FIG. N° 8 : Efecto de 2 ppm de arsénico pentavalente sobre índice mitótico. Incubación a 25°C
- FIG. N° 9 : Efecto de 2 ppm de arsénico pentavalente sobre el índice de marcación en meristemas radiculares de *Allium cepa* L.
- FIG. N° 10 : Efecto de 2 ppm de arsénico pentavalente sobre la frecuencia de células en los períodos del ciclo proliferativo.
- FIG. N° 11 : Efecto de 2 ppm de arsénico pentavalente sobre tres subcompartimentos del período S.
- FIG. N° 12 : Efecto de 2 ppm de arsénico pentavalente sobre el porcentaje de metafases acumuladas.
- FIG. N° 13 : Efecto de 2 ppm de arsénico pentavalente sobre velocidad de tránsito por metafase (barras) y sobre índice mitótico (línea).
- FIG. N° 14 : Efecto de arsénico pentavalente sobre el ingreso y la incorporación de leucina en meristema radicular.

- FIG. N° 15 : Efecto de 2 ppm de arsénico pentavalente sobre el ingreso y la incorporación de leucina en meristema radicular.
- FIG. N° 16 : Efecto de 2 ppm de arsénico pentavalente sobre la concentración intracelular de ATP en meristema radicular.
- FIG. N° 17 : Efecto de arsénico pentavalente (2 ppm) y de fósforo (2 ppm y 6 ppm) sobre el crecimiento radicular.
- FIG. N° 18 : Efecto de arsénico pentavalente (2 ppm) y de fósforo (2 ppm y 6 ppm) sobre el índice mitótico.
- FIG. N° 19 : Método para determinar la frecuencia de células en tres subcompartimentos del período S.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxiribonucleico
ADP	Adenosin di fosfato
ATP	Adenosintrifosfato
act. esp.	actividad específica
c.p.m.	cuentas por minuto
EDTA	etilen diamino tetracetato de sodio
NAD ⁺	nicotin amida adenina dinucleótido oxidado
O.M.S.	Organización Mundial de la Salud
PCA	Acido perclórico
TCA	Acido tricloroacético
ppm	partes por millón

RESUMEN

En esta tesis se establecen las alteraciones producidas por arsénico pentavalente en el crecimiento radicular y en el ciclo de división de células meristemáticas de la raíz de *Allium cepa* L. Además se proponen posibles mecanismos responsables de las alteraciones descritas.

La inmersión de la base de los bulbos de *Allium cepa* L en agua potable filtrada produce brotación, entrando los blastemas radiculares en activa proliferación. La raíz crece longitudinalmente debido tanto al aumento en el número de células en la zona meristemática como a la elongación de las mismas en la zona de diferenciación. En condiciones fijas tanto de temperatura como aireación, y en la oscuridad, las raíces crecen con una cinética constante en el tiempo.

Empleando este sistema, se estudió el efecto de arsénico pentavalente sobre: crecimiento radicular, frecuencia de células en mitosis, distribución celular en los cuatro períodos del ciclo proliferativo (G_1 , S, G_2 y M) y en tres subcompartimentos del período S, duración de la interfase y velocidad de flujo celular a través de la metafase. El estudio de los mecanismos que podrían operar en los efectos de arsénico pentavalente sobre los parámetros biológicos estudia-

dos (crecimiento radicular y proliferación celular), se enfocó en relación a aspectos generales del metabolismo celular tales como transporte de leucina a través de membrana, síntesis de proteínas y concentración intracelular de ATP. Además se estudió el efecto de fósforo sobre la acción de arsénico en cuanto a crecimiento radicular e índice mitótico.

Se observó que arsénico pentavalente inhibe el crecimiento radicular en función de la concentración del microelemento utilizada. El efecto es paulatino, presentando como característica importante una reversión de la inhibición en 1 ppm en presencia del elemento. Por encima de esta concentración, la inhibición es irreversible.

Arsénico inhibe además la proliferación celular en la zona meristemática, efecto que depende de su concentración en el medio que también requiere de un período de latencia. Nuevamente se observa reversión de la inhibición en presencia del microelemento, hasta 3 ppm. Concentraciones mayores inhiben irreversiblemente la proliferación celular.

La diferencia de sensibilidad de los parámetros medidos, crecimiento radicular y proliferación celular, a diferentes concentraciones de arsénico, sugiere que la elongación celular en la zona de diferenciación es más sensible al elemento. La reversión de la inhibición, tanto del creci -

miento celular con 1 ppm como de la proliferación celular en 3 ppm, podría implicar la existencia de mecanismos detoxificantes.

Además se observó que arsénico pentavalente en una concentración de 2 ppm afecta la distribución celular en los cuatro compartimentos del ciclo celular en forma transitoria. La alteración más relevante consiste en un bloqueo de células en G_1 y en G_2 , que se traduce en una disminución de la frecuencia de células en S y M. Este efecto desaparece en función del tiempo en presencia del microelemento. Por otra parte, en estas condiciones, el tiempo de ciclo celular aumenta y la velocidad de tránsito celular disminuye.

Arsénico pentavalente inhibe parcialmente y reversiblemente el transporte de leucina a través de membrana y afecta la síntesis proteica, en etapas tempranas y medianas de incubación en este microelemento. Sin embargo, arsénico no disminuye la concentración intracelular de ATP hasta las 48 horas de tratamiento.

Se demostró además que fósforo⁺⁵ impide la acción inhibitoria ejercida por arsénico sobre el crecimiento radicular y el índice mitótico.

Se postula que la reversión de la inhibición del

crecimiento radicular, y en particular de la proliferación celular observada con las concentraciones más bajas de arsénico utilizadas, se debe a un cambio en la relación P/As producido por flujo de fosfato desde el bulbo hacia la raicilla.

Se sugiere que el bloqueo de células en G_1 y G_2 inducido por arsénico es consecuencia de la inhibición parcial de síntesis de proteínas observada y/o por interferencia con fosforilación de proteínas necesarias para el tránsito celular por el ciclo proliferativo.

A B S T R A C T

Alterations induced by As^{5+} in the root growth and in the cell division cycle of root meristematic cells in *Allium cepa* L were studied. Possible mechanisms responsible for these alterations are proposed.

Onion bulbs were placed in filtered tap water in such a way that only their bases remained submerged. Under these conditions, the meristematic cells of unsprouted roots enter the cell cycle. The root grows in length by increasing the number of cells in the meristematic zone and by cell elongation in the differentiation zone. Root growth is constant in darkness and under standard conditions of temperature and air bubbling.

Using this system, the effect of As^{5+} on root growth, mitotic index, frequency of cells in G_1 , S, G_2 , M and in three subcompartments of S, interphase duration and velocity of cells through metaphase was investigated. Mechanisms that may participate in the observed effects of As^{5+} on these biological parameters were studied in connection with general aspects of cell metabolism, such as leucine transport, protein synthesis and intracellular concentration of ATP. Moreover, the effect of P^{5+} on the action of

As⁵⁺ in relation to root growth and mitotic index were also studied.

As⁵⁺ inhibits root growth as a function of its concentration. This inhibition is gradual, showing as an important feature reversion of inhibition in the presence of 1 ppm of As⁵⁺. Above this concentration, inhibition of root growth is irreversible.

As⁵⁺ also inhibits cell proliferation in the meristematic zone. This effect is dependent on the concentration of this element and is evident only after a latency period. Again, a reversion of the inhibition is observed up to a concentration of 3 ppm. Above this level, inhibition of cell proliferation in concentrations up to 1 ppm As⁵⁺ and up to 3 ppm As⁵⁺ respectively, suggests the existence of processes of detoxification and that elongation is more sensitive to As⁵⁺ than cycling cells.

As⁵⁺ at a concentration of 2 ppm also affects the distribution of cells in the cell cycle, increasing the frequency of cells in G₁ and G₂ with a concomitant decrease of the frequency of cells in S and M, respectively. By 48 hrs this effect is reverted in the presence of the element. As⁵⁺ also increases the length of the cell cycle and decreases the speed of cells through metaphase.

Another action of 2 ppm As^{5+} is a partial inhibition of leucine transport and of its incorporation to protein in the first 24 hrs of incubation. This effect disappears by 48 hrs. However, 2 ppm As^{5+} does not decrease the intracellular concentration of ATP up to 48 hrs.

An interesting observation is that PO_4^{3-} prevents the inhibitory action of As^{5+} on root growth and on cell proliferation of meristematic cells.

It is suggested that the reversion of the inhibition of root growth and of cell proliferation, observed at low As^{5+} concentrations, is a result of a change in the P/As ratio induced by P flux from the bulb. It is also proposed that the increase in the frequency of cells in G_1 and G_2 is a consequence of the partial inhibition of protein synthesis observed and/or a result of arsenolysis of proteins necessary for the flux of cells through the cell cycle.

I N T R O D U C C I O N

El arsénico, en conjunto con otros elementos, es considerado como un contaminante ambiental, siendo su presencia de especial relevancia en zonas mineras y como producto de la combustión del carbón (8, 66). En Chile, la presencia de arsénico en la Primera y Segunda Región alcanza niveles toxicológicos estando presente en el agua de riego y de bebida de algunas localidades en concentraciones superiores al límite máximo nacional (0.12 ppm) y al límite internacional dictaminado por la O.M.S. (0.05 ppm). También existe acumulación natural de arsénico en la zona altiplánica del Norte Grande de Chile por actividad volcánica y geotérmica (3, 54, 55, 56). Este hecho repercute en plantas regadas con agua arsenicada y en personas expuestas a este elemento. X

Entre las consecuencias de la presencia de este contaminante para el hombre, se cuentan algunas patologías que derivan de la alteración de la proliferación celular (2, 8, 51). Estudios epidemiológicos y clínicos (5, 8, 15, 33, 52, 53, 61, 68, 72) señalan una mayor incidencia de cáncer y otras enfermedades, en poblaciones de alto riesgo y en personas que han sido tratadas terapéuticamente con compuestos arsenicados. Estos estudios han llevado a diversos autores a considerar este microelemento como un agente cancerígeno (26). Sin embargo, y a pesar de numerosos esfuerzos, no se ha logrado evidencia X

experimental que demuestre esta supuesta acción cancerígena (1, 28).

Arsénico se encuentra en el ambiente como radical tri y pentavalente, formando parte de compuestos orgánicos e inorgánicos. A pesar de que su forma más estable *in vitro* y en fundiciones es la trivalente, la forma natural en suelos y agua es la pentavalente, siendo los arsenitos lentamente oxidados a arsenatos en presencia de oxígeno en la corteza terrestre (66, 8).

Los trabajos sobre arsénico se refieren fundamentalmente a sus efectos como contaminante ambiental sobre poblaciones expuestas, a su efecto sobre algunos aspectos del ciclo proliferativo y a su efecto sobre el metabolismo celular.

Cabe hacer notar sin embargo, que existe gran confusión en la literatura referente a arsénico, en el sentido que en muchos trabajos no se especifica la valencia del compuesto utilizado o analizado, o bien se explica la acción del arsénico pentavalente con mecanismos de acción del arsénico trivalente y viceversa. Esto tiene especial relevancia, ya que como veremos más adelante, los efectos de ambos estados de oxidación sobre el metabolismo celular son totalmente diferentes.

El mecanismo de acción de arsénico trivalente es fundamentalmente a través de su unión a grupos tiol del sitio activo de diversas enzimas sulfidriladas. Entre los sistemas enzimáticos inhibidos por arsenito inorgánico, se cuentan los de las oxidaciones de cetoácidos y aldehidos y las deshidrogenasas láctica, málica y succínica (66). La gravedad de su acción aumenta más aún por el hecho de que el arsénico trivalente se fija en los tejidos en forma estable, a diferencia del pentavalente que no lo hace (31).

El arsénico pentavalente presenta efectos bioquímicos diferentes. Dada su estructura y propiedades químicas semejantes al fósforo⁺⁵, compite con éste en diversas reacciones metabólicas. La acción principal del arsénico pentavalente consiste en sustituir al fósforo inorgánico, produciéndose compuestos arsenicados inestables en lugar de compuestos fosforilados estables (arsenolisis)(32, 66). Esto implica un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa con respecto a la cadena respiratoria y de la fosforilación ligada a sustrato en la oxidación de fosfogliceraldehido y del α cetooglutarato, reacciones en las que se regenera ATP a partir de ADP (66). Por ejemplo, en la reacción en la que se oxida el 3-fosfogliceraldehido a ácido 1,3-difosfoglicérico, interviene la enzima gliceraldehido fosfato deshidrogenasa que requiere NAD⁺ como oxidante específico y fosfato inorgánico. Es

ta enzima puede utilizar arsenato en vez de fosfato, formándose posiblemente 1,3-fosfoglicerilarsenato, compuesto muy inestable, que se descompone inmediata y espontáneamente en sistemas acuosos. Así, en presencia de arsenato no se forma el compuesto fosfatado de alta energía por acción de la dehidrogenasa aunque la oxidorreducción global tenga lugar (35). Un mecanismo similar ocurre en la fosforilación del α -cetoglutarato.

De la misma manera, se puede suponer que arsenato podría competir con fosfato en las reacciones de fosforilación de proteínas en general, o bien de proteínas particulares.

Arsenato comparte con fosfato el mismo mecanismo de transporte activo a través de membrana (7, 19), el cual, se ha postulado, sería dependiente de ATP (25, 49, 69). En general, arsenato inhibe o bloquea los sistemas de transporte a nivel de membranas. En levadura, arsenato ejerce una acción bloqueadora de sistemas de transporte de la membrana celular, incluyendo el transporte de fósforo, manganeso, magnesio y del propio arsénico (62). La incorporación de arsenato es inicialmente rápida pero disminuye progresivamente hasta cesar, a pesar de haber arsénico en el medio. La presencia de fosfato retrasa pero no impide el bloqueo del sistema de transporte por arsenato y no lo revierte una vez establecido. Los autores postulan que a medida que arsenato es transportado,

alguna fracción del transportador para fosfato y arsenato de saparece continuamente de manera irreversible. A pesar de que el arsenato tiene efectos inhibitorios sobre el metabolismo celular, estos efectos no serían en sí responsables de la inactivación del sistema de transporte. Sin embargo, en *Neurospora crassa* (67), se observa que fosfato no interfiere con la inhibición por arsenato de la incorporación de glucosa. Estos y otros resultados, hacen postular a los autores que la inhibición por arsenato del sistema de transporte activo de glucosa implica transporte de arsenato a la célula por vía del transporte de ortofosfato, reducción del arsenato transportado a arsenito e interacción con algún componente del sistema de transporte de glucosa probablemente por unión covalente con grupos tiol. En estudios efectuados en riñón de mamífero (19), se plantea que arsénico compite con fósforo en cuanto a su transporte a través del epitelio tubular.

Arsénico⁺⁵ tendría también una acción inhibidora en la síntesis de ácido nucleicos y proteínas (57).

Es importante hacer notar que la afinidad de los sistemas fosforilativos es mayor por el fosfato que por el ar } senato; por lo tanto, los efectos ejercidos por arsenato dependerán en gran medida de la relación P/As presente en el sistema en estudio (62).

Existe gran controversia acerca de la posibilidad

de conversión de arsénico +5 a arsénico +3 en el organismo ; sin embargo, la mayoría de los trabajos apuntan a que ello no ocurre (10, 43, 66). Así, estudios acerca del metabolismo de As^{+3} han demostrado claramente que este tiende a ser oxidado en el organismo de mamíferos a As^{+5} , lo cual obviamente reduce su toxicidad (32). En mamíferos, el As^{+5} es excretado primordialmente por el riñón, mientras que los compuestos arsenicados trivalentes en concentración no fisiológica, son excretados por la bilis vía intestinal, acumulándose en parte en los tejidos (32). } X

Existen algunos trabajos acerca de la acción de arsénico⁺⁵ sobre el ciclo celular. Se ha definido el ciclo celular como el intervalo de tiempo que transcurre entre la mitosis de una célula parental y la mitosis de una o las dos células hijas (27). Se divide temporalmente en cuatro etapas discretas: G_1 o período prerreplicativo, definido como el tiempo que transcurre desde el término de la telofase y el inicio de la replicación del DNA nuclear; S o período replicativo, que corresponde al tiempo durante el cual se duplica el material hereditario y G_2 o período postreplicativo, equivalente al tiempo que transcurre entre el término de la etapa S y el inicio de la profase mitótica. Por último, el período M o de mitosis es el tiempo durante el cual se reparte el material hereditario en dos células hijas. El ciclo celular.

ha sido extensamente estudiado en cuanto a aspectos cinéticos, a su regulación, a los eventos moleculares que ocurren en sus diversos períodos y a la morfología celular. Estos aspectos han sido analizados en gran diversidad de sistemas y modelos tanto animales como vegetales (13, 41, 59, 77).

Los antecedentes relacionados con la acción de arsénico pentavalente sobre el ciclo celular señalan que en *Bacillus cereus* se inhibe la formación de colonias, efecto dependiente de la dosis y de la razón P/As en el medio (43). No se observa efecto en la incorporación de precursores a los ácidos ribo y desoxiribonucleicos, proteínas ni pared celular. Estos autores sugieren que su acción se ejerce en etapas de utilización de energía más que directamente en la biosíntesis de macromoléculas. En este sistema no hay interconversión de ambos estados de oxidación del arsénico. En hongos (10) se ha demostrado que arsenato de potasio inhibe o retarda su crecimiento en medios sólidos, existiendo variación en la respuesta de distintas cepas. El autor interpreta sus resultados apoyando la tesis de que la toxicidad del arsenato sobre el crecimiento de hongos se debe a su interferencia competitiva con fósforo en la fosforilación oxidativa y no a una reacción con grupos SH de proteínas esenciales.

En cuanto a células eucarióticas, la mayoría de los

estudios han sido efectuados en linfocitos humanos en cultivo, estimulados con fitohemaglutinina en presencia de arsenato (53, 57, 58). Es importante hacer notar que las concentraciones de arsenato utilizadas son altas, superiores a las presentes en el ambiente como contaminantes. En general se puede afirmar que se produce una inhibición de la incorporación de nucleótidos así como de aminoácidos marcados. Estudios citofotométricos en este sistema, señalan una detención de las células en los períodos S y G₂ del ciclo celular. En estos casos se ha visto también un aumento de aberraciones cromosómicas e intercambios de cromátidas hermanas, apuntando a una posible acción mutagénica de arsénico.

En un estudio acerca del efecto de distintos compuestos arsenicados sobre el crecimiento de diversas líneas celulares de mamífero *in vitro*, (65) se observa inhibición de la multiplicación celular, la cual es dependiente de la dosis y la valencia del arsénico.

Analizando éstos y otros estudios realizados referentes al efecto de arsénico sobre el ciclo celular, se puede apreciar la ausencia de un análisis sistemático y ordenado.

Para estudiar la influencia de arsénico sobre el ciclo celular se requiere de un sistema biológico en el cual el

elemento a estudiar ejerza un efecto directo sobre la célula. Los modelos animales (rata, ratón), presentan distintas vías de metabolización del compuesto (8) hecho que hace difícil el establecimiento de relaciones causa-efecto. Entre los sistemas vegetales, la zona meristemática de las raíces de *Allium cepa* L tiene características que obvian estos problemas, haciéndolo apropiado para estudiar el efecto de As sobre el ciclo celular.

Bajo condiciones de temperatura y aireación fijas, la población de células de los meristemas radiculares de *Allium cepa* L está en equilibrio dinámico, lo que se caracteriza por una constancia en cuanto a velocidad de crecimiento, número de células que proliferan y se diferencian, duración del ciclo celular y porcentaje de células en sus distintas etapas, (17). La raíz, siendo el órgano de absorción de la planta, presenta una alta permeabilidad, propiedad que la hace especialmente adecuada para estudiar el efecto de drogas. La organización y función del ápice radicular de mono y dicotiledóneas han sido detalladamente descritas (71) y sus características proliferativas han sido analizadas por diversos autores (6, 11, 12, 21, 23, 38). En el caso de *Allium cepa* L, la citología es relativamente simple, presenta un contenido 2C de DNA de 33 picogramos y un número relativamente bajo de cromosomas ($2n = 16$). Estas características la hacen apropiada para estudios citogenéticos, bioquímicos y citofotométricos.

La presencia de otros microelementos contaminantes en diversas zonas del país, hacen aconsejable el establecimiento de un procedimiento apropiado para detectar sus efectos sobre el ciclo proliferativo.

En este trabajo, además de establecer las eventuales alteraciones que experimenta el ciclo celular por acción de arsénico pentavalente, se propone una metodología para el estudio del efecto de microelementos contaminantes sobre el ciclo celular. }x

MATERIALES Y METODOS

A) MATERIAL BOLOGICO :

Se utilizó bulbos de *Allium cepa* L con un peso promedio de 20 g, adquiridos en la Vega Central de Santiago.

B) COMPUESTOS QUIMICOS

Se utilizó los siguientes reactivos :

Arsenato de sodio, metabisulfito de potasio, fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de sodio, cloruro de magnesio, cafeína, colchicina, glucosa, tris-hidroxi-metil-aminometano, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido tricloroacético, ácido perclórico y tolueno adquiridos en Merck (Darmstadt, Alemania).

Orceína y pararosanilina adquiridas en BDH Chemicals Ltd. (Poole, England). 2,5 difeniloxazol (PPO), 1,4, bis 2-(5-Phenyloxazol) benzeno (POPOP), etilen diamino tetracetato de sodio, adenosina trifosfato, hexoquinasa, glucosa-6-fosfatodehidrogenasa, nicotin amida adenina dinucleótido fosfato adquiridos en Sigma (St. Louis U. S.A.). Timidina tritiada (act. esp. 6.7 Ci/mmol) adquirida en Radiochemical Centre, Amersham U.K. Leucina tritiada (act. esp. 42 Ci/mmol) adquirida en New England Nuclear, Boston, Mass).

c) METODO DE CULTIVO :

Se indujo brotación de raíces en bulbos de *Allium cepa* L, introduciendo su base en agua potable, filtrada, contenida en tubos de vidrio de 80 ml, a los que se adaptó un sistema de burbujeo constante de aire (10 - 20 ml/min). El cultivo se mantuvo en un incubador a $15^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ y en la oscuridad.

D) TRATAMIENTO :

Los bulbos controles se cultivaron en agua potable filtrada. Los tratamientos con arsénico se hicieron utilizando soluciones de arsenato de sodio (Na_2HAsO_4), en concentraciones de 1 a 10 ppm (1 ppm = 1 mgr de arsénico elemento en 1 litro de agua), preparadas en agua potable filtrada. Los tratamientos con fósforo⁺⁵ se efectuaron en soluciones de fosfato de sodio y potasio (Na_2HPO_4 y KH_2PO_4) en concentraciones de 2,3,6 y 9 ppm calculadas considerando fósforo elemento. En todos los experimentos, la brotación de los bulbos se efectuó en agua potable filtrada hasta que las raíces alcanzaron una longitud de 2 a 3 cm, para ser entonces transferidos a las soluciones de arsenato u otro elemento, manteniéndose las condiciones descritas en c) a lo largo de todo el ensayo. En todos los experimentos el agua y las soluciones fueron renovadas cada 24 horas.

E) METODOS DE ESTUDIO :

1. CRECIMIENTO LONGITUDINAL DE LA RAIZ :

Los bulbos se cultivaron de la manera descrita en c). Se individualizó 10 a 12 raíces de tamaño similar, eliminando las restantes. Se midió la longitud de las raíces cada 24 horas mediante un papel milimetrado. Los resultados se expresaron como incremento en longitud por unidad de tiempo, como crecimiento longitudinal diario en el tiempo, o bien como tasa de crecimiento, vale decir, el crecimiento longitudinal promedio durante el tiempo de tratamiento : (longitud final - longitud inicial/tiempo).

2. PERIODOS DEL CICLO CELULAR :

FRECUENCIA DE CELULAS EN M, G₁, S y G₂.

2.1. Frecuencia de células en mitosis.

El índice mitótico (porcentaje de células en mi tosis) se determinó en preparados de zona meristemática de la raíz, obtenidos fijando 4 - 6 raicillas en etanol - ácido acético 3:1 v/v durante 12 horas a 4°C. Las raicillas fijadas se colocaron en un vidrio de reloj con aproximadamente 5 ml de orceína-acética-clorhídrica*(70)

*Orceína acética clorhídrica: calentar 55 ml de ácido acético a ebullición, mediante una platina termostática, en un balón de cuello esmerilado unido a un condensador de destilación. Agregar lentamente 2 g de orceína y dejar hervir durante 10 minutos, manteniendo agitación constante. Filtrar. Agregar una parte de ácido clorhídrico 1 N por cada 9 partes de esta solución.

y se calentaron suavemente con un mechero de alcohol, hasta la aparición de vapores. Este procedimiento se repitió tres veces, dejándolas posteriormente en reposo en la solución durante media hora. Luego se transfirió cada raicilla a un portaobjetos, obteniendo la zona meristemática por eliminación de la cofia (milímetro terminal) y de la zona de elongación, mediante corte con navaja. Las células meristemáticas, se dispersaron colocando la muestra bajo un cubreobjeto, golpeando suavemente sobre éste con un lápiz de grafito. Luego se presionó sobre el cubreobjeto con el dedo pulgar para lograr la formación de una monocapa. Las preparaciones así obtenidas fueron analizadas al microscopio óptico determinado el índice mitótico mediante el recuento del número de células en mitosis en 1000 células meristemáticas. Para cada punto experimental y controles se cuantificó de 3 a 5 raicillas. Los resultados se expresaron como porcentaje de células en mitosis.

2.2. Frecuencia de células en los períodos de la interfase.

2.2.1. *Frecuencia de células en el período S o de replicación del DNA.*

Las raíces provenientes de bulbos tratados con solución de arsénico en la concentración y por el tiempo determinado para cada experimento se incubaron en una solución de timidina tritiada conteniendo 20 Ci/ml (actividad específica: 6.7 Ci/mmol) durante media hora manteniendo las condiciones de incubación ya descritas. Luego de tres lavados en agua filtrada a 0°C, las raicillas se fijaron en etanol-ácido acético 3:1 v/v durante 12 horas a 4°C . Posteriormente se aplicó la tinción de Feulgen (14, 34), de la siguiente manera:

- a) Tres lavados en agua destilada de 10 minutos cada uno.
- b) Hidrólisis con ácido clorhídrico 5N a 20°C durante 60 minutos.
- c) Tres lavados en agua destilada de 10 minutos cada uno.

- d) Tinción con reactivo de Schiff* du
rante 30 minutos.
- e) Lavado en solución reductora.
Metabisulfito de potasio 10%. 10 ml
Acido clorhídrico 1 N.....10 ml
Agua destilada.....80 ml
- f) Lavado en agua destilada
- g) Aplastado en portaobjeto según mé-
todo descrito en 2.1.
- h) Remoción del cubreobjeto por enfriau
miento a -70°C y deshidratación en
alcoholes de concentraciones cre -
cientes.
- i) Secado en caja cerrada por 24 ho -
ras a temperatura ambiente.

Después de este procedimiento, se efecu
tuó autorradiografía cubriendo el por-
taobjeto con emulsión fotográfica Ko-
dak AR 10 en cuarto oscuro. Los prepau
rados se colocaron en caja negra herme

*Reactivo de Schiff: disolver 1 g de pararosanilina en 200 ml de agua destilada hirviendo, agitando constantemente. Enfriar hasta 50°C y agregar 20 ml de ácido clorhídrico 1N. enfriar a 25°C y agregar 1 g de metabisulfito de sodio o de potasio. Dejar reposar la solución en la oscuridad durante 24 horas. Agregar 0.2 g de carbón activado, agitar y filtrar. Conservar en la oscuridad a 4°C .

ticamente cerrada dejándolos por una semana a -80°C . Luego se efectuó el revelado y fijación utilizando revelador Kodak D-19 y fijador universal Kodak.

El porcentaje de células en período S (índice de marcación) se obtuvo cuantificando los núcleos marcados en 500 células meristemáticas, utilizando un microscopio óptico. Para cada punto experimental y controles se cuantificó un mínimo de 3 raicillas. Los resultados fueron graficados como porcentaje de células marcadas.

2.2.2. *Frecuencia de células en los períodos G_1 y G_2 del ciclo celular.*

Se utilizaron los preparados obtenidos según 2.2.1. (Feulgen y autorradiografía). La frecuencia de células en G_1 y en G_2 se determinó citofotométricamente en un microdensitómetro de barrido M-85 (Vickers Ltd. U.K.), midiendo al azar la absorbancia de 100 núcleos interfásicos no marcados, en cada uno de los meristemas. Las mediciones se

efectuaron utilizando un objetivo de 100 x, con diafragma de 10-30 μm de diámetro, longitud de onda de 550 nm y una amplitud de 30 nm (rango de longitud de onda de 520 a 580 nm). Previamente se determinó la absorbancia en unidades arbitrarias de 12 profases y 12 telofases, calculando el promedio telofásico (\bar{x}_t) y el promedio profásico (\bar{x}_p). El valor correspondiente a una carga 2C de DNA (núcleos en G_1) expresado en unidades arbitrarias, se calculo según la formula $2C = \bar{x}_t + \bar{x}_p/3$ y el valor 4C (núcleos en G_2) como $2 \times 2C$ (42). Los valores obtenidos por citofotometría de los 100 núcleos interfásicos no marcados se agruparon alrededor de estos valores correspondientes a 2C y 4C, estableciéndose de esta manera la frecuencia de células en G_1 y G_2 . En los mismos preparados, se cuantificó el índice mitótico. En conjunto con los resultados de índice de marcación ya mencionado (2.2.1.), se

obtuvo la distribución de células en los cuatro períodos del ciclo celular. Los resultados se expresaron como frecuencia de células en G_1 , S, G_2 y M.

2.2.3. *Frecuencia de células en tres subcompartimentos del período S (S temprano, medio y tardío).*

En raíces teñidas según el método de Feulgen (2.2.1.) se determinó el índice mitótico y el porcentaje de células en interfase. En estas últimas se cuantificó citofotométricamente (2.2.2.) el contenido de DNA de 200 núcleos elegidos al azar en dos raicillas por cada tiempo de tratamiento. La distribución de células en cada uno de los tres subcompartimentos del período S se determinó según el método descrito por Navarrete y cols (50), como sigue (Fig. N° 19): Se cuantificó el valor de 20 profases y 20 telofases, obteniéndose el valor de unidades arbitrarias de núcleos 4C y 2C respectivamente, de acuerdo a lo descrito en 2.2.2. Se calculó

la desviación estandar de los promedios obtenidos. Se estableció un rango de valores en uno de cuyos extremos se ubicó el valor del promedio telofásico menos 1σ y en el otro el valor del promedio profásico más 1σ . El rango de valores así obtenidos se dividió en tres intervalos iguales: I, II y III. Los valores de absorbancia de los doscientos núcleos cuantificados se agruparon en estos tres intervalos. La frecuencia de células en S_1 se determinó restando al intervalo I la frecuencia de células en G_1 obtenida en 2.2.2. El intervalo II equivale a la frecuencia de células en S_2 y la frecuencia de células en S_3 se determinó restando la frecuencia de células en G_2 al intervalo III. Los resultados se expresaron como frecuencia de células en G_1 , S_1 , S_2 , S_3 , G_2 y M.

3. DETERMINACION DE LA DURACION DE LA INTERFASE MINIMA EN UNA POBLACION SINCRONICA DE CELULAS MERISTEMATICAS.

Bulbos de *Allium cepa* L se cultivaron por tres días a 15°C, con el fin de alcanzar condiciones de crecimiento en equilibrio dinámico. Luego se aplicó un tratamiento con cafeína 5mM preparada en agua potable filtrada, por dos horas. La cafeína inhibe la citocinesis (17); por lo tanto, todas las células que pasen por la telofase durante el tratamiento con cafeína, seguirán por el ciclo en forma sincrónica como células binucleadas, al levantar el bloqueo con esta xantina. Estas células binucleadas son fácilmente distinguibles. Trabajos previos han demostrado que a 15°C, las primeras mitosis de células binucleadas aparecen a las 23 horas de incubación en agua después de levantar el bloqueo con cafeína (17, 20, 37).

Después del tratamiento con esta xantina, las raicillas se lavaron en agua potable filtrada a fin de eliminar la droga. Posteriormente, los bulbos se incubaron en agua potable filtrada (controles) o bien en 2 ó 3 ppm de arsénico en forma continua hasta el término del tratamiento. Se fijaron 3 a 5 raicillas cada dos horas a partir de la hora 23 de iniciado el tratamiento, hasta la obtención de dos muestras sucesivas, con células binucleadas en mitosis. Las raíces se fijaron en etanol: ácido acético 3:1 v/v y se

procesaron de la manera descrita en 2.1. Se cuantificó la frecuencia de células binucleadas en mitosis en las primeras dos muestras positivas. La duración de la interfase mínima se determinó considerando una recta que pasando por los puntos equivalentes a los porcentajes de células binucleadas en mitosis, corta la abscisa en un punto correspondiente a la interpolación entre la última lectura negativa y la primera lectura positiva (20). Los resultados fueron expresados como tiempo de duración de la interfase mínima.

4. DETERMINACION DE LA VELOCIDAD DE FLUJO CELULAR A TRAVES DE LA TELOFASE Y METAFASE. (VELOCIDAD DE TRANSITO CELULAR).

Tratando las raicillas con cafeína o colchicina y determinando la frecuencia acumulativa de células binucleadas o en metafase respectivamente, en relación al total de células meristemáticas, se puede inferir la velocidad de flujo celular a través de cada una de estas etapas. Al incubar los bulbos simultáneamente en cafeína o colchicina y arsénico, se puede determinar si este elemento altera la velocidad de flujo celular a través de estas etapas del ciclo (11).

Raicillas en equilibrio dinámico (60 hrs de incubación en agua potable filtrada) se incubaron en una solución de cafeína 5 mM y arsénico 1,2 3 ppm, obteniendo muestras a las 0, 1.5, 3 y 4.5 horas de iniciado el tratamiento. Las raicillas se procesaron de acuerdo al método 2.1. y se determinó el número de células binucleadas en relación al total de células meristemáticas. Para determinar el tránsito metafásico se siguió el siguiente procedimiento: Raicillas en equilibrio dinámico (60 horas de incubación en agua potable filtrada) se trasladaron a una solución de arsénico 2 ppm. A las 0 y 48 horas después de iniciado el tratamiento con As se agregó colchicina 0.05%. Se tomó muestras de 3 a 5 raicillas a las 0, 1.5, 3, 4.5 y 6 horas después de iniciado el bloqueo con colchicina. Las muestras se procesaron según se indica en 2.1. y se cuantificó el número de metafases en 1000 células meristemáticas en cuatro raicillas para cada tiempo de tratamiento. Los resultados se expresaron como porcentaje de células en metafase.

5. EFECTO DE ARSENICO SOBRE LA INCORPORACION DE LEUCINA TRITIADA

Bulbos de *Allium cepa* L se incubaron en agua pota-

ble filtrada por 48 horas y luego se transfirieron a la solución de arsénico en la concentración y por el tiempo correspondiente a cada experimento en particular. En un primer procedimiento se corto longitudinalmente en tercios el bulbo ya brotado, incubando posteriormente un tercio en agua potable filtrada, otro en arsénico por 24 horas y el tercero en arsenato por 48 horas. Después de estos períodos de tratamiento, se incubaron los tres tercios en la misma solución de leucina tritiada. Otro procedimiento fue incubar los bulbos enteros en 2 ppm de arsénico por distintos períodos de tiempo, a fin de obtener un mayor número de raicillas por experimento. Posteriormente se incubaron las raíces unidas al bulbo en 10 ml de una solución de leucina tritiada conteniendo 20 Ci/ml, (actividad específica 42.0 Ci/mmól) durante 1 hora, en las mismas condiciones de aireación y temperatura descrita en 1.1. Luego se cortaron las raíces y se lavaron tres veces en agua potable filtrada a 0°C. Se fijó tres raíces por bulbo para determinar índice mitótico. En el resto de las raíces se aisló el segundo milímetro terminal (zona meristemática), mediante corte de navaja. Con estas muestras, se aplicó el siguiente procedimiento:

1. Fijar en TCA al 5% por 5 min a 0°C y se recupe-

ra el ácido después de la fijación. Las raicillas fijadas se lavaron 2 veces en TCA al 5% por min a 0°C, colocando los lavados con el primer sobrenadante (radiactividad soluble en ácido).

2. Lavar en 5 ml de etanol absoluto a 0°C por una hora. Descartar el sobrenadante.
3. Disgregar el tejido fijado en un homogeneizador de vidrio manual, en 3 x 200 μ l de hidróxido de sodio 1 N. Después de coleccionar el homogeneizado con pipeta Pasteur, enjuagar el homogeneizador con 800 μ l de NaOH 1 N, obteniendo así un total de 1 ml de homogenado.
4. Solubilizar las proteínas, calentando a 90°C en baño de agua, por 15 minutos.
5. Medir la radiactividad en 100 μ l de agua del primer lavado, TCA, etanol y homogeneizado retenidos en papel de filtro Whatman colocado en 5 ml de líquido de centelleo (PPO 0.5%; POPOP 0.05% en Tolueno).
6. Medir la cantidad de proteína en una alicuota del homogeneizado, según la técnica de Lowry (39).

Los resultados se expresaron en c.p.m./100 μ g de proteína, en la fracción ácido-soluble y en la fracción ácido-insoluble. Además, se expresaron como por

centaje de radiactividad con respecto a los valores de los bulbos controles. En cada experimento, se cuantificó el índice mitótico con el fin de corroborar el efecto de arsénico sobre este parámetro.

6. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ATP.

Se empleó un método enzimático en el que, en reacciones secuenciales, se fosforila glucosa con ATP (hexoquinasa) y la glucosa-6-P resultante es oxidada por NADP (glucosa-6-P-dehidrogenasa) a 6-fosfogluconato. La cantidad de NADP red producida es proporcional a la cantidad de ATP defosforilado. El procedimiento fue el siguiente :

Bulbos de *Allium cepa* L se cultivaron durante 48 horas en las condiciones descritas en 1.2. y posteriormente se trasladaron a soluciones de As. Después de los tratamientos, se cortaron 10 a 15 raíces por bulbo, dejándolos en agua destilada en hielo. Posteriormente se aplicó el siguiente procedimiento para la extracción de ATP :

1. Obtener la zona meristemática según se describe en 2.1.
2. Disgregar el tejido meristemático en un homogeneizador de vidrio, en 0.3 ml de PCA al 12%. Trans

ferir el homogeneizado a un tubo Eppendorff. Enjuagar el homogeneizador con 0.3 ml de PCA y agregar al homogeneizado.

3. Dejar en reposo por 10-15 minutos en hielo y centrifugar a 10000 x g, por 1 minuto, en centrifuga Eppendorff.
4. Transferir el sobrenadante a otro tubo Eppendorff y guardar el sedimento a -20°C .
5. Neutralizar el sobrenadante con KOH 1.8 N y KHCO_3 a 0.4 N, en una proporción tal que se obtenga un pH de 7.4. La proporción de ambas soluciones necesaria para obtener dicho pH se determinó antes de comenzar cada procesamiento de muestras.
6. Centrifugar a 10000 x g en centrífuga Eppendorff por 1 minuto. Colectar el sobrenadante y descartar el sedimento.
7. Determinar la concentración de ATP en el sobrenadante mediante el siguiente procedimiento: A 2 ml de solución de reacción* recién preparada agregar cada 30 seg, 100 μl del sobrenadante hasta completar 400 μl , en cubeta de espectrofotómetro y mezclando con varilla de vidrio antes de medir

*50 μl de glucosa 1 M; 100 μl de NADP 10 mg/ml; 100 μl de hexoquinasa 4 mg/ml; 100 μl de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 1 mg/ml; MgCl_2 10 mM; EDTA 5 mM en tampón Tris HCl pH 7.4 a 20°C .

cada vez la densidad óptica a 340 nm.

Junto a cada experimento se efectuó una curva con concentraciones crecientes de ATP. La relación densidad óptica/concentración de ATP dio una línea recta.

El sedimento del homogenizado obtenido en 4, se disolvió en 1 ml de NaOH 1 N a 90°C por 15 minutos y se determinó proteínas por la técnica de Lowry (39), empleando como estandar albúmina de bovino.

Los resultados se expresaron como ug ATP/100 ug de proteína.

R E S U L T A D O S

El crecimiento de la raíz se produce fundamentalmente en base a dos mecanismos: proliferación celular en la zona meristemática y elongación celular en la zona de diferenciación. Para obtener una visión global del efecto de arsénico sobre el crecimiento radicular, se estudió el efecto de diversas concentraciones de este elemento en raíces que se encontraban en equilibrio proliferativo.

En la Figura N° 1, se muestra el incremento longitudinal diario de la raíz, expresado en mm/día, cuando se mantiene en agua potable filtrada o en concentraciones crecientes de arsénico. Se observa una clara inhibición del crecimiento radicular, que depende de la concentración de arsénico. Así, un tratamiento continuo con 1 ppm produce una inhibición que alcanza aproximadamente un 50% del valor control, dos días después de iniciado el experimento. Esta inhibición es reversible, alcanzando valores normales de crecimiento diario hacia los 6 días. Con una concentración de 2 ppm de arsénico, el incremento longitudinal diario disminuye progresivamente, manteniéndose en niveles de aproximadamente un 25% del valor control a partir del cuarto día de tratamiento. No se observa recuperación del crecimiento durante el tiempo estudiado. Con 3 ppm se aprecia una caída brusca en el cre-

cimiento radicular; éste se detiene a partir del segundo día de tratamiento.

Determinando la recta de crecimiento (Figura N° 2), se observa una disminución de la pendiente cuando aumenta la concentración de arsénico en el agua, llegando a detención del crecimiento al segundo día de incubación con 3 ppm de arsénico. Relacionando la diferencia entre la longitud final y la inicial de la raíz y el tiempo de tratamiento (tasa de crecimiento), se demuestra aún con mayor claridad el efecto de diversas concentraciones de arsénico sobre el crecimiento radicular (Figura N° 3).

Considerando la fuerte caída en el crecimiento radicular producida por una incubación de 24 horas en arsénico 3 ppm y el daño celular observado después de tres días de incubación continua en esa concentración de arsénico, se investigó la capacidad de recuperación de la raíz cuando se transfiere a agua potable filtrada después de incubarla en 3 ppm de arsénico. En la Figura N° 4 se muestra que la inhibición del crecimiento radicular producida por 24 horas de incubación en 3 ppm de arsénico es totalmente reversible.

En términos de tasa de crecimiento se observa un promedio de 9.7 mm/día en los controles, 0.4 mm/día en los tratados con 3 ppm de arsénico por 7 días y 7.9 mm/día en a-

quellos tratados con 3 ppm de arsénico por 24 horas e incubados posteriormente en agua hasta el séptimo día (no mostrado). Por lo tanto la incubación de la raíz por 24 horas en 3 ppm de arsénico no produce un efecto tóxico generalizado.

El estudio del efecto de arsénico sobre los cuatro períodos del ciclo celular se inició analizando la frecuencia de células en mitosis (índice mitótico) en la zona meristemática (segundo mm terminal de la raíz). En la Figura N° 5 se observan los resultados obtenidos de raíces tratadas con concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5 y 10 ppm de arsénico por períodos de 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas: Los bulbos control presentan un índice mitótico promedio de 8.4 ± 1.4 . Con 1, 2 y 3 ppm de arsénico se observa una disminución brusca del índice mitótico cuya intensidad aumenta con la concentración de arsénico, alcanzando un mínimo a las 24 horas de tratamiento, con una posterior recuperación al valor control entre las 48 y 72 horas. Al utilizar concentraciones mayores, no se observa recuperación del índice mitótico, encontrándose células muertas en la zona meristemática a las 60 horas con 5 ppm y a las 48 horas con 10 ppm de arsénico.

Con el objeto de precisar el efecto de arsénico durante las primeras 10 horas de tratamiento se incubaron raicillas en equilibrio proliferativo en concentraciones de 1,

2, 3 y 4 ppm de arsénico tomando muestras cada 2 horas desde iniciado el tratamiento. En esta ocasión, además de cuantificar el número de células en mitosis, se estableció el porcentaje de ellas en cada una de las fases de la mitosis. Los resultados de dicho experimento (Figura N° 6) muestran que, en tiempos cortos, no hay efecto significativo de arsénico sobre el índice mitótico en las concentraciones utilizadas. Tampoco se observó un efecto sustancial en la frecuencia de células en las distintas etapas de la mitosis (profase, metafase, anafase y telofase) (Figura N° 7).

Un aumento de la temperatura incrementa la actividad proliferativa del meristema radicular (55, 52). Con el objeto de comparar el efecto de As sobre la frecuencia de células en mitosis a 15°C y 25°C se incubaron raicillas por 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 horas en 2 ppm de As. Los resultados se muestran en la Figura N° 8. El índice mitótico de los controles a 25°C es de 16.3 ± 0.7 . Con 2 ppm de As se observa una disminución significativa a las 8 horas de tratamiento, con un mínimo a las 10 horas. Los niveles control se alcanzan en forma paulatina a las 20 horas de tratamiento. La diferencia observada en los mínimos obtenidos con 2 ppm de arsénico a 15°C y 25°C se corresponde con el efecto de la temperatura en la actividad proliferativa del meristema.

El efecto de arsénico sobre la incorporación de timidina tritiada en el DNA nuclear muestra que en raíces tratadas con 2 ppm de arsénico, el porcentaje de células marcadas (Figura N° 9) disminuye a las 6 horas alcanzando un mínimo de hasta un 35% a las 24 horas. A las 36 horas de tratamiento, se produce un ascenso hacia el valor control que se alcanza a las 48 horas.

Los resultados del análisis de los cuatro compartimientos del ciclo celular (G_1 , S, G_2 y M) en meristemas tratados con 2 ppm de arsénico por 6, 24, 36, 48 horas se muestran en la Figura N° 10. Se observa a las 6 horas de tratamiento un leve aumento et la frecuencia de las células en los períodos G_1 y G_2 , que se hace más evidente a las 24 horas, con una disminución concomitante en la frecuencia de células . en los períodos S y M. Hacia las 36 horas y a las 48 horas de incubación en 2 ppm de arsénico, la frecuencia de células en cada una de las etapas del ciclo celular ha regresado a valores controles (Figura N° 10), situación que se mantiene hasta las 72 horas (no mostrado).

El claro aumento en la frecuencia de células en G_1 puede deberse a detención del ciclo celular en esa fase del ciclo, a una disminución de la velocidad con que las células

se mueven en G_1 , o a ambos sucesos. Para estudiar la primera posibilidad se analizó el efecto de arsénico en la frecuencia de células en tres subcompartimentos del período S: S temprano (S_1), S medio (S_2) y S tardío (S_3) en condiciones de tratamiento continuo con 2 ppm de arsénico. Los resultados se muestran en la Figura N° 11. Tal como se señaló en las Figuras N° 9 y 10, la frecuencia de células en el período S disminuyó hasta alcanzar un mínimo a las 24 horas de tratamiento, para volver a niveles normales 12 horas más tarde. Después de 6 horas de tratamiento con arsénico, se observa un aumento en la frecuencia de células en S_1 y una disminución en S_3 , permaneciendo S_2 sin mayores variaciones. Los cambios más relevantes se producen sin embargo, a las 24 horas de tratamiento, tiempo en el que se aprecia ausencia de células en el período S_1 y disminución de la frecuencia de células en S_2 y S_3 . Después de 36 horas de incubación en arsénico, la distribución de células en los tres subcompartimentos de la fase S tiende a niveles control, así como aquellos correspondientes a G_1 , G_2 y M. A las 48 horas de incubación en 2 ppm de arsénico, la frecuencia de células en los tres subcompartimentos en la fase S (S_1 , S_2 y S_3) es similar al control (Figura N° 11) situación que se mantiene hasta las 72 horas (no mostrado).

La técnica empleada para determinar las frecuencias en los tres subcompartimentos de la fase S no considera aquellas células con poca marcación. Para evitar esta posible fuente de error, se distribuyeron las células considerando su carga de DNA determinada según el análisis de los valores citofotométricos de núcleos interfásicos teñidos con Feulgen, sin considerar los resultados obtenidos por autorradiografía. Los resultados obtenidos confirman la ausencia de células en S_1 (no mostrado). En base a estos resultados es posible afirmar que la incubación de la raíz en 2 ppm de arsénico produce una detención reversible del tránsito de células en G_1 .

Tal como se afirmó anteriormente, otro parámetro que puede ser afectado por arsénico es la velocidad de flujo celular por el ciclo proliferativo. Para medir este parámetro, se obtuvo una población sincrónica de células binucleadas por tratamiento con cafeína. Esta población de células sincronizadas se incubaron continuamente en 2 y 3 ppm de arsénico, determinando el número de células binucleadas en mitosis a las 23, 24, 26, 30 y 46 horas después de iniciado el tratamiento con arsénico. Los resultados correspondientes al tratamiento con 2 ppm de As se muestran en la Tabla 1. Raíces mantenidas en agua potable filtrada presentan una interfase mínima de 20.5 horas, mientras que aquellas incubadas

en 2 ppm de arsénico entran en mitosis a las 45.0 horas. Con 3 ppm de arsénico, las células se encuentran en interfase aún a la hora 46, observándose además alteraciones celulares que denotan toxicidad (no mostrado). Claramente, una concentración de 2 ppm de arsénico aumenta el tiempo del ciclo celular.

Otra manera de medir velocidad de tránsito celular es incubar las células en forma continua en cafeína y en arsénico, y determinar el número de células binucleadas en relación al total de células meristemáticas. Sin embargo, la incubación simultánea de las células en cafeína 5 mM y en arsénico 1, 2, o 3 ppm provocó alteraciones nucleares y citoplasmáticas (efecto tóxico). Por lo tanto, no fue posible aplicar esta técnica. Otra alternativa para determinar velocidad de tránsito celular es incubar las raicillas en arsénico y colchicina, cuantificando el número de células en metafase en relación a la población celular total. Mediante este tratamiento, se logró medir la velocidad de tránsito metafásico en tiempos determinados, sin aparición de efectos tóxicos. Los resultados obtenidos incubando raicillas con 2 ppm de arsénico y aplicando tratamientos de 4.5 horas con colchicina 0.05% desde las 0 y las 48 horas, se muestran en la Tabla 2 y en la Figura N° 12. El número de metafases/hora en los meristemas radiculares en las primeras 4.5 horas de tra-

tamiento con 2 ppm de arsénico fue similar al observado en raicillas incubadas con agua potable filtrada. Sin embargo, después de 48 horas de incubación en 2 ppm de arsénico, el número de metafases/hora disminuyó hasta el 40% del valor control, indicando una fuerte caída en la velocidad de flujo celular.

Relacionando la disminución del tránsito por metafase observado en la Tabla 2 y en la Figura N° 12 con la caída en la frecuencia de células en mitosis que produce la incubación continua de la raíz en 2 ppm de arsénico (Figura N° 5) se infiere que el índice mitótico presenta una normalidad aparente a las 48 horas puesto que el porcentaje de células en mitosis es equivalente al de los controles pero la velocidad de flujo por la mitosis es mucho menor (Fig. 13).

De los resultados obtenidos queda establecido que arsénico, dependiendo de la concentración aplicada, puede afectar reversible o irreversiblemente, el ciclo proliferativo del meristema radicular de *Allium cepa* L. En consecuencia, se intentó investigar el efecto de arsénico sobre algunas funciones celulares que podrían estar implicadas en el efecto observado sobre el ciclo celular.

En primer lugar se estudió la incorporación de leucina radiactiva en raicillas sometidas a tratamiento conti-

nuo con 2, 3 y 4 ppm de arsénico. Se utilizaron dos procedimientos generales. Los resultados de un experimento representativo del procedimiento en que se dividió el bulbo en tercios se representa en la Figura N° 14. Se observa una clara disminución de la incorporación de leucina tritiada a proteínas a las 24 horas, que dependen de la dosis de arsénico utilizada, con un retorno a niveles control hacia las 48 horas. El ingreso del precursor a la célula está claramente afectado 24 horas después de aplicar 3 o 4 ppm de As^{+5} . No ocurre lo mismo con 2 ppm de As, que no afecta el ingreso de leucina (Figura N° 15). Estos resultados sugieren que 2 ppm de As no impiden el ingreso de leucina a la célula pero si su incorporación a proteínas. Por otra parte, concentraciones mayores de As interfieren con el ingreso del precursor a la célula y, por lo tanto, la inhibición de incorporación de leucina a proteínas, observada a estas concentraciones, puede deberse a falta de disponibilidad del precursor. Utilizando bulbos enteros por cada tiempo de tratamiento se estudió el ingreso de leucina radiactiva a las células y su incorporación a proteínas, en tiempos cortos, medianos y prolongados de tratamiento con 2 ppm de arsénico. Los resultados se muestran en la Figura N° 15. Nuevamente, se observa que a las 24 horas el ingreso de leucina a la célula no está afectado pero hay una disminución evidente en la incorporación del precursor a proteínas. A las 48 horas, tanto el ingreso como la in

corporación han regresado a valores controles. En tiempos cortos o medianos de tratamiento, se observa que arsénico dificulta el ingreso de leucina a la célula y hay una disminución clara de la incorporación de este aminoácido a proteínas. Es decir, ya sea en forma indirecta y/o directa (como parece indicar el resultado obtenido después de 24 horas de incubación en 2 ppm de arsénico), se observa que este microelemento interfiere con la incorporación normal de leucina a proteínas en raicillas de *Allium cepa* L.

Considerando que se ha descrito una competencia entre arsénico y fósforo en compuestos fosforilados (arsenolisis), los resultados previamente descritos podrían ser interpretados como consecuencia de una disminución en la cantidad de ATP en la célula. Para indagar acerca de esta posibilidad, se midió la concentración de ATP en la zona meristemática de bulbos tratados con 2 ppm de arsénico durante distintos intervalos de tiempo (15, 30 y 60 minutos y 6, 12, 24 y 48 horas). La Figura N° 16 muestra que la concentración de ATP no disminuye en meristemas incubados en 2 ppm de arsénico, siendo los valores encontrados incluso mayores que aquellos correspondientes a los controles.

La posibilidad de competencia entre As^{+5} y P^{+5} se abordó además, estudiando el crecimiento radicular y la frecuen

cia de células en mitosis, en raicillas tratadas con una concentración fija de As^{+5} y concentraciones crecientes de P^{+5} . Resultados de estos experimentos, efectuados con 2 ppm de arsénico pentavalente, se muestran en la Figura N° 17 y 18. Una concentración de fósforo pentavalente en el medio de incubación tres veces superior a la de arsénico pentavalente, elimina la inhibición producida por 2 ppm de As sobre el crecimiento radicular (Figura N° 17). El fósforo pentavalente, en concentración equimolar con arsénico pentavalente, no revierte la inhibición del crecimiento radicular (Figura N° 17). Resultados similares se obtuvieron con 3 ppm de arsénico pentavalente (no mostrado).

En la Figura N° 18 se muestra el efecto de dos concentraciones de fósforo pentavalente sobre la disminución de la frecuencia de células en mitosis producida por arsénico pentavalente. En este caso, una concentración de 2 ppm de fósforo revierte el efecto de 2 ppm de Arsénico pentavalente sobre el índice mitótico. Concentraciones menores de fósforo pentavalente no impiden el efecto de arsénico pentavalente sobre este parámetro.

T A B L A N° 1

EFECTO DE 2 PPM DE ARSENICO PENTAVALENTE SOBRE EL
TIEMPO DE INTERFASE

TRATAMIENTO	DURACION DE LA INTERFASE
CONTROL	20.5 HORAS
2 PPM AS	45.0 HORAS

Bulbos de *Allium cepa* L se incubaron en agua a 15°C hasta obtener raicillas creciendo en equilibrio dinámico (60 horas). Posteriormente se incubaron seis bulbos en cafeína 5 mM por una hora, para obtener una población sincrónica de células binucleadas. Luego se trataron tres bulbos en forma continua con 2 ppm de arsénico⁺⁵, tomando muestras de 3-5 raicillas cada 2 horas a partir de 23 horas de incubación en arsénico hasta hora 46. Se determinó el porcentaje de células binucleadas en mitosis en las dos primeras muestras positivas. Se calculó la duración de la interfase mínima según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos efectuados.

T A B L A N° 2

EFECTO DE ARSENICO PENTAVALENTE SOBRE LA VELOCIDAD DE
TRANSITO METAFASICO EN MERISTEMA RADICULAR

TRATAMIENTO	TIEMPO (HRS)	METAFASES/HORA	%
AGUA (CONTROL)	0 - 4.5	1.36	100.0
ARSENICO 2 PPM Y COLCHICINA 0.05%	0 - 4.5	1.33	97.7
ARSENICO 2 PPM	0 - 48.0		
ARSENICO 2 PPM Y COLCHICINA 0.05%	48 - 52.5	0.33	40.4

Bulbos de *Allium cepa* L se incubaron en agua a 15°C hasta obtener raicillas creciendo en equilibrio dinámico (60 horas. En cada experimento un grupo de 3 bulbos se incubó en 2 ppm de arsénico⁺⁵ y colchicina 0.05% por 4.5 horas. Otros tres bulbos se incubaron en 2 ppm de arsénico por 48 horas; luego se agregó colchicina 0.05% y se continuó la incubación hasta las 52.5 horas. Desde las 0 horas en el primer grupo y desde las 48 horas en el segundo grupo, se obtuvo 3 a 5 raicillas cada 90 minutos. Se determinó el porcentaje de células en metafase en el total de células meristemáticas. En cada una de las muestras los resultados se expresaron en promedio de metafases/hora y en porcentaje en relación al control. Los resultados corresponden a un experimento representativo de un total de dos experimentos efectuados.

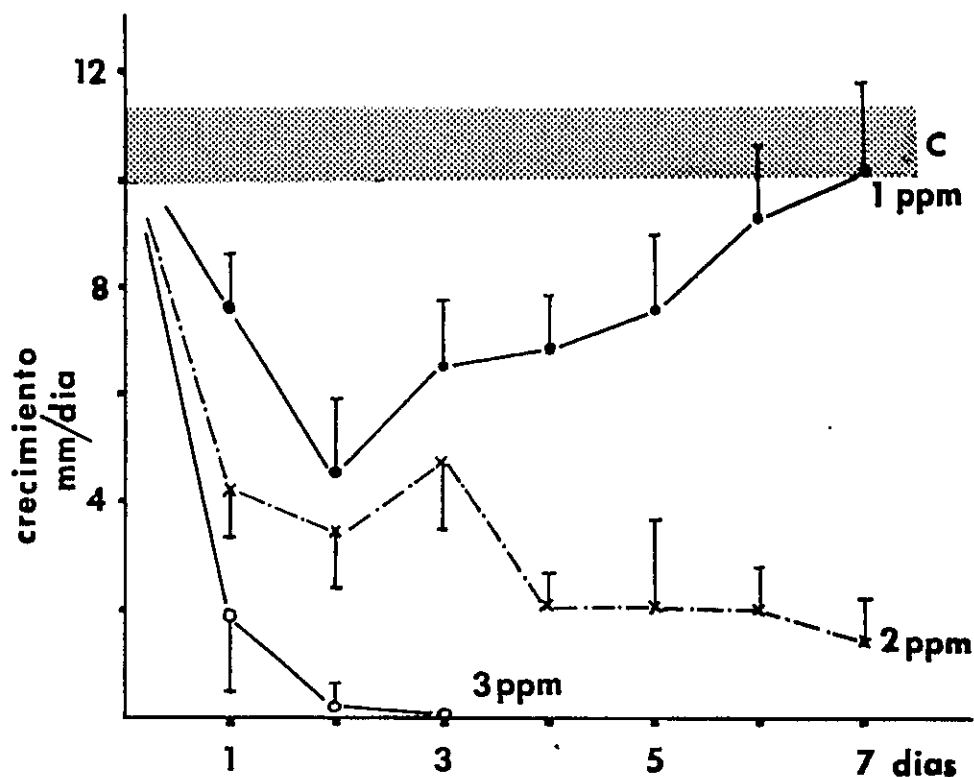


FIGURA No 1 : EFECTO DE ARSENICO PENTAVALENTE SOBRE EL INCREMENTO LONGITUDINAL DIARIO DE LA RAIZ

Bulbos de *Allium cepa* L se incubaron en agua a 15°C hasta obtener raicillas creciendo en equilibrio dinámico (60 horas). Posteriormente se trataron con arsénico⁺⁵ en concentraciones de 1,2 y 3 ppm, midiendo la longitud de 10 a 12 raíces por bulbo, previamente individualizadas, cada 24 horas por 7 días. Cada punto representa el promedio y desviación estándar del incremento longitudinal diario de 10-12 raíces de un bulbo por cada concentración de arsénico⁺⁵ utilizada. La barra achurada (C), corresponde al promedio y desviación estándar de un bulbo control.

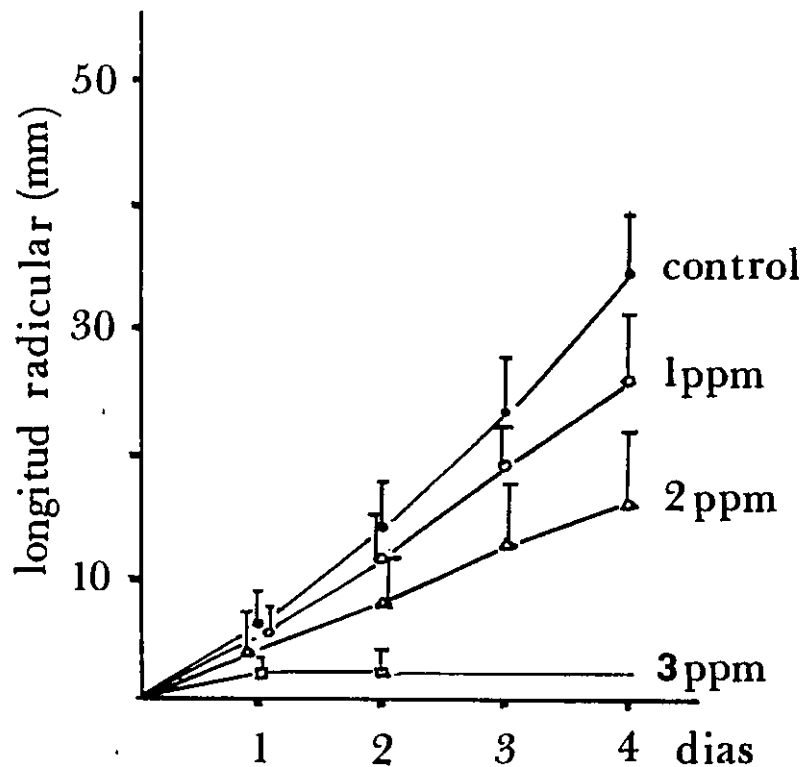


FIGURA No 2 : EFECTO DE ARSENICO PENTAVALENTE SOBRE EL CRECIMIENTO RADICULAR

Bulbos de *Allium cepa* L se incubaron en agua a 15°C hasta obtener raicillas creciendo en equilibrio dinámico (60 horas). Posteriormente se trataron con arsénico⁺⁵ en concentraciones de 1,2 y 3 ppm, midiendo la longitud de 10 a 12 raíces por bulbo previamente individualizadas cada 24 horas por 4 días. Cada punto representa el promedio y desviación estándar de crecimiento diario de las raíces de un bulbo control y un bulbo por cada concentración utilizada. Se consideró la longitud inicial promedio como cero.

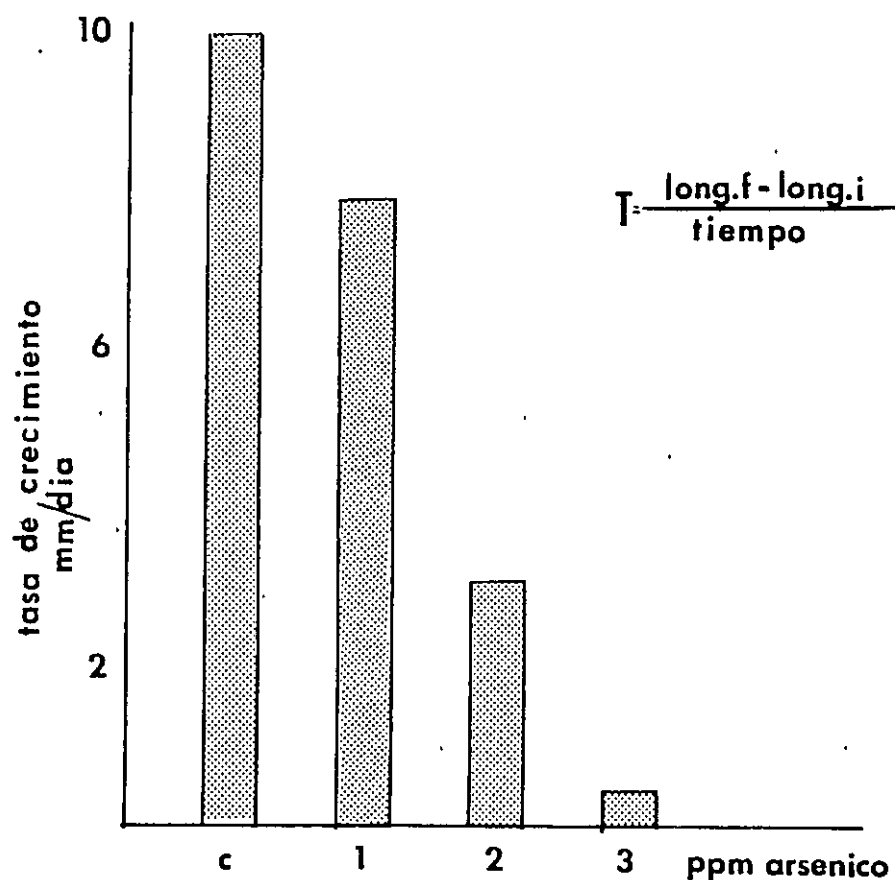


FIGURA No 3 : EFECTO DE ARSENICO PENTAVALENTE SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO RADICULAR

Bulbos de *Allium cepa* L se incubaron en agua a 15°C hasta obtener raicillas creciendo en equilibrio dinámico (60 horas). Posteriormente se trataron con arsénico⁺⁵ en concentraciones de 1,2 y 3 ppm, midiendo la longitud de 10 a 12 raíces por bulbo previamente individualizadas, cada 24 horas por 7 días. La tasa de crecimiento se calculó como se indica en el gráfico. T = tasa de crecimiento; long. f. = longitud final; long. i. = longitud inicial. Las barras representan el resultado de un bulbo control y un bulbo por cada concentración de arsénico⁺⁵ utilizada.

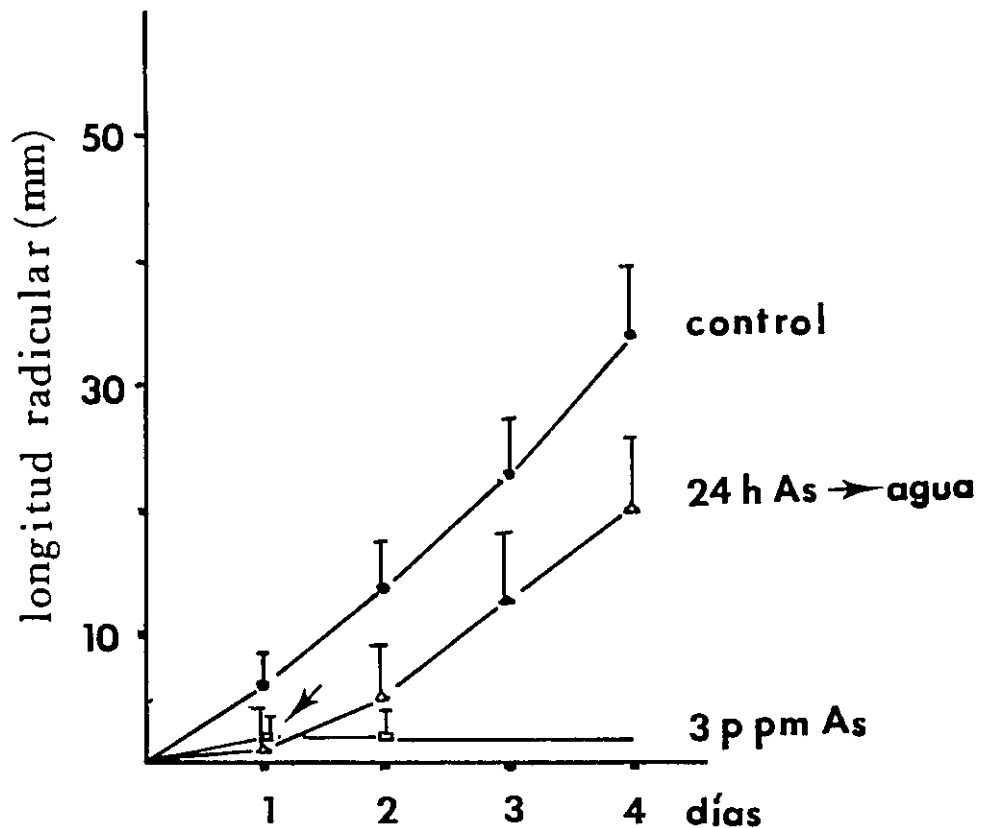


FIGURA No 4 : REVERSION DE LA INHIBICION DEL CRECIMIENTO RADICULAR PRODUCIDO POR ARSEENICO PENTAVALENTE

Bulbos de *Allium cepa* L se incubaron en agua a 15°C hasta obtener raicillas creciendo en equilibrio dinámico (60 horas). Después de incubar por 24 horas en 3 ppm de arsénico⁺⁵ se transfirieron nuevamente al agua, midiendo la longitud radicular de 10-12 raices previamente individualizadas cada 24 horas durante un total de 4 días. Cada punto representa el promedio y desviación estandar de crecimiento diario de las raices de dos bulbos considerando la longitud promedio inicial como cero.

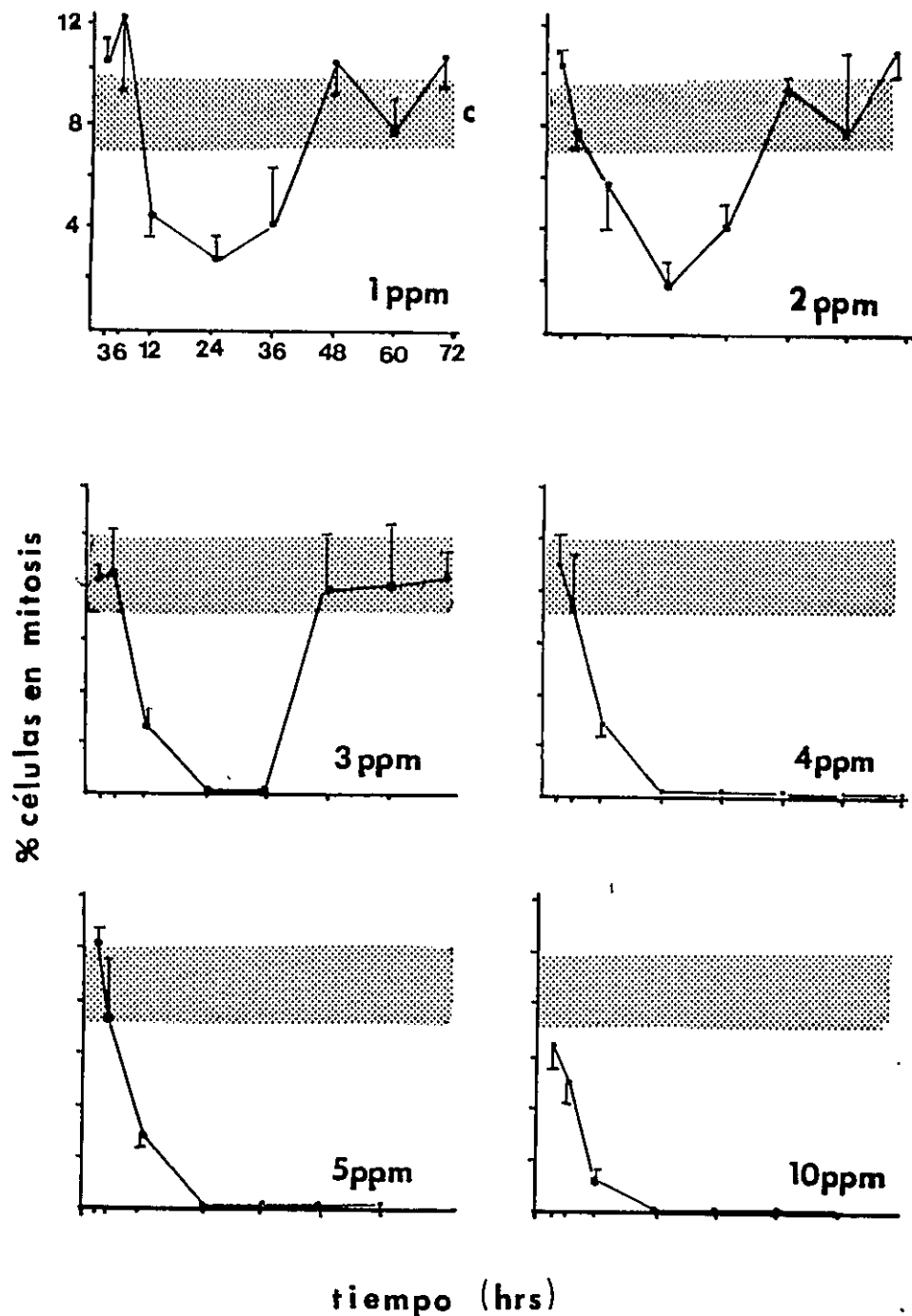


FIGURA Nº 5 : EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ARSENICO PENTAVALENTE SOBRE INDICE MITOTICO DE LA ZONA MERISTEMATICA DE LA RAIZ

Bulbos de *Allium cepa* L se incubaron en agua a 15°C hasta obtener raicillas creciendo en equilibrio dinámico (60 horas). Posteriormente se trataron con 1,2,3,4,5 y 10 ppm de arsénico⁺⁵, tomando muestras de raices a las 3,6,12,24,36,48,60 y 72 horas. En las raices, procesadas como se indica en Materiales y Métodos, se determinó la frecuencia de mitosis en 1000 células en 3 a 5 raices por cada tiempo y concentración de arsénico expresando su promedio y desviación estandar. La barra achurada (C) corresponde al promedio y desviación estandar de tres bulbos control.

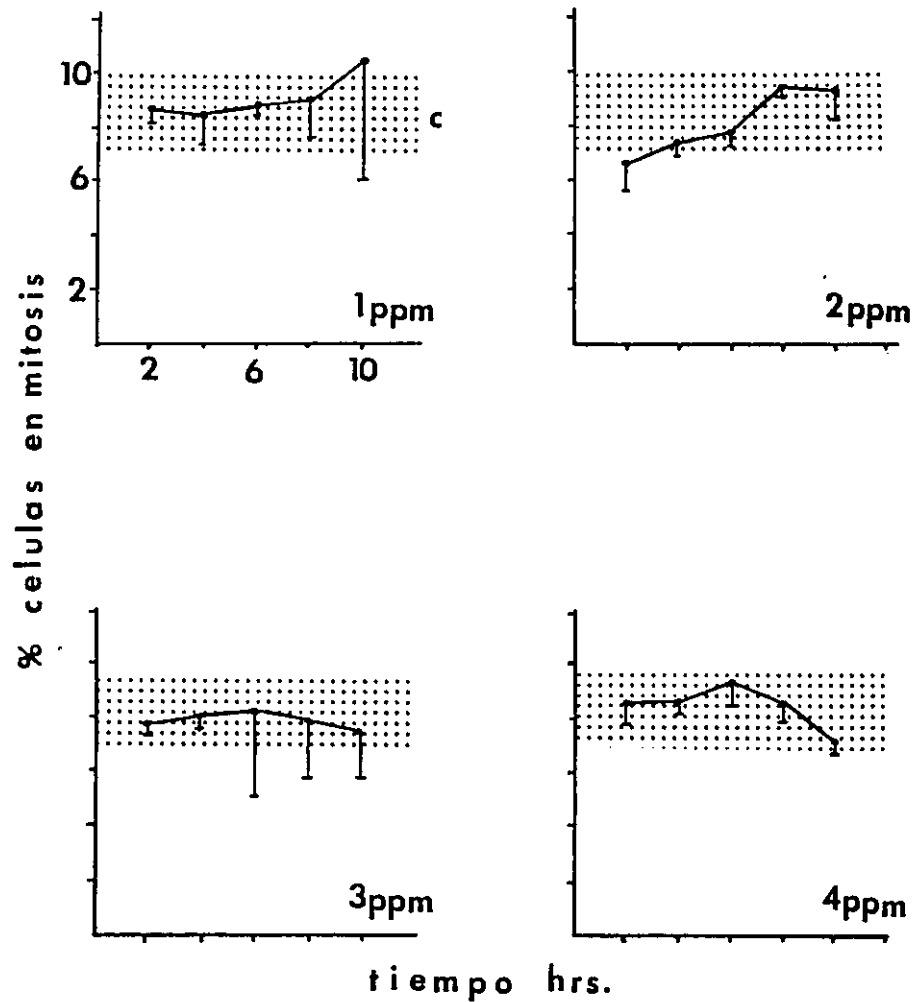


FIGURA No 6 : EFECTO DE ARSENICO PENTAVALENTE SOBRE INDICE MITOTICO DE LA ZONA MERISTEMATICA DE LA RAIZ. PRIMAS DIEZ HORAS DE TRATAMIENTO

Bulbos de *Allium cepa* L se incubaron en agua a 15°C hasta obtener raicillas creciendo en equilibrio dinámico (60 horas).⁵ Posteriormente se trataron con 1,2,3, y 4 ppm de arsénico tomando muestras de raices cada 24 horas hasta completar 10 horas de tratamiento. Luego, las raicillas se procesaron de la manera descrita en Materiales y Métodos. Se determinó la frecuencia de mitosis en 1000 células, en 3 a 5 raíces de dos bulbos por cada tiempo y concentración de arsénico. La barra achurada (C) corresponde al promedio y desviación estandar de 2 bulbos control.

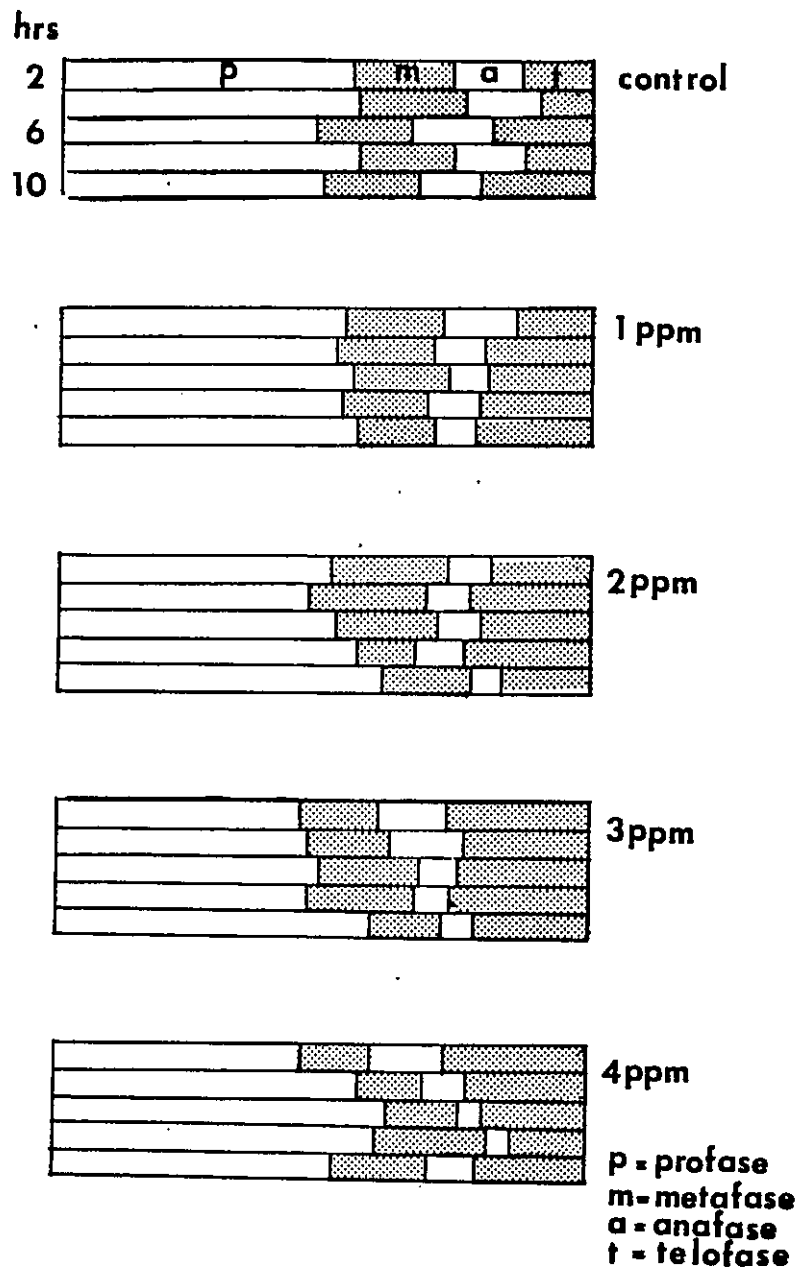


FIGURA N° 7 : EFECTO DE ARSENICO PENTAVALENTE SOBRE LA DISTRIBUCION DE CELULAS EN LAS FASES DE LA MITOSIS

Bulbos de *Allium cepa* L se incubaron en agua a 15°C hasta obtener raicillas creciendo en equilibrio dinámico (60 horas)⁴⁵. Posteriormente se trataron con 1,2,3, y 4 ppm de arsénico⁵, tomando muestras de raices cada 2 horas hasta completar 10 horas de tratamiento. Luego, las raicillas se procesaron según se describe en Materiales y Métodos. Se determinó, en las células meristemáticas en mitosis, la frecuencia de profases, metafases, anafases y telofases. Los resultados corresponden al análisis de tres raicillas de un bulbo control y de un bulbo por cada concentración utilizada.

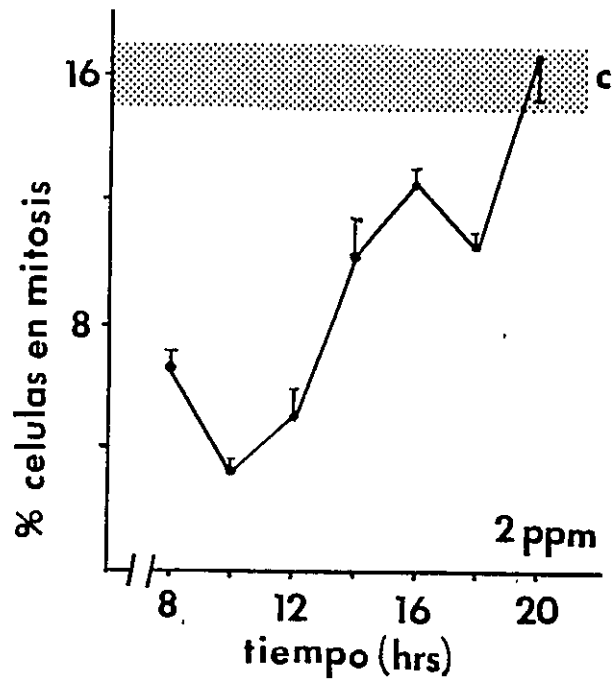


FIGURA N° 8 : EFECTO DE 2 PPM DE ARSENICO PENTAVALENTE SOBRE INDICE MITOTICO. INCUBACION A 25°C

Bulbos de *Allium cepa* L se incubaron en agua a 25°C hasta obtener raicillas creciendo en equilibrio dinámico (36 horas). Posteriormente se trataron con 2 ppm de arsénico⁺⁵, obteniendo muestras de raices cada 2 horas a partir de 8 horas, hasta completar 20 horas de tratamiento. Luego, las raicillas se procesaron de la manera descrita en Materiales y Métodos. Se determinó la frecuencia de mitosis en 1000 células, en 3 a 5 raices por cada tiempo de tratamiento de dos bulbos control y dos bulbos experimentales.

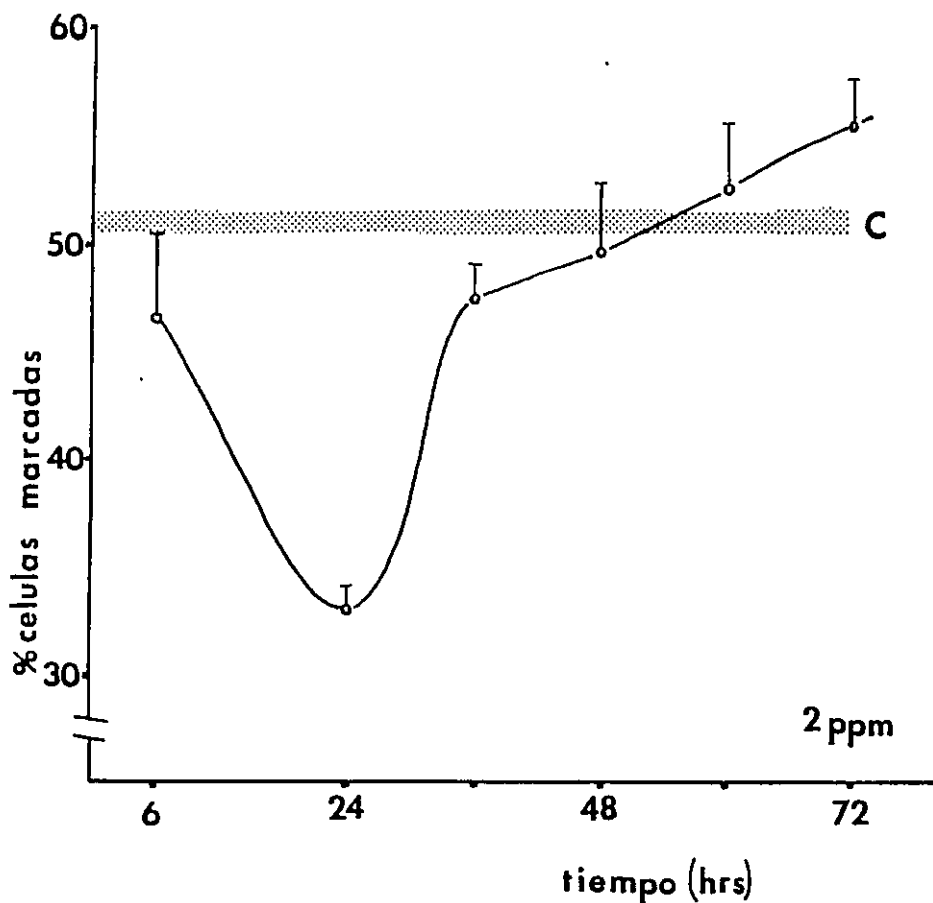


FIGURA N° 9 : EFECTO DE 2 PPM DE ARSENICO PENTAVALENTE SOBRE EL INDICE DE MARCACION DE MERISTEMAS RADICULARES DE ALLIUM CEPA L

Bulbos de *Allium cepa L* se incubaron en agua a 15°C hasta obtener raicillas creciendo en equilibrio dinámico (60 horas). Posteriormente se trataron con 2 ppm de arsénico por 6,24,36,48,60 y 72 horas. Después de cada uno de estos períodos las raices se incubaron en timidina tritiada por 30 minutos. Las raicillas se procesaron como se indica en Materiales y Métodos para autorradiografía. Se cuantificó el porcentaje de células marcadas en 500 células de la zona meristemática en 3 a 6 raices por cada tiempo de tratamiento de dos bulbos control (barra achurada) y dos bulbos experimentales.

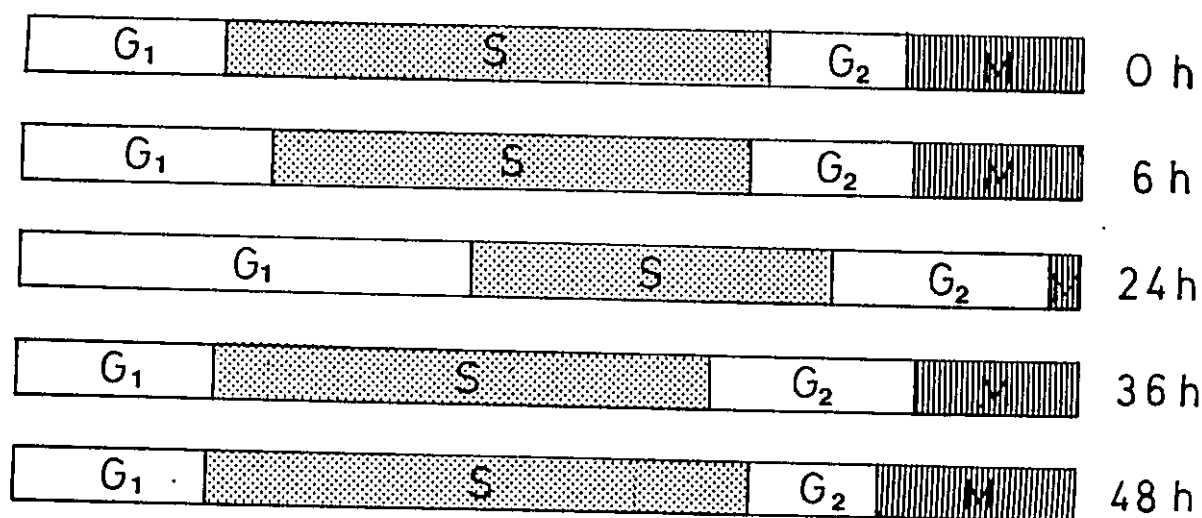


FIGURA N° 10 : EFECTO DE 2 PPM DE ARSENICO PENTAVALENTE SOBRE LA FRECUENCIA DE CELULAS EN LOS PERIODOS DEL CICLO PROLIFERATIVO

Bulbos de *Allium cepa* L se incubaron en agua a 15°C hasta obtener raicillas creciendo en equilibrio dinámico (60 horas). Posteriormente se trataron con 2 ppm de arsénico⁺⁵ por 6,24,36,48,60 y 72 horas. Después de cada uno de estos períodos, las raices se incubaron en timidina tritiada por 30 minutos. Las raicillas se procesaron aplicando la técnica de Feulgen y autorradiografía, como se indica en Materiales y Métodos. Se midió el contenido de DNA en 100 núcleos interfásicos no marcados en 3 raicillas por cada tiempo mediante citofotometría de barrido, discriminando núcleos en G₁ y en G₂. Se determinó además el índice mitótico y el índice de marcación como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados corresponden al análisis de dos bulbos control y dos bulbos experimentales.

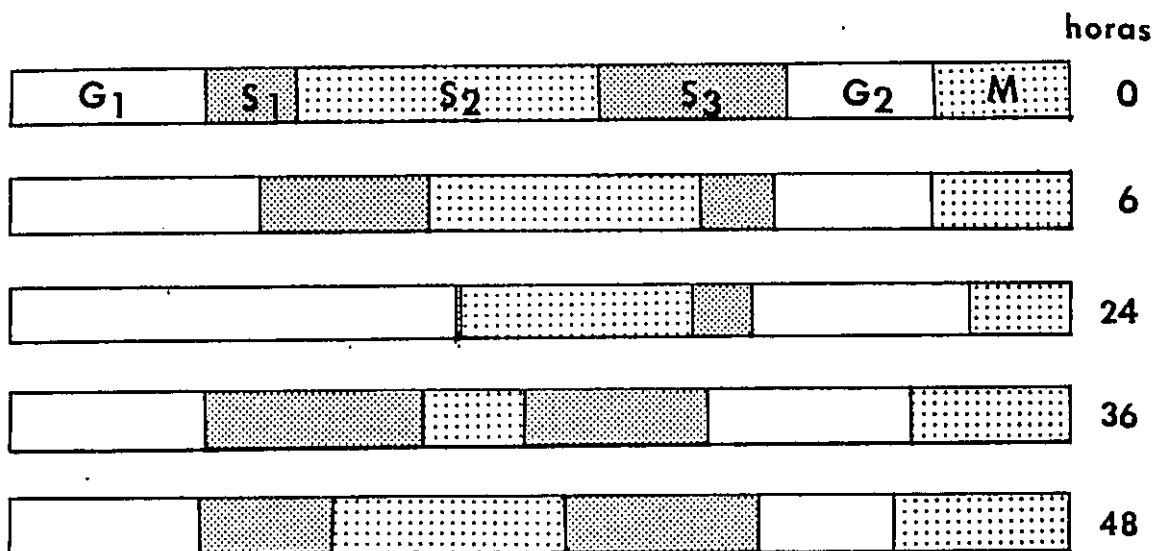


FIGURA N° 11 : EFECTO DE 2 PPM DE ARSENICO PENTAVALENTE SOBRE TRES SUBCOMPARTIMENTOS DEL PERIODO S

Bulbos de *Allium cepa* L se incubaron en agua a 15°C hasta obtener raicillas creciendo en equilibrio dinámico (60 horas). Se trataron con 2 ppm de arsénico⁺⁵ por 6,24,36 y 48 horas. Las raicillas se procesaron aplicando la tinción de Feulgen según se describe en Materiales y Métodos. Utilizando un citofotómetro de barrido, se midió el contenido de DNA de 200 núcleos interfásicos y el índice mitótico en 2 raicillas por cada tiempo de tratamiento según se describe en Materiales y Métodos. El rango de valores obtenido se distribuyó en 5 subcompartimentos según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresaron como frecuencia de células en G₁, S₁, S₂, S₃, G₂, M. Los resultados corresponden al análisis de dos bulbos control y dos bulbos experimentales.

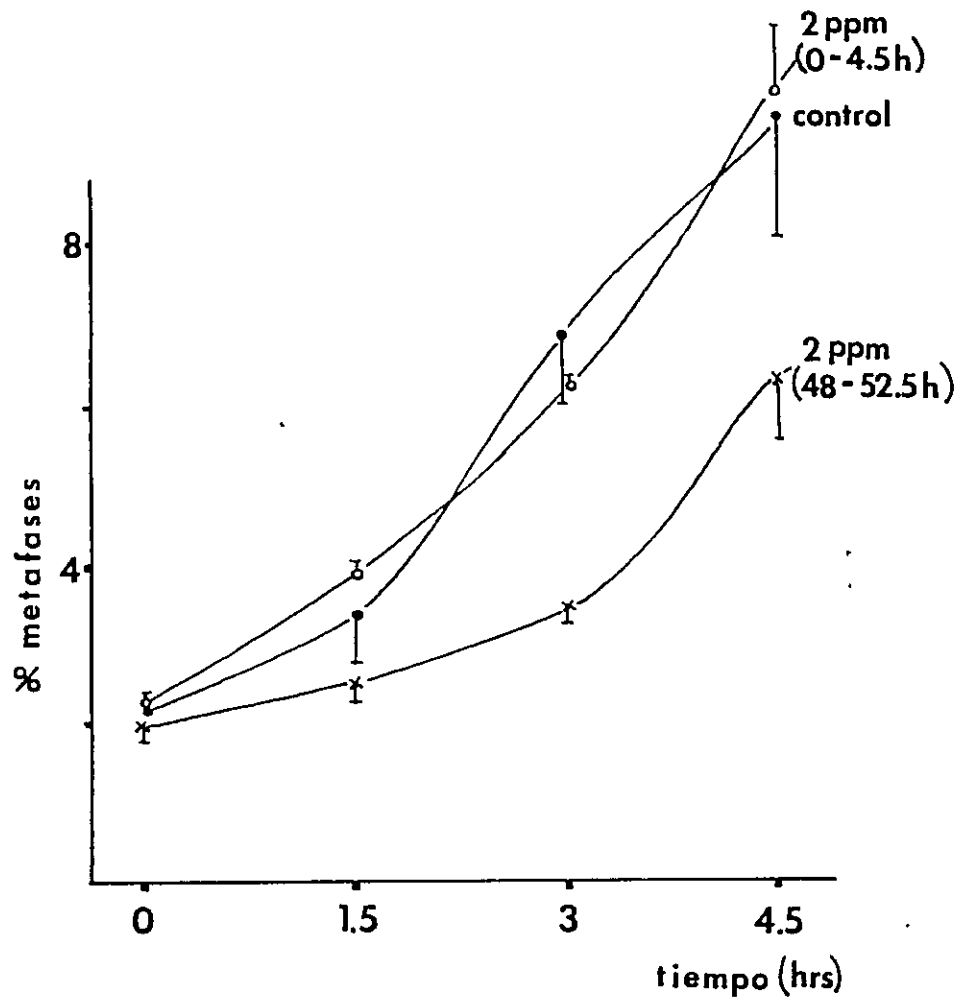


FIGURA N° 12 : EFECTO DE 2 PPM DE ARSENICO PENTAVALENTE SOBRE EL PORCENTAJE DE METAFASE ACUMULADAS

Bulbos de *Allium cepa* L se incubaron en agua a 15°C hasta obtener raicillas creciendo en equilibrio dinámico (60 horas). En cada experimento un grupo de tres bulbos se incubó en 2 ppm de arsénico⁺⁵ y colchicina 0.05% por 4.5 horas. Otros tres bulbos se incubaron en 2 ppm de arsénico por 48 horas; luego se agregó colchicina 0.05% y se continuó la incubación hasta las 52.5 horas. Desde las 0 horas en el primer grupo y desde las 48 horas en el segundo grupo se obtuvo 3 - 5 raicillas cada 90 minutos. Se determinó el porcentaje de células en metafase en el total de células meristemáticas en cada una de las muestras. Cada punto corresponde al promedio y desviación estandar de tres raicillas por bulbo.

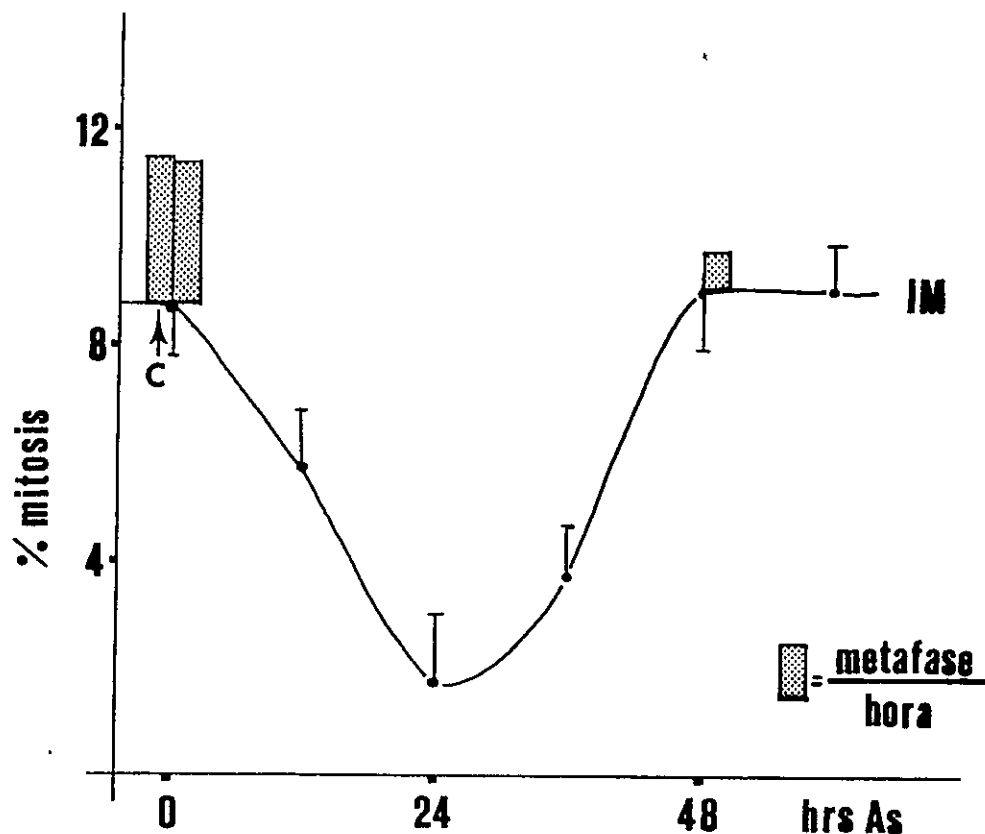


FIGURA N° 13 : EFECTO DE 2 PPM DE ARSENICO PENTAVALENTE SOBRE VELOCIDAD DE TRANSITO POR METAFASE (BARRAS) Y SOBRE INDICE MITOTICO (LINEAS)

Bulbos de *Allium cepa* L se incubaron en agua a 15°C hasta obtener raicillas creciendo en equilibrio dinámico (60 horas). Un grupo de bulbos se incubó en 2 ppm de arsénico y colchicina 0.05% por 4.5 horas. Otros bulbos se incubaron en 2 ppm de arsénico⁺⁵ por 48 horas; luego se agregó colchicina 0.05% y se continuo la incubación hasta las 52.5 horas. Desde las 0 horas en el primer grupo y desde las 48 horas en el segundo grupo, se obtuvo raicillas cada 90 minutos. Se determinó el porcentaje de células en metafase en el total de células meristemáticas. Los resultados se expresaron en metafases/hora (barras) expresadas como por ciento respecto al control (C). Simultáneamente se determinó el índice mitótico a las 0,12,24,36,48 y 60 horas en raicillas mantenidas en 2 ppm de arsénico.

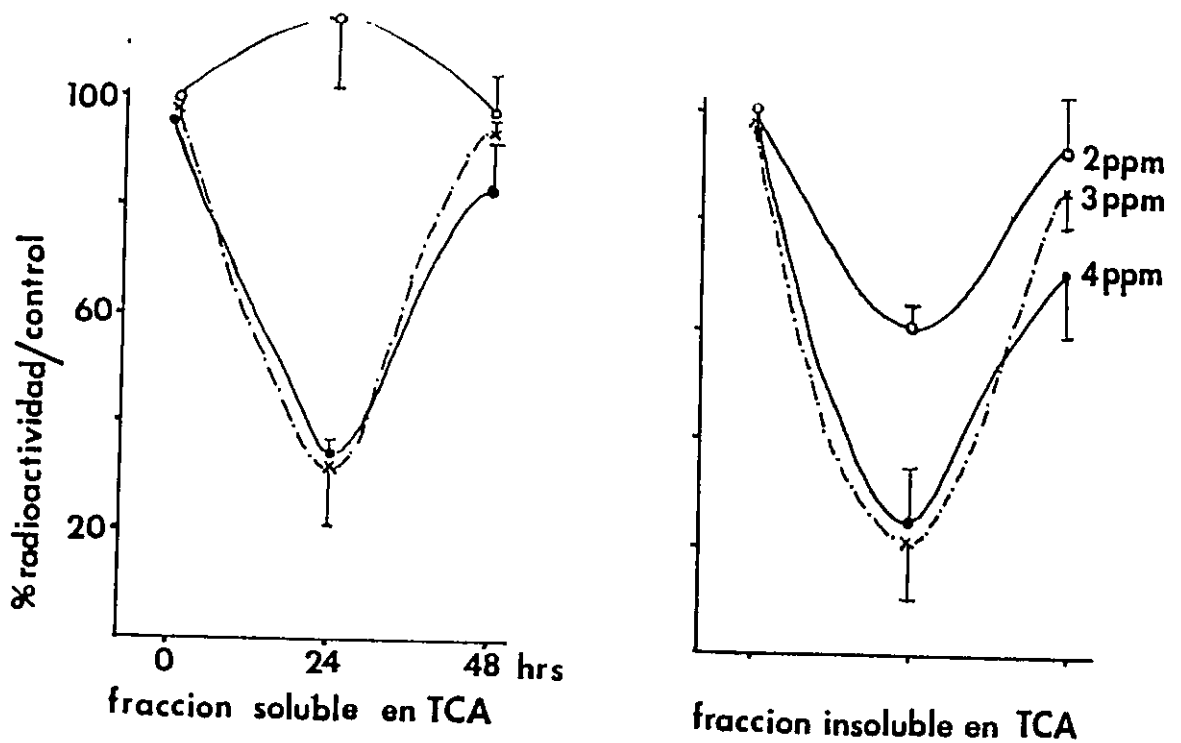


FIGURA N° 14 : EFECTO DE 2 PPM DE ARSENICO PENTAVALENTE SOBRE EL INGRESO Y LA INCORPORACION DE LEUCINA EN MERISTEMAS RADICULAR

Bulbos de *Allium cepa* L se incubaron en agua a 15°C hasta obtener raicillas creciendo en equilibrio dinámico (60 horas). Luego se cortaron longitudinalmente en tercios y se incubó un tercio en agua potable filtrada, otro en 2 ppm de ar sénico por 24 horas y el tercero en 2 ppm de arsénico por 48 horas. Lo mismo se hizo utilizando 3 y 4 ppm de arsénico⁺⁵. Después de los tratamientos se incubaron los tres tercios en una solución de leucina tritiada por una hora. Se aisló la zo na meristemática de las raicillas y después de procesarlas se gún se describe en Materiales y Métodos, se midió la radiacti vidad presente en las fracciones soluble e insoluble en TCA . Los resultados se expresaron en porcentaje en relación al con trol y corresponden al promedio y desviación estandar de las mediciones de tres bulbos control y tres bulbos por cada con centración de arsénico utilizada, de un experimento represen tativo de un total de cinco experimentos efectuados.

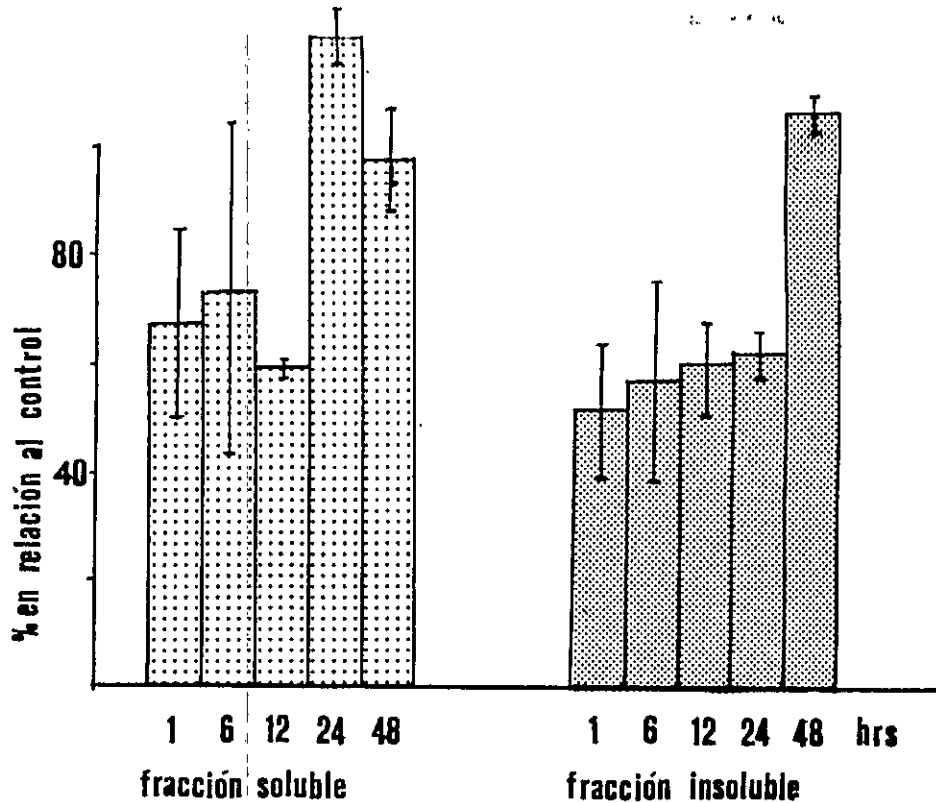


FIGURA N° 15 : EFECTO DE 2 PPM DE ARSENICO PENTAVALENTE SOBRE EL INGRESO Y LA INCORPORACION DE LEUCINA EN ME RISTEMA RADICULAR

Bulbos de *Allium cepa* L se incubaron en agua a 15°C hasta obtener raicillas creciendo en equilibrio dinámico (60 horas). Posteriormente los bulbos se incubaron en 2 ppm de ar sénico⁺⁵ por 1,6,12,24 y 48 horas. Se transfirieron a solu - ción de leucina tritiada por una hora. Se aisló la zona meris temática y se procesó de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, midiendo la radiactividad en la fracción soluble y en la fracción insoluble en TCA. Los resultados se expresaron en porcentaje en relación al control y corresponden al promedio y disviación estandar de las mediciones de tres bulbos control y tres bulbos por cada tiempo de tratamiento. El gráfico corres ponde a los resultados de un experimento representativo de un total de cuatro experimentos efectuados.

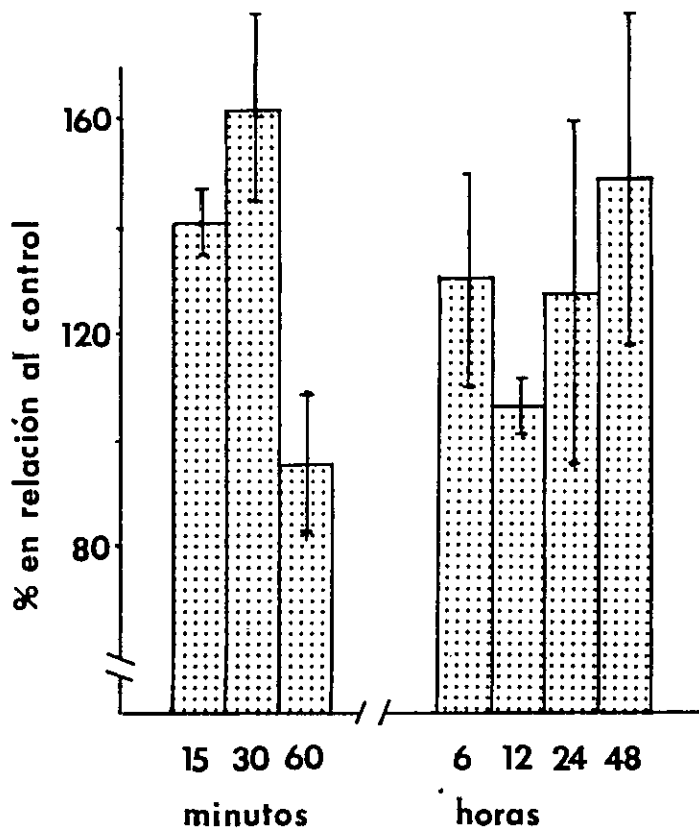


FIGURA N° 16 : EFECTO DE 2 PPM DE ARSENICO PENTAVALENTE SOBRE LA CONCENTRACION INTRACELULAR DE ATP EN ME RISTEMA RADICULAR.

Bulbos de *Allium cepa L* se incubaron en agua a 15°C hasta obtener raicillas creciendo en equilibrio dinámico (60 horas). Posteriormente los bulbos se incubaron en 2 ppm de ar sénico⁺⁵ por 13, 30 y 60 minutos y por 6,12,24 y 48 horas. Se aisló la zona meristemática de las raicillas y se midió la concentración intracelular de ATP, según lo descrito en Mate riales y Métodos. Los resultados se expresaron en porcentaje en relación al control y corresponden al promedio y desvia ción estandar de tres bulbos control y tres bulbos por cada tiempo de tratamiento con arsénico⁺⁵

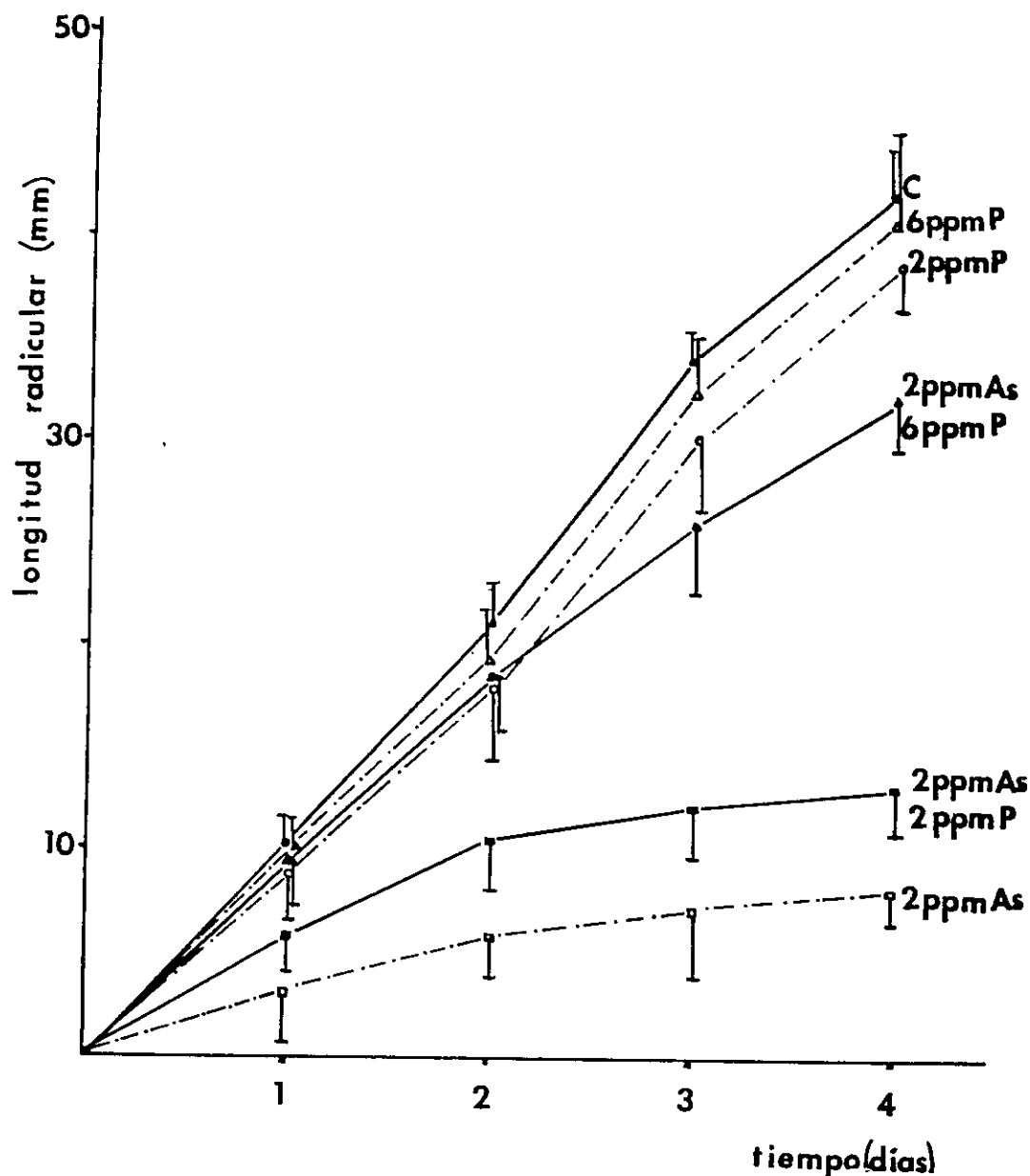


FIGURA No 17 : EFECTO DE ARSENICO PENTAVALENTE (2 PPM) Y DE FOSFORO (2 PPM Y 6 PPM) SOBRE EL CRECIMIENTO RADICULAR

Bulbos de *Allium cepa L* se incubaron en agua a 15°C hasta obtener raicillas creciendo en equilibrio dinámico (60 horas). Se midió la longitud de 10-12 raices previamente individualizadas. Posteriormente se incubaron en una solución de 2 ppm de arsénico, conteniendo fósforo en concentración equimolar o en concentración tres veces mayor. La longitud radicular se midió cada 24 horas por 4 días. Cada punto representa el promedio y desviación estandar de crecimiento diario de las raices de dos bulbos control y dos bulbos por cada concentración utilizada, de un experimento representativo de un total de cinco experimentos efectuados. Se consideró la longitud inicial promedio como cero.

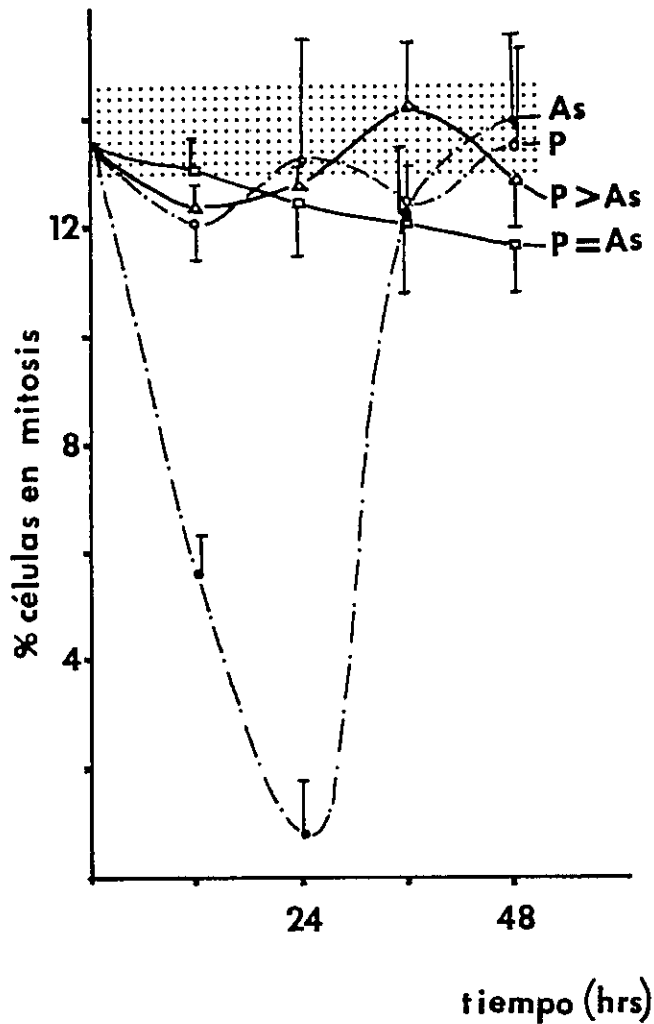


FIGURA No 18 : EFECTO DE ARSENICO PENTAVALENTE (2 PPM) Y DE FOSFORO (2 PPM Y 6 PPM) SOBRE EL INDICE MITOTICO

Bulbos de *Allium cepa* L se incubaron en agua a 15°C hasta obtener raicillas creciendo en equilibrio dinámico (60 horas). Posteriormente se incubaron en soluciones de 2 ppm de arsénico⁵ conteniendo fósforo⁵ en concentración equimolar, o bien en una concentración tres veces mayor. Se obtuvieron muestras a las 12, 24, 36 y 48 horas. Las raíces se procesaron para cuantificar índice mitótico según se describe en Materiales y Métodos. Se determinó el porcentaje de células en mitosis en 1000 células de cada una de 3 a 5 raicillas por punto. Los resultados corresponden al promedio y desviación estandar de dos bulbos control y dos bulbos por cada concentración utilizada de un experimento representativo de un total de cinco experimentos efectuados.

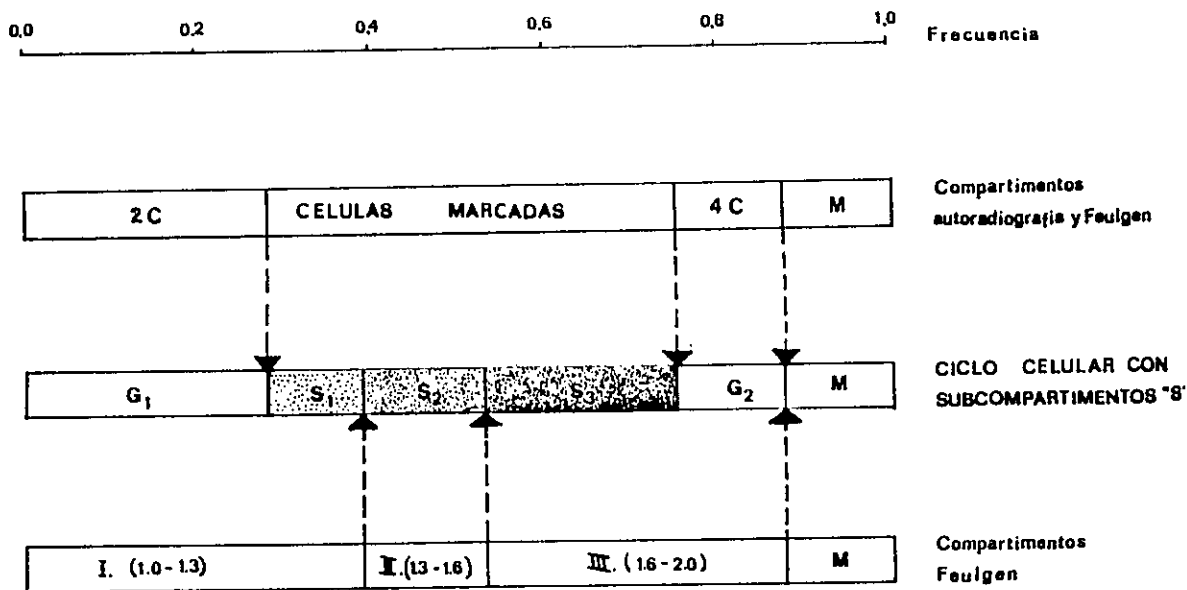


FIGURA Nº 19 : METODO PARA DETERMINAR LA FRECUENCIA DE CELULAS EN TRES SUBCOMPARTIMENTOS DEL PERIODO S

La frecuencia de células en S temprano, medio y tardío (S_1 , S_2 y S_3 respectivamente) señalado en la barra central de la figura se determinó utilizando las frecuencias de células en compartimentos de 2 C y 4 C de ADN (G_1 y G_2), la frecuencia de células marcadas con timidina tritiada (S) y la frecuencia de células en mitosis (barra superior). Paralelamente, en preparados teñidos con Feulgen, se determinó la frecuencia de células en tres compartimentos obtenidos dividiendo el rango de valores encontrados en tres intervalos iguales (barra inferior).

Restando la frecuencia de células en G_1 y G_2 de la barra superior a los compartimentos I y III de la barra inferior, se obtuvo la subcompartimentalización del período S (barra central).

D I S C U S I O N

El crecimiento radicular se produce fundamentalmente a expensas de proliferación celular en la zona meristemática y de elongación celular en la zona de diferenciación. El estudio del efecto de arsénico pentavalente sobre el crecimiento radicular permitió establecer un rango de concentraciones de arsénico que, afectando a la raíz, no ejerciera un efecto tóxico. Además, llevó a obtener una visión global de la acción de este microelemento sobre los dos procesos responsables del crecimiento radicular.

En general, las diferentes concentraciones de arsénico empleadas inhiben el crecimiento radicular. Esta inhibición es reversible con la concentración menor de arsénico, resultado que sugiere la presencia de mecanismos que eliminan o disminuyen el efecto de este elemento a niveles adecuados para el funcionamiento normal de la célula. Estos mecanismos no son suficientes para revertir la disminución del crecimiento producida por concentraciones mayores de arsénico. Sin embargo, aún después de incubaciones en concentraciones de 3 ppm de arsénico por 24 horas, se observa recuperación total del crecimiento cuando se elimina el microelemento del medio de incubación. Este resultado sugiere que las células resisten adecuadamente concentraciones altas de arsénico, por un tiempo finito.

La disminución de la frecuencia de células en mitosis observada en la zona meristemática también depende de la concentración de arsénico en el medio de incubación. De igual forma a lo descrito para crecimiento radicular, concentraciones menores de arsénico producen un efecto reversible sobre el índice mitótico. Así, sólo concentraciones de 4 ppm o mayores afectan irreversiblemente este índice. Este resultado sugiere nuevamente la presencia de un mecanismo que elimina o neutraliza a este microelemento. Llama la atención que el crecimiento radicular es más sensible al arsénico que el índice mitótico. Este hecho sugiere que el proceso de elongación celular es más severamente afectado que la proliferación.

Tratamientos cortos con arsénico (primeras diez horas) en concentraciones de 1, 2, 3 y 4 ppm no interfieren con la capacidad de las células de entrar en mitosis. Este resultado apunta posiblemente a una acción no inmediata de este elemento sobre las células meristemáticas. El análisis de las distintas etapas de la mitosis en tiempos cortos de tratamiento, muestra que en estas condiciones, arsénico tampoco afecta alguna de sus fases en particular. Al respecto, Tsuda (73), al analizar el efecto de arsenato de sodio sobre la mitosis de células en cultivo (fibroblastos de ratón), encuentra que 15 ppm de arsénico no afectan la mitosis en estas cé

lulas. Sin embargo, utilizando este elemento en concentración de 31 y 93 ppm, se produce una detención de las células en profase y metafase aumentando la frecuencia de células en mitosis. Este autor, sin embargo, no se pronuncia acerca de parámetros que midan toxicidad del elemento; sólo establece que el efecto de arsenato es reversible después de tiempos cortos de tratamiento.

Un factor que influye en el ciclo proliferativo de células meristemáticas es la temperatura. El tiempo de ciclo disminuye con la temperatura en un rango de 10 a 30°C, manteniéndose constante la duración relativa de todas sus etapas (22, 37). Si el efecto observado con arsénico sobre el índice mitótico estuviera relacionado con algún evento particular del ciclo celular, este debería ocurrir a tiempos menores con la temperatura. Analizando el efecto de arsénico sobre el índice mitótico a una temperatura mayor (25°C) que la utilizada en el resto de los experimentos (15°C), se ratifica la disminución de la frecuencia de células en mitosis observada anteriormente. Más aún, el índice mitótico cae en tiempos menores sugiriendo que arsénico afecta sucesos que son necesarios en algún momento determinado del ciclo, el que se desplaza al aumentar la temperatura.

El efecto de arsénico sobre la incorporación de timidina tritiada y sobre la distribución de células meristemá

ticas en los cuatro períodos del ciclo celular (G_1 , S, G_2 y M) señalan una disminución de la frecuencia de células en S, con un mínimo a las 24 horas, que revierte a valores control en tiempos más largos de tratamiento (48-72 horas). En el sistema empleado en esta tesis, además del efecto descrito para el período S, arsénico provoca una detención o bloqueo transitorio de células en los períodos G_1 y G_2 , hacia las 24 horas de tratamiento. Esto se fundamenta en el aumento de las frecuencias de células en G_1 y en G_2 , y en la disminución coincidente de las frecuencias de células en S y en M, respectivamente. El bloqueo de células en G_1 se observa con mayor claridad cuando se considera la evidencia aportada por el estudio de subcompartimentos del período S. Analizando los resultados con dos metodologías distintas, se llega a la misma conclusión, a saber, ausencia de células en S temprano a las 24 horas de tratamiento con 2 ppm de arsénico. Se puede inferir entonces que arsénico afecta el ingreso de células al período S, planteando nuevamente la presencia de un punto concreto de bloqueo en G_1 .

Sin embargo, a pesar de la persistencia de arsénico en el medio de incubación, la frecuencia de células en los distintos subperíodos de S y en M regresa a los valores controles al transcurrir el tiempo. Este hecho apunta a la existencia de algún mecanismo que permite que las células sobre-

pasen el bloqueo y repliquen su ADN, llegando finalmente a la mitosis. Nuevamente se puede postular la acción de mecanismos de eliminación o neutralización de la acción o del efecto de este elemento.

Estos resultados no coinciden con aquellos obtenidos por Peters y cols (57), quienes describen detención de linfocitos humanos en S y G_2 por efecto de arsénico⁵.

Se puede concluir entonces, que el efecto más relevante de 2 ppm de arsénico sobre la distribución de células meristemáticas en los cuatro períodos del ciclo celular es una disminución de la frecuencia de células en S y M y un aumento coincidente de la frecuencia de células en G_1 y en G_2 hacia las 24 horas de tratamiento, por bloqueo transitorio y reversible de las células meristemáticas en G_1 y en G_2 .

Considerando los efectos de arsénico pentavalente sobre el metabolismo celular descritos en la introducción de este trabajo, se podría suponer que la presencia continua de este elemento podría traducirse además en alteraciones de tiempo de ciclo celular. En este trabajo se observa que la duración de la interfase mínima se duplica en las raíces sometidas a arsénico. El resultado de los experimentos diseñados para medir la velocidad de flujo celular a través de la metafase, apoya este hecho. En raíces sometidas a arsénico

durante 48 horas, las células meristemáticas presentan una velocidad de tránsito mucho menor (40%) a los controles y en el inicio del tratamiento. Es interesante destacar que Van't Hof y cols (74) demostraron que agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa aumentan el tiempo de ciclo celular en meristemas de *Pisum sativum*. Considerando que arsénico ha sido postulado como un agente desacoplante (47, 64, 66), su efecto sobre el tiempo de ciclo podría encontrar explicaciones en esta propiedad.

Uniendo esta conclusión a la anterior, se puede deducir que arsénico no sólo produce bloqueos transitorios en los períodos G_1 y G_2 sino que además disminuye la velocidad de flujo de células por el ciclo, es decir aumenta el tiempo de ciclo. Esta alteración en el Tc podría estar relacionada con el bloqueo observado en G_1 y G_2 .

El mecanismo básico de acción de arsénico pentavalente sobre el metabolismo celular descrito en la literatura científica consiste en una competencia con fósforo⁺⁵ en las múltiples reacciones en las que éste participa. En los vegetales, así como en otros organismos, el fósforo⁺⁵ se encuentra formando parte de compuestos del metabolismo intermedio y de compuestos de alta energía a través de uniones pirofosfato, siendo el más importante en este último grupo el ATP.

La energía absorbida durante la fotosíntesis y la liberada durante la respiración celular o la degradación anaeróbica de carbohidratos, se utiliza en la síntesis de ATP. Por medio de esta molécula, la energía puede ser aportada a los diversos procesos endergónicos tales como el transporte activo a través de membrana y síntesis de compuestos orgánicos. Los compuestos análogos al ATP tales como CTP, UTP y GTP participan también en la síntesis de sacarosa y callosa (UTP), en la síntesis de fosfolípidos (CTP) y de celulosa (GTP). Todos ellos toman también parte en la síntesis de ARN y ADN (45). Además de todos estos procesos generales, hay que considerar la participación del fósforo⁺⁵ en la fosforilación de proteínas específicas que determinan eventos particulares del ciclo celular (63).

De acuerdo a lo anterior, arsénico podría actuar en distintos procesos o niveles del metabolismo celular, afectando al ciclo celular. En este trabajo se estudió dos parámetros del metabolismo celular que podrían verse afectados por arsénico: síntesis proteica y concentración intracelular de ATP. Además se estudió el comportamiento de las raíces en presencia simultánea de arsénico⁺⁵ y fósforo⁺⁵.

El efecto de arsénico sobre el ingreso e incorporación de leucina a proteína depende de concentración y tiempo, observándose con 2 ppm una inhibición neta de la síntesis

sis proteica a las 24 horas. La reversibilidad del efecto de arsénico pentavalente sobre el ingreso de leucina a la célula y su incorporación a proteína reitera la presencia de mecanismos de neutralización del efecto causado por el elemento.

Al analizar la variable tiempo con una concentración fija de arsénico (2 ppm) se observa que en tiempos cortos y medianos hay una inhibición del ingreso y de la incorporación del precursor, que fluctúa entre el 50 y 60%. A las 24 horas se observa nuevamente inhibición neta de la incorporación de leucina a proteínas, regresando la situación a niveles control hacia las 48 horas.

Estudios relacionados a síntesis proteica en meristemas radicales de *Allium cepa* L (16, 17, 23), señalan que es un proceso continuo a lo largo de la interfase. Sin embargo, Mitchell (46) utilizando un sistema de explante de alcachofa en división sincrónica y por métodos citoquímicos, muestra que el aumento en proteínas totales ocurre en tres etapas, G_1 temprano, inicio de S y en G_2 inmediatamente antes de la mitosis. Estos resultados contrastan con aquellos descritos para fibroblastos de ratón (78, 79) en los cuales la proteína por célula aumenta exponencialmente durante la interfase. Utilizando células de mamífero en cultivo, y analizando incorporación de diferentes aminoácidos marcados, di-

versos autores (47, 78) concluyen que la síntesis proteica es un proceso continuo a lo largo del ciclo y que su velocidad aumenta progresivamente. Hay sin embargo, diferencias en la manera en que aumenta la velocidad de síntesis en los diversos sistemas estudiados (48). Además, empleando una población sincrónica de células meristemáticas de *Allium cepa* L, se ha demostrado que la inhibición de la síntesis proteica en la fase G_1 impide el inicio de la replicación del DNA (23). Utilizando la misma población celular y aplicando un inhibidor de la síntesis proteica en G_2 , se logró establecer la necesidad de síntesis de proteínas en el inicio de este período para la progresión de las células hacia la mitosis (23). Por otra parte, empleando *Pisum sativum* en cultivo, Webster y cols (76) observan detención de células en G_1 al privarlas de carbohidratos, fuente de energía necesaria para la síntesis de proteínas.

En los experimentos descritos en este trabajo, se establece que arsénico produce una reducción de un 40-50% de la síntesis de proteínas, acompañadas de inhibición simultánea del transporte de aminoácidos a través de membrana, en tiempos cortos de tratamiento. Considerando que la inhibición de síntesis de proteínas en G_1 impide la entrada de células en S (23) y que hay una etapa en G_2 que requiere de síntesis proteica para la entrada de células en M (18, -3), y

teniendo en cuenta que la síntesis proteica es un proceso continuo y necesario para el tránsito de las células por el ciclo proliferativo (16, 17, 23), se puede postular que la inhibición parcial de la síntesis proteica producida por arsénico, podría dar cuenta del bloqueo transitorio de las células en G_1 y en G_2 y del mayor tiempo de ciclo observado.

Es interesante hacer notar que la velocidad de tránsito metafásico en 2 ppm de arsénico está claramente disminuida a las 48 horas de iniciado el tratamiento, momento en el cual el bloqueo en G_1 y G_2 ha sido sobrepasado. Considerando que la síntesis de proteína ha regresado a valores normales hacia las 48 horas, existe una relación temporal entre la inhibición de la síntesis proteica observada, con el bloqueo de células en G_1 y G_2 , y no así con la velocidad de flujo metafásico. Este hecho podría ser consecuencia de un efecto tóxico derivado de la acción conjunta de arsénico y colchicina sobre este sistema. Cabe recordar que la incubación de las raicillas en arsénico y cafeína produjo alteraciones serias de las células meristemáticas.

Considerando la inhibición de transporte de leucina a través de membrana observada por acción del arsénico, y teniendo en cuenta además la competencia entre fósforo y arsénico por productos fosforilados (arsenolisis), se plantea la posibilidad de que arsénico afecte la síntesis y/o los ni-

veles de ATP. La disminución de la concentración intracelular de ATP afectaría, sin lugar a dudas, el metabolismo celular y como consecuencia, el ciclo celular. Estos hechos podrían explicar el bloqueo transitorio producido por arsénico en los períodos G_1 y G_2 del ciclo celular, que han sido definidos como los de mayor requerimiento energético (75, 76).

Al respecto, algunos trabajos efectuados en células de mamífero sugieren que los niveles de ATP sufren variaciones periódicas, indicando que el aporte, o bien los requerimientos energéticos durante el ciclo, no son constantes (40). Los trifosfatos de nucleósidos pirimídnicos presentan un incremento brusco al inicio de la fase S, lo que llevó a sugerir que la síntesis de estos compuestos puede ser gatillada en, o poco antes del inicio de la replicación del ADN. Sin embargo, en células de Hamster chino sincrónicas se ha observado que los niveles de ATP por célula aumentan a lo largo del ciclo celular para disminuir hacia el final de G_2 , presentando un paralelismo con los cambios de volumen celular (40). En células L de ratón sincrónicas, se ha descrito que los niveles de ATP por célula muestran cambios cíclicos, disminuyendo en G_1 , presentando un máximo al final de S y bajando luego progresivamente hacia el final de la mitosis. (40).

Van't Hof (74) y Webster y cols (76), han postulado que los desacoplantes actúan deteniendo las células en G_1

y G_2 , a través de una disminución en el aporte energético mínimo necesario para que se cumplan las transiciones $G_1 \rightarrow S$ y $G_2 \rightarrow M$. Van't Hof y Kovacs (69), trabajando en *Pisum sativum*, *Vicia faba* y *Helianthus annuus*, en condiciones de deprivación de hidratos de carbono, observan detención de células en las fases G_1 y G_2 del ciclo celular. Infieren que el período pre sintético de ADN y el premitótico, poseen una cualidad no compartida por S y M en cuanto a requerimientos energéticos. Proponen que el ciclo proliferativo estaría gobernado por dos puntos principales de control, uno en G_1 y otro en G_2 , los que representarían bloqueos metabólicos que regulan la entrada en S y M. Estos puntos de bloqueo se hacen evidentes en ausencia de hidratos de carbono, en presencia de hidratos de carbono y ausencia de oxígeno, en presencia de desacoplantes de la fosforilación oxidativa y en presencia de inhibidores de la síntesis proteica. De estas observaciones, estos autores concluyen que las transiciones $G_1 \rightarrow S$ y $G_2 \rightarrow M$ requieren de un mayor aporte energético. Sin embargo, no miden la concentración intracelular de ATP en su sistema, condición necesaria para demostrar su hipótesis.

En el sistema utilizado en esta tesis no se observa disminución en la concentración de ATP en células meristemáticas bajo el efecto continuo del arsénico en concentración de 2 ppm, sino incluso, aumento. Por otra parte, del análisis

sis de los niveles intracelulares de ATP se sugiere que la inhibición de la síntesis de proteínas causada por arsénico no podría explicarse satisfactoriamente como consecuencia de falta de aporte energético. Llama la atención que arsénico no produzca variaciones en los niveles intracelulares de ATP en raicillas de cebolla si se considera la competencia entre fósforo y arsénico ampliamente discutida en esta tesis. Sin embargo, las concentraciones de arsenato necesarias para desacoplar la fosforilación oxidativa en diversos sistemas estudiados (9, 47, 64) son considerablemente mayores que las empleadas en este trabajo. Además, Scarborough y cols (67) llegan a similares resultados. Así, realizaron la observación de que el tratamiento de *Neurospora crassa* con arsénico produce marcada inhibición del transporte afectando sólo muy parcialmente los niveles de ATP. Estos resultados coinciden con los expuestos en esta tesis, tanto en lo que se refiere a niveles intracelulares de ATP como al ingreso de leucina en las células meristemáticas incubadas en ausencia de arsénico.

Se postula que el mecanismo de acción del arsénico sobre el metabolismo celular se basaría fundamentalmente en su competencia con fósforo en las diversas reacciones metabólicas en las que éste participa. Por lo tanto la presencia de fósforo en el medio de incubación que contiene arsénico debería impedir el efecto de este microelemento sobre el ciclo

celular, descrito en esta tesis. Nuestros resultados experimentales muestran que, en efecto, en presencia de concentraciones adecuadas de fosfato, el arsenato no inhibe el crecimiento radicular ni afecta el índice mitótico. En relación a crecimiento radicular, se requiere una concentración tres veces mayor de fosfato para anular el efecto de este microelemento. Por el contrario, el fosfato es capaz de impedir el efecto arsénico sobre el índice mitótico en concentración equimolar. Esta diferencia sugiere nuevamente que el fenómeno de elongación es más sensible a arsénico que el de la proliferación celular. De estos experimentos se puede concluir que, por lo menos en parte, arsenato actuaría compitiendo con fosfato en reacciones cruciales para que el ciclo celular pueda completarse.

Un hecho interesante es la transitoriedad del efecto observado con bajas concentraciones de arsénico⁺⁵ sobre los aspectos de crecimiento radicular, ciclo celular y metabolismo estudiados en esta tesis. Considerando que el fosfato impide la acción del arsenato, se puede postular que la transitoriedad del efecto de este microelemento se debe a movimientos de fosfato desde el bulbo hacia la raíz, desviando la relación P/As a favor del primero. En efecto, el fosfato presenta un alto grado de movilidad, tanto ascendente como descendente en vegetales. Así, el fosfato incorporado en los

segmentos basales de la raíz de cebada, se movilizan tanto a la punta de la raíz como a las partes superiores de la planta. El movimiento de fosfato en dirección descendente ocurre fundamentalmente a través del floema. Además, el fosfato absorbido por las células vegetales participa rápidamente en reacciones metabólicas, incorporándose principalmente a hexosafosfato y uridinfosfatos (72). Por otra parte se ha demostrado una gran movilidad de fósforo radiactivo desde las raicillas de *Allium cepa* L hacia el bulbo y viceversa (J. López-Saez, comunicación personal).

Además, diversos trabajos plantean que la acción del arsénico⁺⁵ sobre la proliferación celular y/o el metabolismo celular depende de la relación P/As en el medio. Así, Mandel y cols (43) trabajando en *Bacillus cereus* establecen que la inhibición de la formación de colonias ejercida por arsénico pentavalente, es menor en presencia de fósforo que en su ausencia. En estudios efectuados en *Streptococcus faecalis*, (25) se plantea que la incorporación de arsenato y fosfato es un proceso unidireccional firmemente unido a alguna reacción metabólica que involucra ATP, y que la incorporación de arsenato está regulada por el fósforo inorgánico intracelular. Scarborough (67), utilizando *Neurospora crassa* y analizando el transporte de sorbosa a través de membrana, observa que la acción inhibitoria sobre el transporte ejercida por arsenato

es suprimida por la presencia de fosfato. Da Costa (10), trabajando con distintas cepas de hongos, muestra retardo o inhibición de crecimiento de estos microorganismos por efecto de compuestos arsenicados. Se observa mucha variación de respuesta en distintas cepas de hongos, pero la acción de arsenato es consistentemente reducida por la adición de fosfato en alta concentración. Por último, Johnstone (31) establece que arsenato desacopla la fosforilación oxidativa en mitocondrias intactas de hígado, efecto que es revertido por fosfato.

Considerando los resultados de esta tesis y las numerosas evidencias experimentales aquí expuestas, se postula que la transitoriedad del efecto de bajas concentraciones de arsénico sobre los parámetros celulares estudiados se debe a reflujos de fósforo desde el bulbo hacia el meristema, revirtiendo la relación P/As. Además el reflujos de fósforo puede dar cuenta de los mecanismos detoxificantes a los cuales hemos hecho referencia anteriormente. La reversión del efecto arsénico podría ser explicada además por otros mecanismos. Así, en células vegetales existen vacuolas rodeadas por membrana de permeabilidad selectiva a iones que cuenta con capacidad de transporte activo (45). Esta propiedad podría ser responsable del secuestro de arsénico en la vacuola. Por otro lado, en levadura (7), se ha observado que la capacidad.

de estos microorganismos de crecer en presencia de arsénico depende de cambios a nivel de membrana en la relación glucano/manano a favor del primero, observándose además un aumento en fosfoinositol y disminución en la síntesis de fosfolípidos. En bacterias, se ha descrito cepas de *E. coli* y *S. aureus* capaces de multiplicarse en presencia de altas concentraciones de arsenato (69). Esta resistencia les es conferida por un plasmido que codifica una función de excreción de arsenato, la cual es dependiente de energía y posee un alto grado de especificidad hacia este elemento.

Otra manera de explicar el efecto de arsenato sobre los parámetros celulares estudiados en esta tesis es a través de su conversión a arsenito (As^{+3}). Existe gran controversia en la literatura al respecto. Schroeder (66), afirma que el arsénico biogénico y aquel que se encuentra como contaminante en suelos superficiales y agua, por el hecho de estar en contacto con oxígeno, está en el estado de oxidación pentavalente. Además el arsenato inorgánico ingerido por mamíferos es excretado en forma pentavalente. En todo caso, se conoce poco acerca de la biotransformación de compuestos arsenicados en el hombre (32). No obstante se sabe que el equilibrio redox *in vivo* favorece la oxidación del As^{+3} a As^{+5} . La baja toxicidad y el hecho de recobrar la mayor parte del arsénico en forma pentavalente en orina indican que

hay muy poca reducción (32). Sin embargo, Ginsburg y cols (19) establecen pequeñas pero significativas cantidades de arsénico trivalente en la orina y el plasma de perros que han sido transfundidos por vía endovenosa con arsénico pentavalente.

Borst-Pauwels (4), estudiando la incorporación de arsenato radiactivo por levadura, plantea que un 10 a un 50% del total que ingresa a la célula es transformado en compuestos tales como arsenito y sus productos, que se encuentran en la fracción no extractable por TCA, etanol o agua. Por el contrario, Mandel y cols (43), utilizando *Bacillus cereus* y arsénico radiactivo, establecen que no hay evidencias de reducción de arsenato a arsenito. Da Costa (10), analizando el efecto de arsenato en hongos, apoya la tesis de que la toxicidad de este elemento es debida a su interferencia competitiva con fósforo en la fosforilación oxidativa (As^{+5}) y no a una reacción de As^{+5} con grupos SH de proteínas esenciales. Sin embargo, la interpretación de resultados de trabajos efectuados con As^{+5} radiactivo debe ser hecha con cautela puesto que estudios relacionados con su preparación y pureza, establecen que de un 3 a un 98% de la actividad puede estar presente como As^{+3} (60). La proporción de As^{+5} en estas muestras aumenta espontáneamente en función del tiempo.

Para detectar As^{+3} y As^{+5} existen distintas posibilidades. Una es aplicar una técnica citoquímica, que emplea formalina y sulfato de cobre para detectar arsénico en tejidos animales (36). Sin embargo, esta técnica requiere de una reducción previa de arsenato a arsenito y la formación de un precipitado de cobre que se reconoce con ácido rubiánico. Por lo tanto, este procedimiento no permite discriminar entre ambos estados de oxidación del elemento. Otra posibilidad es aplicar técnicas químicas y espectrofotométricas para determinar y cuantificar ambos estados de oxidación (29, 30). Estas técnicas no ofrecen garantías para este estudio puesto que arsenato, arsenito y fosfato se reconocen con molibdato, produciendo cromógenos que absorben en longitudes de onda muy similares.

A pesar de que no fue posible determinar *in situ* o químicamente la presencia y concentraciones de As^{+3} , As^{+5} y P^{+5} , el hecho que el efecto producido por bajas concentraciones de arsénico sea transitorio y reversible y que la presencia simultánea de fosfato en el medio impide dichos efectos, sugieren fuertemente que no hay conversión importante de arsénico pentavalente a arsénico trivalente. Además, el efecto de arsénico trivalente se propone a través de la unión covalente de este elemento a proteínas (66). Esta unión es firme y de larga duración, hecho que no coincide con la rápida

recuperación del crecimiento radicular observado al transferir los bulbos desde 3 ppm As^{+5} a agua potable filtrada.

Los efectos de arsénico pentavalente sobre el ciclo celular descritos en este trabajo, podrían ser explicados en términos de competencia de este elemento con fósforo⁺⁵ en reacciones de fosforilación de proteínas en general, o bien de proteínas particulares. Uno de los mecanismos bioquímicos básicos de la regulación de diversos fenómenos biológicos es la fosforilación de proteínas. Por acción de una proteinaquinasa, se fosforilan sustratos tales como enzimas regulatorias o proteínas que participan en el control de la transcripción génica. Ejemplos de estas últimas son las proteínas histónicas y no histónicas (24, 44). Según Ruddon (63) estas proteínas sufren importantes modificaciones post-traduccionales tales como metilación, acilación y fosforilación que afectan su unión al DNA y que juegan por lo tanto un importante papel en el control de la replicación del DNA y en la transcripción. La fosforilación de residuos de histonas, tienden a neutralizar cargas positivas en sitios específicos de la molécula. No sólo presentan especificidad en cuanto a estructura molecular, sino que además, las fosforilaciones ocurren en tiempos específicos del ciclo celular. Esta especificidad sugiere con mayor claridad que las histonas fosforiladas tienen una función importante en el control de la ex

presión génica. Así la fosforilación de H1 ha sido asociada con diversas fases del ciclo celular (63). Se ha visto que hay un aumento en la fosforilación de H1 en momentos específicos de las fases S y M, las que tendrían ingerencia en la replicación del DNA y condensación de cromosomas, respectivamente. Por lo menos el 50% de las moléculas H1 son fosforiladas en células en activa división. A medida que las células entran a G₁ temprano, se produce una rápida desfosforilación. Esta evidencia apunta a mecanismos específicos de control del ciclo celular a través de procesos de fosforilación (63). En relación a proteínas no histónicas (NHP), se ha postulado que la fosforilación es la modificación postsintética más importante en estas proteínas. Sin embargo, no está claro cómo las proteínas no histónicas regulan la expresión génica. La velocidad de fosforilación de NHP varía a lo largo del ciclo celular, siendo más rápida durante los períodos de mucha síntesis de RNA (G₁ y S temprano) y declinando en los períodos G₂ y M. Estos procesos de fosforilación pueden ser dependientes o independientes de cAMP. (63).

Se podría postular entonces, que el ciclo celular de células meristemáticas de *Allium cepa* L, presenta procesos de fosforilación más sensibles o específicos a la acción de arsénico pentavalente en determinados momentos del ciclo celular. Es decir, arsénico afectaría procesos de fosforila

ción de enzimas o proteínas específicas que participan en eventos que permiten la transición G_1 -S y G_2 -M. Esta posibilidad, sumada a la inhibición parcial de la síntesis de proteínas provocada por arsénico, podría explicar el bloqueo observado, tanto en G_1 como en G_2 .

En conclusión, los resultados de los experimentos efectuados en el presente trabajo nos permiten plantear las siguientes consideraciones generales :

1. Arsénico pentavalente inhibe el crecimiento radicular en función de la concentración del microelemento utilizada. El efecto es paulatino, presentando como característica importante una reversión de la inhibición en 1 ppm en presencia del elemento. Por encima de esta concentración, la inhibición es irreversible.

Arsénico inhibe además la proliferación celular en la zona meristemática, efecto que depende de su concentración en el medio y que también requiere de un período de latencia. Nuevamente se observa reversión de la inhibición en presencia del microelemento, hasta 3 ppm. Concentraciones mayores inhiben irreversiblemente la proliferación celular.

La diferencia de sensibilidad de los parámetros me

dados, crecimiento radicular y proliferación celular, a diferentes concentraciones de arsénico, sugiere que la elongación celular en la zona de diferenciación es más sensible al elemento.

La reversión de la inhibición, tanto del crecimiento radicular en 1 ppm como de la proliferación celular en 3 ppm, podría implicar la existencia de mecanismos detoxificantes.

2. Arsénico pentavalente, en una concentración de 2 ppm en el medio de incubación.
 - 2.1. Afecta la distribución celular en los cuatro compartimentos del ciclo proliferativo en forma transitoria. La alteración más relevante consiste en un bloqueo de células en G_1 y en G_2 , que se traduce en una disminución de la frecuencia de células en S y M. Este efecto desaparece en función del tiempo, en presencia del microelemento.
 - 2.2. Aumenta el tiempo de ciclo celular y disminuye la velocidad de tránsito celular.
 - 2.3. Inhibe parcialmente el transporte de leucina a través de membrana.
 - 2.4. Afecta la síntesis proteica, en etapas tempranas y

medianas de incubación en este microelemento. Este efecto desaparece hacia las 48 horas de incubación.

- 2.5. No disminuye la concentración intracelular de ATP hasta las 48 horas.
3. El fosfato impide la acción inhibitoria de arsénico pentavalente sobre el crecimiento radicular y sobre la proliferación celular.
4. Se postula que la reversión de la inhibición del crecimiento radicular y de la proliferación celular ("mecanismo detoxificante"), observada en las concentraciones más bajas de arsénico utilizadas, se debe principalmente a un cambio en la relación P/As producido por flujo de fósforo desde el bulbo hacia la raicilla.
5. Se sugiere que el bloqueo de células en G_1 y G_2 inducido por arsénico es consecuencia de la inhibición parcial de síntesis de proteínas observada y/o por interferencia con fosforilación de proteínas necesarias para el tránsito de las células por el ciclo celular.

B I B L I O G R A F I A

1. Baroni, C., Van Esch. G.J. and Saffiotti, V.:
Carcinogenic Tests of two inorganic Arsenicals. Arch.
Environ. Health 7: 54-60, 1963.
2. Bencko, V.:
Carcinogenic, Teratogenic and Mutagenic effects of arse
nic. Environmental health perspectives 19: 179-182 ,
1977.
3. Borgoño, J.M. and Greiber, R.
Epidemiological study of arsenism in the city of Antofagasta in:
D.D. Hemphill Ed. Trace substances in environmental
health.
V. Proceedings of University of Missouri's 5th Annual
Conference on Trace substances in Environmental Health.
Held, June 29-July 1 1971. Columbia University of Mis-
souri, 1972; pp. 13-24.
4. Borst-Pauwels, G.W., Peter, J.K., Jager, S. and Wijf -
fels, C.C.:
A study of the arsenate uptake by yeast cells compared
with phosphate uptake.
Biochim. Biophys. Acta 94: 312-314, 1965.

5. Braun, W.:
Carcinoma of the Skin and the internal organs caused by arsenic.
Germ. Med. Monthly 3: 321-324, 1958.
6. Calvo, A., Cruz, J.L., Gutiérrez, C., García-Herdugo, G., Gimenez-Martín, G. and López-Saez, J.F.:
Analysis of Cell Cycle in Root Meristems.
J. Theor. Biol. 96: 295-308, 1982.
7. Cerbón, J. and Llerenas E.:
Evidence for a functional change in the plasma membrane of yeasts associated with the mechanism of arsenate resistance.
Arch. Biochem. Biophys. 174: 373-380, 1976.
8. Committee on Medical and Biological Effects of Environmental Pollutants.
Division of Medical Sciences. Assembly of Life Sciences. National Research Council. Arsenic.
Eds. National Academy of Sciences.
Washington D.C. 1977
9. Crane R.K. and Lipmann, F.:
The effect of arsenate on aerobic phosphorylation
J. Biol. Chem. 201: 235-243, 1953.

10. Da Costa, E.W.B.:
Variation in the toxicity of arsenic compounds to microorganisms and the suppression of the inhibitory effects by phosphate.
Appl. Microbiol. 23: 46-53, 1972.
11. De la Torre C., González-Fernández. A. and Gimenez-Martín G.
Cell flow and its application to the estimate of Cell Cycle parameters in meristems.
Biol. Zool. 9: 707-710, 1971.
12. De la Torre C. and González-Fernández, A.:
Cell cycle mapping by irradiating cells with Bromosubstituted DNA segments.
Photochem. Photobiol. 29: 977-981, 1979.
13. Fantes, P.A. and Nurse P.:
Division timing: controls, models and mechanisms In:
The Cell Cycle.
P.C.L. John Ed.
Cambridge University Press, 1981, pp. 11
14. Feulgen R., and Rosenbeck H.:
Mikroskopisch chemisches waschwer einer Nukleinsäure von Typus der Tymornukleinsäure und die darauf beruhende mikroskopischen preparaten.
Z. Phys. Chem. 135: 203, 1924.

15. Fowler B.A.
Toxicology of Environmental Arsenic. In:
Advances in Modern Toxicology. Vol. 2. Toxicology of
Trace elements. Goyer R.A. and Mehlman M.A. eds. Hemis-
phere Publishing Co. Washington D.C. 1977, pp. 79-122.
16. García-Herdugo, G., González-Fernández, A. and López -
Saez, J.F.:
DNA replication in the presence of protein synthesis in
nibitors in higher plant cells.
Exp. Cell. Res. 104: 1-6, 1976.
17. Gimenez-Martín G., De la Torre C. and López-Saez, J.F.:
Cell division in higher plants. In: Mechanisms and Con
trol of Cell Division.
Rostand T.L. and Gifford, E.M. Jr. Eds.
Dowdon, Hutchinson and Ross Inc.
Stroudsburg, Pennsylvania, 1977, p. 262.
18. Gimenez-Martín G. González-Fernández, A., de la Torre C.
and Fernández-Gomez, E.:
Partial initiation of endomitosis by 3-deoxiadenosine
Chromosoma 33: 361-371, 1971.
19. Ginsburg, J.M. and Lotspeich W.D.:
Interrelations of arsenate and phosphate transport in
the dog kidney.
Am. J. Physiol. 205: 707-714, 1963.

20. González-Bernáldez F., López-Saez, J.F. and García-Ferrero, G.:
Effect of osmotic pressure on root growth, cell cycle and cell elongation.
Protoplasma 65: 255-262, 1968.
21. González-Fernández, A., López-Saez, J.F., Moreno P. and Gimenez-Martín G.:
A model for dynamics of cell division cycle in Onion roots.
Protoplasma 65: 263-276, 1968.
22. González-Fernández, A., Gimenez-Martín, G. and De la Torre, C.:
The duration of interphase period at different temperatures on root tip cells.
Cytobiol 3: 367-371, 1971.
23. González-Fernández, A., Gimenez-Martín, G., Fernández-Gomez, M.E. and De la Torre, C.:
Protein synthesis requirements at specific points in the interphase of meristematic cells.
Exptl. Cell. Res. 88: 163-170, 1974.
24. Gurley, L.R., Tobey, R.A., Walters, R.A., Hidebrand, C.E., Hohmann, P.G., D'Anna, J.A., Barham, S.S. and Deaven, L.L.:

- Histone Phosphorilation and Chromatin Structure in Synchronized Mammalian Cells. In:
Cell Cycle Regulation.
James R. Jeter, Jr., Ivan L. Cameron, George M., Padilla and Arthur M. Zimmerman Eds.
Cell Biology a series of Monographs.
Academic Press Inc., 1978, p. 37.
25. Harold, F.M. and Spitz, E.:
Accumulation of arsenate, phosphate and aspartate by *Streptococcus faecalis*.
J. of Bacteriol. 122: 266-277, 1975.
26. Hernberg, S.:
Incidence of cancer in population with exceptional exposure to metals. In:
Origins of Human Cancer.
Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation.
Winsten J.A. Eds.
Vol 4, 1977 pp. 147-148.
27. Howard, A. and Pelc, S.R.:
A nuclear incorporation of P³² as demonstrated by autoradiographs.
Exp. Cell. Res. 2: 178-187, 1951.

28. Hueper, W.C., Payne, W.W.:
Experimental studies of metal carcinogenesis. Arch. Environ. Health 5: 445-461, 1962.
29. Johnson, D.L.:
Simultaneous determination of Arsenate and Phosphate in natural waters.
Environ Sci. Techn. 5: 411-414, 1971.
30. Johnson, D.L. and Pilson M.E.:
Spectrophotometric determination of arsenite, arsenate and phosphate in natural waters.
Anal Chim. Acta. 58: 289-299, 1972.
31. Johnstone, R.M.:
Sulfhydryl agents: Arsenicals. In:
Metabolic Inhibitors. Vol II.
Hochster, R.M. and Quastel. J.H. Eds.
Academic Press, New York, 1963.
32. Klaasen, C.D.:
Heavy metals and heavy metal antagonists in:
The Pharmacological Basis of Therapeutics. Sixth Ed.
Goodman, A., Gilman L.S. and Gilman, A. Eds.
Mac Millan Publishing Co Inc. 1980 p. 1629.

33. Lee, A.M. and Fraumeni, J.F.:
Arsenic and respiratory Cancer in man; an occupational study.
J. Nat. Cancer Inst. 42: 1045-1052, 1969.
34. Leiva S., Alliende, C., Sans, J. and González, J.:
Metodos Histoquímicos.
Depto. Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, División Norte, Universidad de Chile, Eds. 1982, p. 11.
35. Lehninger A.L.:
Biochemistry. The Molecular Basis of Cell Structure and Function.
2nd Edition, 1975 pp. 429.
Worth Publishers, Inc.
36. Lillie, R.D.:
Histochemical demonstration of arsenic. In:
Histopathologic Technic and Practical Histochemistry. The Blakiston Division.
Mac Graw Hill Book Company, 1954, p. 269.
37. López-Saez, J.F., Gimenez-Martín, G. and González-Fernández, A.:
Duration of the cell division cycle and its dependence on temperature.
Z. Zellforsch 75: 591-600, 1966.

38. López-Saez, J.F., González-Fernández, A., De la Torre ,
C., Diez, J.L., Fernández-Gomez, M.E., Navarrete, M.H.,
García-Herdugo, G. and Gimenez-Martín, G.:
A model for cell cycle and growth kinetics in roots.
J. theor. Biol. 53: 463-473, 1975.
39. Lowry, C., Rosenbrough, N., Farr, A. and Randal, R.
Protein measurement with the folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.
40. Lloyd D., Poole, R.K., Edwards, S.W.:
Bioenergetics and transport. In:
Temporal Organization and Control of Cellular growth and
Reproduction.
D. Lloyd, R.K. Poole, S.W., Edwards Eds.
Academic Press, 1982, p. 279.
41. Lloyd, D.:
Bioenergetics and Transport In:
The cell Division Cycle Temporal Organization and con -
trol of cellular growth and reproduction.
David Lloyd, Robert K. Poole and Steven W. Edwards Eds.
Academic Press, 1982, p. 265.
42. Mak, S.:
Mammalian cell cycle analysis using microspectrophotome
try combined with autoradiography.
Expl. Cell. Res. 39: 286-289, 1965.

43. Mandel, H.G., Mayersak, J.S. and Riis, M.:
The action of arsenic on *Baccillus cereus*.
J. Pharm. Pharmacol. 17: 794-804, 1965.
44. Matthews, H.R.
Chromatin proteins and progress through the cell cycle.
In:
The Cell Cycle.
Edited by P.C.L. John.
Cambridge University Press, 1981, p. 223.
45. Mengel, K. and Kirkby E.A.:
Phosphorus, In: Principles of Plant Nutrition
International Potash Institute Eds.
Berne Switzerland,
P.O., Box, CH-3048 Worblaufen
Boern/Switzerland 1978, p. 347.
46. Mitchell, J.P.
The pattern of protein accumulation in relation to DNA
replication in Jerusalem artichockecallus cultures.
Annals of Botany 32: 315-326, 1968.
47. Mitchell, R.A., Chang, B.F., Huang, C.H. and De Master,
E.G.:
Inhibition of mitochondrial energy linked functions by

arsenate. Evidence for a nonhydrolytic mode of inhibitor action.

Biochemistry 10: 2049-2054, 1971.

48. Mitchinson, J.M.:
Cell Growth and Protein synthesis. In:
The Biology of the Cell Cycle.
Mitchinson J.M. Ed.
Cambridge University Press. 1971, p. 128.
49. Mobley, H.L.T. and Rosen B.P.:
Energetics of plasmid-mediated arsenate resistance in
Echerichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 6119-6122, 1982.
50. Navarrete, M.H., De la Torre, C. and Schwartzman, J.B.:
Compartmentalizing the S period.
Cell Biol. Intern. Rep. 2: 607-613, 1978.
51. Neuman, E., and Schwank, R.:
Multiple malignant and benign epidermal and dermal tumours following arsenic.
Acta Dermato-venereologica. 40: 400-409, 1960.
52. Nordenson, I., Salmonsson, S., Brun, E. and Beckman, G.
Chromosome aberrations in psoriasis patients treated
with arsenic.
Hum. Genet. 48: 1-6, 1979.

53. Novey, H.S., Martel, S.H.:
Asthma, arsenic and Cancer.
J. Allergy 44: 315-319, 1969.
54. Pastenes, J., Acevedo, E., Valladares, R. y Iratchet, R.
Relaciones de contenido de arsénico en el sistema agua-suelo-planta en el valle de Chiu-Chiu.
Bol. Soc. Chil. Quim. (Abstr. Annu. Meet.) Vol 28 N° 2.
480-482, 1983. ISSN 0366-1644.
55. Pastenes J. y Acevedo, E.:
Presencia y distribución de Arsénico en el sistema suelo-agua-planta en el Norte de Chile. I. Contaminación arsenical de suelos, aguas y plantas.
Primer encuentro sobre el medio ambiente chileno.
Centro de Investigación y Planificación del Medio Ambiente (Versiones abreviadas) La Serena 2: SAL/45-SAL/49, 1983.
56. Pastenes, J. y Acevedo, E.:
Presencia y distribución de Arsénico en el Sistema suelo-agua-planta en el norte de Chile. II. Contaminación arsenical en la quebrada de Camiña (I Región).
Primer encuentro sobre el medio ambiente chileno.
Centro de Investigación y Planificación del Medio Ambiente. (Versiones abreviadas) La Serena 2: SAL/50-SAL/54, 1983.

57. Peters, J., Baron, D., Kiefer G., Glaesener, J.J., Hug, J. and Hagedorn, M.:
Comparative studies of the incorporation inhibition of radioactive nucleotides and aminoacids *in vitro* under the influence of Adriamycin, Bleomycin and Sodium Arsenate.
Arch. Derm. Res. 257, 185-194, 1976.
58. Petres, J., Baron, D. and Hagedorn, M.:
Effects of arsenic on cellmetabolsim and cell prolifera -
tion: cytogenetic and biochemical studies.
Environ. Health. Persp. 19: 223-227, 1977.
59. Prescott, D.M.:
The cell cycle and the control of cellular reproduction
Adv. genet. 18: 99-177, 1976.
60. Reay, P.F. and Asher, C.J.
Preparation and Purification of ⁷⁴As-labeled Arsenate -
and Arsenite for use in Biological Experiments.
Analytical Biochemistry. 78: 557-560, 1977.
61. Roth, F.:
The sequelae of Chronic Arsenic Poisoning in Moselle -
Vitners.
Germ. Med. Monthly Vol II; 172-175, June 1957.

62. Rothstein, A.:
Interactions of arsenate with the phosphate-transporting system of yeast.
J. of Gen. Physiol. 46: 1075-1085, 1963.
63. Ruddon, R.W.:
Regulation of cellular differentiation. In : Cancer Biology.
Oxford University Press.
New York - Oxford 1981, p. 69.
64. Sandoval, F., Gómez-Puyou, A., Tuena, M., Chávez and Peña, A.:
Effect of Sodium and Potassium Ions on Mitochondrial oxidative phosphorylation. Studies with arsenate. Biochem 9: 684-689, 1970.
65. Savchuk W.B., Loy, H.W. and Schiaffino, S.S.:
Effect of Arsenic on Growth of Mammalian cells in vitro
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 105: 543-547, 1960.
66. Schroeder, H.A. and Balassa, J.J.:
Abnormal Trace metals in man: arsenic.
J. Chron. Dis. 19: 85-105, 1966.
67. Scarborough, G.A.:
The mechanism of arsenate inhibition of the glucose active transport system in *Neurospora crassa*
Arch. Biochem. Biophys. 166: 245-250, 1975.

68. Sommers, S.C. and Mac Manus R.G.:
Multiple arsenical cancers of skin and internal organs.
Cancer 6: 347-359, 1953.
69. Silver, S., Keach, D.:
Energy dependent arsenate efflux: the mechanism of plasma
mediated resistance.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6114-6118, 1982.
70. Tjio, J.M. and Levan, A.:
The use of oxiquinoline in chromosome analysis.
Ann Tal. Exptl. Aula dei 2: 21-64, 1950.
71. Torrey, J.G. and Feldman, L.J.:
The organization and function of the root apex.
Amer. Scientist 65: 334-344, 1977.
72. Tseng, W.P., Chu, H.M., How, S.W., Fong, J.M., Lin, C.S.
and Yeh, S.:
Prevalence of Skin Cancer in an endemic area of Chronic
Arsenism in Taiwan.
J. Nat. Cancer. Inst. 40: 453-463, 1968.
73. Tsuda, S.:
Effects of 2,4-Dinitrophenol, Sodium arsenate and oligo
mycin on mitosis of Mouse L cells growing in monolayer
culture.
J. Exptl. Med. 3: 49-59, 1974.

74. Vant' Hof, J. and Wilson, G.B.:
Studies on the control of mitotic activity. The effect of respiratory inhibitors on mitotic cycle time in the root meristem of *Pisum sativum*.
Chromosoma (Berl) 13: 39-46, 1962.
75. Van't Hof, J. and Kovacs, C.J.:
Mitotic cycle regulation in the meristem of cultured roots: the principal control point hypothesis. In: The dynamics of meristem cell populations.
Miller M.W., Kuehnert C.C. Eds.
Advances in Experimental Medicine and Biology 18.
New York & London : Plenum Press, 1972, pp. 15-31.
76. Webster, P.L. and Van't Hof, J.:
Dependence on energy and aerobic metabolism of initiation of DNA synthesis and mitosis by G_1 and G_2 cells.
Exptl. Cell. Res. 55: 88-94, 1969.
77. Yeoman, M.M.:
The mitotic cycle in higher plants. In:
The cell cycle,
P.C.L. John ed.
Cambridge University Press, 1981. p. 161

78. Zetterberg, A., Killander, D.
Quantitative cytochemical studies on interphase growth.
II. Derivation of synthesis curves from the distribu -
tion of DNA, RNA and mass value of individual mouse fi -
broblasts *in vitro*.
Exptl. Cell. Res. 39: 22-32, 1965.
79. Zetterberg, A.:
Synthesis and accumulation of nuclear and cytoplasmic -
proteins during interphase in mouse fibroblast *in vitro*
Exptl. Cell. Res. 42: 500-511, 1966.