

1418

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA



INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS EN  
CROMOSOMAS DE LINFOSITOS HUMANOS INDU-  
CIDOS IN VITRO POR VARIOS ALCOHOLES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

MARIO AGUSTIN ALTAMIRANO LOZANO

MEXICO, D. F.

1981



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## C O N T E N I D O

	Pags.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	14
RESULTADOS	17
DISCUSION Y CONCLUSIONES	20
REFERENCIAS	30
TABLAS Y FIGURAS	40

INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS EN CROMOSOMAS DE LINFOCITOS  
HUMANOS INDUCIDOS IN VITRO POR VARIOS ALCOHOLES

RESUMEN

Se probaron los alcoholes: metílico, etílico, propílico e isopropílico en la inducción de intercambio de cromátidas hermanas (ICH), utilizando el cultivo de linfocitos humanos en presencia de 5-BrdU durante dos ciclos de replicación.

Los resultados obtenidos demuestran que todos estos alcoholes provocaron ICH observándose que al aumentar la concentración se incrementa la frecuencia de intercambios. Al comparar la efectividad de cada uno de ellos se encontró que; metanol < etanol < isopropanol < propanol.

Estos alcoholes también provocaron endorreduplicación y alargamiento de la duración del ciclo mitótico.

## INTRODUCCION

El problema de la farmacodependencia ha tenido repercusiones recientes, ya que a partir de 1940 empezaron a incrementar los casos de abuso y dependencia de drogas, en ocasiones propiciados por tratamientos médicos (CEMEF, 1976).

Actualmente, el gran desarrollo industrial ha dado lugar a un sinnúmero de productos químicos que son usados con fines de farmacodependencia, de los cuales, los más comunes son los solventes, pues, además de ser empleados como inhalantes, son baratos y fáciles de adquirir.

Los solventes son compuestos líquidos empleados en la industria para dispersar o disolver sustancias orgánicas (Gutiérrez-Flores, 1975) y en la elaboración de gran número de productos de usos muy específicos como los adhesivos, en el que los componentes importantes son la acetona y el tolueno, los colorantes, con el metanol y el etanol y removedores de pinturas y esmaltes con la acetona y el amilacetato como componentes (Oliver, 1977).

Debido a la gran demanda, cada vez se producen mas solventes con fórmulas complejas (Gutiérrez-Flores, 1975).

Los solventes, por sus características funcionales han sido clasificados en 4 grupos: solventes activos, co-solventes, solventes latentes y diluyentes.

Alcoholes como el metanol, etanol y propanol, son componentes de los co-solventes, los cuales presentan una actividad semejante a la de los solventes latentes, ya que estos en combinación con los activos aumentan la capacidad de los últimos, pudiendo de esta manera actuar como solventes de resinas, lo que no sucede cuando actúan por separado (Gutiérrez-Flores, 1975).

Los solventes industriales, a los cuales pertenece el tiner, son el resultado de mezclas balanceadas de solventes activos, latentes y diluyentes, los cuales son muy potentes y de bajo costo (Gutiérrez-Flores, 1975).

Una de las características importantes para el uso de los solventes que representa una base para su clasificación es la velocidad de evaporación, rápida, mediana y lenta; los dos primeros tipos son los más usados en la industria ya que son los más poderosos y los menos costosos (Gutiérrez-Flores, 1975).

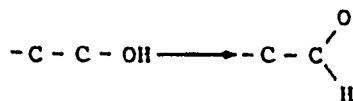
Dentro de los componentes de los solventes de evaporación lenta están el butanol, los carbitoles y los celosol-  
ves; en la de mediana, el metanol, etanol, propanol e isopropanol, los cuales son compuestos polares usados en la industria de los recubrimientos orgánicos y en los de rápida se pueden mencionar al acetato de etilo, la acetona y al benceno (Gutiérrez-Flores, 1975; Oliver, 1977).

Los alcoholes son derivados hidroxilados de hidrocarburos al substituir los átomos de hidrógeno por los grupos oxhidrilo (OH).

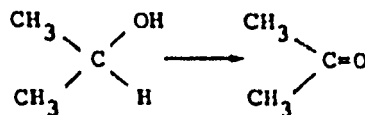
Dentro de los alcoholes, los alifáticos monovalentes presentan un solo grupo oxhidrilo, siendo estos los más importantes en la industria. Dependiendo de la posición del grupo OH los alcoholes monovalentes pueden ser primarios, secundarios y terciarios.

El metanol, etanol y el propanol son alcoholes primarios (Figs. 1a,b,c), mientras que el isopropanol corresponde a los alcoholes secundarios (Fig. 1d); los primeros son los que con mayor facilidad se deshidratan, además los tres tipos de alcoholes se diferencian por sus productos de oxidación.

Los alcoholes primarios se oxidan a aldehídos.

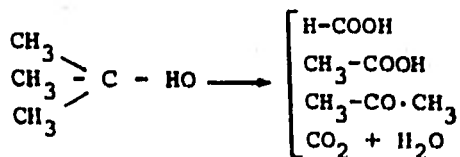


Los alcoholes secundarios se oxidan a cetonas.





Los alcoholes terciarios, aunque son más estables frente a los oxidantes, dan como resultado una mezcla de cetonas y ácidos.



Los estudios bioquímicos y toxicológicos de los solventes orgánicos y de sus componentes, han mostrado que estos son altamente tóxicos (Belsasso, 1975; Guzmán-Flores, 1975) produciendo efectos principalmente, sobre el sistema nervioso central de las personas que los inhalan voluntaria o involuntariamente (Jones et al., 1973; Belsasso, 1975; Guzmán-Flores, 1975; Mulvihill y Yeager, 1976).

De igual manera que muchos agentes químicos, los alcoholes han mostrado una fuerte actividad sobre la fisiología y bioquímica celulares originando una serie de alteraciones.

Ploc y Starka (1978) describieron los posibles sitios de oxidación de los alcoholes en las células de ratas, los primarios fueron oxidados preferentemente en el citoplasma celular, mientras que a los secundarios les sucedió en las mitocondrias.

Entre las alteraciones bioquímicas, alcoholes como metanol, etanol e isopropanol, han mostrado ser inhibidores

in vitro de las reacciones de oxidación de esteroides mediadas por isocorticoesteroides y determinadas por la enzima alcohol deshidrogenasa (AD) (Martín y Monder, 1978).

Salomon y Elad (1974) observaron que el alcohol isopropílico aumenta la efectividad de la luz ultravioleta para producir la alquilación del ADN in vitro, actuando preferencialmente sobre las purinas para formar derivados adenínicos y guanínicos.

Vázquez y Ballesta (1979) determinaron en los ribosomas de E. coli, que los radicales OH de los alcoholes afectan las interacciones hidrofóbicas de la estructura del ARN ribosómico así como la misma estructura de los ribosomas y observaron que el metanol es el que afecta más directamente estas estructuras impidiendo así la síntesis de proteínas.

La combinación de metanol o isopropanol con el  $CCl_4$  aumentó la toxicidad de este último cuando se probó en ratones, siendo más marcada la acción del isopropanol, el cual además produjo hiperbilirubinemia y mayor actividad de las enzimas hepáticas (Traiger y Plaa, 1971).

El metanol por otro lado, ha mostrado ser un radioprotector efectivo contra neutrones rápidos en células de mamíferos (Singh et al., 1976).

La eliminación de alcohol del organismo se hace por medio de varias enzimas como la alcohol deshidrogenasa y

la catalasa hepática para el etanol y solo la catalasa hepática para el metanol, interviniendo además en ambos casos el sistema microsómico hepático (Bassili y Mannering, 1968; Goodman y Thephly, 1968; Jones et al., 1973; Mulvihill y Yeager, 1976; Shields et al., 1976; Ploc y Starka, 1978).

La intoxicación con alcohol principalmente puede seguir dos vías: por ingestión y por inhalación.

La distribución del alcohol etílico, que es el de uso más común y menos restringido, se lleva a cabo en el estómago e intestino repartiéndose rápidamente en todo el organismo, mientras que el metanol se incorpora en los tejidos de acuerdo con su contenido de agua (Haggard y Greenberg, 1939).

Los estudios realizados en personas intoxicadas con solventes volátiles, como los alcoholes, han mostrado que éstos pueden tener efectos a corto y largo plazo: el metanol produce desde irritación de las mucosas, cefalea, neuritis y ceguera, hasta convulsiones, coma y muerte (Barroso-Moguel, 1975), mientras que el etanol llega a provocar dificultades respiratorias, vasodilatación, estupor, taquicardia y coma (CEMEF, 1976).

El alcohol propílico o propanol es obtenido de la destilación de granos para la fabricación de bebidas presentando efectos similares al etanol.

Por otro lado, en casos de niños de madres alcohóli

cas se ha demostrado que el etanol produce en éstos, lesiones a nivel del sistema nervioso, así como defectos cardiovasculares y de crecimiento, mostrando anormalidades en la formación de extremidades, notándose de esta manera también una marcada acción teratogénica del alcohol (Jones et al., 1973; Mulvihill y Yeager, 1976).

Se ha encontrado una relación entre el alcoholismo y el cáncer en forma tal que a mayor ingestión de alcohol se incrementa el riesgo de adquirir carcinomas epidérmicos, faríngeos, laríngeos o de esófago, así como de presentar linfopenia (Lundy et al., 1975).

Los estudios hechos en Aspergillus nidulans mostraron al etanol como inductor de alteraciones cromosómicas (Harsanyi et al., 1977) y en los realizados en ratones se observó que produjo la aparición de genes mutantes letales dominantes (Badr y Badr, 1973). También se ha descrito la inducción de alteraciones cromosómicas por etanol en células meristemáticas de la raíz de Vicia faba (Michaelis et al., 1959, 1962; Michaelis y Rieger, 1968; Rosas, 1980) en Allium cepa (Sax y Sax, 1966) y en linfocitos humanos en cultivo (Bregman, 1971). El metanol mostró ser inductor de alteraciones cromosómicas en células de Vicia faba (López, 1980).

Se ha observado que los vapores de etanol producen anormalidades morfológicas y abortición de los granos de polen de Aneilema pulchella (Balderas, 1977) y que los del metanol

produjeron mutaciones somáticas en Tradescantia (Hernández, 1977).

Algunas alteraciones cromosómicas que se han podido determinar en personas alcohólicas son monosomías, polisomías y cambios estructurales en la morfología de los cromosomas; estas alteraciones son estables en los individuos hasta por un período de 5 años (Torok, 1972).

Diversos sistemas biológicos de prueba están siendo desarrollados para ser usados como sensores del daño citogenético inducido en las células por mutágenos y carcinógenos químicos con el fin de obtener una visión más completa del daño producido en el hombre (Environmental Mutagen Society, 1975). Estos sistemas de prueba deben ser lo suficientemente sensibles para evaluar el daño provocado por los agentes químicos en concentraciones menores a las máximas permisibles en el medio ambiente.

El cultivo de linfocitos reúne una serie de ventajas que lo hacen un sistema adecuado para estos estudios, ya que se obtiene fácilmente una numerosa población celular ( $1-3 \times 10^3$  linfocitos por mililitro de sangre extraída) (Evans y O'Riordan, 1975), además por medio de mitógenos como la fitohemaglutinina, inducirlos a la división in vitro (Jasinska et al., 1970; Skoog et al., 1974; Evans y O'Riordan, 1975; Crossen y Morgan, 1977a), así como sincronizar su división

por varios métodos (Jasinska et al., 1970; Crossen y Morgan, 1977b). La obtención de las preparaciones de cromosomas en metafase de linfocitos, se logra por la adición de venenos mitóticos como la colchicina.

El cariotipo de las células humanas (Fig. 2) está compuesto de 22 pares de cromosomas somáticos o autosomas, agrupados en 7 grupos (del A al G) y por un par de cromosomas sexuales, XX para la mujer y XY para el hombre.

En la etapa de metafase, los cromosomas están muy contraídos y presentan 2 cromátidas siendo este estado de la mitosis uno de los más adecuados para el estudio del daño producido al material genético por los agentes químicos (Evans y O'Riordan, 1975; Crossen y Morgan, 1977a y b).

Sin embargo, ha sido necesario mejorar los sistemas biológicos de prueba para los análisis citogenéticos, con el objeto de obtener una mayor y mas clara respuesta, tal es el caso de las técnicas de tinción diferencial, las cuales ayudan a detectar el daño que normalmente no se notaría con la tinción convencional, como es el caso de las inversiones, que pueden ser observadas con el sistema de bandeo (Kajii et al., 1972; Shiraishi y Yosida, 1972; Meisner et al., 1973; Chen, 1974) o por medio de los intercambios de cromátidas hermanas (Dutrillaux y Fosso, 1974; Kato, 1974; Korenberg y Freedlender, 1974; Perry y Wolff, 1974; Evans y Jankins, 1975;

Goto et al., 1975).

La tinción diferencial de las cromátidas hermanas (ICH) en los cromosomas de linfocitos humanos es considerado como un indicador muy sensible del daño producido a las cadenas del ADN por los agentes químicos in vitro (Latt, 1974; Perry y Evans, 1975; Takehisa y Wolff, 1977).

Taylor (1958) describió por primera vez el fenómeno de intercambio de cromátidas hermanas en los cromosomas de vegetales marcados con timidina tritiada y observados por autorradiografía.

La detección y el análisis de los intercambios en los cromosomas ha sido facilitado por el uso de técnicas que incluyen análogos de bases como 5-bromodesoxiuridina (5-BrdU), colorantes fluorocromados como el Hoechst-33258 (Huang, 1967; Zakharov y Egolina, 1972) y los colorantes como el Giemsa (Perry y Wolff, 1974), los cuales permiten detectar la incorporación de 5-BrdU en el ADN.

La técnica está basada en la incorporación de 5-BrdU en el ADN por 2 ciclos de generación celular (Fig.3) y la interacción de éste con el ADN.

Latt (1973) encontró que el ADN que contenía 5-BrdU al ser teñido con el Hoechst-33258 sufría una decoloración parcial, ya que la reacción del 5-BrdU tiende a decrecer la fluorescencia del Hoechst-33258, siendo además dependiente

del 5-BrdU incorporado, de tal manera que el ADN que no presenta ninguna cadena substituída fluoresce eficientemente, el que presenta una cadena substituída lo hace menos intensamente y cuando es substituída la doble cadena casi no fluorescen.

La desventaja que presenta este método es la pérdida de la coloración y la fluorescencia con el transcurso del tiempo, sin embargo con la adición del colorante Giemsa la desventaja es superada (Perry y Wolff, 1974).

En el caso de los intercambios de cromátidas hermanas la acción de los agentes sobre los cromosomas implica rompimientos simétricos e intercambios de cadenas de ADN entre cromátidas hermanas o de la misma cromátida (Fig.4) sin llegar a alterarse la morfología de los cromosomas (Perry y Evans, 1975), demostrándose así que la mayoría de los agentes mutagénicos y carcinogénicos pueden producir intercambios en los cromosomas (Sugiyama, 1971; Latt, 1974; Kihlman, 1975; Perry y Evans, 1975).

Perry y Evans (1975) mostraron que la mitomicina-C es un agente químico eficaz en la producción de intercambios, ya que es muy estable en exposiciones crónicas.

Por otro lado, Takehisa y Wolff (1977) usando el sistema de microsomas hepáticos observaron que la activación de ciertos compuestos como la aflatoxina B y el benzo(a)pireno aumentó la frecuencia normal de intercambios.



Lambert y colaboradores (1975) determinaron que el 5-BrdU por si solo puede aumentar la frecuencia de intercambios al incrementar su concentración, mientras que Kato (1974) demostró que estos intercambios se presentan espontáneamente .

Para el estudio de los efectos de los alcoholes sobre los cromosomas se eligió el sistema de cultivo de linfocitos humanos, descrito originalmente por Moorhead et al., (1960), el cual ha mostrado ser un buen indicador del efecto mutagénico de algunos agentes químicos sobre el material genético, tanto in vivo como in vitro (Evans y O'Riordan, 1975; Zhurkov y Yakovenko, 1976; Crossen y Morgan, 1977b), así como el sistema de intercambio de cromátidas hermanas que es inducido con concentraciones de agentes químicos 10 veces menores que las que normalmente producen aberraciones cromosómicas (Wolff, 1977), además de consistir en un sistema biológico que puede relacionarse mas directamente con el daño producido al hombre.

En este trabajo, se pretende establecer la inducción de intercambios de cromátidas hermanas en los cromosomas de linfocitos humanos in vitro por los alcoholes metílico, etílico, propílico e isopropílico en varias concentraciones.

## MATERIAL Y METODOS

Se realizaron cultivos de sangre periférica humana de sujetos sanos de la siguiente manera: con una jeringa heparinizada (Heparina Abott, 1000 U.) se extrajeron 5 ml de sangre por punción venosa y se colocaron 8 gotas de sangre en un frasco de cultivo conteniendo 5 ml de medio McCoy's 5A (Microlab), mas 0.20 ml de fitohemaglutinina M, poniendose a 37°C por 72 horas.

Al transcurrir 24 horas de iniciado el cultivo se agregaron 20 µg/ml de cultivo de 5-Bromodesoxiuridina (Gibco), dejándose así 48 horas.

A las 70 horas se adicionó una solución de colchicina para obtener una concentración final de 4 µg/ml de cultivo y se dejó que los cultivos completaran 72 horas. Posteriormente se trasladaron a tubos de centrifuga y fueron centrifugados a 1000 RPM durante 5 minutos, al término de estos se desechó el sobrenadante con una pipeta Pasteur y el botón se resuspendió en una solución citrato-salina (0.075 M de KCl) y se pusieron en baño María por 20 minutos a 37°C. Transcurrido este lapso se centrifugaron por 5 minutos a 1000 RPM y se retiró el sobrenadante resuspendiendo los botones en 5 ml de fijador metanol-acético (3:1) y se dejaron reposar 15 minutos. Después se repitió el proceso de centrifugación y fijación dejando reposar el botón en el fijador 10 minutos.

Inmediatamente después fueron centrifugados nuevamente y re-suspendidos en 20 gotas de fijador y a partir de esta suspensión se realizaron las preparaciones por goteo, dejándose secar al aire.

Las preparaciones obtenidas fueron teñidas por 20 minutos en la obscuridad con una solución de Hoechst-33258 (5 µg/ml), después fueron lavadas con agua destilada y montadas en agua destilada, irradiándolas con luz ultravioleta por 24 horas, nuevamente lavadas y teñidas con Giemsa (1:50) en agua corriente por 10 minutos.

Siguiendo el método anterior los tratamientos se llevaron a cabo de la siguiente manera: simultáneamente al agregarse 5-BrdU a los cultivos se les añadieron las concentraciones correspondientes a los alcoholes metílico, etílico, propílico e isopropílico (Merck) (Tablas I - IV).

Las concentraciones empleadas fueron determinadas mediante experimentos preliminares. El tiempo de tratamiento en todos los casos fue de 48 horas.

Las soluciones de los diferentes alcoholes fueron preparadas con agua destilada y se esterilizaron por filtración usando membranas "Millipore" de 45µ. En todos los casos se tuvo el testigo correspondiente al cual se le agregó solamente agua destilada estéril.

Para cada concentración de los diversos alcoholes

se analizaron 100 metafases en segunda división (Fig.5) contabilizando los intercambios tanto por metafase como por cromosoma; los intercambios terminales se registraron como un intercambio (Fig.6a) y los intersticiales como dos (Fig.6b).

El análisis de los datos se realizó aplicando la prueba de "t" de Student, cuya fórmula es:

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{\sqrt{\frac{S_1^2}{N_1} + \frac{S_2^2}{N_2}}}$$

Donde:

$\bar{X}_1$  = Media poblacional de los tratamientos

$\bar{X}_2$  = Media poblacional de los testigos

$S_1^2$  = Variancia de los tratamientos

$S_2^2$  = Variancia de los testigos

$N_1$  = Total de metafases analizadas de los tratamientos

$N_2$  = Total de metafases analizadas de los testigos

También se analizaron 500 metafases por concentración para el registro de células endorreduplicadas (Fig.7).

## RESULTADOS

Las frecuencias de intercambios de cromátidas hermanas inducidas por las distintas concentraciones de alcoholes se muestran en las tablas I a IV.

Los resultados de los intercambios producidos por el metanol (Tabla I) muestran que este alcohol produjo el menor daño, ya que las frecuencias ocasionadas con los otros alcoholes fueron mayores. Las frecuencias obtenidas con el metanol muestran menor significatividad que las observadas con los otros tres alcoholes con respecto al testigo (Tablas I a IV).

En la tabla II se muestran las frecuencias de ICH inducidas por el etanol, notándose que en la concentración de  $1 \times 10^{-4}$  M la significatividad fue mas baja que en las otras dos concentraciones.

El alcohol propílico (Tabla III) fue el que produjo las máximas frecuencias de intercambios por concentración con respecto a los otros tratamientos y en todos los casos los resultados fueron significativos con  $P < 0.001$ .

En los resultados obtenidos con el alcohol isopropílico (Tabla IV) las frecuencias de intercambios fueron mayores que las del metanol y etanol, presentando en todos los casos valores de "t" significativos con respecto al testigo

con  $P < 0.001$ .

En la figura 8 se muestran las regresiones lineares de los intercambios de cromátidas hermanas por cromosoma contra las concentraciones de los alcoholes, observándose que en todos los casos se presenta una clara respuesta con respecto al incremento de intercambios.

En los cuatro casos las líneas de regresión mostraron coeficientes de correlación en el rango 0.97-0.99.

Un efecto visible provocado por la acción de los alcoholes fue el alargamiento de la duración del ciclo celular (Tabla IV).

El análisis que se realizó de la frecuencia de células que se encontraban en primera, segunda ó tercera divisiones, permitió determinar el retraso del ciclo tomando como valor máximo de células en segunda división las observadas en el testigo (78%).

El etanol a concentraciones de 2 y 3 x 10<sup>-4</sup> M mostró un marcado efecto sobre la duración del ciclo, disminuyendo el porcentaje de células en segunda división a 63 y 50% respectivamente, siendo el que mayor efecto produjo.

El propanol en general, mostró un porcentaje de 63 células en segunda división, mientras que el isopropanol no produjo una disminución significativa de células en segunda división.

El metanol no produjo ningun efecto sobre la duraci3n del ciclo.

El posible efecto de los alcoholes sobre los mecanismos de divisi3n de las c3lulas se reflej3 en los resultados obtenidos en la Tabla VI en donde se presentan los porcentajes de c3lulas endorreduplicadas (Fig.9) encontradas con los distintos tratamientos de alcoholes. El alcohol propilico fue el que present3 el mayor porcentaje de endorreduplicaciones, not3ndose que en la concentraci3n de  $3 \times 10^{-4}$  M la frecuencia aument3 considerablemente con respecto a las primeras dos concentraciones. Las siguientes frecuencias fueron obtenidas con el isopropanol, etanol y finalmente el menor da1o fue provocado por el metanol.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

El uso del cultivo de linfocitos humanos para evaluar el daño cromosómico producido por diferentes agentes, tanto físicos como químicos ha sido de gran utilidad ya que este método es uno de los mas sencillos y confiables para observar en metafase los cambios producidos sobre los cromosomas.

Además de este método, el sistema de intercambio de cromátidas hermanas ha sido utilizado con éxito para detectar el daño sobre el ADN con concentraciones 10 veces menores que las usadas normalmente para producir rompimientos cromosómicos (Wolff, 1977).

Los trabajos realizados in vitro han aportado datos importantes para el empleo de la técnica. Perry y Evans (1975) describen un incremento significativo en las frecuencias de ICH con concentraciones de diversos agentes químicos no tóxicas para las células y que no causan daño cromosómico significativo.

El análisis de los intercambios de cromátidas hermanas en sistemas biológicos in vivo ha adquirido actualmente mucha atención; describiéndose en conejos (Wolff, 1977), embriones de pollo (Bloom y Hsu, 1975) y pacientes con anemia de Fanconi (Sasaki y Tonomura, 1973; Sasaki, 1975).

En diversos experimentos, se ha demostrado que la



frecuencia de intercambios detectada en linfocitos humanos normales es aproximadamente 200 veces mayor que la presentada por los rompimientos cromosómicos y cromatídicos, lo que indica la existencia de una frecuencia inicial de intercambios, ya sea espontánea (Kato, 1974) o producida por la adición de altas concentraciones de 5-BrdU (Lambert et al., 1976), siendo estos últimos independientes de la capacidad de las células para llevar a cabo sus procesos de reparación. Hasta ahora se desconoce si el intercambio de cromátidas hermanas se lleva a cabo espontáneamente in vivo.

El hecho de que el fenómeno de intercambio de cromátidas hermanas involucre segmentos de cadenas sencillas o dobles de ADN sugiere que están implicados mecanismos de reparación en el sistema que da como resultado el intercambio de porciones de ADN. Entre los mecanismos que pueden estar relacionados con este fenómeno se consideran el de escisión y el de post-replicación, los cuales pueden intervenir en forma decisiva en la recombinación.

Kato (1977), trabajando con cromosomas substituidos en una sola banda, encontró que una cadena individual rota es suficiente para iniciar el proceso que conduce a los intercambios de cromátidas.

En la figura 4 se representan 2 tipos de mecanismos que pueden producir un intercambio, ya sea con cadenas

sencillas de ADN de cromátidas hermanas ó de la misma cromátida. El primer mecanismo (Fig.4a) demuestra el intercambio de cadenas sencillas de ADN entre las cromátidas hermanas, siendo necesario que este se lleve a cabo después de pasar por el segundo período de síntesis, ya que de suceder el intercambio durante las etapas anteriores se obtendrían patrones de marcaje iguales en regiones análogas (Fig.4b) llamadas regiones isomarcadas, mostrando en el cromosoma fragmentos en ambas cromátidas teñidos de igual manera.

El segundo mecanismo demuestra el intercambio de cadenas sencillas de ADN entre la misma cromátida, el cual se lleva a cabo después de la primera síntesis o durante la fase de  $G_1$  del segundo ciclo de replicación para que pueda manifestarse en metafase (Fig.4c), ya que si el intercambio se realiza antes de la primera ó después de la segunda síntesis, estos no se pueden detectar en la segunda metafase debido a que en las cromátidas no se alterarían los patrones de bandas marcadas existentes antes de que ocurriera el intercambio.

Otro mecanismo mediante el cual se puede detectar el intercambio de cromátidas hermanas es el propuesto por Olivieri y Brewen (1966) basado en rompimientos isocromatídicos simétricos en  $G_2$  del segundo ciclo de replicación, es decir cuando se tiene una cromátida substituída por 5-BrdU y otra substituída en una de sus cadenas (Fig.10). Esto puede

ser posible por la presencia de los alcoholes en el cultivo hasta el momento de la cosecha.

Kato (1977) demostró que la mitomicina-C y la cafeína son capaces de producir entrecruzamientos de cadenas complementarias del ADN.

Al igual que los intercambios de cromátidas hermanas, las aberraciones de tipo cromatídico son alteraciones producidas en el ADN no reparadas en el momento en el que se producen (Kato, 1974).

Se ha podido determinar que el etanol (Michaelis et al., 1962; Rosas, 1980) y el isopropanol (Salomon y Elad, 1974) producen rompimientos de banda sencilla en el ADN, mientras que el metanol produce tanto rompimientos de banda sencilla como de banda doble (López, 1980), pudiendo, estos alcoholes, producir por estas vías la formación de intercambios.

Por otro lado, se ha descrito que aquellos agentes que afectan una sola banda del ADN, requieren que se efectúe la síntesis de éste para que se manifieste el daño, de tal manera que aquellas alteraciones que se produzcan en G<sub>2</sub> del primer ciclo de replicación se evidenciarán hasta después del segundo ciclo (Evans y Scott, 1964; Bender et al., 1974), dicho efecto puede resultar en aberración de tipo cromatídico o en intercambio de cromátidas hermanas incompleto (Ikushima, 1977).

Se ha propuesto que la formación de intercambios de cromátidas hermanas se debe principalmente al paso de cadenas sencillas de ADN, tanto substituídas como no substituídas en la misma cromátida (Fig.4c), ya que la cercanía de estas puede favorecer el fenómeno (Kato, 1974).

Además, la existencia de intercambios de porciones grandes de ADN demuestra que pueden existir cambios de cadenas dobles, ya que de suceder el paso de cadenas sencillas, se necesitaría que ocurriera una separación de las bandas, así como un desenrollamiento de las mismas, lo cual implicaría un evento poco probable dada su longitud tan grande, así como las características que presenta el ADN en su estructura secundaria.

Una manera de explicar la formación de intercambios de cromátidas hermanas es la sugerida por Kato (1974) basándose en los modelos previamente propuestos por Whitehouse (1963) (fig.11) y por Holliday (1964) (Fig.12).

En los resultados obtenidos se observó que hubo un aumento en la frecuencia de intercambios al incrementarse la concentración de los alcoholes (Fig.8), y en cada concentración la frecuencia fue proporcional al número de carbonos presentes en cada alcohol (excepto para el etanol en  $1 \times 10^{-4}$  M); con el isopropanol, a pesar de tener el mismo número que el propanol, se observó menor frecuencia.

Este hecho implica que probablemente la porción de la molécula que provocó los intercambios fue la alquilica, puesto que el radical OH fue constante.

La baja frecuencia de rompimientos encontrados en este trabajo y los resultados obtenidos por Bregman (1971) y Cadotte et al. (1973), quienes no encontraron diferencias significativas en la frecuencia de rompimientos en los cromosomas de linfocitos humanos tratados con bajas concentraciones de etanol y los testigos, indican la posible intervención de mecanismos de reparación para transformar los rompimientos en intercambios.

Los alcoholes producen una gran frecuencia de rompimientos en los cromosomas de las plantas (Michaelis et al., 1962; López, 1980; Rosas, 1980), lo que puede implicar una mayor efectividad de los mecanismos de replicación en los sistemas celulares de mamífero que en los vegetales.

La primera demostración de lesiones persistentes que pueden dar origen a intercambios de cromátidas ocasionados por agentes químicos, fue hecha por Stetka et al. (1978) quienes, trabajando con mitomicina-C inyectada en conejos, encontraron que el daño producido al ADN no era reparado de inmediato pudiendo permanecer latente por algunas semanas.

En el caso de los alcoholes usados en este trabajo el tiempo de exposición que fue continuo durante 48 horas, pu

do dar origen a que los intercambios producidos se llevaran a cabo en los dos ciclos celulares.

Para poder determinar la verdadera efectividad de los alcoholes como productores de intercambios, así como para precisar el posible tipo de mecanismo que interviene en la formación de intercambios, es necesario aplicar tratamientos de pocas horas, ya sea al principio del primer ciclo ó durante el segundo periodo de división, así como en fases específicas del ciclo celular.

Una de las características importantes del sistema de intercambio de cromátidas hermanas, es que inequívocamente marca en las células el número de divisiones que han transcurrido, dado que los cromosomas que solo han realizado una división, van a presentar ambas cromátidas con una sola cadena de ADN substituída, tiñendo normalmente (Fig.13), los cromosomas en segunda división presentan una cromátida doblemente substituída y la otra una sola de las cadenas substituída, teniendo así una tinción diferencial (Fig.5), mientras que las células que ya han completado tres divisiones presentan en la mayoría de los cromosomas las 4 cadenas substituídas tiñendo claramente (Fig.14).

Esta característica del sistema ayudó a determinar el efecto de los alcoholes sobre el ciclo celular, encontrándose que en la mayoría de los casos el tiempo de duración

del ciclo fue mayor, reflejándose esto en la presencia de mas células en la primera división que en la segunda. Posiblemente los alcoholes tuvieron acción sobre la síntesis de proteínas o del ADN, provocando por esta razón, un retardo en la iniciación del ciclo celular.

Vázquez y Ballesta (1979) encontraron que el metanol produjo cambios conformacionales en la estructura de los ribosomas, lo cual a su vez varió la reactividad de las proteínas cuando son incorporadas a estos. Los resultados mostraron que son afectadas las interacciones hidrofóbicas, lo cual induce un desequilibrio en la estructura terciaria del ARN ribosómico dando como resultado una falla en la traducción de las proteínas. Por otro lado, también se demostró que el alcohol puede afectar directamente a las proteínas libres. Todos los cambios realizados por los alcoholes, tienden a disminuir la eficacia de las células para dividirse normalmente, conduciendo esto a retrasos en la división.

Lundy et al. (1975), trabajando con pacientes alcohólicos, encontraron que al ser cultivados sus linfocitos la capacidad de dividirse en presencia de agentes mitogénicos (como la fitohemaglutinina y la concavalina A) estaba muy disminuida.

Además del intercambio de cromátidas hermanas, los diferentes alcoholes indujeron el fenómeno de endorreduplica-

ción , ya que se obtuvo una doble duplicación cromosómica con ausencia de anafase entre los dos periodos de división (Fig.7) lo que dió como resultado los llamados diplocromosomas que son cromosomas con 4 cromátidas en lugar de las 2 normales (Sutou y Tokuyama, 1974) (Fig.9).

El fenómeno de endorreduplicación puede ser producido por una gran variedad de agentes físicos (Jackson y Hill, 1967) y químicos (Jackson y Lindahl, 1963; Jackson y Killander, 1964).

Las observaciones hechas por Schmid (1965) en preparaciones de células de ratón, revelaron que la mayoría de las mitosis que presentaron diplocromosomas mostraron también anafases en configuraciones anormales como husos multipolares, lo cual coincide con los resultados obtenidos en Phloeoba antennata por Manna y Mazumder (1964) con etanol y en Vicia faba por López (1980) y Rosas (1980) con el metanol y el etanol respectivamente, implicando que el posible daño en el huso y algunos otros mecanismos pueden provocar la aparición de células endorreduplicadas, las cuales dan como resultado células tetraploides.

El riesgo potencial de los alcoholes como solventes industriales sobre el material genético humano se puede evidenciar de los resultados obtenidos aquí, concluyéndose que en mayor ó menor grado todos ellos producen alteraciones



en el ADN que se manifiesta como intercambios de cromátidas hermanas, además de que se verificó que producen un alargamiento de la división celular, debido probablemente a la inhibición de las síntesis de proteínas y de ADN. También indujeron disturbios en la división normal de los cromosomas provocando endorreduplicaciones, demostrándose el gran peligro que representa el contacto prolongado con estas substancias.

El fenómeno de intercambio de cromátidas hermanas permite contar con un sistema de detección de daño al ADN el cual es rápido y muy confiable, pudiéndose determinar y evaluar los niveles mínimos de acción de los agentes mutagénicos y carcinogénicos.

Por otro lado, el intercambio de cromátidas hermanas ha ayudado a proveer datos acerca de la posible estructura cromosómica, mecanismos de acción de agentes mutagénicos sobre el ADN y los posibles mecanismos de reparación de los daños causados en los cromosomas humanos.

REFERENCIAS

- Badr, F.M. y Badr, R.S. (1973). Induction of dominant lethal mutation in male mice by ethyl alcohol. *Mutat. Res.* 21, 345.
- Balderas, R.M. (1977). Aborción de polen inducida por rayos gamma y etanol en Anciloma pulchella. Tesis, Facultad de Ciencias. UNAM, México.
- Barroso-Moguel, R. (1975). Alteraciones morfológicas producidas por inhalantes. Cuadernos Científicos CEMEF 2, 97-105.
- Bassili, M.A. y Mannering, G.J. (1968). Role of the intracellular distribution of hepatic catalase in the peroxidative oxidation of methanol. *Mol. Pharmacol.* 4, 484-491.
- Belsasso, G. (1975). Aspectos generales sobre inhalantes. Cuadernos Científicos CEMEF 2, 25-34.
- Bonder, M.A., Griggs, H.G. y Bedford, S.J. (1974). Recombinational DNA repair and sister chromatid exchanges. *Mutat. Res.* 24, 117-123.
- Bloom, S.E. y Hsu, T.S. (1975). Differential fluorescence of sister chromatids in chicken embryos exposed to 5-Bromodeoxyuridine. *Chromosoma* 51, 261-267.
- Bregman, A.A. (1971). Cytogenetic effects of ethanol in human leukocyte culture. *EMS Newsletter* 4, 35-36.
- Cadotte, M., Allard, S. y Verdy, M. (1973). Lack of effects of

- ethanol in vitro on human chromosomes. *Ann. Genet.* 16, 55-56.
- CEMEF. (1976). *Farmacos de abuso*. México, pp. 21, 42-45.
- Chen, T.R. (1974). A simple method to sequentially reveal Q- and C-bands on the same metaphase chromosomes. *Chromosoma* 47, 147-156.
- Crossen, P.E. y Morgan, W.F. (1977a). Proliferation of PHA and PWM stimulated lymphocytes measured by sister chromatid differential staining. *Cell. Immunol.* 32, 432-438.
- Crossen, P.E. y Morgan, W.F. (1977b). Analysis of human lymphocyte cell cycle time in culture measured by sister chromatid differential staining. *Exp. Cell Res.* 104, 453-457.
- Dutrillaux, B. y Fosse, A.M. (1974). Sur le mécanisme de la segmentation chromosomique induite par le BUDR (5-Bromodeoxyuridine). *Ann. Genet.* 17, 207-211.
- Environmental Mutagen Society (1975). Environmental mutagenic hazards. *Science* 187, 503-514.
- Evans, H.J. y Scott, D. (1964). Influence of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by X-rays and maleic hydrazide in Vicia faba. *Genetics* 49, 17-38.
- Jenkins, E.C. (1975). Differential sister-chromatid staining. *Lancet* 2, 178-179.
- Jordan, M.L. (1975). Human peripheral blood

- lymphocytes for the analysis of chromosome aberration in mutagen test. *Mutat. Res.* 31, 135-148.
- Goodman, J.J. y Tephply, T.R. (1968). The role of hepatic microbody and soluble oxidases in the peroxidation of methanol in the rat and monkey. *Mol. Pharmacol.* 4, 492-501.
- Goto, K.T., Akematsu, H.S. y Sugiyama, T. (1975). Simple differential Giemsa staining of sister chromatids after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining. *Chromosoma* 53, 223-230.
- Gutierrez-Flores, R.R. (1975). Solventes industriales. Cuadernos Científicos CEMEF 2, 35-48.
- Guzmán- Flores, C. (1975). Neurobiología del tiner: Alteraciones conductuales producidas a largo plazo. Cuadernos Científicos CEMEF 2, 49-58.
- Haggard, H.W. y Greenberg, L.A. (1939). Studies in absorption, distribution and elimination of alcohol. IV. The elimination of methyl alcohol. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 66, 479-496.
- Marsanyi, Z., Grant, I.A. y MacKenzie, D.W.R. (1977). Genetic damage induced by ethyl alcohol in Aspergillus nidulans. *Mutat. Res.* 48, 51-74.
- (1977). Inducción de mutaciones somáticas en estaminales de Tradescantia por vapores de

- metanol. Tesis, Facultad de Ciencias. UNAM, México.
- Holliday, R. (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetic. Res.* 5, 282-304.
- Huang, C.C. (1967). Induction of a high incidence of damage to X chromosome of Rattus (Mastomys) natalensis by base analogues, viruses and carcinogens. *Chromosoma* 23, 162-179.
- Ikushima, T. (1977). Role of sister chromatid exchanges in chromatid aberration formation. *Nature* 268, 235-236.
- Jackson, J.F. y Lindahl, K.K. (1963). Polyploidy and endoreduplication in human leukocytes cultures treated with B-mercaptopyruvate. *Science* 141, 424-426.
- Jackson, J.F. y Killander, D. (1964). DNA synthesis in phytohemagglutinin stimulated human leukocyte cultures treated with B-mercaptoethanol. *Exp. Cell Res.* 33, 459-467.
- Jackson, J.F. y Hill, F.S. (1967). Polyploidy in human leukocyte cultures treated with cysteamine and irradiation. *Nature* 214, 1155-1156.
- Jasinska, J., Steffen, J.A. y Michalowski, A. (1970). Studies in vitro lymphocyte proliferation in cultures synchronized by the inhibition of DNA synthesis. II. Kinetics of the initiation of the proliferation response. *Exp. Cell Res.* 61, 333-341.

- Jones, K.L., Smith, D.W., Ulleland, C.U. y Streissguth, A.P. (1973). Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. *Lancet* 1, 1267-1271.
- Kajii, T., Ohama, K., Auirachan, S. y Auirachan, T.T. (1972). Trypsin banding of Giemsa stained chromosomes. *Lancet* 2, 1311-1312.
- Kato, H. (1974). Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BUdR labelling method. *Nature* 251, 70-72.
- Kato, H. (1977). Mechanisms for sister chromatid exchanges and their relation to the production of chromosomal aberrations. *Chromosoma* 59, 179-191.
- Kihlman, B.A. (1975). Sister chromatid exchanges in Vicia faba. II. Effects of thiotepa, caffeine and 8-etoxicaffeine on the frequency of SCE's. *Chromosoma* 51, 11-18.
- Korenberg, J.R. y Freedlender, E.F. (1974). Giemsa technique for detection of sister chromatid exchanges. *Chromosoma* 48, 355-360.
- Lambert, B., Hansson, K., Lindsten, J., Sten, M. y Werelius, B. (1976). Bromodeoxiuridine-induced sister chromatid exchanges in human lymphocytes. *Hereditas* 83, 163-174.
- Latt, S.A. (1973). Microfluorometric detection of deoxiribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*. 70, 3395-3399.

- Latt, S.A. (1974). Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin-C. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA). 71, 3162-3166.
- López, R.G. (1980). Efectos producidos por el alcohol metílico en los cromosomas de las células meristemáticas de la raíz de haba Vicia faba. Tesis, Facultad de Ciencias. UNAM, México.
- Lundy, J., Raaf, J.H., Deakins, S., Wanebo, H.S., Jacobs, D.A., Lee, T., Jacobowitz, D., Spear, C. y Oetteng, H.F. (1975). The acute and chronic effects of alcohol on the human immune system. Gynecol. Obst. 141, 212-218.
- Manna, G.K. y Mazumder, S.C. (1964). Ethyl alcohol induced sex-chromosome breakage in the grasshopper, Phloeoba antennata. Naturwissenschaften 51, 646.
- Martin, K.O. y Monder, C. (1978). Oxidation of steroids with the 20-B-hydroxy-21-oxo side chain to 20-B-hydroxy-21-oic acids by horse liver aldehyde dehydrogenases. J. Steroid Biochem. 9, 1233-1240.
- Meisner, L.F., Cheprevich, T.W. e Inhorn, S.L. (1973). Giemsa banding specificity. Nature 245, 145-147.
- Michaelis, A. y Rieger, R. (1968). On the distribution between chromosomes of chemically induced chromatid aberrations: Studies with a new karyotype of

Vicia faba. Mutat. Res. 6, 81-92.

Michaelis, A., Ramshorn, K. y Rieger, R. (1959). Athylalkohol radiomimetisches agens bei Vicia faba.

L. Naturwissenschaften 46, 381-382.

Michaelis, A., Nicoloff, H. y Rieger, R. (1962). Influences of EDTA on the inductin of chromatid aberrations by triethylenemelanine and ethyl alcohol. Biochem. Biophys. Res. Commun. 9, 280-284.

Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, W.J., Battips, D.M. y Hungerford, D.A. (1960). Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp. Cell Res. 20, 613-616.

Mulvihill, J.J. y Yeager, A.M. (1976). Fetal alcohol syndrome. Teratol. 13, 345-348.

Oliver, J.S. (1977). Abuse of solvents for kicks. Lancet 8, 84-86.

Olivieri, G. y Brewen, J.G. (1966). Evidence for nonrandom rejoining of chromatid breaks and its relation to the origin of sister chromatid exchanges. Mutat. Res. 3, 237-248.

Perry, P. y Wolff, S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. Nature 251, 156-158.

Perry, P. y Evans, H.J. (1975). Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. Nature 258, 121-125.



- Ploc, I. y Starka, L. (1978). Gas chromatographic study of the histochemical reaction for isopropanol dehydrogenase. *Chromatography* 11, 374-378.
- Rosas, S.P. (1980). Inducción de alteraciones cromosómicas por el alcohol etílico en las células meristemáticas de la raíz de Vicia faba. Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Salomon, J. y Elad, D. (1974). Selective photochemical alkylation of purines in DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 58, 890-895.
- Sasaki, M. (1975). Is Fanconi's anemia defective in a process essential to the repair DNA crosslinks? *Nature* 257, 501-503.
- Sasaki, M y Tonomura, A. (1973). A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer Res.* 33, 1829-1835.
- Sax, H. y Sax, H.J. (1966). Radiomimetic beverages, drugs and mutagens. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*. 55, 1431-1435.
- Schmid, W. (1965). Multipolar spindles after endoreduplication. *Exp. Cell Res.* 42, 201-204.
- Shields, A., Baltimore, D. y Ryback, R.S. (1976). Viability of cells in ethanol. *J. Stud. Alcohol.* 37, 321-326.
- Shiraishi, Y. y Yosida, T.H. (1972). Banding pattern analysis

- of human chromosomes by use of a urea treatment technique. *Chromosoma* 37, 75-83.
- Sinhg, D.R., Mahajan, J.M. y Krishnan, D. (1976). Effect of chemical protector on fast-neutron induced reversion in yeast. *Radiat. Biol.* 30, 585-588.
- Skoog, V.T., Weber, T.H. y Richter, W. (1974). Studies on the interaction between mitogens and human lymphocytes in vitro. *Exp. Cell Res.* 85, 339-350.
- Stetka, D.G., Minkler, J. y Carrano, A.V. (1978). Induction of long-lived chromosome damage as manifested by sister-chromatid exchange, in lymphocytes of animals exposed to mitomycin-C. *Mutat. Res.* 51, 383-396.
- Sugiyama, T. (1971). Specific vulnerability of the largest telocentric chromosome of rat bone marrow cells to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *J. Nat. Cancer Inst.* 47, 1267-1275.
- Sutou, S. y Tokuyama, F. (1974). Induction of endoreduplication in cultured mammalian cells by some chemical mutagens. *Cancer Res.* 34, 2615-2623.
- Takehisa, S. y Wolff, S. (1977). Induction of sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells by carcinogenic mutagenic requiring metabolic activation. *Mutat. Res.* 45, 263-270.
- Taylor, J.H. (1958). Sister chromatid exchanges in tritium

- labeled chromosomes. *Genetics* 43, 515-529.
- Torok, D. (1972). Chromosomal irregularities in alcoholics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 197, 90-100.
- Traiger, G.J. y Plaa, G.L. (1971). Differences in the potentiation of carbon tetrachloride in rats by ethanol an isopropanol pretreatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 20, 105-112.
- Vázquez, C.B.D. y Ballesta, J.P.G. (1979). Conformational changes in ribosomes induced by alcohols. *Febs Lett.* 99, 251-254.
- Whitehouse, H.L.K. (1963). A theory of crossing-over by means of hybrid deoxyribonucleic acid. *Nature* 199, 1034-1040.
- Wolff, S. (1977). Chromosome effects induced by low levels of mutagens. *Research in Photobiology*, Plenum Publishing Corporation, New York.
- Zakharov, A.F. y Egolina, N.A. (1972). Differential spiralisation along mammalian mitotic chromosomes. *Chromosoma* 38, 341-365.
- Zhurkov, V.S. y Yakovenko. K.N. (1976). The culture of human lymphocytes as a test subject for evaluation of mutagenic activity of chemicals. *Mutat. Res.* 41, 107-112.

**TABLA I**

**FRECUENCIA DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR ALCOHOL METILICO EN CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO**

Tratamiento ( $10^{-4}$ M)	X de ICH $\pm$ E.E.	Frecuencia de ICH por cromosoma $\pm$ E.E.	Valores de "t"
Testigo	4.11 $\pm$ 0.223	0.089 $\pm$ 0.0048	
1	4.90 $\pm$ 0.230	0.106 $\pm$ 0.0050	2.01*
2	5.25 $\pm$ 0.249	0.114 $\pm$ 0.0054	2.41**
3	6.10 $\pm$ 0.251	0.132 $\pm$ 0.0054	4.19***

\*P < 0.05

\*\*P < 0.01

\*\*\*P < 0.001

**TABLA II**

**FRECUENCIA DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR ALCOHOL ETILICO EN CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO**

Tratamiento ( $10^{-4}$ M)	X de ICH $\pm$ E.E.	Frecuencia de ICH por cromosoma $\pm$ E.E.	Valores de "t"
Testigo	3.22 $\pm$ 0.193	0.070 $\pm$ 0.0041	
1	4.19 $\pm$ 0.209	0.091 $\pm$ 0.0045	2.41*
2	6.35 $\pm$ 0.213	0.138 $\pm$ 0.0046	7.70**
3	7.01 $\pm$ 0.257	0.152 $\pm$ 0.0055	8.42**

\*P < 0.01

\*\*P < 0.001

TABLA III

FRECUENCIA DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS  
 POR ALCOHOL PROPILICO EN CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS  
IN VITRO

Tratamiento (10 <sup>-4</sup> M)	X de ICH ± E.E.	Frecuencia de ICH por cromosoma ± E.E.	Valores de "t"
Testigo	3.90 ± 0.200	0.084 ± 0.0043	
1	7.21 ± 0.263	0.156 ± 0.0057	7.14*
2	8.15 ± 0.272	0.177 ± 0.0059	9.00*
3	10.25 ± 0.303	0.222 ± 0.0065	12.62*

\*P < 0.001

TABLA IV

FRECUENCIA DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS  
 POR ALCOHOL ISOPROPILICO EN CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS  
IN VITRO

Tratamiento (10 <sup>-4</sup> M)	X de ICH ± E.E.	Frecuencia de ICH por cromosoma ± E.E.	Valores de "t"
Testigo	3.66 ± 0.166	0.079 ± 0.0034	
1	5.91 ± 0.221	0.128 ± 0.0048	5.90*
2	6.99 ± 0.229	0.151 ± 0.0049	8.50*
3	8.33 ± 0.269	0.182 ± 0.0058	11.02*

\*P < 0.001

TABLA V

FRECUENCIA DE CELULAS EN PRIMERA, SEGUNDA Y TERCERA DIVISIONES  
 TRATADAS CON VARIOS ALCOHOLES IN VITRO \*

Substancia	Concentración (10 <sup>-4</sup> M)	Frecuencias de células en:		
		1a división	2a división	3a división
Testigo		0.19	0.78	0.30
Metanol	1	0.15	0.80	0.05
	2	0.18	0.78	0.04
	3	0.19	0.75	0.06
Etanol	1	0.29	0.71	0.00
	2	0.37	0.63	0.00
	3	0.50	0.50	0.00
Propanol	1	0.32	0.68	0.00
	2	0.36	0.63	0.01
	3	0.41	0.59	0.00
Isopropanol	1	0.28	0.70	0.02
	2	0.22	0.73	0.05
	3	0.29	0.69	0.02

\* Análisis hecho en 100 células

TABLA VI

FRECUENCIAS DE CELULAS ENDORREDUPLICADAS PRODUCIDAS POR DIFERENTES ALCOHOLES \*

Substancia	Concentración (10 <sup>-4</sup> M)	Células endorreduplicadas	endorreduplicación
Testigo		0	0.0
Metanol	1	0	0.0
	2	0	0.0
	3	1	0.2
Etanol	1	1	0.2
	2	3	0.6
	3	4	0.8
Propanol	1	12	2.4
	2	14	2.8
	3	40	8.0
Isopropanol	1	5	1.0
	2	8	1.6
	3	10	2.0

\* Análisis hecho en 500 células

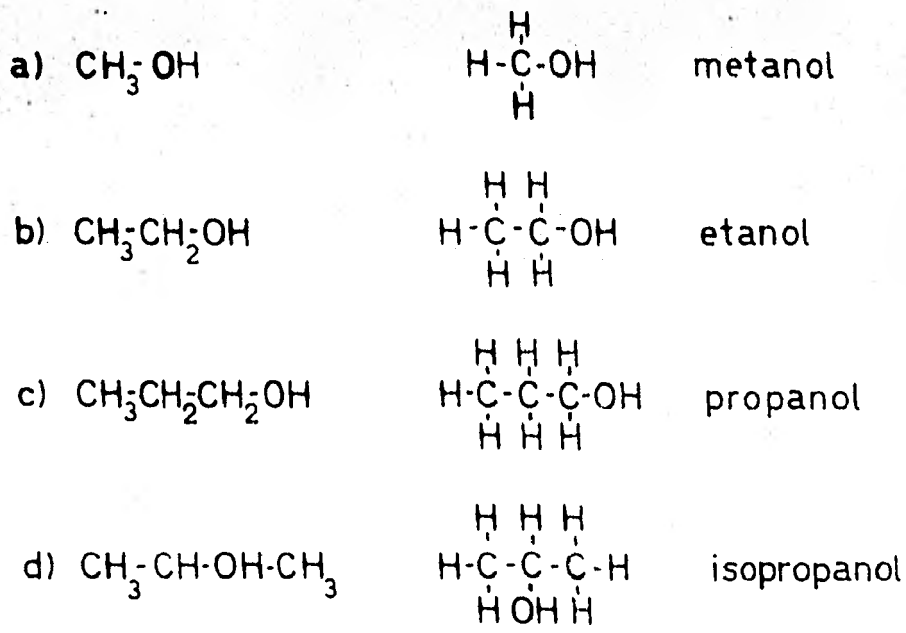


Fig. 1 FORMULAS SEMIDESARROLLADAS Y DESARROLLADAS DE LOS ALCOHOLES PRIMARIOS (a,b,c) y SECUNDARIOS (d).

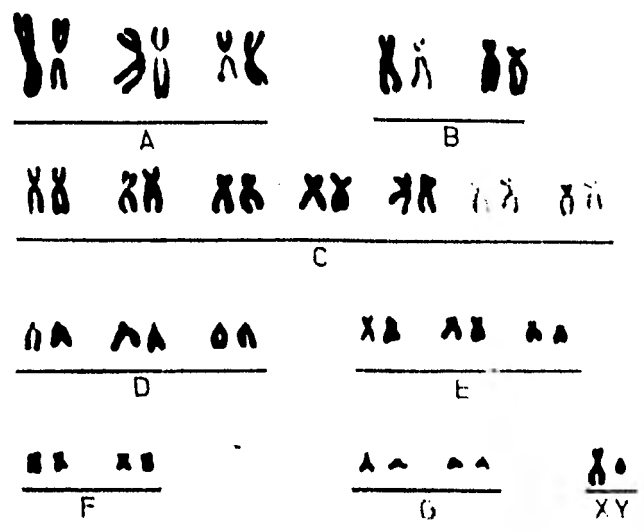


Fig. 2 CARIOTIPO HUMANO.



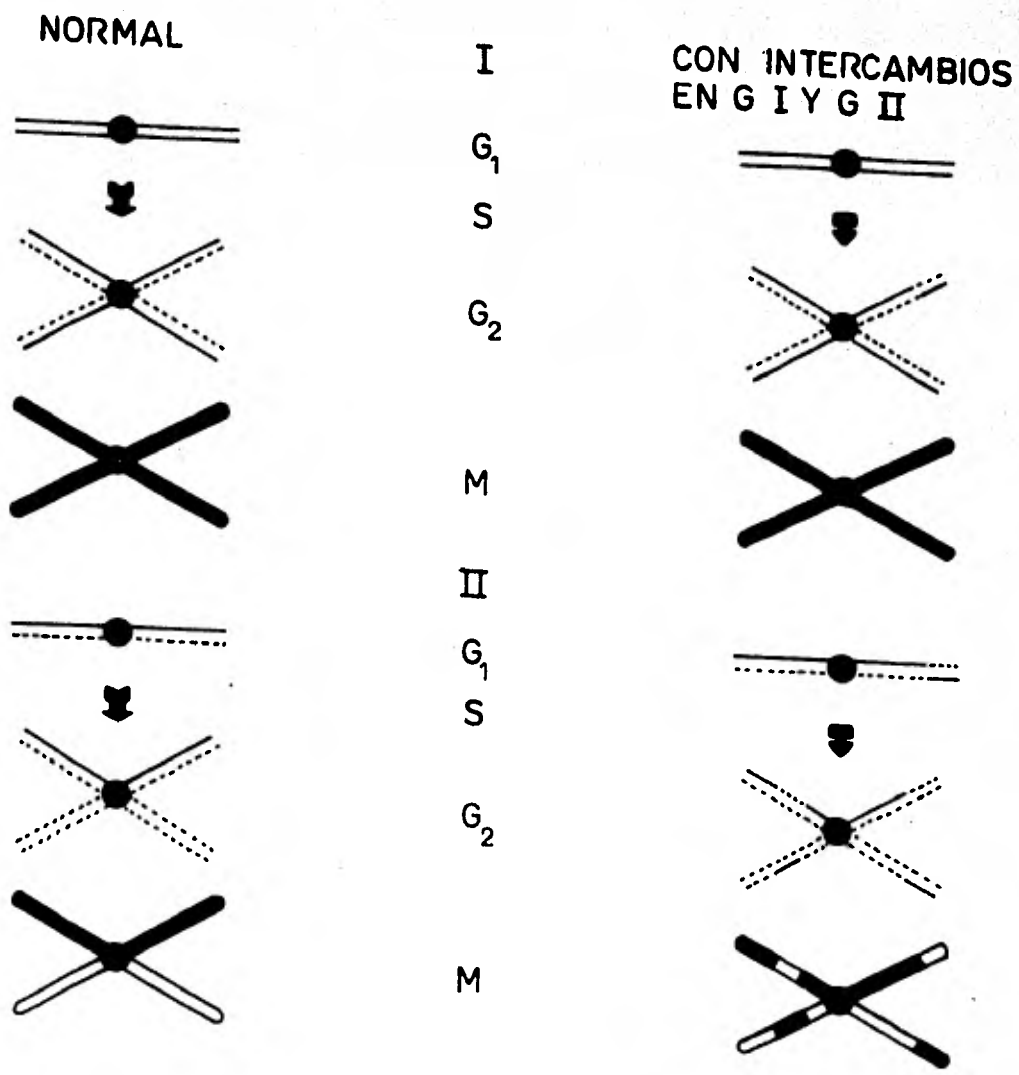


Fig. 3 REPLICACION CROMOSOMICA E INCORPORACION DE 5-Brdu DURANTE DOS CICLOS CELULARES (I y II).

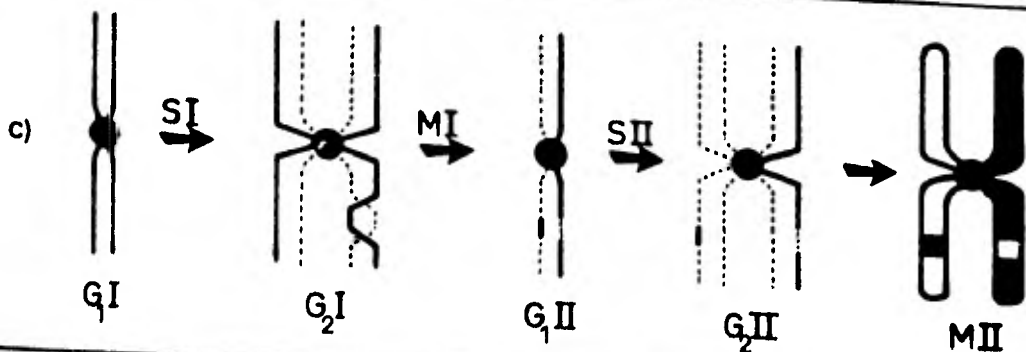
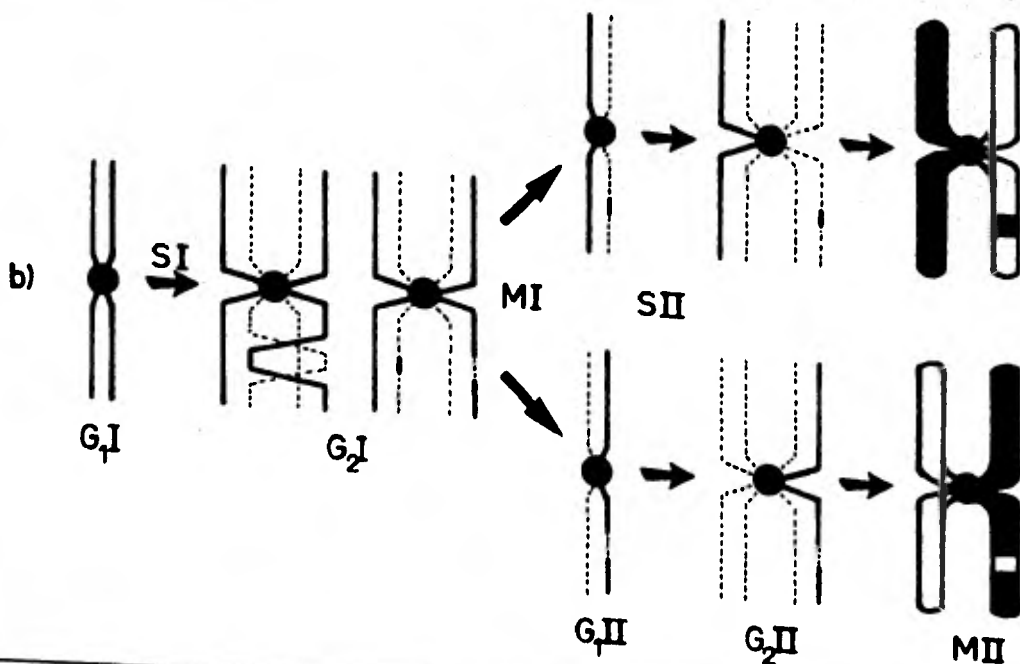
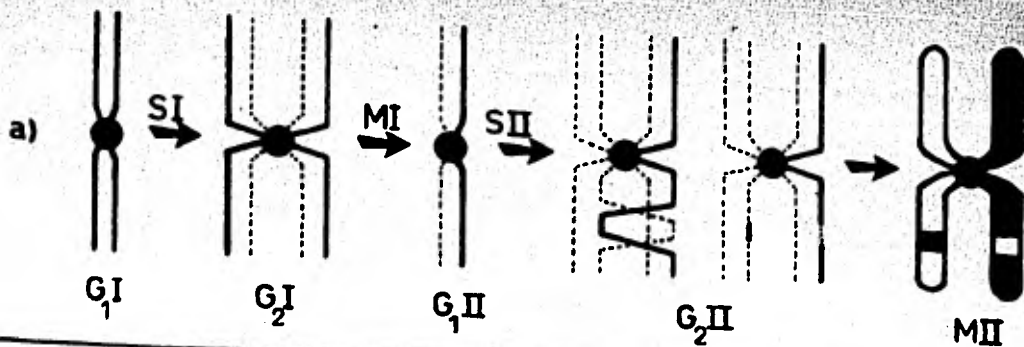


Fig. 4 MECANISMO DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS.  
 a) INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS.  
 b) INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS EN  $G_2II$ .  
 REGIONES ISOMARCADAS.  
 c) INTERCAMBIO EN LA MISMA CROMATIDA.

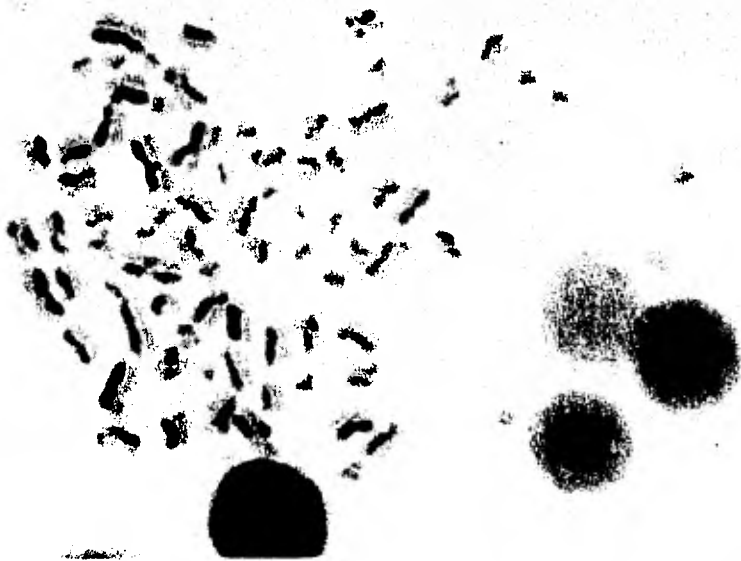


Fig. 5 CROMOSOMAS HUMANOS METAFASICOS DESPUES DE DOS CICLOS CELULARES EN PRESENCIA DE BrdU.



(a)



(b)

Fig. 6 a) CROMOSOMA CON UN INTERCAMBIO TERMINAL  
b) CROMOSOMA CON UN INTERCAMBIO INTERSTICIAL

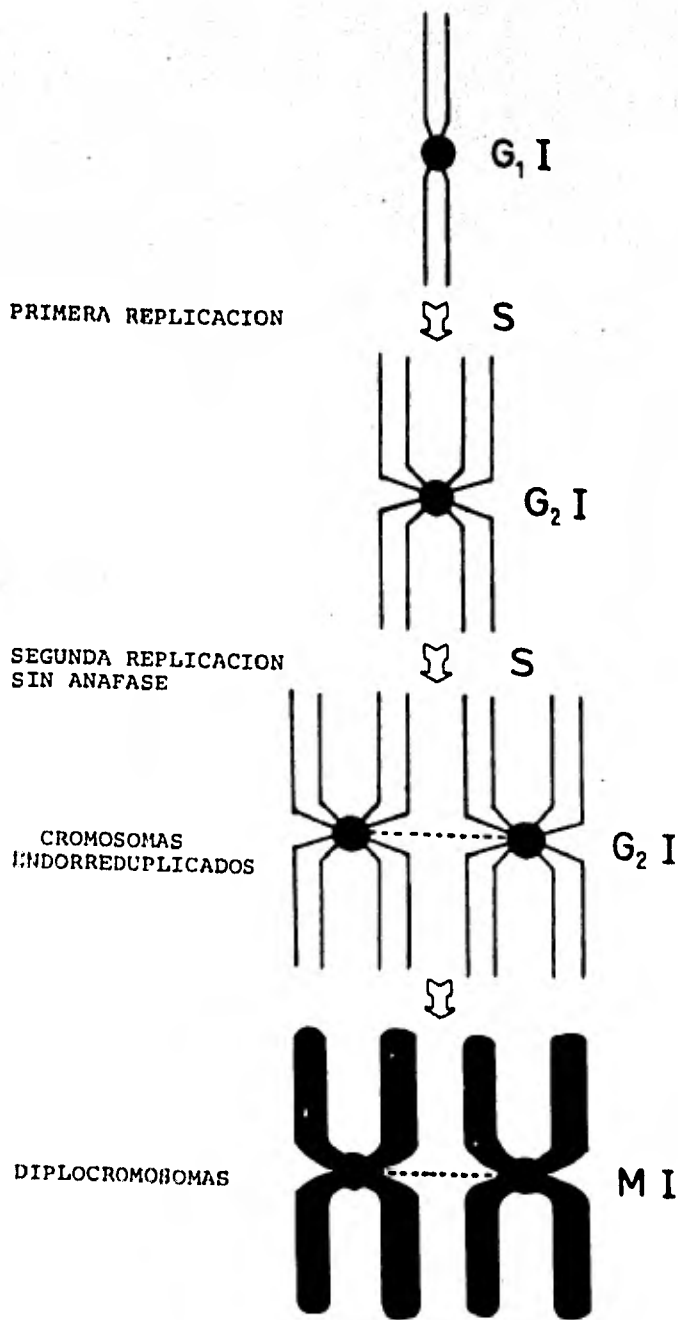


Fig. 7 MECANISMO DE ENDORREDUPLICACION MOSTRANDO LA FORMACION DE LOS DIPLOCROMOSOMAS, PRESENTANDO 4 CROMATIDAS EN LUGAR DE 2.

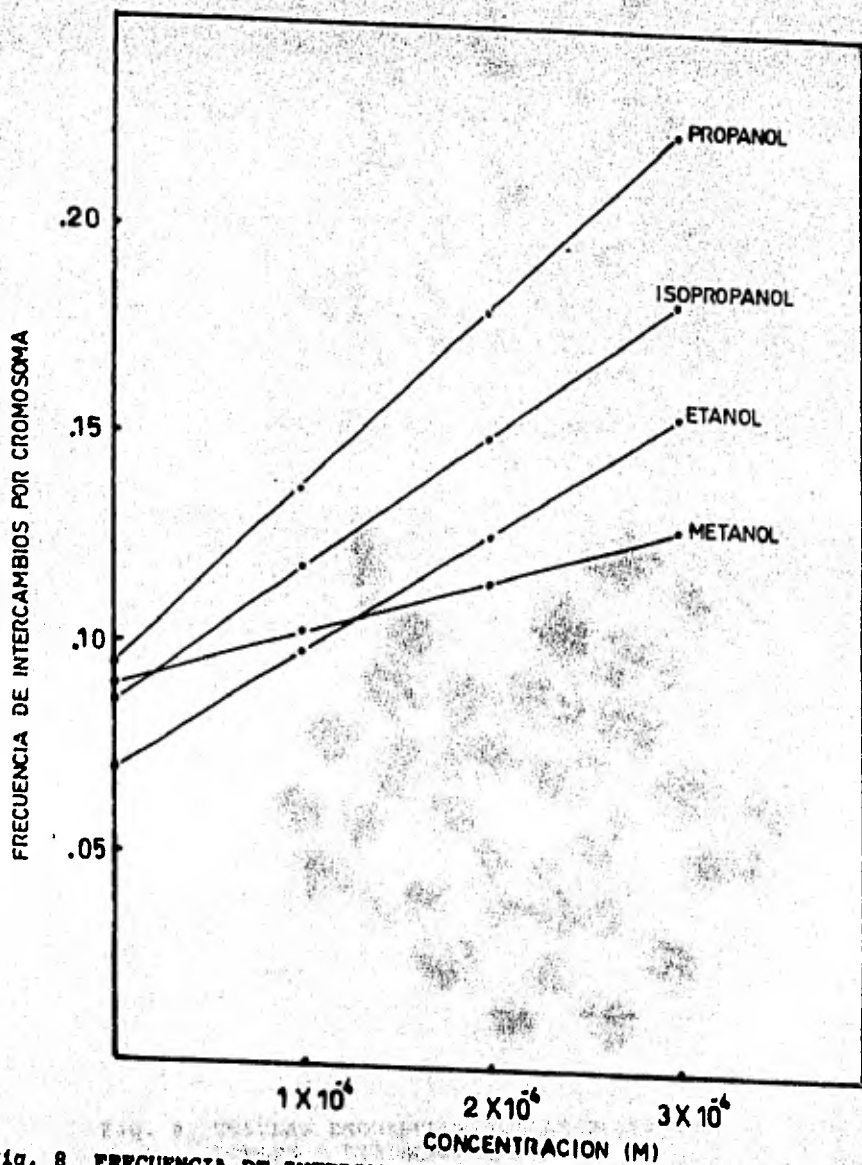


Fig. 8 FRECUENCIA DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS EN CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS IN VITRO CON DIFERENTES ALCOHOLES.



Fig. 9 CELULAS ENDORREDUPLICADAS MOSTRANDO LOS CROMOSOMAS DOBLES O DIPLOCROMOSOMAS.

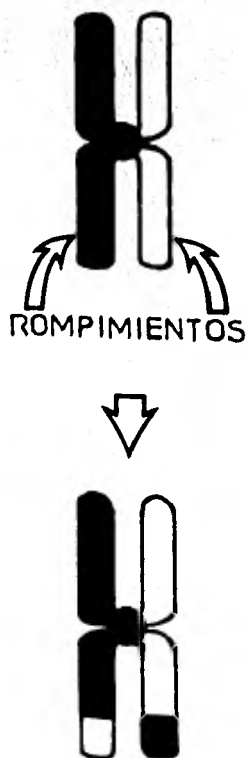
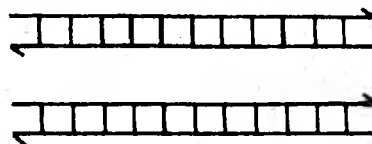
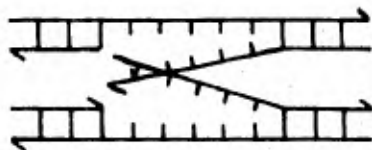


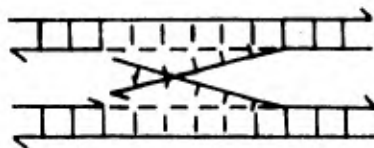
Fig. 10 ROMPIMIENTOS DE ISOLOCUS  
PRODUCIDOS EN UN CROMOSO  
MA G<sub>2</sub>-II Y REUNION SIME -  
TRICA, DANDO ORIGEN A UN  
INTERCAMBIO DE CROMATI -  
DAS HERMANAS.



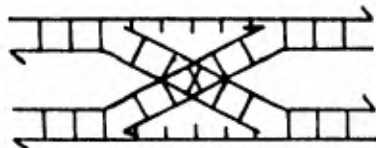
(a) CADENAS DOBLES DE ADN DE CROMATIDAS HERMANAS.



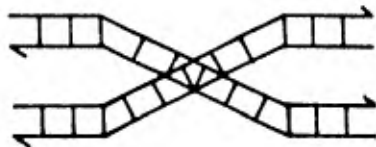
(b) RUPTURA Y SEPARACION DE CADENAS DE ADN DE POLARIDAD OPUESTA.



(c) SINTESIS DE ADN EN EL ESPACIO LIBRE.



(d) SEPARACION DEL ADN RECIEN SINTETIZADO Y REASOCIACION DE ESTE CON LAS CADENAS LIBRES.

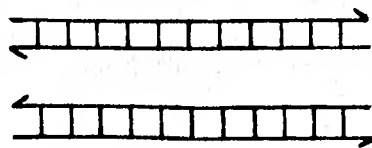


(e) DEGRADACION DEL ADN NO APAREADO.

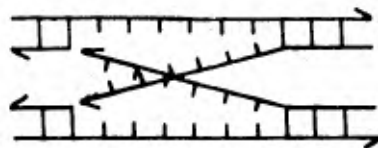
Fig.11

MODELO MOLECULAR DE ENTRECruzAMIENTO PROPUESTO POR WHITEHOUSE (1963) USADO PARA EXPLICAR LA FORMACION DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS.

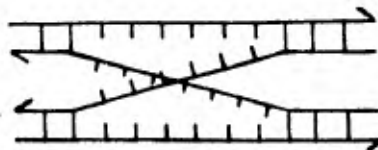




(a) CADENAS DOBLES DE ADN DE CROMATIDAS HERMANAS. '



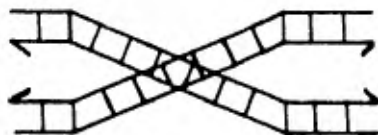
(b) RUPTURA Y SEPARACION DE CADENAS DE ADN DE IGUAL POLARIDAD.



(c) REASOCIACION DE LAS CADENAS LIBRES.



(d) RUPTURA DE LAS CADENAS CONTRARIAS Y GIRO DE LA DOBLE CADENA DE ADN.



(e) REASOCIACION DE LAS CADENAS LIBRES.

**Fig.12** MODELO MOLECULAR DE ENTRECruzAMIENTO PROPUESTO POR HOLLIDAY (1964) USADO PARA EXPLICAR LA FORMACION DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS.



Fig. 13 CROMOSOMAS HUMANOS METAFASICOS DESPUES DE UN CICLO CELULAR EN PRESENCIA DE BrdU.

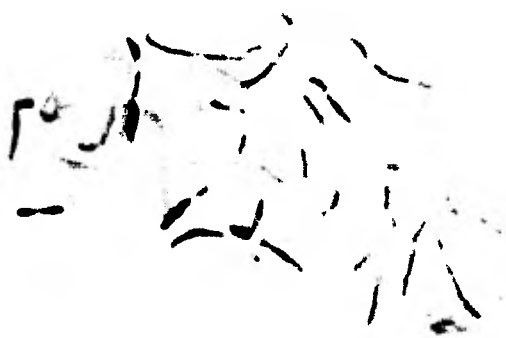


Fig. 14 CROMOSOMAS HUMANOS METAFASICOS DESPUES DE TRES CICLOS CELULARES EN PRESENCIA DE BrdU.