

El índice mitótico y la cinética de proliferación linfocitaria en el monitoreo biológico

Patricia Ostrosky Wegman*

Resumen

La exposición a xenobióticos es causa de preocupación sobre todo por sus posibles efectos sobre el ADN y la generación de cáncer. El largo tiempo de latencia entre la exposición y la manifestación clínica de sus efectos, de años y/o hasta generaciones, dificulta la identificación de estos agentes. Es por ello que el uso de biomarcadores se propone para el monitoreo biológico de individuos que por razones naturales, laborales, médicas o accidentales se consideran de alto riesgo. El presente trabajo evalúa la utilización de biomarcadores de proliferación celular en el cultivo de linfocitos de individuos expuestos a hidroarsenicismo, desechos industriales peligrosos, pacientes con neurocisticercosis en tratamiento con praziquantel y en individuos a los que se les administró metronidazol. La utilidad de estos biomarcadores se pone en evidencia con los cambios en la proliferación linfocitaria en individuos expuestos toda su vida a altas concentraciones de arsénico en los que se ha reportado una mayor frecuencia de cáncer de pies y en pacientes con neurocisticercosis en los que la frecuencia de neoplasias es elevada. No encontramos alteraciones en la cinética de los individuos expuestos a desechos industriales, sin embargo, en los individuos tratados con metronidazol observamos un incremento en la velocidad de proliferación. El significado biológico de estos resultados abre nuevos campos de investigación.

Palabras clave: Biomarcadores, índice mitótico, cinética de proliferación celular, linfocitos.

Introducción

La exposición a xenobióticos es causa de preocupación sobre todo ante el desconocimiento de sus efectos a largo plazo como son: las alteraciones genéticas y reproductivas, el cáncer y algunas enfermedades de origen inmunológico.^{1,2} En el monitoreo biológico de individuos expuestos a factores tóxicos se ha propuesto el uso de biomarcadores, que son indicadores de eventos ocurridos en el organismo o en las células y pueden ser de exposición, efecto o susceptibilidad. Los primeros miden la concentración del xenobiótico o sus

Summary

Xenobiotics exposure generates concern, mostly because the effects on DNA and cancer generation are not well known. Identification of dangerous agents are difficult due to the large latency period between exposure and clinic manifestations (from years to several generations). Biomarkers are proposed for human biomonitoring of individuals that due to natural, laboral, medical or accidental exposure are considered of "high risk". The present work evaluates the use of biomarkers of cell proliferation in lymphocyte cultures of individuals exposed to hydroarsenicism, dangerous industrial products (DIP), neurocysticercotic patients under treatment with praziquantel and individuals treated with metronidazole. The slowing of cell proliferation in arsenic exposed individuals and in neurocysticercotic patients, in which higher cancer frequencies have been reported, evidence the usefulness of these parameters. We did not find lymphocyte proliferation changes due to DIP exposure although we did find an increased proliferation due to metronidazole treatment. The biological meaning of these data opens new research interests.

Key words: Mitotic index, cell proliferation Kinetics, lymphocytes, biomarkers.

metabolitos en los líquidos biológicos. Los marcadores de efecto son cambios fisiológicos, bioquímicos o genéticos que ocurren en las células o los tejidos, mientras que los biomarcadores de susceptibilidad implican una interacción especial del xenobiótico con las características genéticas del individuo (Figura 1).² Se ha propuesto que los marcadores de efecto podrían servir como indicadores de un daño al organismo en sus fases iniciales y que pudieran llegar a ser reversibles, permitiendo así prevenir enfermedades que una vez diagnosticadas son difíciles o intratables.

Trabajo de ingreso leído el 27 de octubre de 1993.

*Académico numerario. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Los biomarcadores de efecto se proponen como indicadores tempranos de enfermedad (Figura 1).² La determinación de biomarcadores en poblaciones en riesgo, permitirá evitar que se llegue a desenlaces patológicos y ocuparán un lugar muy importante en la medicina del Siglo XXI, que se vislumbra como una medicina preventiva.

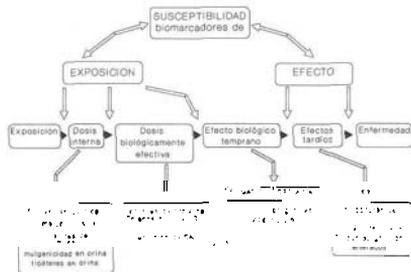


Figura 1. Biomarcadores de exposición a xenobióticos. La progresión de eventos desde exposición hasta enfermedad puede estar afectada por la susceptibilidad del individuo. Los biomarcadores correspondientes no pueden distinguirse con claridad en cada momento, debido a que existe continuidad en los cambios que representan.

Como marcadores de efecto genotóxico se han propuesto las aberraciones cromosómicas, el intercambio de cromátidas hermanas, los micronúcleos, y las mutaciones génicas.²

El índice mitótico (IM) y la cinética de proliferación celular (CPC) son parámetros que han sido utilizados ampliamente para evaluar la proliferación de linfocitos de niños,³ adultos y viejos,⁴ así como el de células normales y tumorales.³ Los toxicogenetistas los utilizan para evitar la evaluación del daño al ADN a concentraciones citotóxicas ya que las alteraciones en la proliferación pueden alterar la genotoxicidad. Estas células tienen como ventaja el que mediante muestreos no invasivos puede obtenerse un gran número de ellas, que pueden ser cultivadas mediante técnicas relativamente sencillas y de bajo costo, además de permitir la evaluación de efectos tanto *in vivo* como *in vitro*.

La adición a los cultivos de linfocitos de bromodesoxiuridina permite que al incorporarse este análogo en lugar de timina en el ADN de nueva formación, se diferencien las cromátidas hermanas y se puedan identificar las células en metafase, que se han duplicado, una, dos o más veces, haciendo posible el examen de la cinética de poblaciones celulares en división.⁷

Antecedentes

Durante la evaluación de la genotoxicidad de medicamentos

antiparasitarios, buscando las dosis que nos produjeran citotoxicidad encontramos que el Ketoconazol y la niclosamida adicionadas *in vitro* alteraban tanto el IM como la CPC.⁸ La variabilidad encontrada en cultivos longitudinales de muestras de mujeres ictericas que algunas de las respuestas podían estar influenciadas por el ciclo menstrual, por ello evaluamos los efectos de la progesterona y del estradiol en el IM y la CPC de cultivos de linfocitos estimulados a dividirse con fitoheماغlutinina (PHA) que fueron significativos *in vitro*, aunque *in vivo*, la cantidad de variables que pueden afectar estos parámetros enmascara la acción de las hormonas.⁹ Utilizando como control positivo la mitomicina, (antineoplásico de actividad reconocida) en un estudio transversal con cinco donadores y longitudinal con dos donadores demostramos que el IM y la CPC son parámetros reproducibles,¹⁰ utilizando medicamentos antineoplásicos de uso clínico, encontramos una inhibición del IM en relación directa con la dosis, la CPC fue afectada de diferentes maneras dependiendo del mecanismo de acción del medicamento evaluado.¹¹

Estos datos nos llevaron a proponer estos parámetros en el precerminiento de actividad citostática y la evaluación de varios medicamentos de nueva síntesis que la casiopeína,¹² el AS101¹³ y la T514¹⁴ en evaluación, han demostrado la funcionalidad del sistema.

Con objeto de valorar el uso de este parámetro como biomarcador en exposiciones ambientales adicionamos a los cultivos arsenito y arseniato de sodio en diferentes fases del ciclo celular y reportamos que la potencia de los efectos del As está en relación directa con la fase en la que se encuentran los linfocitos siendo la G₀ la fase más sensible.¹⁵

Estos datos nos llevaron a incorporar esos parámetros en la evaluación de biomarcadores que realizamos en individuos expuestos a factores xenobióticos, al evaluar individuos expuestos por razones ambientales (arsénico en el agua),¹⁶ laborales (desechos industriales peligrosos)¹⁷ y médicas (praziquantel y metronidazol, utilizados en el tratamiento de la neurocisticercosis y la amibiasis respectivamente). El objetivo de este trabajo es el análisis del uso de IM y la CPC como biomarcadores en el monitoreo biológico.

Material y métodos

Individuos estudiados

Todos los donadores en este estudio aceptaron participar después de ser informados acerca de los objetivos del mismo y dieron su consentimiento por escrito.

Testigos históricos

Dieciocho individuos sanos en edad adulta han sido estudiados. Todos ellos laboran en el Instituto de Investigaciones Biomédicas y su tiempo de residencia en la ciudad de México es de al menos un año.

Hidroarsenicismo, Comarca Lagunera

Individuos con bajo hidroarsenicismo: nueve individuos adultos, habitantes del poblado de Nuevo León, Coahuila, expuestos a una baja concentración de arsénico en el agua (0.06 mg/l) durante 10 días. Normalmente estos individuos utilizan agua sin arsénico y la exposición fue accidental; sus muestras de sangre fueron utilizadas como testigos para el grupo con hidroarsenicismo crónico.*

Individuos con hidroarsenicismo crónico: ocho habitantes del poblado de Santa Ana, Coahuila, adultos, expuestos a concentraciones altas de arsénico en el agua (0.39 mg/l), durante prácticamente toda su vida.

Residuos peligrosos, San Luis Potosí

Testigos del poblado El Huizache: siete donadores adultos, del sexo masculino, que habitan en el mismo pueblo que los trabajadores de la estación de transferencia de residuos peligrosos.*

Trabajadores de la estación de transferencia: 12 individuos del sexo masculino, cuyo trabajo consistía en mover y acomodar los contenedores de los desechos dentro de la estación. Fueron estudiados después de 5 a 8 meses de exposición, durante los cuales utilizaban escasa protección para evitar inhalar, tocar o incluso ingerir partículas de los desechos.

Individuos con neurocisticercosis

Tratamiento con praziquantel: seis individuos con neurocisticercosis y previa exposición reciente a analgésicos, tomografía computarizada, anestésicos, antibióticos y antiinflamatorios. Se les tomó una muestra de sangre el día antes de iniciar el tratamiento con el cestocida praziquantel.

Al 15° día de recibir 50 mg/kg/día de praziquantel diariamente, se tomó una segunda muestra de sangre.

Individuos tratados con metronidazol

Doce individuos sanos, adultos, habitantes de la ciudad de Morelia, aceptaron participar en un estudio para establecer los efectos genotóxicos del tratamiento con metronidazol. El día que iniciaban el tratamiento se les tomó una muestra de sangre. Durante 10 días recibieron las dosis terapéuticas usadas contra la amibiasis (1 500 mg/día en tres tomas). Se extrajo una muestra de sangre el día posterior al término del tratamiento.

Estudios con linfocitos de sangre periférica

*Los testigos elegidos para estos estudios viven en la misma región demográfica y sus condiciones socioeconómicas son semejantes a las de los individuos estudiados.

Toma de muestra

Se utilizó sangre heparinizada, obtenida en forma estéril, la cual fue enviada a temperatura ambiente al laboratorio para ser procesada antes de transcurrirían 24 horas. Se utilizaron 0.5 ml de sangre heparinizada para sembrar en medio de cultivo RPMI-1640, suplementado con L-glutamina y aminoácidos no esenciales; se agregó además bromodesoxiuridina (BrdU) a una concentración final de 32 uM para marcar a las células que sintetizaran DNA durante el cultivo. Se estimuló la proliferación de los linfocitos con PHA y los cultivos se incubaron a 37°C en forma continua durante 70 horas, tiempo en el que se agregó colcemid para obtener metafases. Se determinó IM, la CPC y el índice de replicación (IR). El IM se calcula como el número de células en mitosis entre 2000 células contadas. La CPC se evalúa en las primeras 100 metafases encontradas, las cuales se clasifican de acuerdo con su patrón de tinción, como M1 si se dividieron una vez, M2 si se dividieron dos veces y M3 si se dividieron tres veces o más y el IR se calcula de acuerdo a la fórmula: $No. \text{ las } + 2 (\text{No. } 2as) + 3 (\text{No. } 3as)/100$.¹⁰

Pruebas estadísticas

Se aplicó la prueba de chi-cuadrada para analizar los datos de CPC. En la comparación de los índices de replicación se utilizó la prueba de t de Student y en el análisis de los índices mitóticos se utilizó un análisis de varianza.

Resultados

El promedio de IM, CPC e IR en individuos sanos en cultivos de 72 horas, en las condiciones de nuestro laboratorio, fue de 0.03 ± 0.01 ; M1 18, M2 20, M3 62 e IR de 2.45 ± 0.1 , respectivamente. Estos datos fueron obtenidos a lo largo de 3 años y son considerados como testigos históricos (Cuadro 1).

De los testigos concomitantes de hidroarsenicismo, de desechos industriales peligrosos y de los participantes de Morelia, el IM sólo mostró un aumento significativo en los individuos del estudio de hidroarsenicismo, comparado con el testigo histórico ($p < 0.05$), (Cuadro 1). Cabe señalar que este fue el grupo con individuos de mayor edad, siendo 44 por ciento de ellos mayores de 40 años.

Entre los individuos expuestos a factores xenobióticos sólo se cuenta con los datos de IM del grupo expuesto a altas dosis de arsénico y de los tratados con metronidazol. El primero mostró incrementos significativos con referencia al testigo concomitante, mientras que en el segundo las diferencias sólo fueron significativas con respecto al testigo histórico.

En los individuos expuestos crónicamente a altas dosis de arsénico en el agua de ingesta se encontró un mayor número de células que sólo llevaron a cabo una sola mitosis (M1) y muy pocas células que llegaron a una tercera división (M3),

mientras que las personas expuestas a bajas dosis y los controles muestran una mayor proporción de células en tercera o sucesivas divisiones. Entre los tamberos del confinamiento industrial y los individuos testigo en este estudio la CPC fue similar y no se encontraron diferencias significativas (Cuadro 2).

Los pacientes con neurocisticercosis mostraron un comportamiento similar al de los individuos con hidroarsenicismo con una CPC retardada significativamente ($p < 0.05$) del testigo histórico y de los mismo pacientes después del tratamiento con praziquantel (Cuadro 2).

Cuadro 1. Índice mitótico y cinética de proliferación en linfocitos de individuos testigo

Individuos	N	Rango de Edad	I.M.+	C.P.C. (%)			I.R.+
				M1	M2	M3	
Testigo histórico (D.F)	18	21-39	.031 ± .01	18	20	62	2.45 ± 0.1
Hidroarsenicismo Subagudo baja exposición testigo Comarca Lagunera	9	31-58	.061 ± .01*	14	21	65	2.43 ± 0.12
Desechos industriales peligrosos S.L.P.	7	20-40		19	24	57	2.48 ± 0.32
Testigo Morelia	12	20-25	.041 ± .005	12	36	52	2.41 ± 0.17

I.M. = Índice mitótico
C.P.C. = Cinética de proliferación celular
I.R. = Índice de replicación
+ = Valores promedio ± error estandard
P < 0.05 con respecto al testigo histórico

Cuadro 2. Índice mitótico y cinética de proliferación en individuos expuestos a factores xenobióticos

Individuos	N	Rango de Edad	I.M.+	C.P.C. (%)			I.R.+
				M1	M2	M3	
Hidroarsenicismo crónico alta exposición Comarca Lagunera 1.85±0.12*,**	8	21-62	.038 ± .02**	30	26		44**,**
Desechos industriales Peligrosos S.L.P.	12	20-40		17	18	65	2.38±0.28
Neurocisticercosis Hospital La Raza y Centro Médico Siglo XXI D.F.	8	16-65		36	24	40*	2.035±0.43*
Neurocisticercosis Tratamiento Praziquantel Hospital La Raza y Centro Médico Siglo XXI D.F.	8	16-65		17	24	59**	2.41±0.17**
Tratamiento Metronidazol Morelia	12	20-25	.053±.003*	6	26	68**,**	2.61±0.9**,**

I.M. = Índice mitótico
C.P.C. = Cinética de proliferación celular
I.R. = Índice de replicación
+ = Valores promedio ± error estandard
* = P < 0.05 con respecto al testigo histórico
** = P < 0.05 con respecto al testigo concomitante

En los individuos tratados con metronidazol la CPC aumentó, lo que implica un ciclo más rápido, mostrando diferencias significativas con respecto a los valores encontrados en los mismos individuos antes del tratamiento. El valor después del tratamiento también es significativamente diferente al testigo histórico ($p < 0.05$) (Cuadro 2).

Discusión

Los parámetros evaluados en individuos testigos coinciden con los datos obtenidos por otros grupos.¹⁸ Cabe mencionar que existe variabilidad individual; con respecto al IM la dispersión de los datos establece que dentro de un grupo homogéneo de individuos sanos esta variabilidad no es significativa. No sucede lo mismo con respecto a la cinética de proliferación celular en la que sí se observaron diferencias individuales que se refleja en la mayor dispersión encontrada en el IR.

Las diferencias significativas observadas en el IM de los individuos con baja exposición a arsénico con respecto a los otros grupos testigo evaluados, podría deberse a diferencias en la edad, aunque una explicación más firme es que las dosis pequeñas de arsénico aumentan la respuesta mitogénica a la PHA, de hecho se ha reportado que dosis pequeñas de mutágenos, específicamente la radiación, inducen respuestas homeostáticas, conocidas como *hormesis*,¹⁹ incluso se ha reportado que dosis pequeñas de As^{20} y de Cd^{21} estimulan la proliferación celular. En estudios *in vitro* con citostáticos de amplio uso en la clínica, hemos encontrado que dosis pequeñas producen estimulación de la proliferación linfocitaria.²²

La homogeneidad del ritmo de proliferación de los linfocitos en los diferentes grupos testigo estudiados, demostrada en que en todos ellos el IR tiene el mismo valor.

El hecho de que haya un incremento no significativo en el IM de los sujetos después del tratamiento con Metronidazol, pero sí significativo con respecto al control histórico, indica que este medicamento pudiera tener un efecto en la respuesta mitogénica de los linfocitos, que en tres de los individuos de este estudio se incrementó hasta tres veces con respecto a su propio valor antes del tratamiento. Estas variaciones individuales no se reflejan en el promedio del grupo, lo que habla de la gran importancia que tienen los datos de cada donador antes y después de una exposición, ya que podrían evidenciar la susceptibilidad individual; la utilidad del IM como biomarcador de susceptibilidad requiere, por lo tanto, ser investigada.

Las diferencias significativas en la CPC, y en el IR correspondiente, de los individuos con hidroarsenicismo crónico con respecto a sus testigos concomitantes y al testigo histórico, señalan que hay un retraso en la capacidad proliferativa del linfocito, lo que podría significar que el arsénico fue capaz de producir una disfunción en la respuesta inmunológica celular. Esta acción del arsénico se demostró en tratamientos *in vitro* a linfocitos de donadores sanos, a dosis similares a las encontradas en los individuos expuestos,

aún más, se encontró que la fase del ciclo celular más sensible es G_0 ,¹⁵ que es la fase en la que normalmente se encuentran los linfocitos circulantes.

Es interesante señalar que Walder y cols²³ reportaron que en pacientes que habían sido inmunosuprimidos químicamente para recibir trasplantes, se desarrollaron cánceres de piel similares a los que presentan los individuos en la Comarca Lagunera.²⁴ Nuestros hallazgos de retraso en la CPC en individuos con hiperqueratosis y lesiones premalignas justifican su uso como biomarcador de efecto temprano (Figura 1).

El hecho de que los pacientes con neurocisticercosis hayan mostrado un ciclo más lento antes de recibir el praziquantel podría deberse a alguno de los tratamientos previos (ver material y métodos), sin embargo el parásito *per se* podría ser causante de esta alteración. En apoyo de esto se puede mencionar el que en cerdos infectados se encontró una frecuencia mayor de linfocitos poliploides y los autores de este trabajo postularon que este daño genético podría haber sido causado por el *cisticerco*.²⁵ Después del tratamiento con praziquantel los valores de CPC e IR en los pacientes con cisticercosis son similares a los valores de los testigos históricos. Este hecho podría ser un efecto de la acción del praziquantel sobre los linfocitos o de la eliminación del parásito y sus secreciones. Los datos similares con respecto al daño genotóxico provocado por parásitos, se reportaron recientemente en pacientes infectados con esquistosomiasis.²⁶ La existencia de genotoxinas generadas por parásitos ha sido propuesta anteriormente.²⁷ Recientemente hemos demostrado que en cerdos infectados con huevecillos de *Taenia solium* y que desarrollaron cisticercosis, la proliferación *in vitro* de sus linfocitos estimulados con PHA se modifica significativamente,²⁸ durante las primeras seis semanas de infección, la CPC se aceleró lo cual puede estar relacionado con la respuesta inmunológica que el hospedero está desarrollando contra la infección con huevecillos de *Taenia solium*. Sin embargo, a partir de la séptima semana de infección, la proliferación linfocitaria *in vitro* comenzó a ser más lenta. En los cerdos que desarrollaron la cisticercosis, la CPC después de 11 semanas fue similar a la observada antes de la infección con huevecillos. Resulta interesante mencionar que la frecuencia de intercambio en los dos animales cisticercosos aumentó significativamente a medida que transcurrió el tiempo de infección. Molinari y cols²⁹ aislaron un factor secretado por el *cisticerco* que *in vitro* es capaz de suprimir la proliferación de linfocitos humanos estimulados con PHA. Nosotros observamos que este factor es capaz de transformar morfológicamente células cultivadas de embriones de criceto sirio.³⁰ Esto sugiere que la cisticercosis puede estar relacionada con la inducción de cáncer. Aunque no hay estudios epidemiológicos completos, las evidencias descritas en los trabajos de Ridaura³¹ y Villagrán y Olvera³² muestran que alrededor del 22 por ciento de los casos de cisticercosis detectados en material de autopsia desarrollaron también algún tipo de neoplasia.

A diferencia del retardo en la CPC encontrado en el caso de hidroarsenicismo y en la neurocisticercosis, el Metronidazol produjo un incremento significativo en la CPC, lo que implica un efecto inmunomodulador de este medicamento que tendría relevancia en la clínica. Esto es apoyado por el hecho de que el Levamisol (que al igual que el Metronidazol es un imidazol), potencia la inmunidad mediada por células. T.³³

En conclusión, no obstante que la utilización de un solo biomarcador no es suficiente y que debe usarse en forma complementaria a otros biomarcadores, nuestros hallazgos ponen en evidencia que el IM y la CPC pueden ser utilizados como biomarcadores tempranos en la exposición a xenobióticos. El hecho de que se haya encontrado una disminución en la proliferación linfocitaria, tanto en los individuos con hidroarsenicismo como en los pacientes con neurocisticercosis, y que en ambos casos exista una correlación con cáncer, indica la relevancia que este biomarcador puede tener en la clínica y en la prevención de enfermedades, lo que abre nuevos campos de investigación.

Agradecimientos

La investigación hoy en día no es labor individual, los resultados presentados son producto de la colaboración interdisciplinaria con varios grupos nacionales y principalmente del trabajo realizados en los laboratorios de Toxicogenética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Referencias

1. Trosko JE y Chang CC. An integrative Hypothesis linking cancer, diabetes and atherosclerosis: the role of mutations and epigenetic changes. *Medical Hypotheses* 1980;6:455.
2. National Research Council. Biological markers in reproductive toxicology. National Academy Press. Washington, D.C., 1989:395.
3. Palma, V., Tudón H., Buentello L., Nava S., Ostrosky-Wegman P. and Salamanca F. Methods for the Analysis of Cellular Kinetics in PHA Stimulated Blood Lymphocytes Using BrdU Incorporation. A Comparative Study. *Mut. Res.* 1993. En prensa.
4. Tice RR, Thorne P and Schneider EL. Bisact analysis of the phytohaemagglutinin-induced proliferation of human peripheral lymphocytes. *Cell Tiss. Kinet.* 1979;12:1.
5. Schneider EL, Nakanishi Y, Lewis J and Sternberg H. Simultaneous examination of sister chromatid exchanges and cell replication Kinetics in tumor and normal cells in vivo. *Cancer Res.* 1981; 41:4973.
6. Scott D, Galloway S, Marshall M. y ool. Genotoxicity under extreme culture conditions. *Mutation Res.* 1991;257:147.
7. Tice RR, Schneider EL and Rary JM. The utilization of bromodeoxyuridine incorporation into DNA for the analysis of cellular Kinetics. *Exp. Cell Res.* 196;102:232.
8. Ostrosky-Wegman P, García G, Montero R, Pérez Romero E y Cortinas de Nava C. Susceptibility of Genotoxic Effects of Niclosamide in Human Peripheral Lymphocytes Expose in vitro and in vivo. *Mutation Res.* 1986;173:81
9. Herrera LA, Montero R, León-Cázarez JM, Rojas E, Gonsebatt ME and Ostrosky-Wegman P. Effects of Progesterone and Estradiol on the Proliferation of Phytohemagglutinin-stimulated Human Lymphocytes. *Mutation Res.* 1992;270:211.
10. Rojas E, Montero R, Herrera LA, Sordo M, Gonsebatt ME, Rodríguez R and Ostrosky-Wegman P. Are Mitotic Index and Lymphocyte Proliferation Kinetics Reproducible Endpoints in Genetic Toxicology Testing. *Mutation Res.* 1992;282:283

11. Rojas E, Sordo M, Bizarro A y cols. Lymphocyte proliferation as a cytostatic screening system. *Env. Mol. Mut.* 1991;17:62.
12. Ostrosky P, Montero R, Hernández N y cols. *Env. Mut.* 1988;11:80.
13. Montero R, Gonsebatt ME, Gerson R, Rojas E, Herrera L y Ostrosky-Wegman P. As-101: A modulator of in vitro T-cells proliferation. *Anti-Cancer Drugs* 1993. En prensa.
14. Garza-Ocañas L, Gin CH, Acosta D, Torres-Alanis O and Piñeyro-López A. Toxicity assessment of toxins T-514 and T-544 of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*) in primary skin and liver cell cultures. *Toxicology* 1992;73:191.
15. Ostrosky ME, Vega L, Herrera LA, y cols. Inorganic Arsenic Effects on Human Lymphocyte Stimulation and Proliferation. *Mutation Res.* 1992;283:91.
16. Ostrosky-Wegman P, Gonsebatt ME, Montero R, y cols. Lymphocyte Proliferation Kinetics and Genotoxic Findings in a Pilot on Individuals Chronically Exposed to Arsenic in Mexico. *Mutation Res.* 1991;250:477.
17. Diaz-Barriga F, Santos M, Yañez L, y cols. Biological monitoring of workers at a recently opened hazardous waste disposal site. *J. of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* 1993; en prensa.
18. Dewdney RS, Lovel DP, Jenkinson PC, and Anderson D. Variation in sister-chromatid exchanged among 106 members of the general U.K. population. *Mutation Res.* 1986;171:43.
19. Hickey RJ, Bowers EJ and Clelland RC. Radiation hormesis, public health, and public policy: a commentary. *Health Physices* 1983;44:207.
20. Zglinicki VT, Edwall C, Ostlund E y cols. Very low cadmium concentrations stimulate DNA synthesis and cell growth. *J. of Cell Science* 1992;103:1073.
21. McCabe M, Maguire D and Nowak M. The effects of arsenic compounds on human and bovine lymphocyte mitogenesis in vitro. *Environmental Res.* 1983; 31:323.
22. Ostrosky P, Montero R and López L. Paradoxical effects of low doses on cell proliferatio of lymphocytes. *Env. and Mol. Mut.* 1990;15:46.
23. Walder BK, Robertson MR and Jeremy J. Skin cancer and immunosuppression. *Lancet* 1971;ii:1282.
24. Cebrán ME, Albores A, Aguilar M and Blakely E. Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico. *Hum. Toxicol.* 1983;2:121.
25. Flisser A, González D, Plancaort A y cols. Praziquantel treatment of brain and muscle porcine *Taenia solium* cysticercosis 2 Immunological and cytogenetic studies. *Parasitol. Res.* 1990;76:640.
26. Anwar AW and Rosin MP. Reduction in chromosomal damage in schistosomiasis patients after treatment with praziquantel. *Mutation Res.* 1993;298:179.
27. Gentile JM. Schistosome related cancers: a possible role for genotoxins. *Env. Mut.* 1985;7:775.
28. Ostrosky-Wegman P, Santiago P, Rojas E y cols. Alterations in the frequency of SCE and cell proliferation Kinetics by cysticercosis. *Env. and Mol. Mut.* 1993;21. en prensa.
29. Molinari JL, Tato P, Reynoso OA and Cázarez JM. Depressive effect of *Taenia solium* cysticercus factor on cultured human lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin. *Ann. of Tropical Med. and Parasitol.* 1990;84:205.
30. Herrera LA, Ostrosky-Wegman P, Schiffman D y cols. Morphological transformation (MT) of syrian hamster embryo (SHE) cells by a cysticercus secreted factor. *Env. and Mol. Mut.* 1993;21. en prensa.
31. Ridaura C. Host response in childhood neurocysticercosis. Some pathological aspects. *Child's Nerv. Syst.* 1987;3:206.
32. Villagrán UJ y Olvera JE. La cisticercosis en el material de autopsia en el Hospital General de México. En: Flisser A y Malagón F (eds.) *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México.* Limusa, 1989:97.
33. Renoux G, Renoux M, Teller N, McMahon S and Guillaumin JM. Potentiation fo T-cell mediated immunity by Levamisol. *Clin. exp. Immunol.* 1976;25:288.