

CONTENIDO

	Pág.
Resumen	1
Introducción	2
Material y Método	16
Resultados	20
Discusión y Conclusiones	22
Referencias	38



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 está 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.

RESUMEN

Se demuestra que los intercambios de cromátidas hermanas (ICH) constituyen un criterio adecuado para evaluar el efecto citogenético de bajas concentraciones de agentes químicos en plantas. En esta tesis se emplean las raíces de Vicia faba como sistema de prueba de la acción del tiner.

Los resultados demuestran que este disolvente eleva significativamente las frecuencias de ICH encontradas en el testigo, notándose que aumentan a medida que se incrementa la concentración.

INTRODUCCION

Recientemente, el desarrollo industrial ha originado el empleo de gran cantidad de agentes químicos a los cuales el hombre está constantemente expuesto y que en su mayor parte se desconocen sus efectos.

En la industria, se han identificado como tóxicos más de 15 000 productos. Sin embargo sólo 18 de ellos, que incluyen asbestos, cloruro de vinilo y benceno, son regulados como cancerígenos por el Instituto de Seguridad y Salud Ocupacional de los Estados Unidos; las sustancias restantes se consideran carcinógenos potenciales (Seminario, 1978).

Entre los agentes químicos ampliamente usados en la industria, están los solventes. Este hecho ha llevado a la realización de numerosas investigaciones acerca de su mutagenicidad, carcinogenicidad y teratogenicidad (Trátai et al., 1980)

Los solventes utilizados inadecuadamente causan graves problemas de salud así como de farmacodependencia en diversos países

del mundo entre ellos México, Estados Unidos, Japón, Canadá algunos del este de Europa, de Sudamérica y de Africa (Cohen, 1973).

En México, la inhalación de solventes representa uno de los principales problemas de drogadicción. Dichos compuestos son consumidos especialmente por jóvenes y niños (entre los 6 y 14 años) de clase económicamente baja, ya que son fáciles de conseguir y tienen bajo costo en comparación con otras drogas. Su abuso es frecuente en las llamadas "colonias perdidas", donde muchos niños las consumen en ocasiones para olvidar el hambre (CEMEF, 1976).

Los solventes son productos orgánicos líquidos de importancia comercial, con propiedades para disolver o dispersar sustancias de origen orgánico, naturales o sintéticas, normalmente insolubles en agua. Se clasifican (Gutierrez-Flores, 1975) de acuerdo a sus funciones en:

Solventes activos, entre los que se encuentran gran cantidad de cetonas, ésteres, éteres, hidrocarburos clorados y nitroparafinas.

Co-solventes, como metanol, etanol, n-propanol, alcoholes amílico e isoamílico y metil amil alcohol, entre otros.

Solventes latentes o diluyentes, como hexano, heptano, benceno, tolueno, xileno, queroceno, decalina, trementina, tetralina, naftas alifáticas, espíritus minerales, etc.

Entre los solventes más empleados está el tiner que es una mezcla balanceada de solventes activos, latentes y diluyentes, usado en la industria de los recubrimientos orgánicos como ingrediente o componente de pinturas, lacas, barnices, tintas y productos similares. Su función es la de reducir la viscosidad o dar la consistencia adecuada, controlar la velocidad de evaporación y abatirlos costos (Gutiérrez Flores, 1975). Los daños fisiológicos que provoca son directamente sobre el sistema nervioso central causando efectos inmediatos de hipermotilidad, conducta alucinante, ataxia, cataxia y crisis mioclónicas, a partir de estos últimos efectos sobrevienen diversos autotraumatismos durante los cuales no hay respuesta a los estímulos ambientales (Guzmán-Flores, 1975). Así mismo se ha observado que produce un tipo de anemia grave entre los inhaladores y un defecto hereditario de los glóbulos sanguíneos (Ferrara-Castro, 1976).

No obstante su importancia, son pocos los estudios que se han realizado para investigar los efectos del tiner como tal.

Sin embargo, se conocen algunos de los daños producidos por sus principales componentes, como el benceno el cual es el más simple de los hidrocarburos aromáticos y provoca enfermedades de la sangre que van desde anemia hasta leucemia (Browning, 1975; Takeshi et al., 1981). Debido a su asociación con anemia aplástica y leucemia (IARC, 1974), este compuesto ha sido clasificado como carcinógeno ocupacional por el Instituto de Seguridad y Salud Ocupacional de los Estados Unidos (Seminario, 1978). La relación que existe entre anormalidades de la sangre y la exposición al benceno ha sido ampliamente estudiada tanto en el hombre como en animales experimentales (Picciano, 1979). Así mismo se han llevado a cabo estudios epidemiológicos que han demostrado aumento del riesgo a presentar leucemia en trabajadores expuestos al benceno (Tareeff et al., 1963; Vigliani y Saita, 1964; Aksoy et al., 1972; Browning, 1975; Infante et al., 1977). Evidencias recientes sugieren que los metabolitos del benceno, y no este como tal, son los principales responsables de la interferencia en la producción de eritrocitos y leucocitos en la médula ósea (Tice et al., 1980), proponiéndose que ambos involucran tanto al ADN como a las proteínas (Lutz y Schlatler, 1977; Tunek et al., 1978). Vigliani y Forni (1976) han descrito más de cien casos de leucemia debidos a exposición con benceno. Arcos y Argus (1968) encuentran que otros derivados de éste, como el benzopireno, el benzofieno y el benzofluranteno, producen cáncer en la piel y en el tejido subcutáneo. Además se ha

demostrado que este disolvente por sí solo no induce intercambios de cromátidas hermanas, y se ha sugerido que los metabolitos del benceno como: hidroquinasa y catecol son los responsables de dicho efecto (Morimoto y Wolff, 1980). En Vicia faba este disolvente provoca alteraciones cromosómicas así como disturbios en el huso acromático que dan como resultado la inducción de anafases multipolares (Gómez-Arroyo, 1980).

Acerca de la teratogenicidad del benceno, no se conoce mucho al respecto, aunque se incluye en la lista de agentes que se sospecha que tienen dicho efecto (Yager, 1973). Es importante considerar este aspecto ya que el benceno es usado en muchos sitios donde se emplean mujeres jóvenes en edad fértil (Tátrai et al., 1980). Watanabe y Yoshida (1970) encuentran casos de agnatia, micrognatia, paladar hendido y otras anormalidades esqueléticas en fetos de ratón tratados subcutáneamente con benceno en concentraciones de $1\ 000\ \text{ng}/\text{m}^3$ durante 24 horas por día, sin embargo de 9 a 14 días el solvente no es teratógeno. Durante este lapso ninguna de las concentraciones induce alteraciones, tampoco se observan malformaciones externas, viscerales o esqueléticas. El efecto embriotóxico más importante del benceno es la mortalidad fetal cuando las inhalaciones son hechas durante el período de organogénesis (Ungváry et al., 1978). La exposición temprana al benceno destruye la fertilización

antes o durante la implantación (Tátrai, 1980). La embriotoxicidad de este solvente está en relación con su carácter lipofílico y su bajo peso molecular por lo que puede pasar la barrera placentaria y afectar a las células embrionarias directamente. Además se ha demostrado que inhibe la síntesis de ADN en la células de la médula espinal (Moeschilin y Speck, 1976). Kuna y Kapp (1981) describen en ratas el efecto teratógeno de este solvente, produciendo pérdida de peso en el feto y falta de osificación.

Otra sustancia empleada en la formulación del tñer es el tolueno que produce una de las complicaciones fisiológicas más graves ocasionadas por solventes: la degeneración cerebelosa (Grabsky, 1961). Recientemente se ha encontrado que la administración de tolueno y xileno en ratas provoca decremento en la concentración de glutatión en el hígado (Doorn et al., 1980). Estos resultados indican que durante el metabolismo del tolueno, se forman intermediarios alquilantes que reaccionan con el glutatión. Por su propiedad de disolver lípidos, el tolueno es comunmente usado para extraerlos de las membranas en estudios celulares; observándose que inhibe procesos bioquímicos tales como la síntesis proteica en Bacillus subtilis (Winston y Matsuhita, 1975). También presenta efecto teratógeno en los embriones del pez Oryzias latipes (cuyos huevos se proponen como una herramienta sencilla

y rápida para observar estos efectos debido a la transparencia de los mismos) produciendo deformaciones anatómicas en el embrión, así como daño sistémico e intoxicación (Stoss y Hainer, 1979). A nivel citotóxico el tolueno provoca picnosis del núcleo (Kronevi et al., 1977). Donner (1980) nota ascenso de ICH en ratas sometidas a este solvente. El tolueno ha mostrado tener efecto mutagénico sobre Drosophila melanogaster (Norppa et al., 1980; Rodríguez-Arnaíz., 1982). Funes-Cravioto et al. (1977) describen aumento significativo de rupturas cromosómicas en linfocitos de personas expuestas ocupacionalmente a tolueno (impresores), sin embargo, en trabajadores de rotograbado con exposición ocupacional a este solvente no se menciona elevación significativa de aberraciones cromosómicas ni de ICH. Norppa et al. (1980) encuentran que el vinil tolueno empleado en la industria plástica induce ICH y aberraciones cromosómicas.

En n-hexano, otro componente del tiner, se presenta en altas concentraciones en el aire pues forma parte de la gasolina. Ocasiona polineuropatía que es una de las complicaciones más frecuentes del sistema nervioso central (Yamamura, 1969).

Causa también degeneración acentuada en los nervios periféricos de animales de laboratorio (Spencer y Shaunburg, 1977) y en humanos ocupacionalmente expuestos (Herskowitz et al., 1971). Provoca además inflamación axonal en el sistema nervioso central; y lesiones en la visión que conducen a defectos de discriminación al color y cambios en la memoria visual (Seppäläinen et al., 1979). El efecto genético del n-hexano, ha sido demostrado ampliamente por Gómez-Arroyo (1980), produciendo aberraciones de tipo subcromatídico, cromatídico y cromosómico, así como daño sobre el centrómero y el huso acromático en Vicia faba y por Rodríguez-Arnáiz (1982) en Drosophila melanogaster mediante la inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo.

Por su parte, el n-heptano, que también se incluye en las formulaciones del tiner, es narcótico en altas concentraciones induciendo vértigo en el hombre a 1000 ppm (Gerarde, 1973); tal efecto depende de la acción de los solventes sobre las membranas nerviosas ricas en lípidos (Haydon et al., 1977). En experimentos con ratas expuestas a vapores de n-heptano en concentraciones de 4, 21 y 62 mol/l durante dos semanas se observa que tanto en el cerebro como en el cuerpo hay acumulación proporcional a la dosis del solvente. Los efectos neuroquímicos iniciales debidos a cantidades bajas muestran reducción en la síntesis de ARN

(Savolainen y Pfaffli, 1980). En un estudio comparativo sobre los efectos de: n-pentano, n-hexano y n-heptano en ratas, Tabei et al. (1980) notan que el n-hexano produce serios daños en el sistema nervioso periférico, especialmente en la unión con las fibras nerviosas, mientras que las expuestas a n-pentano y n-heptano no presentan cambios. Crespi et al. (1979) describen daños mínimos en el sistema nervioso periférico de trabajadores expuestos a vapores de n-heptano. En las células meristemáticas de Vicia faba, el n-heptano induce alteraciones cromosómicas así como daño en el huso acromático (Dávila, 1981).

Otro constituyente del tiner es el acetato de etilo que forma parte de los esterres alifáticos (Fassett, 1963). Los vapores de acetato de etilo en concentraciones de 200 ppm emiten un fuerte olor y producen pérdida del olfato hacia determinados aromas (Barrios y Devoto, 1931). En cantidades mayores tiene efecto narcótico (Marsden y Seymour, 1943). Gallaher y Loomis (1975) observan que en ratas la inhalación excesiva de acetato de etilo altera el metabolismo del piruvato y provoca una acumulación de alcohol etílico y ácido acético. Así mismo eleva

el ácido láctico y decrece el glicógeno, siendo estas alteraciones bioquímicas responsables de sus efectos tóxicos (Seth y Srivastava, 1974). Además se considera que la intoxicación aguda por este solvente disminuye la presión sistémica y la arterial pulmonar (Nakano y Kessinger, 1971). También ejerce acción depresiva sobre la contractilidad del miocardio, originando el colapso muscular y subsecuentemente la muerte (Nakano et al., 1973).

El daño genético ocasionado por el acetato de etilo se manifiesta por la producción de aberraciones cromatídicas y cromosómicas, cromosomas con el centrómero inactivado e isocromosomas; anafases multipolares y micronúcleos en Vicia faba. La presencia de cromosomas con el centrómero inactivado sugieren la acción de esta sustancia sobre la región centromérica, siendo mayor el efecto sobre este que en el resto del cromosoma (Castillo, 1981). La aparición de C-mitosis y de anafases multipolares, son evidencia de las alteraciones que provoca sobre el huso mitótico, con la consiguiente distribución anormal de los cromosomas en las células hijas (Castillo, 1981). En Drosophila melanogaster este compuesto induce mutaciones letales resesivas ligadas al sexo (Rojas, 1984).

El metanol es otro solvente empleado en la elaboración del tñer. En el organismo este alcohol se elimina lentamente y produce metabolitos tóxicos. Los síntomas de intoxicación

se deben a sus productos de oxidación, el formaldehído y el ácido fórmico. Los primeros efectos de este alcohol se manifiestan por debilidad, anorexia, cefalea y náusea. Posteriormente se presentan vómitos, dolor de espalda, de extremidades y en muchos casos, se experimenta dolor violento en el abdomen (Röe, 1955).

La intoxicación debida a la inhalación de los vapores de metanol puede causar irritación de las mucosas nasal, faríngea y ocular, así como cefalea, temor, neuritis y aún ceguera; además de incoordinación que al principio es mínima, pero que va en constante aumento sobreviniendo convulsiones, coma y muerte por parálisis respiratoria (Barroso-Moguel, 1975).

Sobre el material genético el metanol ha mostrado ser inductor de alteraciones cromosómicas en células de Vicia faba (López, 1980). Además induce intercambios de cromátidas hermanas en cultivo de linfocitos humanos observándose, que al aumentar la concentración se incrementa la frecuencia de los mismos (Altamirano, 1981).

Debido a que es difícil realizar la experimentación directa sobre el hombre, se propone el uso de diversos sistemas biológicos de prueba. Uno de ellos lo constituyen las raíces del haba (Vicia faba) que representa ventajas tales como su bajo número de cromosomas ($2n=12$) de gran tamaño, lo que permite que sean fácilmente observables, su ciclo celular

corto, ya que en las células meristemáticas de la raíz principal dura 19.3 horas a 19°C (Evans y Scott, 1964). Además es un material poco costoso y fácil de manipular.

En estudios de citogenética se emplea la prueba de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) para verificar el efecto de las sustancias sobre los cromosomas. El método reúne numerosas ventajas tales como rapidez, facilidad y sensibilidad para detectar los efectos genéticos en concentraciones 10 veces menores a las que producen aberraciones cromosómicas (Kato, 1974a; Perry y Evans, 1975; Craig-Holmes, 1977; Wolff, 1977; Latt, 1980). Además de que pueden ser identificados tanto los compuestos que actúan directamente sobre el ADN como aquellos que requieren activación metabólica (Latt, 1980). Esta técnica se usa también para realizar estudios tanto in vitro como en personas accidental u ocupacionalmente expuestas. De hecho el ICH ha sido usado en la investigación de varias enfermedades humanas heredables y con predisposición para desarrollar neoplasias, tales como el síndrome de Bloom, la anemia Fanconi, ataxia telangictaxia, entre otras; por lo que posiblemente esta prueba pueda ser empleada como un buen prospecto en el diagnóstico prenatal (German, 1972).

Aunque el intercambio de cromátidas hermanas fue inferido inicialmente por McClintock (1938) al estudiar los cromosomas en anillo de maíz, la primera evidencia inequívoca de este acontecimiento fue proporcionada por Taylor y colaboradores (1957) al tratar de comprobar la teoría de la duplicación semiconservadora del ADN, por medio de autorradiografía en cromosomas de Vicia faba en segunda división, que han incorporado timidina tritiada (H^3Thd), siendo esto la demostración de la segregación semiconservadora del ADN en cromosomas de eucariontes. El método de ICH fue iniciado por Zakharov y Egolina (1972) dejando a las células durante dos ciclos de replicación en presencia de 5-Bromodesoxiuridina (BrdUrd) después de los cuales los cromosomas contienen cromátidas sustituidas en una sola cadena de ADN. Tales cromátidas al teñirse diferencialmente presentan intercambios. Latt et al. (1975) agregan a esta técnica la tinción con el colorante fluorocromado bizbenzimidazol (33 258 Hoechst) la cual resulta mejor que las obtenidas con otros colorantes fluorocromados como quinacrina y naranja de acridina que habían sido reportados con el mismo efecto por Kato (1974a) y Perry y Wolff (1974); sin embargo la pérdida de la fluorescencia es rápida lo cual dificulta el estudio y la cuantificación de estos eventos, Perry y Wolff (1974) eliminan estas desventajas tiñendo las preparaciones con Giemsa. Posteriormente se han realizado otras modifi-

caciones por otros investigadores entre ellos Kim (1974), Korenberg y Freedlender (1974) y Goto et al. (1978).

En vista de que es importante contar con un sistema sensor de daño genético a bajas concentraciones y ya que se ha demostrado que el tiner produce aberraciones cromosómicas en Vicia faba, en este trabajo se pretende verificar si la inducción de intercambio de cromátidas hermanas es detectable en el sistema biológico mencionado cuando se le aplican tratamientos con bajas concentraciones de esa mezcla de solventes.

MATERIAL Y METODO

Se utilizaron semillas de Vicia faba (var. minor) que se lavaron durante dos horas en agua corriente, dejándose remojar 24 horas con el fin de acelerar la germinación, pasado ese tiempo se sembraron entre dos capas de algodón humedecido con agua de la llave, en charolas que fueron colocadas en la oscuridad y a temperatura constante de $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Al aparecer la radícula se les quitó la testa para evitar la contaminación por hongos. Cuando las raíces alcanzaron 2-3 cm de longitud se introdujeron en una solución de 5-Bromodesoxiuridina (BrdUrd) durante un ciclo de replicación. Inmediatamente después se aplicaron tratamientos de una hora con tiner (Pimex*) en concentraciones de 0.003, 0.006 y 0.012% las cuales son diez veces menores a las que provocaron aberraciones en los cromosomas.

El tiner tiene baja solubilidad en agua por lo que se mantuvo en agitación constante para homogenizar la mezcla y el testigo permaneció en las mismas condiciones pero en agua destilada. Al transcurrir ese lapso las raíces se cambiaron a una solución fresca de timidina (dThd) y en oscuridad durante un segundo ciclo de replicación, con el objeto de eliminar el efecto adverso que tiene la 5-Fdurd sobre los procesos metabólicos de las células.

*Los resultados del estudio por cromatografía de gases, realizado por CEMEF, indican que los componentes del tiner utilizado son: tolueno (2.4%), n-hexano (25.6%), etanol (12.8%), acetato de etilo (6.0%), isopropanol (2.0%), benceno (1.2%) y n-heptano (1.2%).

Posteriormente fueron puestas en una solución de colchicina (0.05%) durante tres horas, en este momento se cortó el meristemo apical de la raíz (aproximadamente 2 mm) y se fijaron en metanol-ácido acético (3:1) por un período de 14-20 horas.

A continuación, los meristemos se incubaron en una solución de pectinasa disuelta en un amortiguador de citratos 0.01M, con un pH de 4.2; durante 1 hora a 37°C. Todo ello con el objeto de romper los enlaces pectídicos de la pared celular de los vegetales. A continuación empleando esta misma solución los cortes fueron aplastados en monocapa ("squash"), en portaobjetos previamente gelatinizados con una mezcla de grenetina al 0.5% y alumbre de cromo al 0.05%.

Las preparaciones se hicieron permanentes empleando la técnica de Conger y Fairchild (1953) congelándolas con hielo seco y separando el cubreobjetos con un bisturí. Después se hidrataron partiendo de etanol 100, 95, 85, 70, 50 y 30% hasta agua destilada.

Enseguida se enjuagaron con 0.5 x SSC (solución salina de citrato de sodio) y fueron teñidas con el colorante fluorocromado Hoechst-33258* durante 30 minutos en la oscuridad, el cual se une a las regiones del cromosoma que incorporan

Hoechst 33258* durante 30 minutos en la oscuridad, el cual se une a las regiones del cromosoma que incorporan cualquier análogo de base, en este caso la 5-Bromodesoxiuridina (5-BrdUrd). Los colorantes fluorocromados como el bizbencimidazol o el naranja de acridina, entre otros se emplean precisamente para visualizar la incorporación de estos análogos de base en el ADN; estos colorantes emiten cierta fluorescencia que disminuye en intensidad ya que átomos pesados como el bromo la alteran (Latt et al., 1982).

Con el objeto de mejorar el contraste diferencial las preparaciones fueron irradiadas con una lámpara de luz ultravioleta y se colocaron a 10 cm de la fuente sobre cajas de Petri conteniendo 0.5 de SSC. La irradiación fue seguida por incubación a 45°C en 0.5 x SSC durante 60 minutos.

Al cabo de este tiempo las preparaciones fueron teñidas con Giemsa (Sigma) al 3% disuelto en agua corriente durante 7 minutos, secadas al aire y posteriormente deshidratadas en xilol y montadas en bálsamo de Canadá.

Por cada concentración se registraron 250 cromosomas subacrocéntricos (S) y 50 cromosomas submetacéntricos (M) que es el número cromosómico correspondiente a 25 metafases. Las preparaciones fueron reetiquetadas para evitar prejuicio del observador.

*La solución se prepara de la siguiente manera.
Solución madre: 0.001/mg de Hoechst-33258 en 1 ml de alcohol etílico, de ahí se toman 0.2 µl (200 µl) y se diluyen en 100 ml de SSC, utilizando cajas Koplín cubiertas con papel aluminio.

Para valorar estadísticamente los resultados se empleó la prueba de "t de Student".

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

Donde:

\bar{X}_1 = media poblacional entre los tratamientos

\bar{X}_2 = media poblacional entre los testigos

$(S_1)^2$ = varianza entre los tratamientos

$(S_2)^2$ = varianza entre los testigos

N_1 = total de metafases analizadas de los tratamientos

N_2 = total de metafases analizadas de los testigos

RESULTADOS

Al observar las preparaciones se nota que el tiner induce intercambios de cromátidas hermanas tanto intersticiales como distales (Fig.1).

En la tabla I aparecen los resultados del primer experimento con varias concentraciones de tiner, notándose que a medida que aumenta la concentración se incrementa la frecuencia de ICH. En la tabla II, se presentan los valores de la repetición del experimento, encontrándose el mismo comportamiento.

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre las frecuencias obtenidas en cada una de las concentraciones de los experimentos, se aplicó la prueba de "t" de Student, notándose que no hay diferencias entre ellos, por lo cual fue posible promediarlos.

En la tabla III y fig. 2 se presentan los promedios de los dos experimentos en donde se observa que a medida que se incrementa la concentración se eleva la frecuencia de ICH, siendo en todos los casos significativamente diferentes al testigo con $p < 0.001$.

En tanto que considerando el criterio del doblaje del efecto

de testigo se nota que solamente en las concentraciones de 0.006 y 0.012% se obtienen resultados significativos (tabla III).

En la fig. 2 se presentan cromosomas con intercambios tanto distales como interticiales.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El hecho de que las primeras observaciones para detectar intercambios de cromátidas hermanas (ICH) se realizaran en células vegetales, no es sorprendente ya que en el período comprendido entre 1938 y 1957 aún no se habían establecido las técnicas citogenéticas modernas en células de mamíferos. Actualmente la mayoría de las investigaciones que están emcaminadas a analizar el ICH se llevan a cabo en células animales, en las cuales se han mejorado los métodos que se basan en la incorporación del análogo de timidina, la 5-Bromodesoxiuridina (BrdUrd), para determinar los intercambios de cromátidas hermanas con gran precisión (Kihlman y Andersson, 1982).

Sin embargo, la técnica de fluorescencia más Giemsa (FMG) ha sido adaptada a células vegetales especialmente en Vicia faba (Kihlman y Kronborg, 1975), Allium cepa (Schvarztman y Cortés, 1977) Tradescantia paludosa (Grant y Goldstein, 1983), Secale cereale (Gill y Kimber, 1974), Zea mays (Hadlaczy y Kalman, 1975) y Hordeum vulgare (Nilan, 1974), entre otras, no obstante hasta el momento son escasos los estudios de intercambios de cromátidas hermanas realizados en plantas.

La principal razón de que existan pocas investigaciones

de ICH en dicho material biológico de prueba se debe a la necesidad de implementación de toda una serie de pasos para vencer obstáculos, tales como la incapacidad de la raíz para incorporar suficiente BrdUrd impidiendo así una buena tinción diferencial de las cromátidas hermanas; la resistencia que ofrecen las paredes celulares a ser aplastadas en monocapa ("squash") y el alto contenido de ARN que provoca una coloración excesiva del citoplasma.

Para incrementar la incorporación de BrdUrd en los meristemas radiculares, se debe suprimir la síntesis de novo del ácido timidílico y esto se logra mediante la adición del análogo de uridina la 5-Fluorodesoxiuridina (5-FduUrd) (Haut y Taylor, 1967); tratamientos prolongados también pueden causar alargamiento del ciclo celular, además de inducir rompimientos cromosómicos (Kihlman, 1971) e inhibir la síntesis del ácido ribonucleico (Rao y Gontcharoff, 1969), por tal razón se agrega de manera simultánea uridina (Urd) para contrarrestar cualquier efecto adverso sobre la síntesis de ARN (Kihlman y Kronborg, 1975); así mismo se debe determinar la concentración óptima de FduUrd que sea capaz de inhibir la síntesis de ácido timidílico pero que no afecte otros procesos metabólicos de la célula (Schvartzman y Cortés, 1977) Como consecuencia la solución estará constituida de 5-BrdUrd, 5-FduUrd y Urd.

A esta solución se exponen las raíces de la planta durante un ciclo de replicación, al cabo del cual pueden crecer en presencia de una solución fresca de BrdUrd (procedimiento que se sigue en Secale cereale) quedando los cromosomas con una cromátida que ha incorporado en una de sus cadenas 5-BrdUrd, mientras que la otra queda sustituida por el análogo de base (TB-BB); o bien las raíces son expuestas durante el segundo ciclo de replicación en timidina obteniéndose cromosomas M_2 que presentan una cromátida unifilarmente sustituida por 5-BrdUrd y la otra sin sustitución (TT-TB).

En cuanto a la resistencia que ofrecen las células vegetales a ser aplastadas en monocapa, este obstáculo se ha podido vencer a través del empleo de ácidos o enzimas capaces de hidrolizar la lámina media de la pared celular, resultando en la disolución de las sustancias pécticas de la misma y en una buena separación de las células meristemáticas (Kihlman y Andersson, 1982).

Todas estas modificaciones han hecho que los procedimientos resultantes para obtener tinción diferencial de las cromátidas hermanas en vegetales sean muy elaborados. En la actualidad se han desarrollado técnicas más sencillas que involucran el menor número de pasos posibles, una de las cuales se basa en la tinción de Feulgen (Tempelaar et al., 1982).

A pesar de las técnicas tan elaboradas, existen algunos aspectos del ICH que se han podido estudiar con mayor detalle en células vegetales que en células animales, esto se debe a que los cromosomas de las plantas son generalmente más grandes, que los de los mamíferos, su número cromosómico es bajo (Vicia faba y Tradescantia paludosa $2n=12$; Secale cereale $2n=14$; Allium cepa $2n=16$) y a la presencia de gran cantidad de células en división (Kihlman y Andersson, 1982). Todas estas características aunadas al bajo costo del sistema y a la fácil manipulación del mismo hacen de las plantas un material muy adecuado para este tipo de estudios (Grant et al., 1981).

Vicia faba ha mostrado ser muy útil y sensible en la inducción de ICH producido por diversos agentes químicos, uno de los aspectos de intercambio que se ha estudiado detalladamente en este sistema es la presencia de intercambios puntuales o diminutos los cuales tienen una dimensión menor al grosor de una cromátida. Kihlman (1975), observa por primera vez dichos intercambios en Vicia faba y posteriormente son estudiados por Schvartzman y Cortés (1977) en Allium cepa. Los intercambios puntuales se presentan tanto en los testigos como en las células tratadas y su tamaño va desde un punto diminuto que está en el límite de la resolución del microscopio de luz,

hasta una línea delgada que recorre la mayor parte del grosor de una cromátida.

Este tipo de ICH se ha reportado como pequeñas regiones en donde están presentes dos intercambios localizados muy cercanos uno a otro.

Hasta ahora los intercambios puntuales o diminutos no han sido descritos en células animales.

De acuerdo con los cálculos hechos por Schweizer (1973) cinco intercambios en el brazo largo de los cromosomas 5 de Vicia faba son suficientes para hacerle parecer isomarcado en toda su longitud. En células de mamíferos se ha demostrado que cuando se presentan intercambios de cromátidas hermanas múltiples muy cercanos unos a otros, provocan aparente isomarcaje (Wolff y Perry, 1974). Este fenómeno ha sido empleado como una evidencia en favor de una constitución polinémica del cromosoma (Peacock, 1963).

La técnica de fluorescencia más Giemsa (FMG) no parece adecuada para demostrar los ICH producidos espontáneamente en las células puesto que tanto la H^3Thd como la BrdUrd empleadas para detectarlos, inducen estos eventos, como ha sido ampliamente demostrado por Marin y Prescott (1964); Kato y Stich (197 Lambert et al. (1976) y Mazrimas y Stetka (1978).

La frecuencia de intercambios parece depender del número de ciclos durante los cuales las células se han expuesto a BrdUrd (Schvartzman et al., 1979) detectándose mayor frecuencia de intercambios en los cromosomas que han estado durante dos ciclos de replicación en una solución de 5-Bromodesoxiuridina (constitución TB-BB) mientras que en los cromosomas que han permanecido un ciclo en BrdUrd y otro en timidina (TT-TB) el promedio de ICH encontrado por metafase es de 23. En este trabajo el valor obtenido es de 30-32 ICH espontáneos por célula en cromosomas de constitución TT-TB, siendo mayor que el descrito por Kihlman y Andersson (1982) para el mismo caso. La diferencia puede deberse a que a pesar de que en ambos trabajos se emplea la misma variedad, estos autores utilizan el tipo Weibulls Akerböna en tanto que en esta investigación se usa el Cochinerá.

La frecuencia de ICH también parece estar relacionada con el contenido de ADN. Kihlman y Kronborg (1975) informan en Vicia faba que la frecuencia de intercambios es aproximadamente proporcional a la longitud del cromosoma; de acuerdo con Gerard y Peacock (1969), el número promedio de ICH en cada cromosoma subacrocentrico (S) es de 1.64 ± 0.04

y el número de intercambios por cada cromosoma metacéntrico (M) es de 4.05 ± 0.16 considerando que el contenido de ADN es de 44 picogramos por célula (Baetcke et al., 1976). Schweizer (1973) menciona un número considerablemente menor de ICH y es el primero en señalar que aparecen agrupados en determinadas regiones mostrando ser más obvios en zonas de heterocromatina, existiendo un exceso significativo de ICH en la región nucleolar y en la constricción primaria de los cromosomas M. El número promedio "espontáneo" de ICH en los cromosomas M y S de Vicia faba encontrados en este trabajo concuerdan con los datos descritos por Gerard y Peacock (1969) ya que para los cromosomas M el promedio de intercambios espontáneos es de 5, mientras que para los S es menor.

Shubert et al. (1979) y Schweizer (1973) han encontrado a través del uso de la técnica de autorradiografía, que en Vicia faba los ICH están distribuidos al azar excepto para la constricción nucleolar; no así en Allium cepa en que los intercambios son más evidentes en las regiones que presentan bandas C (heterocromatina constitutiva).

Estudios recientes llevados a cabo por Friebe (1978)

en cromosomas de Secale cereale muestran que los intercambios son más evidentes en las regiones eucromáticas adyacentes a regiones heterocromáticas lo que concuerda con el mecanismo de formación de ICH propuesto por Painter (1982). Sin embargo Schubart et al. (1980) han encontrado en Hordeum vulgare una distribución de intercambios de cromátidas hermanas independiente de la heterocromatina.

Un agrupamiento similar de ICH entre las uniones de heterocromatina y eucromatina ha sido descrito por Wolff (1977) en células de mamíferos, y en el hombre la frecuencia de ICH aparentemente es mayor entre las regiones claras y oscuras (Bandas G o Bandas Q) (Latt, 1974 ; Hoo y Parslow, 1979). Estas uniones pueden representar regiones entre dos replicones que difieren en la progresión de la "horquilla" y pueden ser más susceptibles a la inducción de ICH (Painter, 1980). Sin embargo la distribución espacial de las mutaciones en células de mamíferos y la influencia sobre ellas de la heterocromatina adyacente es aún incierta (Carrano y Thompson, 1982).

Los intercambios son un fenómeno celular que se evidencia cuando las células han sido tratadas con análogos de bases del ADN; en torno a este fenómeno se han elaborado una serie de hipótesis para explicar su función celular y el proceso molecular que los origina.

La existencia de ICH fué demostrada por primera vez (1957) por Taylor y colaboradores a través de autorradiografías de cromosomas de segunda división después del marcaje con timidina tritiada (H^3 Thd).

En la primera mitosis después de la incorporación de timidina, ambas cromátidas se encuentran marcadas uniformemente y cualquier intercambio que pudiera haber ocurrido se observa hasta la segunda mitosis, ya que cada cromosoma tendrá una cromátida marcada y otra sin marcar. En esa época los mecanismos de formación de los intercambios no podían explicarse porque no se tenía el conocimiento exacto de la estructura de la cromátida, de ahí que con el fin de conocer los mecanismos de formación de ICH, Taylor repitió sus experimentos en Bellavalia romana, una pequeña planta liliacea con cuatro pares de cromosomas. De estos experimentos concluyen que los cromosomas antes de duplicarse y las cromátidas hermanas después de la duplicación, van a estar constituidas por una molécula de ADN, conformada a su vez por dos cadenas complementarias de polinucleótidos proponiendo entonces que la unidad de intercambio es toda la cromátida, ya que si el ICH se efectuara entre una cadena marcada y otra sin marcar, daría por resultado un heteromarcaje; sin embargo, este autor nunca llega a observar dichos fenómenos por

que sugieren que la unidad de intercambio debe ser toda la cromátida. En la segunda mitosis después de la incorporación puede aparecer o no el isomarcaje, lo cual es el resultado de intercambios de media cromátida que en la primera mitosis se evidencian como heteromarcas.

De estos experimentos, Taylor propone que los ICH se producen por la recombinación de segmentos del ADN entre las dos cromátidas de un cromosoma, comprendiendo las dos cadenas complementarias de polinucleótidos que forman la molécula de ADN que constituye cada cromátida. La reunión de polinucleótidos solo se lleva a cabo entre aquellos que muestran solo la misma polaridad proponiéndose que esta recombinación de segmentos entre cadenas sencillas de polinucleótidos con la misma polaridad probablemente representa un mecanismo de reparación post-replicativo que actúa después de un rompimiento del ADN, de forma tal que si se trata de un cromosoma uninémico una de las cadenas será nueva y otra vieja, quedando marcada una y la otra sin marcar para cada cromátida del cromosoma metafásico pudiéndose evidenciar de esta manera los ICH.

Con base en esta hipótesis Kato (1974b) y posteriormente Kihlman y Sturelid (1978) experimentan con cafeína, que es un agente inhibidor de la reparación por recombinación

post-replicativa. Lehman y Kirk-Bell (1974), realizan tratamientos combinados de cafeína y agentes tales como luz ultravioleta y mitomicina C observando que los intercambios inducidos por estos, disminuyen notablemente con la cafeína, mientras que la frecuencia de aberraciones cromosómicas aumenta. Dichos hallazgos hicieron pensar que realmente los ICH pueden ser la manifestación de un proceso de reparación, Kato propone entonces que la formación de los intercambios se realiza de dos maneras, una que opera en los lugares en donde se está llevando a cabo la replicación probablemente utilizando la maquinaria de replicación del ADN y la otra cuya acción solamente es en la porción post-replicada del ADN, siguiendo los modelos de entrecruzamiento propuestos por Whitehouse (1963) (Fig.3) y Holliday (1964) (Fig.4).

Para que se inicie el primer proceso se requiere un extremo libre resultante de un rompimiento de una sola cadena del ADN sustituido por BrdUrd que se puede aparear o unir con la secuencia complementaria de una región parcialmente desnaturalizada de la doble hélice de ADN (que no ha sido rota) correspondiente a la cromátida

hermana. . Este primer proceso también puede llevarse a cabo presentándose dos rompimientos para que se inicie la formación de ICH uno de ellos va a estar dado por la cadena naciente del ADN y la separación temporal de las histonas que facilita el proceso. Este mecanismo es en esencia similar al modelo de recombinación de Meselson y Radding (1975) (Fig. 5).

El segundo camino para el intercambio, se efectúa cuando el proceso de reparación, que trata de subsanar el daño al ADN, es perturbado de alguna manera y solo funciona en las regiones post-replicadas de ADN, de manera similar al modelo de Holliday (1964), que explica el entrecruzamiento. Este modelo requiere de dos rupturas, cada una en una banda de las cromátidas hermanas y del desplazamiento del extremo libre de una de ellas hasta el punto de ruptura permitiendo la interacción de las dos moléculas de ADN (Fig.4).

Uno de los últimos modelos que se han propuesto para explicar la formación de intercambios de cromátidas hermanas es el de Painter (1982), el cual se basa en la idea de que los ICH se presentan con más frecuencia en los sitios de unión entre grupos de replicones. De acuerdo

a este modelo cuando el ADN es afectado por algún agente químico o físico que producen inhibición en la elongación de la cadena de polinucleótidos, dicho daño provoca retardo en la duplicación de ciertos agrupamientos de replicones. Este hecho finalmente lleva a la existencia de regiones del ADN no replicadas adyacentes a regiones replicadas en donde se originan rompimientos de doble banda por acción de topoisomerasas. En ocasiones los rompimientos son sellados de tal forma que los filamentos recién sintetizados de las regiones replicadas se unen a bandas no replicadas dando lugar a la formación de ICH. (Fig. 6).

De acuerdo con la clasificación de Kihlman et al. (1978) quien reúne en dos grupos a los agentes físicos y químicos que inducen aberraciones en los cromosomas:

1.-Aquellos cuyos efectos se expresan sin importar el estado del ciclo en el que se encuentran las células sobre las que actúa (S-independientes).

2.-Los que producen los cambios que van a ser de acuerdo a la fase del ciclo en que las células son afectadas (S-independientes).

En el primer grupo se pueden citar los agentes alquilantes y la radiación ultravioleta (Bender et al., 1973) y dependen de la síntesis de ADN para que se exprese la aberración, mientras en el segundo grupo al que pertenecen los rayos X, antibióticos como la estreptonigrina y las oxipurinas metiladas originan aberraciones independientemente de la síntesis de ADN.

Hasta el momento se han reportado gran número de sustancias con efecto S-dependiente que incrementan la frecuencia de ICH en Vicia faba (Kihlman, 1985; Peterson y Setlow, 1972; Andersson et al., 1980). Sin embargo, algunos agentes que se consideran de efecto S-independientes como la luz ultravioleta de onda larga (Natarajan et al., 1980) y el antibiótico estreptonigrina (Kihlman y Odonork, 1975) han probado inducir ICH, por lo que Andersson (1981) propone considerar a estos agentes solo parcialmente S-independientes. Esto puede ser el resultado del daño a las bases antes de que se rompa la doble hélice ya que más tarde puede provocarse aumento en las aberraciones cromosómicas, lo que implica que los mecanismos de producción de ICH y de aberraciones cromosómicas deben ser al menos en parte diferentes, lo cual es apoyado por los resultados obtenidos con cafeína que aumenta la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas por agentes con efecto S-dependiente y tienen poco a ningún efecto sobre la frecuencia de ICH inducida por los mismos agentes.

Con base en lo mencionado, Gómez-Arroyo (1980) muestra que el tiner es un agente S-independiente pero como en este trabajo se encuentra que el tiner aumenta la frecuencia de ICH en Vicia faba, su efecto es solo parcialmente S-independiente similarmente a la luz ultravioleta de onda larga y al antibiótico estreptonigrina.

Los datos obtenidos en esta investigación posiblemente se apegan al modelo descrito por Painter (1982) quien rechaza que el ICH se produzca por rompimientos homólogos de las cromátidas, porque en este caso se esperaría una curva que reflejara dos eventos; sin embargo, el intercambio requiere solo de un evento (rompimiento de banda doble), lo cual es consistente con los datos que muestran que los ICH se forman como una función lineal con la dosis. Lo cual es congruente con los resultados puesto que se encuentra una respuesta lineal de la concentración del tiner con respecto a la producción de ICH, proponiéndose que la acción molecular que se lleva a cabo pueda ser similar a la propuesta por Gómez-Arroyo et al. (datos no publicados) para la producción de aberraciones ya que como se menciona anteriormente el tiner tiene un comportamiento S-independiente y este tipo de agentes provocan rompimientos de doble banda al ADN; además Painter (1982) sugiere que aquellos agentes que retardan o bloquean la elongación

de la cadena pueden ser efectivos inductores de ICH. En contraste, agentes que inhiben la síntesis de ADN primariamente suprimiendo la iniciación total de racimos, tales como la radiación ionizante, no inducen muchos ICH. El hecho de que algunas concentraciones del tiner produjeran frecuencias elevadas de ICH implica que es un efectivo inductor de este fenómeno y que probablemente el mecanismo involucrado es el bloqueo de la elongación de las cadenas de ADN.

El hecho de haber obtenido en este trabajo un alto número de ICH inducidos por tiner en Vicia faba demuestra que este material tiene suficiente sensibilidad para expresar el daño sobre el material genético. Y con ello puede concluirse que este disolvente es un agente químico que debe ser considerado altamente tóxico, puesto que concentraciones sumamente bajas son capaces de producir daño genético.

REFERENCIAS

- Aksoy, M., Dincol, D., Erdem, S., Akgun, T., Doncol, G. (1972) Details of blood changes in 32 patients with pancytopenia associated with long-term exposure to benzene. *Brit. J. Ind. Med.* 29, 56-64.
- Altamirano, L.M. (1981) Intercambio de cromátidas hermanas en cromosomas de linfocitos humanos inducidos in vitro por varios alcoholes. Tesis. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Andersson, H.C. (1981) Induction of sister chromatid exchanges by streptonigrin, an antibiotic and antineoplastic agent. *Hereditas* 95, 141-148.
- Andersson, H.C. Kihlman, B.A. y Palitti, F. (1980) Production of sister chromatid exchanges by X-rays under aerobic conditions. *Hereditas* 95, 41-44.
- Arcos, C.J. y Argus, F.M. (1968) Molecular geometry and carcinogenetic activity of chromatic compounds. *New Perspect. Adv. Cancer Res.* 11, 305-471.
- Baetcke, K.P., Sparrow, A.H., Nauman, C.H. y Schwemmer, S.S. (1967) The relation-ship of DNA content to nuclear and chromosome volumens and to radiosensitivity (LD50) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 58, 533-539.
- Barroso-Moguel, R. (1975) Alteraciones morfológicas producidas por inhalantes. *Cuadernos Científicos CEMEF* 2, 97-105.
- Barrios, D.L. y Devoto, J.S. (1931) Comentarios sobre l'accion tóxica del "Baniz", "Tini" y "Pomada" *Sem. Med. B. Aires*, I, 252.

Bender, M.A., Griggs, H.G. y Walker, P.L. (1973) Mechanisms of chromosomal aberrations production. I. Aberration induction by ultraviolet light. *Mutat. Res.* 20, 387-402.

Browning, E. (1975) Toxicity and metabolism of industrial solvents. Elsevier Amsterdam.

CEMEF. (1976) ¿Cómo identificar las drogas y sus usuarios? Programa Nacional de Combate a los Problemas de Drogas. México. 41-42.

Cohen, S. (1973). The volatile solvents. *Public. Health Rev.* 2, 185-200.

Craig-Holmes, A.D. (1977) Effects of 6 carcinogens on SCE frequencies and cell kinetics in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.* 46, 375-384.

Crespi, V., Di Costanzo, M., Ferrario, F., Tredici, G. (1970). Electrophysiological findings in workers exposed to n-heptane fumes. *J. Neurol.* 222, 135-138.

Dávila, C. (1981) Efectos producidos por el n-heptano en los cromosomas de las células meristemáticas de la raíz de haba (Vicia faba). Tesis. Facultad de Ciencias, UNAM, México.

Donner, M., Husgafoel-Pursianin, K., Maki-Paakkanen, J. Sosa, M. y Vainio, H. (1980) Genetic effects of in vivo exposure to toluene. X Anual Meeting of EMMS on Enviromental Mutagenesis. Atenas Grecia, Sept. 14-19.

Doorn, R. van, Leijdekkers Ch. M. y Henderson P. Th. (1980) Electrophilic intermediates in the metabolism of toluene and xilenes in rat a metabolic pathway involving sequencial side-chain oxidation, sulphation and glutatione conjugation. Toxicol. Lett., S.I. No. 1 (Abstracts of the Second International Congress on Toxicology Bruselas p. 219.

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.

Fassett, D.W. (1963) Esters. En: Industrial and Toxicology. Ed. D.W. Fassett Vol.2 Interscience, Inish Nueva York p.p.1847.

- Ferrara-Castro, L. (1976) Estudio de un grupo de menores que inhalan tñer y la observaci3n de rasgos de personalidad. Cuadernos Cientificos CEMEF 5, 3-40.
- Friebe, B. (1978) Unteruchugen zum schuiester chromatide naustausch bei Secale cereale. Micros. Acta 81, 159-165.
- Funes-Cravioto, F., Zapata-Gayon, C., Kolmodin, B., Lambert, B., Lindsten, J., Norberg, E., Skj3ld, M., Olin, R. y Swensson, Å. (1977). Chromosome aberrations and sister chromatid exchange in workers in chemical laboratories and a rototyping factory and in children of women laboratory workers. Lancet 2, 322-325.
- Gallaher, E.J. y Loomis, I.A. (1975) Metabolism of ethylacetate in the rat: hidrolisis to ethyl alcohol in vitro and in vivo. Toxicol. Appl. Pharmacol. 34, 301-313.
- Gerard, C.R. y Peacock, W.J. (1969) Sister chromatid exchange in Vicia faba. Mutat. Res. 7, 215-223.
- Gerarde. H.W. (1973) Gases y vapores nocivos. II Hidrocarburos y mezclas de hidrocarburos. En farmacologfa m3dica. Prensa M3d. Mex. M3xico 1187-1206.
- German, J. (1972) Gases wich increase chromosomal inestability in somatic cells and predispose to cancer. Prog. Med. Genet. 8, 61-101.

- Gill, B.S. y Kimber, G. (1974) The Giemsa C-banding karyotype of rye. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 71, 1247-1249.
- Gómez-Arroyo, S. (1980) Efectos cromosómicos del tiner y algunos de sus principales componentes en Vicia faba. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. UNAM, México.
- Goto, K., Maeda, S. Kano, Y. y Guqiyama Y. (1978) Factors involved in differential Giemsa staining of sister chromatids. Chromosoma 66, 351-359.
- Grabsky, A. (1961) "Toluene"sniffing producing cerebellar degeneration. Amer. J. Psychiat. 118, 461-462.
- Grant, W.F. y Goldstein, L.D. (1983). Sister chromatid exchange in Tradescantia. A first report. Genetics Soc. Canada Bull. 14, 51.
- Grant, W.F., Zinov'eva -Stahevitch, A. y Zura, K.D. (1981) Plant Genetic test systems for the detection of chemical mutagens. En: Short -term test for chemical carcinogens Nueva York. p.p. 200-216.
- Gutiérrez-Flores, 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.

- Hadlaczky, G. y Kelman, L. (1975): Discrimination of Homologous chromosomes of maize with Giemsa staining. *Heredity* 35, 371-374.
- Haut, W.F. y Taylor, J.H. (1967) Studies of bromouracil deoxyriboside substitution in DNA of bean roots (*Vicia faba*) *J. Mol. Biol.* 26, 389-401.
- Haydon D.A., Hendry B.M., Levison, S.R. y Requena, J. (1977) Anaesthesia by the n-alkanes: A comparative study of nerve impulse blockage and the properties of black lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 470, 17-34.
- Herskowitz, A., Ishii, N. y Schaumburg, H. (1971) n-Hexane neuropathy. A syndrome occurring as a result of industrial exposure *New Engl. J. Med.* 285, 82-85.
- Holliday, R. (1964) A mechanism for gene conversion in fungi *Genet. Res. (Camb.)* 5, 282-304.
- Hoo, J.J. y Parslow, M.I. (1979) Relation between the SCE points and the DNA replication bands. *Chromosoma* 73, 67-74.
- IARC. (1974) Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans, IARC. Monographs 7, 203-222.

Infante, P.F., Rinsky, R.A., Wagner, J.K. & Young, R.J. (1977)

Leukemia in benzene workers. *Lancet*. 2, 76-78.

Kato, H. (1974a) Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a-BudR³-labelling method. *Nature* 251, 70-72.

Kato, H. (1974b) Induction of sister chromatid exchanges by chemical mutagens and its possible relevance to DNA repair. *Exp. Cell Res.* 85, 239-247.

Kato, H., & Stich, N.F. (1976) Sister chromatid exchanges in aging and repair-deficient human fibroblast. *Nature* 260, 447-448.

Kihlman, B.A. (1971) Molecular mechanisms of chromosome breakage and rejoining, *Advanc. Cell Molec. Biol.* 1, 59-108.

Kihlman, B.A. (1975) Sister chromatid exchanges in Vicia faba II. Effects of thiotepa, caffeine and 8-ethoxy-caffeine on the frequency of SCEs. *Chromosoma* 51, 1-10.

Kihlman, B.A. (1977) *Caffeine and Chromosomes*, Elsevier Amsterdam, pp. 304.

- Kihlman, B.A. y Andersson, H.C. (1982) Sister chromatid exchanges in plants En: Sister Chromatid Exchange Wiley Nueva York pp. 261-263.
- Kihlman, B.A. y Kronborg, D. (1975) Sister chromatid exchanges in Vicia faba. I. Demonstration by a modified fluorescent plus giemsa (FPG) technique. *Chromosoma* 51, 1-10.
- Kihlman, B.A. y Odmark, G. (1975) Deoxiribonucleic acid synthesis and the production of chromosomal aberrations by streptonigrin, 8-ethoxycaffeine and 1,3,7,9-tetramethyluric acid. *Mutat. Res.* 2, 494-505.
- Kihlman, B.A. y Sturelid, S. (1978) Effects of caffeine on the frequencies of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges induced by chemical mutagens in root tips of Vicia faba. *Hereditas* 88, 35-41.
- Kihlman, B.A., Natarajan, A.T. y Andersson, H.C. (1978) Use of the 5-bromodeoxyuridine-labelling technique for exploring mechanisms involved in the formation of chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 52, 181-198.
- Kim, M.A. (1974) Chromatidaustausch und Heterocromatinveränderungen menschlicher Chromosomen nach BudR-Markierung. Nachweis mit Benzimidazolfluorochrom und Giemsa-farbstoff, *Humangenetik* 25, 179-188.

- Korenberg, J.R. y Freedlender, F., (1974) Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. *Chromosoma* 48, 355-370.
- Korenberg, J.R. y Freedlender, F. (1979) Giemsa technique for detection of sister chromatid exchanges. A new assay for tranplacental mutagens. *Nature* 279, 531.
- Kronevi, T., Wahlaerg, J., y Holmberg B. (1977) Hitopathology of skin, liver and kidney after epicutaneous administration of five industrial solvents to Guinea pigs. *Environ. Res.* 19, 56-69.
- Kuna, R.A. y Kapp, R.W. Jr. (1981) The embriotoxic teratogenic potential of benzene vapor in rats *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 57, 1-7.
- Lambert, B. Hansson, K., Lindsten, J., Sten, M. y Werelius, B. (1976) Bromodeoxyuridine induced sister chromatid exchanges in human limphocytes. *Hereditas* 83, 163-174.
- 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. (U.S.A.)* 71, 3162-3166.

- Latt, S.A., Stetten, G., Juergens, I.A., Willard, H.F. y Scher, C.D. (1975) Recent developments in the detection of deoxyribonucleic acid synthesis by 33 258 Hoechst fluorescence. *J. Histochem. Cytochem.* 23, 493-505.
- Latt, S.A., Scheck, R., Loveday, K.S., Dougherty, C.P. y Shuler, C.F. (1980) Progress in Human Genetics (Symposium), Nueva York, pp. 267-331.
- Latt, S.A. y Wohleb, J.C. (1975) optical studies of the interaction of 33 258 Hoechst with DNA chromatin and metaphase chromosomes. *Chromosoma* 52, 297-316.
- Lehmann, A.R. y Kirk-Bell, S. (1974) Effects of caffeine and theophylline in DNA synthesis in unirradiated and UV-irradiated mammalian cells. *Mutat. Res.* 26, 73-82.
- López, R.G. (1980) Efectos producidos por el alcohol metílico en los cromosomas de las células meristemáticas de la raíz de Vicia faba. Tesis. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Lutz, W.K. y Schlatter, C.H. (1977) Mechanism of carcinogenic action of benzene. Irreversible binding to rat liver DNA. *Chem. Biol. Interact.* 18, 241-245.
- Marin, G. y Prescott, D.M. (1964) The frequency of sister chromatid exchanges following exposure to varying doses of ³H-thymidine or X-rays. *J. Cell. Biol.* 21, 159-167.

Marsden, C.B. y Seymour, M. (1943) Solvents Guide. Cleorer
Hune Press LTD. Londres.

Mazrimas, J.A. y Stetka D.G. (1978) Direct evidence for the
role of incorporated BudR in the induction of sister
chromatid exchanges. Exp. Cell Res. 117, 23-30.

Mc Clintock, B. (1938) The production of homozygous
deficient tissues with mutant characteristics by
means of the aberrant mitotic behaviour of ring-
shaped chromosomes. Genetics 23, 315-376.

Meselson, M.S. y Hadding, C.M. (1975) A general model for
genetic recombination. Proc. Nat. Acad. Sci.
(U.S.A.) 72, 358-361.

Moeschlin, S. y Speck, B. (1976) Experimental studies
on the mechanism of action of benzene on the bone
marrow radioautographic studies using ^3H -Thymidine.
Acta Haematol. 38, 104-111.

Morimoto, K, y Wolff, S. (1980) Increase of sister chromatid
exchanges and perturbations of cell division
kinetics in human lymphocytes by benzene metabolites.
Cancer Res. 40, 1189-1193.

Morvai, V. Aranka, H. Ungváry, G. y Varga, B. (1976) Egg changes
in benzene, toluene and xylene poisoned rats, Acta Med. Acad.
Sci. Hung. 33, 275-286.

- Nakano, J. y Kessinger, J.M. (1971) Cardiovascular effects of ethanol, its congeners and synthetic bourbon in dogs. Eur. J. Pharmacol. 17, 195-201.
- Nakano, J., Moore, S.E. y Kessinger, C.L. (1973) Myocardial depressant action of ethyl acetate. J. Pharm. Pharmacol. 25, 1018-1020.
- Natarajan, A.T., Kihlman, B.A. y Obe, G. (1980) Use of the 5-bromodeoxyuridine-labelling technique for exploring mechanisms involved in the formation of chromosomal aberrations. II. G1 experiments with Chinese hamster ovary cells. Mutat. Res. 73, 307-317.
- Nilan, R.A. (1974) Barley (Hordeum vulgare). En: Handbook and Protist R.C. King Nueva York. Plenum pp. 93-110.
- Norppa, H., Skytta, E., Donner, M., Sorsa, M. y Vainio, H. (1980) Mutagenicity of vinyl toluene. X Annual Meeting of EMMS on Environmental Mutagenesis Atenas Grecia. Sept. 14-19.
- Painter, R.B. (1980) A replication model for sister chromatid exchange. Mutat. Res. 70, 337-341.
- Painter R.B. (1982) Replication model for sister chromatid exchange En: Sister Chromatid Exchange. Alan R. Ed. Nueva York. pp. 115-121.

- Paterson, M.C. y Sellow R.B. (1972) Endonucleolytic activity from Micrococcus luteus that acts on γ -ray-induced damage in plasmid DNA of Escherichia coli minicells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 2927-2931.
- Peacock, W.J. (1963) Chromosome duplication and structure as determined by autoradiography. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 49, 793-801.
- 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 exchanges. Nature 258, 121-125.
- Picciano, D. (1979) Cytogenetic study of workers exposed to benzene. Environ. Res. 19, 33-38.
- Rao, B., Gontcharoff, M. (1969) Functionality of newly synthesized DNA as related to RNA synthesis during mitotic cycle in Physarum polycephalum. Exp. Cell Res. 56, 269-274.
- Roe, O. (1955). The metabolism and toxicity of methanol. Pharmacol. Rev. 7, 399-412.
- Rodríguez-Arnaíz, R. (1982) Efectos genéticos del tñer y de algunos de sus componentes en Drosophila melanogaster. Tesis Doctoral. Facultad Ciencias (Biología) UNAM. México.

- Rojas, C.E. (1984) Efectos genéticos del acetato de etilo en Drosophila melanogaster. Tesis. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Savolainen, H. y Pfäffli, P. (1980) Neurochemical effects on rats of n-heptane inhalation exposure. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 9, 727-732.
- Schubert, I., Sturelid, S., Döbel, P. (1979) Intra-chromosomal distribution patterns of mutagen induced sister chromatid exchanges and chromatid aberrations in reconstructed karyotypes of Vicia faba Mutat. Res. 59, 27-38.
- Schubert, I., Künzel, G., Bretschneider, H., Rieger, R., y Nicoloff, H. (1980) Sister chromatid exchanges in barley. Theor. Appl. Genet. 54, 1-4.
- Schwarzman, J. y Cortés, F. (1977) Sister chromatid exchanges in Allium cepa. Chromosoma 62, 119-131.
- Schwarzman, J.B., Cortés, F., González-Fernández, A., Gutiérrez, C. y López-Sáez J.F. (1979) On the nature of sister-chromatid exchanges in 5-Bromodeoxyuridine-substituted chromosomes. Genetics 92, 1250-1264.
- Schweizer, D. (1973) Vergleichende Untersuchungen zur Langsdifferenzierung der Chromosomen von Vicia faba L. Verhandl. Naturf. Ges. Basel. 83, 1-75.
- Seminario, M. (1978) Women workers: Hazards on the Jobs. AFL-CIO American Federation of Laborers. Estados Unidos de Norteamérica.

- Spencer, P.S. y Shaunburg. H.H. (1977) Neurotoxic properties of certain aliphatic hexacarbons. Proc. Roy. Soc. Med. 70, 37.
- Seppäläinen, A.M., Raitta, C. y Huuskonen, M. (1979) n-hexane-induced changes in visual evoked potentials and electroretinograms of industrial workers. Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 47, 492-498.
- Seth, P.K. y Srivastava, S.P. (1974) Biochemical changes induced by ethyl acetate in blood and liver of the rat. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 12, 612-616.
- Stoss, F.W. y Haines, T.A. (1979). The effects of toluene on embryos and fry of the Japanese medaka Oryzias latipes with a proposal for rapid determination of maximum acceptable toxicant concentrations. Environ. Pollut. 20, 139-137.
- Takeuchi, I., Ono, Y., Hisanaga, N., Kith, S. y Suguera, Y. (1980) A comparative study on neurotoxicity of n-pentane, n-hexane and n-heptane in the rat. Brit. J. Ind. Med. 37, 241-247.
- Takeshi, K., Santella, R., Pulkrabek, P. y Jeffrey, A.M. (1981) Benzene oxide: genetic toxicity. Mutat. Res. 91, 99-102.
- Tempelaar, M.J., de Both M.T.J. y Versteegh, J.E.G. (1982) Measurement of SCE frequencies in plants: a simple Feulgen-staining procedure for Vicia faba Mutat. Res. 103, 231-236.

Tareeff, E.M., Kontchalovskaya, N.M. y Zorina, L.A. (1963)

Benzene leukemias. Acta Unio. Int. Contra. Cancrum,
19, 751-755.

Tatrai, E., Ungaváry, G., Hudák, A., Rodics, K., Lorincz, M.

y Barcza, G. (1980) Concentration dependence of
the embryotoxic effects of benzene inhalation in CFY
rats. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 24,
363-371.

Taylor, J.H., Woods, P.S. y Hughes, W.L. (1957) The organization

and duplication of chromosomes as revealed by
autoradiographic studies using tritium-labelled
thymidine Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 43, 122-128.

Tice, R.R., Costa, D.L. y Drew R.T. (1980) Cytogenetic

effects of inhaled benzene in murine bone marrow
Induction of sister chromatid exchanges, chromosomal
aberrations and cellular proliferation inhibition
in DBA/2 mice. Genetics 77, 2148-2152.

Tunek, A., Platt, K.L., Bentley, P. y Oesch, F. (1978)

Microsomal metabolism of benzene to species
irreversibly binding to microsomal protein and
effects of modifications of this metabolism.

Mol. Pharmacol. 14, 920-929.

- Ungváry, G., Aranka, H., Tatrai, E., Lorunez, M. y Folly, G. (1978) Effects of vinyl chloride exposure alone and in combination with tripan blue-applied systematically during all thirds of pregnancy on the fetuses of CFY rats. *Toxicology*. 11, 45-54.
- Vigliani, E.C., Saita, G. (1964) Benzene and leukemia. *N. Engl. J. Med.* 271, 872-876.
- Vigliani, E.C. y Forni A. (1976) Benzene and leukemia. *Environ. Res.* 11, 122-127.
- Watanabe, G. y Yoshida, S. (1970) The teratogenic effect of benzene in pregnant mice. *Acta Med. Biol.* 17, 285-291.
- Whitehouse, H.L.K. (1963) A theory of crossing-over by means of hybrid deoxyribonucleic acid. *Nature* 199, 1034-1040.
- Winston, S. y Matsushita, T. (1975) Permanent loss of chromosome initiation in toluene treated Bacillus subtilis cells. *J. Bacteriol.* 123, 921-927.
- Wolff, S. (1977) Sister Chromatid exchanges. *Ann. Rev. Genet.* 11, 183-201.
- Wolff, S. y Perry, P. (1974) Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography. *Chromosoma* 48, 341-353.
- Wolff, S., Rodin, B. y Cleaver, J.E. (1977) Sister chromatid exchanges induced by mutagenic carcinogens in normal and Xeroderma pigmentosum Cells. *Nature*, 265, 345-347.

Yager, J.W. (1973) Congenital malformations and enviromental influence. *J. Occup. Med.* 15, 724-728.

Yamamura, Y. (1979) "n-hexane polyneuropathy". *Folia Psychiatrica et Neurologica Japonica* 23, 45-57.

Zakharov, A.F. y Egolina, N.A. (1972) Differential spirilization along mammalian mitotic chromosomes.I. BudR-revealed differentiates in Chinese hamster chromosomes. *Chromosoma* 38, 341-355.

TABLA I. 1er. Experimento

FRECUENCIA DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDAS POR TINER EN Vicia faba

TRATAMIENTO (%)	\bar{X} ICH \pm E.E.	"t" de Student
Testigo	32.52 \pm 1.1389	
0.003	43.60 \pm 2.6489	2.92 *
0.006	58.44 \pm 2.2964	7.54 **
0.012	80.00 \pm 4.6422	8.21 **

* $p < 0.01$

** $p < 0.001$

TABLA II. 2o. Experimento

FRECUENCIA DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDAS POR TINER EN Vicia faba

TRATAMIENTO (%)	\bar{X} ICH \pm E.E.	"t" Student
testigo	28.48 \pm 0.9697	
0.003	44.32 \pm 1.3263	6.89 *
0.006	62.56 \pm 1.9800	11.55 *
0.012	74.92 \pm 3.618	10.12 *

* $p < 0.001$

TABLA III

FRECUENCIA PROMEDIO DE LOS EXPERIMENTOS I Y II DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS

HERMANAS INDUCIDOS POR TINER EN Vicia faba

TESTIGO (%)	\bar{X} ICH \pm E.E.	't' Student
testigo	30.50 \pm 0.8026	
0.003	43.96 \pm 1.4818	5.8921 *
0.006	60.50 \pm 1.5446	12.7812 *
0.012	77.46 \pm 2.9652	12.4632 *

* $P < 0.001$

Fig.1 Cromosomas acrocéntricos mostrando intercambios(a) distales

(b) intersticiales.



(a)



(b)

Fig.2 Intercambios de Cromátidas Hermanas inducidos por
tíner en Vicia faba

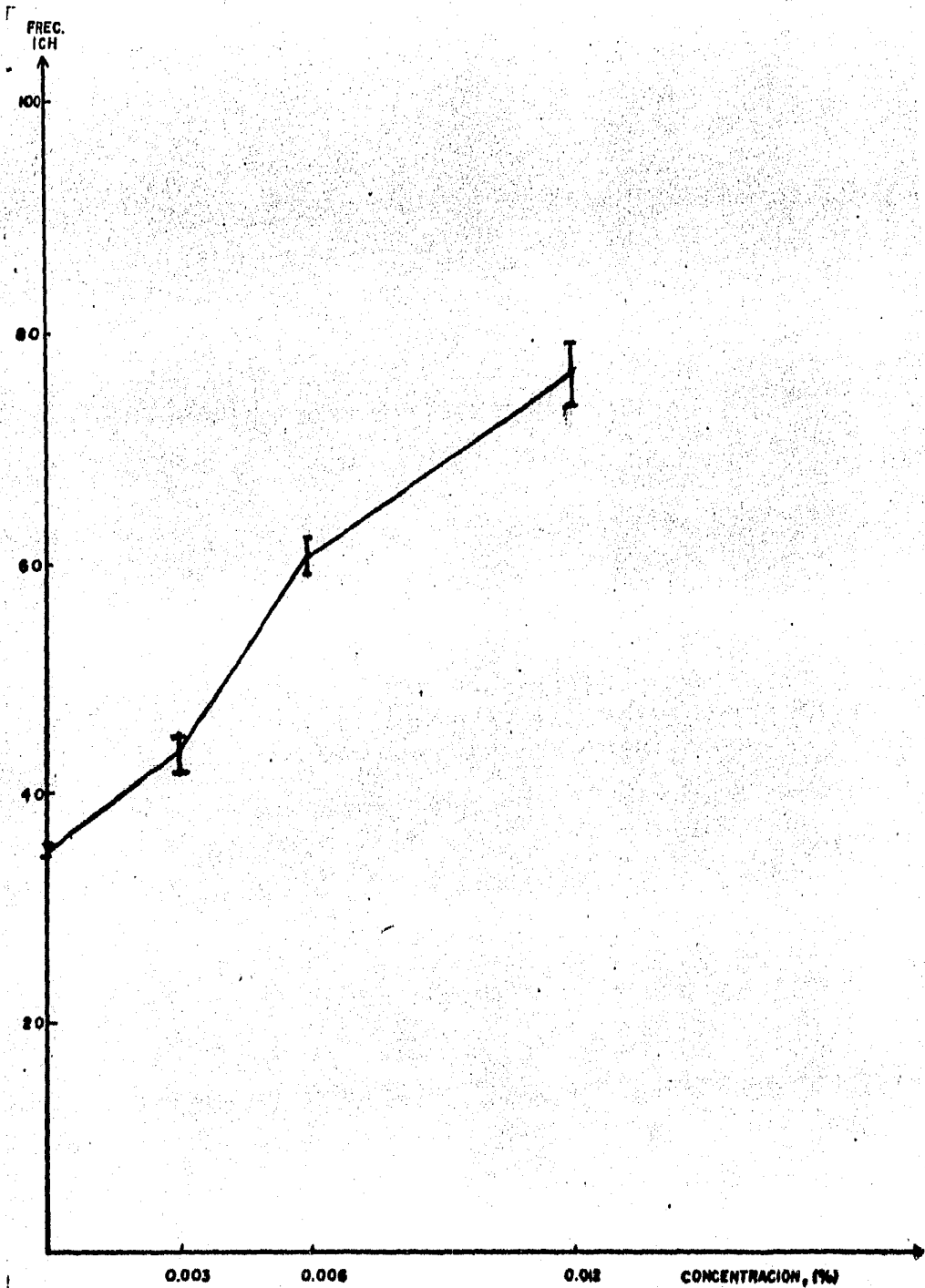
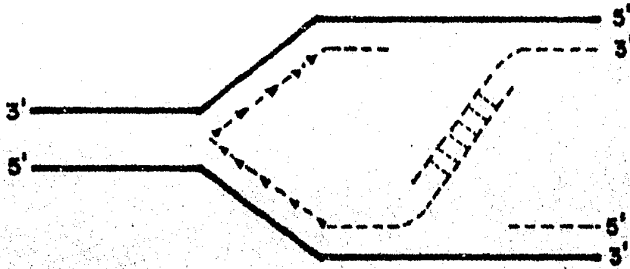
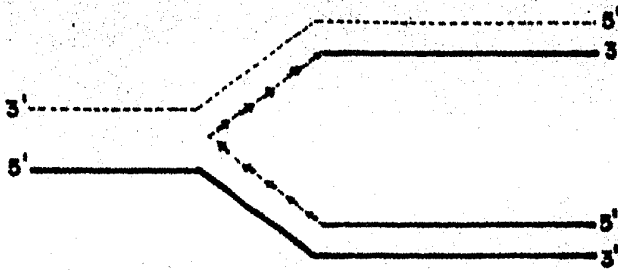


Fig.3. Modelo propuesto por Whitehouse (1963) para explicar la recombinación genética.

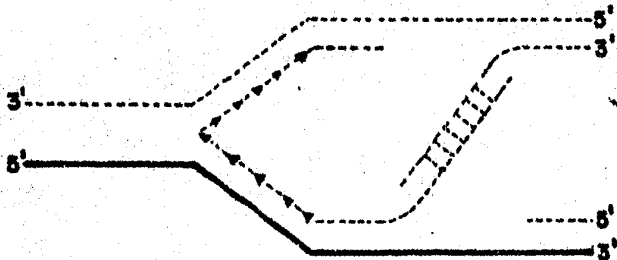
WHITEHOUSE (1963)



1^o Ciclo



2^a Con Thd



2^a Con Brdu

Fig.4. Modelo descrito por Holliday (1964) para la recombinación genética.

HOLLIDAY, 1964

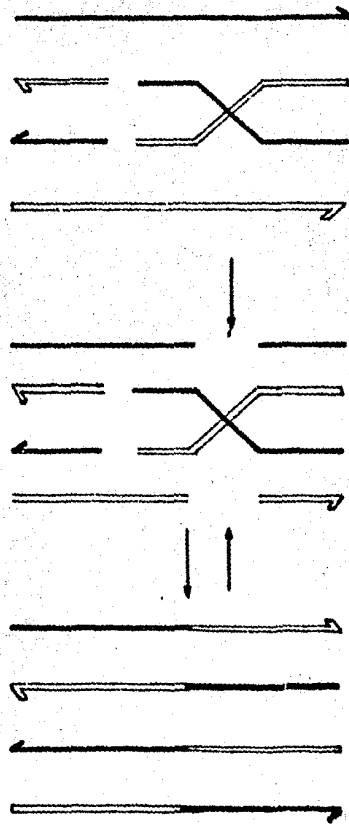
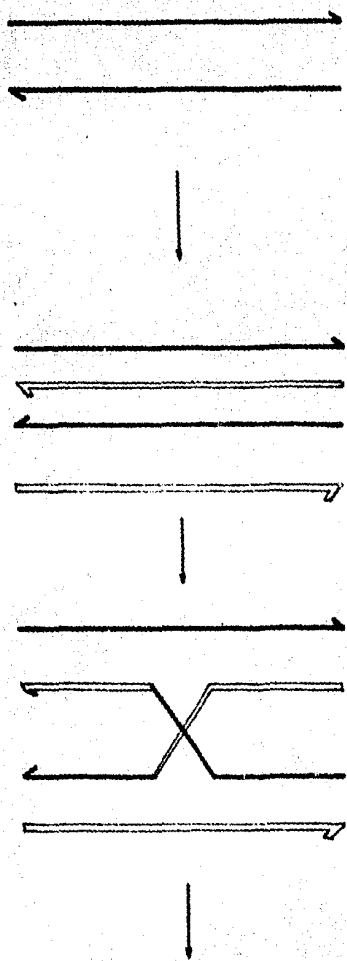
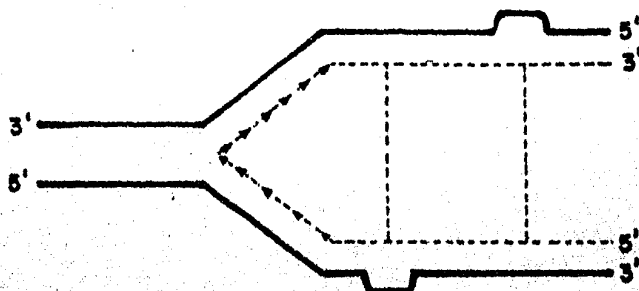
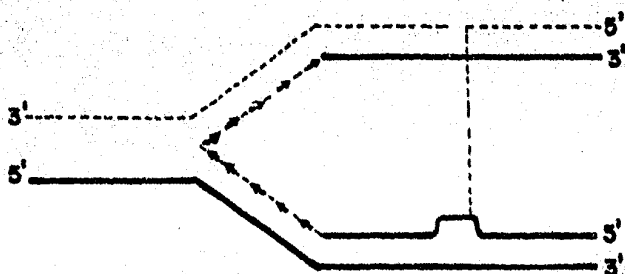


Fig. 5. Modelo de recombinación propuesto por Meselson y Radding (1975).

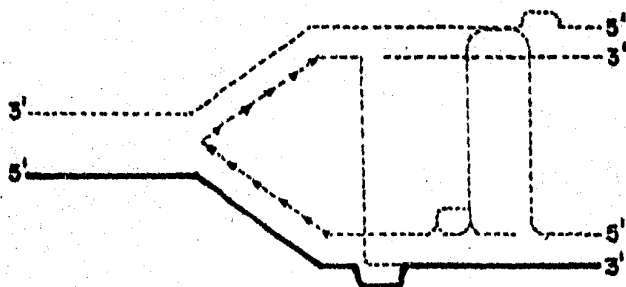
MESELSON - RADDING (1975)



1^o Ciclo



2^o Con Thd



2^o Con Brdu

**Fig. 6. Modelo de intercambio de cromátidas hermanas
sugerido por Painter (1982).**

PAINTER (1982)

