

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFECTO DEL DIMETIL SULFOXIDO (DMSO) SOBRE  
LAS CELULAS MERISTEMATICAS DE LA  
RAIZ DE *Vicia faba*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

PRESENTA

PEDRO RAFAEL VALENCIA QUINTANA

REALIZADA BAJO LA DIRECCION DE LA

DRA. SANDRA GOMEZ ARROYO

EN EL LABORATORIO DE CITOGENETICA Y  
MUTAGENESIS AMBIENTALES DEL  
CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMOSFERA

202

2ej.



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 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.

## INDICE

<b>CONTENIDO</b>	<b>PAGINA</b>
RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	3
MATERIALES Y METODOS .....	13
RESULTADOS .....	17
DISCUSION Y CONCLUSIONES .....	21
BIBLIOGRAFIA .....	35
TABLAS Y FIGURAS .....	51

## **EFFECTO DEL DIMETIL SULFOXIDO (DMSO) SOBRE LAS CELULAS MERISTEMATICAS DE LA RAIZ DE *Vicia faba***

### **RESUMEN**

Se determinó el efecto del DMSO sobre los cromosomas de las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*, probándose diversas concentraciones (0.10, 1.00, 5.00, 10.00, 20.00, 30.00 y 40.00 % v/v) de este disolvente. Los resultados indicaron que causa daño a nivel genético, originando alteraciones como son aberraciones cromosómicas, cromosomas con el centrómero inactivado, isocromosomas y disturbios en el huso acromático, que se observaron en células en anafase. También se registró la presencia de micronúcleos en células en interfase y se observó su incidencia sobre el índice mitótico.

## EFFECTO DEL DIMETIL SULFOXIDO (DMSO) SOBRE LAS CELULAS MERISTEMATICAS DE LA RAIZ DE *Vicia faba*

### INTRODUCCION

El sulfóxido de dimetilo (DMSO), es un compuesto químico extraordinario y controvertido. Fue sintetizado por primera vez en el año de 1866 por Alexander Saylzeff. Actualmente se obtiene como un subproducto común en la manufactura de la pulpa de papel e industrias relacionadas (Leake, 1967). Comercialmente es extraído del petróleo y por oxidación del sulfuro de dimetilo (DMS) (Pearson *et al.*, 1981).

Existen informes limitados de su presencia en la naturaleza. Ha sido encontrado en: aceite de hierbabuena (Canova, 1971), leche descremada (Ferretti y Flanagan, 1972), cereales (Boyco *et al.*, 1978), cebada y malta (Anness *et al.*, 1979, citados por Pearson *et al.*, 1981) y aguas naturales (Andreae, 1980a). La ocurrencia de éste en medios de crecimiento de fitoplanctón hace pensar que es un producto del metabolismo de las algas (Andreae, 1980b). Es responsable de los aromas característicos de muchos alimentos (Self *et al.*, 1963; Miers, 1966; Tressl *et al.*, 1977).

En la tabla I se muestra una revisión de sus diferentes propiedades físicas realizada por diversos autores.

Su molécula tiene una estructura química piramidal, con átomos de azufre, oxígeno y carbono en las esquinas. El enlace azufre-oxígeno es completamente polar, de tal forma que su constante dieléctrica es elevada. Esta polaridad y geometría permiten una considerable organización en el estado líquido, en el que se encuentra asociado en cadenas por atracción dipolar (Lindberg, 1961, citado por McGregor, 1967).

Es una substancia aceitosa, incolora, con pH de 7 y peso molecular de 78.1 (de la Torre *et al.*, 1981). Su constante dieléctrica permite una

fácil separación de cargas y por lo tanto es buen disolvente para gran variedad de moléculas iónicas, polares y polarizables. Debido al aumento de la densidad electrónica en el átomo de oxígeno y a su capacidad estérica, disuelve cationes en general (McGregor, 1967).

Lindberg (1961, citado en McGregor, 1967), ha estimado que el enlace de hidrógeno entre el DMSO y el agua es 1 1/3 veces más fuerte que el que hay entre las moléculas del agua. La capacidad para competir efectivamente por los grupos donadores de hidrógenos es un factor importante en su acción.

Presenta las reacciones típicas de un sulfóxido alifático. Cede o gana electrones cuando interactúa con agentes oxidantes o reductores poderosos, respectivamente (McGregor, 1967).

El incremento de su uso en química orgánica es, en gran medida, el resultado de sus amplias propiedades como disolvente y su actividad química única (Agami, 1965). Sus reacciones análogas en sistemas biológicos pueden jugar un papel importante en sus atributos medicinales (Jacob *et al.*, 1964).

Es un disolvente dipolar aprótico, debido a su tendencia de aceptar, más que donar protones. El compuesto puro está altamente asociado y posee una estructura ordenada. Su asociación es termolábil entre 40° y 60 °C y en este aspecto es similar al agua, que presenta un cambio estructural a 37 °C (Rammler y Zaffaroni, 1967).

Esta sustancia puede ser representada en la forma polarizada que se esquematiza en la figura 1A, de esta manera, tanto el oxígeno como el azufre tienen pares electrónicos libres.

Las amplias propiedades como disolvente que lo caracterizan son el resultado de su capacidad para producir solvatos por interacciones dipolo-dipolo o asociaciones disolvente-soluto por enlaces hidrofóbicos (Brown *et al.*, 1963). Es extremadamente higroscópico y miscible en agua en todas las proporciones. Es probable que se establezca una asociación 2:1 con el agua (Cowie y Toporowski, 1961). La formación del complejo hidratado está acompañada de una considerable evolución de calor, la posible estructura se presenta en la figura 1B. Como se menciona anteriormente, se ha sugerido que los enlaces de hidrógeno que existen entre el agua y éste son más fuertes que los que hay entre las moléculas de agua (Cowie y Toporowski, 1961).

Sus características fisicoquímicas lo hacen un disolvente poco usual, por lo cual es ampliamente utilizado en la industria (Pearson *et al.*, 1981). Esta facultad junto con sus extraordinarias cualidades de penetración han

hecho que sea empleado en la agricultura para ayudar al transporte de los elementos nutritivos, así como para el control de enfermedades en los vegetales (Leake, 1967; Smale *et al.*, 1975).

El DMSO puede atravesar la barrera dérmica rápidamente en concentraciones altas, llevándose a cabo esto con muy poco o ningún daño tisular permanente (Kligman, 1965a, 1965b; Perlman y Wolfe, 1966; Goldman *et al.*, 1967; Sulzberger *et al.*, 1967).

Es razonable asumir que la visible e inofensiva permeabilidad a través de una barrera proteica, cuya conformación integral es dependiente de la captura de agua, es el resultado de cambios configuracionales reversibles de estas proteínas debidos a la sustitución del agua por el disolvente (Rammmler y Zaffaroni, 1967).

Su efectividad como perturbante estructural está relacionada no sólo con sus características químicas especiales sino también con su tamaño. Debido a su pequeña dimensión, puede penetrar regiones de las subunidades proteicas más fácilmente que otros disolventes (Rammmler y Zaffaroni, 1967). Así, parece ser extremadamente efectivo alterando la configuración de las proteínas.

Este compuesto tiene dos propiedades biológicas muy importantes. La primera, es su capacidad para proteger gran variedad de células de los efectos perjudiciales de la congelación, almacenamiento y descongelación a muy bajas temperaturas. La segunda concierne a la modificación del daño inducido por los rayos-X en células vegetales y en una amplia diversidad de sistemas biológicos, cuando está presente antes y durante la exposición a la radiación (Ashwood-Smith, 1967).

Su acción protectora contra los efectos de la radiación y en parte la de materiales biológicos almacenados en congelación, pueden ser atribuídos a su capacidad para capturar radicales libres perjudiciales así como a su habilidad para deshidratar a las células y reemplazar los enlaces de agua (Roubal y Tappel, 1966; Singh *et al.*, 1976). Otra propiedad química que puede ser utilizada inespecíficamente por la célula, es su disposición para ser oxidado (Fig. 2).

A partir del momento en que se descubre su aptitud para penetrar la piel, se sugiere su uso clínico potencial (Leake, 1967) y se promueven investigaciones intensivas acerca de sus características farmacológicas (Jacob y Rosebaum: 1967; Jacob y Herschler, 1975; Wood y Wood, 1975).

Su actividad biológica parece ser amplia y benigna. Simultáneamente con los estudios farmacológicos en modelos experimentales de laboratorio, se han hecho evaluaciones de su eficacia terapéutica clínica, encontrándo-

sele un amplio espectro de atributos. En muchos aspectos el caso del DMSO es único, ya que parece mitigar gran número de condiciones clínicas diferentes, además de tener gran rango de propiedades farmacológicas (Wood y Wood, 1975), dentro de las cuales se pueden citar su capacidad para penetrar las membranas (Juel-Jensen *et al.*, 1970; Ashton *et al.*, 1971; Inglot y Woyton, 1971; Levine *et al.*, 1971; Robinson y Dover, 1972), su eficiencia antiinflamatoria (Weissman *et al.*, 1968; Görög y Kovács 1968, 1969), de vasodilatación (Bonnareaux, 1971; Zetler y Langhof, 1971; Stewart *et al.*, 1972; de la Torre *et al.*, 1973), de bloqueo nervioso (Paul, 1966, 1967; Penrod *et al.*, 1967; Becker *et al.*, 1969), de relajación muscular (Birkmayer *et al.*, 1966), de inhibir a la colinesterasa (Sams *et al.*, 1966), de analgésico (Shealy, 1966), así como la de ser un agente diurético (Formanek y Suckert, 1966), y bacteriostático (Jacob *et al.*, 1964; Seibert *et al.*, 1967; Kunze y Klein, 1971).

Se le atribuyen cualidades fibrinolíticas, así como el de ser diferencialmente citotóxico (Jacob y Rosembaum, 1967). Se le considera útil en el tratamiento de artritis reumatoide (Zuckner *et al.*, 1967; Matsumoto, 1967); escleroderma (Gries *et al.*, 1967; Scherbel y McCormack, 1967; Engel, 1972) y condiciones inflamatorias poco severas (Steinberg, 1967). De igual manera puede ayudar en el transporte de esteroides a través de la piel (Djan y Gunberg, 1967; Maibach y Feldman, 1967; Wood *et al.*, 1967).

El DMSO es un compuesto químico ampliamente empleado. Se ha probado en animales utilizando varios métodos y vías de administración, es así que sus propiedades han sido y están bien documentadas en el aspecto clínico y farmacológico, al igual que sus características para afectar importantes macromoléculas biológicas, además de su acción crioprotectora sobre una variedad de células y de sus efectos radioprotectores sobre diferentes sistemas biológicos (Jacob y Rosembaum, 1967; Leake, 1967; Kaul, 1970; Mazar, 1972; Reuvers *et al.*, 1973; Jacob y Herschler, 1975; Singh *et al.*, 1976; de la Torre *et al.*, 1981).

Sin embargo, la investigación sobre su posible actividad mutagénica ha sido limitada (Singh *et al.*, 1976; Kapp y Eventoff, 1980).

Respecto a su efecto mutagénico, existen contradicciones, ya que se ha descrito como negativo en algunos sistemas de prueba y como capaz de presentar, o de alterar dicha actividad en otros.

El DMSO ha sido considerado desde el punto de vista de su uso como disolvente para agentes químicos que son insolubles en agua y que van a probarse para determinar su posible mutagenicidad. El examen de compues-



tos orgánicos moderadamente solubles para detectar su actividad mutagénica *in vitro* es frecuentemente llevada a cabo agregando el compuesto en un disolvente orgánico y posteriormente diluído con agua o amortiguador. Estos disolventes son en ocasiones tóxicos en los sistemas empleados para los análisis y por esta razón sólo unos cuantos han sido ampliamente usados. Las sustancias que han tenido gran aceptación como solubilizadores presentan en general baja toxicidad y usualmente no son mutagénicas. De hecho, muchos de ellos son empleados como testigos cuando se llevan a cabo ensayos rutinarios de mutagenicidad. Es conocido que los disolventes orgánicos afectan la conformación de las membranas y proteínas (Abbondandolo *et al.*, 1980), siendo también posible que estén alterando las respuestas mutagénicas (Ashby y Styles, 1978; Herman *et al.*, 1978, 1980; Abbondandolo *et al.*, 1980).

En *Schizosaccharomyces pombe*, el DMSO se describe como incapaz de provocar duplicación de la frecuencia espontánea de mutaciones bajo condiciones experimentales, presentando baja toxicidad en todas las dosis probadas (0.50, 2, 5 y 10% v/v) (Abbondandolo *et al.*, 1980).

Su toxicidad sobre la viabilidad celular en *Saccharomyces cerevisiae*, es examinada para 4 horas a temperatura ambiente en un rango de concentraciones del 5 al 30% (v/v). No se observa muerte apreciable a 10% y a 30% la sobrevivencia es del 50% , las levaduras permanecen en fase estacionaria de crecimiento (Singh *et al.*, 1976).

Se ha descrito como mutagénicamente inactivo en la prueba de *Salmonella* con activación metabólica (McCann *et al.*, 1975).

No induce alteraciones genéticas en larvas de *Drosophila melanogaster* (Mollet *et al.*, 1974; Mollet, 1976).

Los resultados mostrados por Mazar (1972), en un estudio sobre efectos radioprotectores a *D. melanogaster*, indican que éste provee radioprotección tanto a nivel del individuo como genético.

Sus efectos han sido investigados en la prueba de *Salmonella* con activación metabólica empleando 2-aminoantraceno, en que varias concentraciones de DMSO son usadas para disolverlo y se obtienen diversas respuestas. El incremento en la concentración del disolvente puede reducir o aumentar la manifestación mutagénica en las bacterias a este compuesto (Anderson y McGregor, 1980). Como ha sido sugerido por Herman y colaboradores (1978), los efectos pueden ser interpretados en términos de la reacción entre el compuesto mutagénico y el disolvente.

La actividad de la p-fenilenediamina en la prueba de Ames en *Salmonella*, con activación metabólica, es marcadamente influida por el uso del

DMSO como disolvente y por la edad de la solución previa al tratamiento. Soluciones acuosas de p-fenilenediamina no son mutagénicas, así como tampoco recién preparadas con DMSO sin embargo, éstas últimas al permanecer durante 4 horas a temperatura ambiente son altamente activas (Burrnett *et al.*, 1982).

Células de la cepa D<sub>4</sub> de *Saccharomyces cerevisiae*, recolectadas de cultivos en fase logarítmica de crecimiento sobre glucosa, son capaces de metabolizar el DMSO a productos genéticamente activos en la misma célula. Los resultados presentados por Callen y Philpot (1977) muestran que éste puede ser activado a mutágeno. Es posible que el compuesto sea metabolizado a dimetilsulfona (DMSO<sub>2</sub>), un metabólito que ha sido aislado en plantas (Smale *et al.*, 1975); sin embargo, no existe información disponible referente a la mutagenicidad de esta última (Callen y Philpot, 1977).

Inhibe la mutagenicidad de la N, N-dimetilnitrosamina, (DMN). Cuando es utilizado como disolvente, el efecto mutagénico de la DMN no se detecta y el de la dietilnitrosamina (DEN) se reduce. La vía de acción para producir este efecto es desconocida (Yahagi *et al.*, 1977).

Su incidencia sobre las levaduras ha sido investigada por Yee y colaboradores (1972), determinándose que con la exposición a concentraciones cada vez más elevadas se obtiene un decremento en la viabilidad celular al rebasarse el 20% (v/v). Su inclusión en el medio de cultivo da como resultado la conversión de levaduras normales a deficientes respiratorias o "petites". Este efecto mutagénico requiere de crecimiento celular para su expresión. El mecanismo de esta inducción es desconocido, pero parece ser que la mutación es de naturaleza citoplásmica.

La adición de 5% de DMSO a cultivos de *Euglena gracilis* en fase logarítmica de crecimiento causa inhibición inmediata de la división celular y de la motilidad sin bloquear completamente la división nuclear (Vannini y Poli, 1983).

También provoca, en varios tipos celulares, impresionantes rearrreglos de las estructuras que contienen actina, como la desaparición de los microfilamentos del citoplasma y la formación de haces de actina dentro del núcleo interfásico (Fukui y Katsumaru, 1980; Osborn y Weber, 1980; Sanger *et al.*, 1980; Wehland *et al.*, 1980).

Los efectos radioprotectores del DMSO, también han sido demostrados en vegetales. Un pretratamiento con 10% (v/v), reduce la muerte de las semillas, el daño de las mismas, así como las rupturas cromosómicas en *Triticale* (Kaul, 1970). Previamente a este informe se le había encontrado capaz de reducir significativamente las aberraciones cromosómicas induci-

das por la radiación en *Vicia faba* y su nivel de eficiencia es mucho más alto que el de muchos otros agentes radioprotectores en plantas (Kaul, 1969).

La mutagenicidad del DMSO *in vivo* ha sido estudiada en ratas. Los resultados indican que causa daño cromosómico en las células de la médula ósea de estos organismos. El efecto es estadísticamente significativo aún en concentraciones bajas (1 %). Hay una marcada elevación en el daño citogenético cuando la concentración se incrementa del 50 al 100 %. La razón para este fenómeno no está clara, es posible que los mecanismos de reparación genética de las células de mamífero sean capaces de cubrir sus efectos a bajos niveles, pero son ineficientes en las concentraciones más altas del disolvente (Kapp y Eventoff, 1980).

También es significativo el número de células severamente dañadas que se observan en la concentración mayor (100 %). Parece que este alto nivel altera drásticamente la configuración cromosómica, causando pérdida de la integridad del cromosoma (Kapp y Eventoff, 1980). La investigación de las propiedades químicas de la interacción del DMSO/cromatina en ADN aislado indica que lo desestabiliza, aún en concentraciones de menos del 10 % (Lapeyre y Bekhor, 1974).

Los efectos citogenéticos descritos en esta revisión, claramente indican la necesidad de mayor investigación sobre la actividad genética de este disolvente. Se han analizado varias concentraciones (1, 10, 50 y 100 %), en células de médula ósea de rata, para determinar aberraciones incluyendo rupturas cromosómicas y cromatídicas, intercambios, anillos, cromosomas dicéntricos y células severamente dañadas. Las rupturas cromosómicas no revelan diferencias entre los grupos tratados y el testigo, en tanto que las cromatídicas están significativamente aumentadas sobre el testigo, excepto en 10 %. La incidencia de intercambios, anillos y cromosomas dicéntricos es significativamente elevada cuando se compara con el testigo. Sólo en 100 % se encuentra un incremento significativo en la frecuencia de células más alteradas. Cuando los daños anteriores son combinados, el porcentaje resultante de células aberrantes por animal en 1 % de DMSO fue de 10 % y de 68.67 % de células anómalas en 100 % (Kapp y Eventoff, 1980).

Se considera que los datos obtenidos hasta ahora, son pocos y los que existen son contradictorios. Por lo tanto, es importante utilizar más sistemas de prueba para conocer con certeza el efecto que a nivel cromosómico puede presentar el DMSO.

Debido a que es difícil hacer experimentación directa sobre el hombre, se han creado otros sistemas de prueba, actualmente se conocen diver-

sos de ellos que abarcan gran variedad de organismos tanto animales como vegetales, los cuales han sido desarrollados para ser usados como indicadores del daño citogenético inducido por agentes tanto químicos como físicos, con el fin de obtener una visión más completa del riesgo que implican para el hombre (Environmental Mutagen Society, 1975).

Un sistema adecuado para evaluar el daño citogenético, lo constituyen las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*, ya que pueden ser consideradas como el tejido ideal para estudiarlo, puesto que son fácilmente manejables y existen gran número de células en división. Además las células de las puntas de las raíces son directamente expuestas a la sustancia en cuestión y pueden ser estudiados los efectos de concentraciones conocidas. Por otra parte, este material combina la ventaja de que esta disponible todo el año y es poco costoso (Kihlman, 1971a, 1975).

Esta planta se ha utilizado ampliamente para detectar el daño cromosómico producido tanto por las radiaciones como por una amplia variedad de mutagenos químicos (Bell *et al.*, 1976; Ma, 1982). El sistema ha sido establecido sobre el principio de que los agentes solubles en agua pueden ser fácilmente absorbidos dentro de los tejidos meristemáticos (Ma, 1982).

El complemento cromosómico de *V. faba* consiste de 5 pares de cromosomas de igual longitud con centrómeros subterminales (S-cromosomas), y un par con centrómeros medios (M-cromosomas), su número cromosómico diploide es de 12. Los cromosomas metacéntricos contienen una constricción (nucleolar) secundaria que separa un gran satélite del resto del cromosoma (Kihlman, 1971a, 1975).

En los exámenes citogenéticos en *V. faba*, el sistema mitótico de las puntas de las raíces es ampliamente usado y mejor validado cuando las aberraciones son utilizadas como indicadores de mutagenicidad. Este tipo de ensayo es eficiente en la selección preliminar de los mutágenos químicos además de confiable como indica la experiencia (Ma, 1982).

El promedio de la duración del ciclo celular de la raíz principal de *V. faba*, es de 19.3 horas a 19 °C y sus períodos presintético ( $G_1$ ) de 4.9 horas, sintético (S) de 7.5 horas, postsintético ( $G_2$ ) de 4.9 horas y la mitosis de 2 horas (Evans y Scott, 1964).

En el caso de estas células cuyo ciclo celular tiene una duración entre 16 y 20 horas, se pueden distinguir dos tipos de efectos producidos por diversos agentes. Uno de ellos es el obtenido de 0 a 8 horas después de 1 a 4 horas de exposición al agente químico y se conoce como efecto "no retardado" (Kihlman, 1966), induciéndose alteraciones cromatídicas al menos 3 horas después de iniciado el tratamiento y teniendo su máxima

frecuencia entre las 4 y las 10 horas siguientes, en este caso, los agentes provocan aberraciones en células que han completado su síntesis de ADN (que se encuentran al final de S ó en G<sub>2</sub>). Si las anomalías se presentan entre las 8 y 48 horas después del tratamiento, se considera que hay un efecto "retardado" y presumiblemente actúan en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, por lo que las frecuencias pico se manifiestan entre las 24 y las 48 horas siguientes (Kihlman, 1963, 1966). El retardo en la aparición de las aberraciones está relacionado con el tiempo de tratamiento y no como resultado del alargamiento del ciclo celular (Kihlman, 1966).

Se han descrito dos tipos de agentes físicos y químicos que dañan a los cromosomas produciendo aberraciones (Kihlman, 1963; Bender *et al.*, 1974; Kihlman *et al.*, 1978; Natarajan y Obe, 1978). En el primer grupo se encuentran los agentes que al inducir lesiones en los cromosomas, en cualquiera de las etapas del ciclo celular, es necesaria la síntesis de ADN para que dichas lesiones se transformen en aberraciones como resultado de errores en la replicación ("mis-replication") (Evans, 1966), por ello se les considera S-dependientes. Estas aberraciones son únicamente del tipo cromatídico. A este grupo pertenecen los agentes alquilantes y las radiaciones ultravioleta (Bender *et al.*, 1973). Las alteraciones producidas por estos agentes son rompimientos de banda sencilla y daño a las bases del ADN (Kihlman *et al.*, 1978). En el segundo grupo se sitúan los agentes cuyos efectos no requieren de la síntesis de ADN para ser expresados como aberraciones, es decir, que son S-independientes. Las alteraciones provocadas son del tipo subcromatídico, cromatídico y cromosómico. En este caso los cambios que se causan dependen del estado del ciclo celular en el que están las células que son afectadas. Las lesiones inducidas por estos agentes se desarrollan produciendo alteraciones en los cromosomas como resultado de errores en la reparación ("mis-repair") (Evans, 1977), las cuales se originan al dañarse las bases y por rompimientos de banda sencilla o doble del ADN (Kihlman *et al.*, 1978). En este grupo se incluyen los rayos-X, antibióticos como bleomicina y pleomicina así como algunas oxipurinas metiladas (Kihlman, 1977).

Debido a la importancia del DMSO como agente terapéutico, así como disolvente, en conjunción con exámenes *in vivo* e *in vitro*, se pretende establecer la curva de concentración-efecto de éste, en la inducción de alteraciones cromosómicas en las células del meristemo de la raíz principal de *Vicia faba*, así como su acción en la división celular, con el propósito de evaluar su posible actividad mutagénica.

## MATERIALES Y METODOS

Las semillas de *Vicia faba* variedad *minor*, se lavaron en agua corriente durante 2 horas. Posteriormente fueron imbibidas en agua de la llave durante 24 horas con el propósito de acelerar la germinación. En seguida se pusieron a germinar entre dos capas de algodón humedecido a 20 °C en la oscuridad.

Cuando apareció la radícula, la testa fue removida y al medir la raíz principal de 3 a 4 cm, previamente a los tratamientos, se eliminó la cofia, para evitar que este tejido obstaculizara la observación de las células meristemáticas.

Se prepararon soluciones frescas de DMSO con las siguientes concentraciones: 0.10, 1, 5, 10, 20, 30 y 40 % (v/v), en un volumen de 100 ml cada una.

Las diversas soluciones se colocaron en cristalizadores que se cubrieron con papel aluminio, el cual fue perforado previamente para introducir las raíces de las plántulas por estos orificios, de tal manera que quedaron en contacto con el líquido.

El tiempo de tratamiento fue de 4 horas con 2, 18 y 44, de recuperación. Una vez transcurrido el lapso de exposición, las raíces de las plántulas fueron lavadas y se dejaron en la recuperación, la cual se llevó a cabo en un baño de agua corriente con aereación y temperatura constantes (20°C), en la obscuridad durante los tiempos ya estipulados.

Se formaron varios grupos, cada uno de ellos con 15 plántulas, para ser sometidos a las diferentes concentraciones de DMSO, de las cuales correspondieron 5 para cada tiempo de recuperación.

Los lotes testigos, uno por cada tiempo de recuperación se mantuvieron bajo las mismas condiciones de tratamiento con la excepción de que las raíces se sumergieron en agua destilada.

Transcurridos los tiempos de recuperación, las raíces se sacaron del baño y lavaron con agua corriente.

Se cortaron 2 mm de la punta de la raíz y fueron colocados en portaobjetos excavados con unas gotas de HCl 5N, para hidrolizarlas, durante 10 min. Posteriormente se retiró el ácido y se agregaron unas gotas de aceorfeína\* y se dejaron ahí durante 20 min.

A continuación las puntas de las raíces se trasladaron a portaobjetos planos que contenían unas gotas de ácido acético al 45 %. Rápidamente se colocó un cubreobjetos y se hizo presión con la goma de un lápiz para que se llevara a cabo el aplastamiento del tejido en monocapa ("squash") y se metieron al congelador.

Para hacer las preparaciones permanentes se utilizó la técnica de Conger y Fairchild (1953), acomodándolas sobre hielo seco hasta que estuvieron completamente congeladas. Posteriormente se desprendió el cubreobjetos con un bisturí y se deshidrataron con dos cambios rápidos de butanol absoluto, se secó el exceso de alcohol y se montaron en bálsamo de Canadá (Gómez-Arroyo, 1980).

Las preparaciones fueron reetiquetadas antes del análisis para evitar prejuicios del observador.

La identificación de las alteraciones cromosómicas se realizó en anafase, registrando fragmentos sencillos y dobles, puentes cromatídicos y cromosómicos, al igual que cromosomas con el centrómero inactivado e isocromosomas. Al azar se analizaron 1000 células en interfase para determinar la incidencia de micronúcleos, así como el índice mitótico (IM), que se obtuvo de la manera siguiente.

$$IM = \frac{\text{NUMERO DE CELULAS EN DIVISION}}{\text{NUMERO TOTAL DE CELULAS}}$$

\* Para su preparación se usaron 3 g de orceína sintética y 100 ml de ácido acético al 70 %, los cuales se mezclaron y calentaron a reflujo durante 2 horas, se dejaron enfriar y se filtraron.

El análisis estadístico se hizo mediante la prueba de diferencia de proporciones (Spiegel, 1970) cuya fórmula es:

$$p = \frac{N_1 P_1 + N_2 P_2}{N_1 + N_2}$$

$$q = 1 - p$$

$$\sigma (P_1 - P_2) = \sqrt{p \cdot q \left( \frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} \right)}$$

$$z = \frac{P_1 - P_2}{\sigma (P_1 - P_2)}$$

donde:

$N_1$  = total de células analizadas en el testigo

$N_2$  = total de células analizadas en cada concentración

$P_1$  = índice mitótico del testigo expresado como porcentaje

$P_2$  = índice mitótico en cada concentración expresado como porcentaje

$\sigma (P_1 - P_2)$  = desviación estándar de los índices mitóticos

$z$  = valor crítico

$p$  = probabilidad de encontrar células en mitosis

$q$  = probabilidad de encontrar células en interfase

Se realizó un experimento y su repetición para cada una de las siete concentraciones probadas.



## RESULTADOS

El efecto producido por el DMSO en los cromosomas de las células meristemáticas de la raíz principal de *Vicia faba*, se evalúa mediante el análisis de las alteraciones que se presentan en células en anafase después de 4 horas de tratamiento con 2, 18 y 44 horas de recuperación.

Se registran aberraciones tales como fragmentos sencillos y dobles, puentes sencillos y dobles. También se encuentran alteraciones tales como cromosomas con el centrómero inactivado e isocromosomas, así como anafases multipolares. En células en interfase se detectan micronúcleos. En general se observa una alteración por anafase, pero en ocasiones hay más de una.

Las tablas II a VIII, muestran las frecuencias de las alteraciones producidas por el disolvente con las diferentes concentraciones y distintos tiempos de recuperación. De forma general se observa que sólo las aberraciones presentan una respuesta consistente con las concentraciones usadas, no así los demás parámetros registrados.

Las alteraciones cromatídicas (fragmentos sencillos y puentes sencillos), aparecen en todas las concentraciones y tiempos de recuperación (Tablas II a VIII).

Las aberraciones cromosómicas (fragmentos dobles y puentes dobles), se registran después de 22 y 48 horas de iniciado el tratamiento, en frecuencias bajas respecto a las cromatídicas, pero no en todas las concentraciones (Tablas III a VII). A partir de las 22 horas surgen en 10, 20 y 30 % (Tablas V a VII) y en 48 horas en 1, 5, 10, 20 y 30 % (Tablas III a VII).

Los cromosomas con el centrómero inactivado se advierten en la mayoría de las concentraciones y tiempos de recuperación, en tanto que los isocromosomas lo hacen con menos frecuencia (Tablas II a VIII).

Las anafases multipolares se manifiestan en todas las concentraciones, excepto en 5 % (Tabla IV) y en la mayoría de los tiempos de recuperación. Para las 6 horas en 1, 10, 30 y 40 % (Tablas III, V, VII y VIII), a las 22 horas en 0.10, 10, 30 y 40 % (Tablas II, V, VII y VIII), para 48 horas después de iniciado el tratamiento a partir de 10 % hasta la concentración más alta (Tablas V a VIII).

Las micronúcleos se evidencian en todos los tiempos de recuperación y en todas las concentraciones (Tablas II a VIII).

Las tablas IX, X y XI incluyen las frecuencias de las alteraciones obtenidas con las diferentes concentraciones para 2, 18 y 44 horas de recuperación respectivamente. La tabla XII y la figura 5, resumen los promedios de todos los tiempos de recuperación para cada concentración. En estas tablas se observa, en general, que en las concentraciones de 0.10 y 1% se incrementa el número de anafases y después disminuye al elevarse la concentración hasta 20 %, evidenciándose un aumento en 30 y 40%. Para anafases anormales y aberraciones totales (Figs. 3, 4 y 5), así como alteraciones del tipo cromatídico (fragmentos sencillos más puentes sencillos) (Fig. 6), se determina que su frecuencia se eleva al aumentar la dosis alcanzando su máximo valor en 20 %, disminuyendo en 30 y 40 %. Para anomalías cromosómicas (fragmentos dobles más puentes dobles) (Fig. 6) se nota el mismo comportamiento aunque sus frecuencias son más bajas, respecto a las cromatídicas.

Para el caso de cromosomas con centrómero inactivado, isocromosomas, anafases multipolares y micronúcleos no se encuentra una relación entre su incidencia y las diferentes concentraciones usadas.

La figura 3 compara las frecuencias de anafases anormales inducidas en los tres diferentes tiempos de recuperación, lo mismo para la incidencia de aberraciones totales, se representa en la figura 4.

En la figura 6 se comparan los porcentajes de aberraciones cromatídicas y cromosómicas.

El índice mitótico es otro criterio que se evalúa para determinar el daño producido por el DMSO a diversas concentraciones. Los valores obtenidos se muestran en la tabla XIII y en la figura 7, observándose incremento en las dos concentraciones más bajas para posteriormente disminuir, hasta 20 %. En 30 y 40 % se obtiene aumento respecto al valor mínimo que se alcanza.

Por medio de la prueba de diferencia de proporciones (Spiegel, 1970), se observa que en 1% hay efecto estimulante, en 20 y 30% se nota inhibición mientras que en las demás concentraciones los valores no presentan diferencias significativas cuando se comparan con el testigo (Tabla XIII).

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Para prevenir el riesgo y determinar el potencial mutagénico de un compuesto, se recomienda utilizar sistemas biológicos de prueba cuyos resultados se obtengan a corto plazo, sean de manejo sencillo y repetibles, aporten datos fáciles de interpretar y que además sean confiables (Dabney, 1981).

Las plantas superiores se han usado ampliamente en el estudio de los efectos genéticos de gran variedad de mutágenos, tanto químicos como físicos, estos agentes son herramientas valiosas para el proceso y la inducción de mutaciones (Nilan *et al.*, 1963; De Serres, 1978). Los ensayos en las raíces principales de *Vicia faba* para la detección de aberraciones cromosómicas de productos químicos ambientales son un sistema bien reconocido (Grant *et al.*, 1981; Ma, 1982; Gómez-Arroyo y Castillo-Ruiz, 1985).

Para estudiar las consecuencias de estos agentes a nivel citogenético, generalmente se observan los cromosomas en las etapas de la división celular correspondientes a la metafase y/o anafase, es decir, cuando se encuentran más contraídos e identificables (Conger, 1965; Kihlman, 1975; Savage, 1975). En este trabajo se decidió hacer los registros en células en anafase porque es posible analizar, además de aberraciones como son puentes y fragmentos acéntricos (Kihlman, 1975) otro tipo de alteraciones, los cromosomas con el centrómero inactivado y los isocromosomas, que se producen al afectarse la región centromérica (Ramanna y Natarajan, 1966; Tomkins y Grant, 1972; Nicoloff y Gecheff, 1976; Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1983), en cuyo caso los cromosomas quedan fuera de la

cinética normal de la anafase, ya que no se integran a los núcleos hijos y pueden dar como resultado aneuploidías (Gómez-Arroyo, 1980). Así también pueden observarse las anafases multipolares que se forman por disturbios en el huso mitótico (Gómez-Arroyo *et al.*, 1986). Tanto los fragmentos acéntricos (Read, 1959), como los cromosomas con centrómero inactivado e isocromosomas (Schmid, 1973), pueden examinarse en interfase como micronúcleos, es así que el análisis de éstos provee un método sencillo para detectar la presencia de daño cromosómico (Read, 1959; Heddle, 1973; Schmid, 1973; Von Ledebur y Schmid, 1973).

La aplicación de los distintos tiempos de recuperación se hizo con el propósito de establecer la sensibilidad de las diferentes etapas del ciclo celular y determinar el comportamiento que tiene el DMSO con respecto a la aparición de las aberraciones en cuanto a efecto "retardado" o "no retardado" y si es S-dependiente o S-independiente (Gómez-Arroyo, 1980).

El amplio uso del DMSO como un disolvente y su demanda por los efectos terapéuticos que presenta han creado una gran necesidad de tener la comprensión de su mecanismo de acción y confiabilidad (Richmond, 1982). Con el presente estudio se ha pretendido ampliar la información sobre su efecto a nivel citogenético.

Las observaciones realizadas sugieren que efectivamente interrumpe la integridad de la estructura cromosómica en *Vicia faba*.

Aunque la inducción de aberraciones cromosómicas en células eucariotas por radiaciones ionizantes y por agentes químicos, ha sido ampliamente estudiada por muchos años, no ha surgido ninguna teoría general satisfactoria sobre el origen de éstas (Revell, 1955, 1958, 1963; Wolff, 1961; Evans, 1962; Kihlman, 1966; Bender *et al.*, 1974).

Gran cantidad de agentes químicos se han mencionado por su capacidad para provocar aberraciones cromosómicas (Fishbein *et al.*, 1970), pero han existido frecuentemente conflictos y contradicciones en reportes publicados sobre los efectos de diversos compuestos, sin poderse explicar hasta ahora el mecanismo mediante el cual causan las alteraciones cromosómicas. No obstante, en su revisión sobre el tema, Kihlman (1966) es capaz de distinguir varias clases de agentes químicos productores de aberraciones, de acuerdo a los efectos que éstos inducen con relación a la posición de las células en el ciclo celular al momento de ser expuestas y al tiempo seguido del tratamiento en que las alteraciones comienzan a aparecer, como se ha descrito en la introducción.

Las aberraciones cromatídicas son inducidas durante S y G<sub>2</sub> (Kihlman, 1966; Bostock y Summer, 1978; Kihlman *et al.*, 1978) y de acuerdo

con Kihlman (1963, 1966), los agentes con efecto "no retardado", son capaces de producir las aberraciones en las dos primeras horas de iniciado el tratamiento y las de tipo cromosómico pueden presentarse entre las catorce y dieciocho horas de recuperación. En este trabajo la incidencia de alteraciones cromatídicas y cromosómicas corresponderían a las 6 y 22 horas posteriores a la exposición respectivamente. Observándose en la primera mitosis después del tratamiento el daño producido en  $G_2$  y en la segunda el inducido en S y  $G_1$ .

Con base en los puntos anteriores y debido a que el DMSO induce aberraciones de tipo cromatídico se puede considerar, *a priori*, dentro del grupo de los agentes S-dependientes. Aunque se registran aberraciones de tipo cromosómico sus frecuencias son bajas respecto a las cromatídicas (Tabla XII y Fig. 6), las cuales posiblemente en algunos casos sean espontáneas e incluso errores en la interpretación de las observaciones, habiéndose registrado como fragmentos y puentes dobles lo que en realidad son dos fragmentos o dos puentes sencillos.

De acuerdo con esto, Kapp y Eventoff (1980), encuentran como resultado del tratamiento de las células de la médula ósea en la rata, con varias concentraciones de DMSO, que sólo las aberraciones cromatídicas son significativamente elevadas sobre el grupo testigo, en todos los lotes experimentales, mientras que por otro lado, la incidencia de rupturas cromosómicas no muestra incremento significativo.

Sin embargo, en el modelo experimental usado en esta investigación, el hecho de que las aberraciones se presenten a las seis horas de iniciado el tratamiento implica que el DMSO es un agente cuyo efecto es "no retardado", ya que está expresando el daño provocado en  $G_2$ , lo cual sugiere un comportamiento S-independiente de acuerdo al criterio de Kihlman (1977) y Kihlman *et al.* (1978).

Las opiniones sobre la naturaleza de una aberración cromosómica producida por la acción de varios agentes químicos y físicos, están divididas (Kaul y Kak, 1973). Taylor *et al.*, (1962) y Kihlman (1962), proponen que las alteraciones producidas en los cromosomas son debidas a lesiones inducidas en las moléculas de ADN, por otra parte, Wolff (1960, 1961b), así como Bell y Wolff (1964), plantean que las rupturas cromosómicas son debidas a un efecto sobre el componente proteínico de éstos más que sobre el ADN mismo.

El comportamiento de una substancia que interactúa directamente con el ADN algunas veces depende, pero no siempre, del período de síntesis de ADN. Sin embargo, la existencia de otros factores que provocan

acción indirecta en la ruptura cromosómica, hacen extremadamente difícil determinar el origen de las aberraciones observadas y puede llevar a errores en la clasificación del agente utilizado.

Es evidente que el DMSO está presentando un cambio a nivel citogenético en *Vicia faba*, no obstante, la naturaleza de su efecto no queda muy clara, por lo que es importante analizar algunos de los posibles mecanismos de acción de esta molécula.

El disolvente tiene la habilidad de penetrar fácilmente los tejidos vivos, probablemente debido a su naturaleza relativamente polar, su capacidad para aceptar enlaces de hidrógeno y sus características estructurales (Szmant, 1975). Estas propiedades redundan en su efectividad para asociarse y alterar la configuración de moléculas biológicas de gran importancia (Barner, 1965, citado en Rammler y Zaffaroni, 1967), como: agua, proteínas, carbohidratos, sustancias iónicas y ácidos nucleicos entre otros constituyentes.

De gran importancia, para comprender las posibles funciones de este compuesto en los sistemas biológicos, en su aptitud para reemplazar o capturar algunas de las moléculas de agua asociadas con los componentes celulares, o su habilidad para afectar la estructura de ésta (Szmant, 1975).

El principal componente químico de la célula es el agua (Webb, 1965). La forma primitiva de los biopolímeros tales como proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos, está rodeada por moléculas de agua ordenadamente colocadas, la cubierta hidratada. Su estructura natural depende en parte de estos enlaces de agua, en adición a interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno y otras fuerzas estabilizadoras (Joly, 1965). La sustitución o pérdida de la cubierta hidratada, o jaula de agua, de estas sustancias se espera que altere su configuración.

Ya que la hidratación de los constituyentes celulares y la actividad del agua en general no son necesariamente las mismas en los diferentes estados de ésta, resulta que el DMSO puede ejercer un efecto indirecto sobre los sistemas biológicos en virtud de los cambios que provoca. Entre las consecuencias más importantes de esta acción se pueden mencionar alteraciones en la conformación y asociaciones de proteínas o de ácidos nucleicos (Szmant, 1975).

Estudios de subunidades proteicas han sugerido que su asociación es frecuentemente establecida no solo por puentes de hidrógeno y uniones hidrofóbicas, sino también por enlaces de agua y por puentes de agua entre los grupos donadores y aceptores de protones sobre la superficie de las proteínas (Lewin, 1967a; 1967b; Henderson *et al.*, 1970; Henderson y Henderson; 1975).

El DMSO forma fuertes enlaces de hidrógeno con grupos donadores de protones de los biopolímeros, como lo hace el agua (Rammler y Zaffaroni, 1967), es así que sus efectos se deben, en parte, a la constitución de estructuras hidratadas en las que las uniones de hidrógeno, entre éste y el agua u otros grupos donadores de protones, son más poderosas que los puentes de hidrógeno con las mismas moléculas de agua (Henderson 1975).

Este disolvente afecta en primera instancia los enlaces hidrofílicos y en altas concentraciones también actúa sobre los hidrofóbicos en las proteínas (Henderson y Henderson, 1975). Herskovits (1962), ha descrito que los disolventes metilados como el DMSO, parecen ser desnaturizantes de biopolímeros mucho más efectivos que otros agentes de acción similar no substituidos, aparentemente debido a la actividad de los grupos metilo en la ruptura de uniones hidrofóbicas.

De esta manera, muchos de sus efectos sobre las subunidades proteicas son implicables por dos propiedades: su afinidad por los grupos donadores de protones y la presencia de grupos hidrofóbicos así como hidrofílicos en su molécula (Henderson y Henderson, 1975).

Es así que tal vez el DMSO esté alterando en forma directa la molécula de ADN o la configuración y en consecuencia la función, de proteínas que posiblemente estén implicadas en la replicación de la molécula del ADN y de esta manera provoque las aberraciones encontradas en el presente trabajo.

Varios investigadores han establecido que las enzimas no responden en una forma predecible cuando se encuentran en soluciones con DMSO (Chang y Simon, 1968; Kaul, 1970; Wood y Wood, 1975). Hay enzimas a las que parece no afectarles las altas concentraciones de este disolvente, otras incrementan su actividad catalítica y un tercer tipo de éstas son inhibidas en soluciones con bajas concentraciones. Posiblemente estos estudios reflejan cambios de pH, modificaciones en la conformación de las proteínas o, en el caso de la inhibición, la actividad catalítica está relacionada con cambios químicos en los grupos funcionales de éstas (Rammler, 1967; Rammler y Zaffaroni, 1967; Friedman, 1968; Rammler, 1971).

El compuesto parece ser extremadamente efectivo alterando la configuración de las proteínas, pero este cambio es aparentemente reversible después de removerlo (Rammler y Zaffaroni, 1967). Este proceso puede ser concebido como una difusión o transporte activo de la mayor cantidad del disolvente de los tejidos y una remoción competitiva y gradual del DMSO, unido a las proteínas, por el agua celular.



Se ha descrito que esta recuperación ocurre siempre y cuando la concentración y la temperatura sean menores de 20% y 25 °C, respectivamente. Niveles elevados de este compuesto o altas temperaturas se han correlacionado con la pérdida irreversible de la actividad enzimática, pudiendo ser esto considerado como una "desnaturalización" de las proteínas (Henderson y Henderson, 1975).

Concentraciones altas de DMSO o el incremento en el tiempo de exposición evitan la síntesis de proteínas y glicoproteínas (Nilsson, 1980; Richmond, 1982). Se ha visto que cantidades superiores al 10% tienen un marcado efecto sobre la capacidad de síntesis de péptidos en células de la médula ósea del ratón *in vitro* (Ashwood-Smith, 1967), suprimiendo la replicación del ADN y la formación de lípidos en algunos casos.

Muchos inhibidores de la duplicación del ADN, de proteínas así como también de la fosforilación oxidante, incrementan la frecuencia de aberraciones (Natarajan, 1976). Estos han sido ampliamente revisados por Kihlman (1966, 1971b). Varios compuestos que impiden la formación de precursores para la síntesis de ADN, producen aberraciones principalmente en las fases S y G<sub>2</sub>. Los mecanismos por los cuales éstos inducen las alteraciones han sido interpretados como debidos a interrupciones en: a) la replicación del ADN (efecto perturbador en S); b) la formación de un tipo especial de ADN, p.e. secuencias terminales (efecto en G<sub>2</sub>); c) los mecanismos de reparación que ocurren normalmente en el ciclo celular (Kihlman, 1971b).

Las anomalías cromatídicas o cromosómicas son conocidas como una consecuencia de la exposición de células a rayos-X, radiación ultravioleta, infecciones de virus y gran variedad de compuestos químicos (Harris, 1964). Estas han sido generalmente aceptadas como el resultado de un ataque directo de los agentes físicos y químicos sobre el material cromosómico, probablemente el ADN, no obstante, existe la posibilidad de que las rupturas de las cromátidas se provoquen por acción enzimática, originada de la activación de enzimas hidrolíticas liberadas de la propia célula.

La expresión de la acción enzimática de los lisosomas se presenta acompañada generalmente por la liberación de las moléculas catalíticas de estos organelos (Berthet *et al.*, 1951; de Duve *et al.*, 1955; de Duve *et al.*, 1962; Misch y Misch, 1975). En particular, parece factible que la desoxirribonucleasa (DNasa) y otras enzimas liberadas, pueden ser capaces de penetrar al núcleo y producir alteraciones estructurales en los cromosomas (Allison y Paton, 1965).

El compuesto empleado en este trabajo ha sido considerado como un agente que fácilmente atraviesa las membranas celulares (Jacob *et al.*, 1971; Pluenneke y Burson, 1973; Szmant, 1975; Vannini y Poli, 1983) y varios tipos de tejidos vegetales (Garren, 1967; Leonard, 1967). Tomando en cuenta las propiedades que como disolvente presenta, particularmente respecto a lípidos y sus efectos sobre las características físicas de las proteínas (Gries *et al.*, 1967), es razonable sugerir que durante una exposición prolongada, ocurre daño en las membranas (Pluenneke y Burson, 1973).

Concentraciones elevadas de DMSO y/o tiempos largos de exposición incrementan la fragilidad de las células en *Tetrahymena sp.* (Richmond, 1982) y alteran las superficies membranosas (Nilsson, 1980; Richmond, 1982).

Vannini y Poli (1983) en *Euglena gracilis*, después de una hora de tratamiento en una solución con 10% de DMSO, encuentran que casi el 60% de los organismos presentan depresiones, lo que para ellos son signos inequívocos de lisis. Este hecho apoya la liberación de la DNasa por rompimiento de los lisosomas, conduciendo de esta manera a cambios conformacionales en los cromosomas. La DNasa liberada de estos organelos puede romper al mismo tiempo la doble cadena del ADN, que es el esqueleto de la cromatina interfásica desespiralizada (Bernardi y Sadron, 1964).

Su efecto sobre las membranas de estos organelos ha sido estudiado (Misch y Misch, 1967, 1968; Gander y Moppert, 1969; Misch y Misch, 1969; Lee, 1971; Misch y Misch, 1973). Misch y Misch (1975) obtienen una actividad máxima de la fosfatasa ácida con lisosomas incubados en la presencia del disolvente en amortiguador de fosfatos, observando la liberación de la enzima al sobrenadante. De igual manera puede ocurrir con la DNasa que al ser liberada al citoplasma puede entrar al núcleo, actuar sobre su contenido (Allison y Paton 1965) y así provocar las alteraciones que se obtienen en el presente estudio.

Se considera que el posible daño causado a este nivel se debe, más que a la concentración, al tiempo de tratamiento, ya que hasta en las dosis más bajas (0.10% ), hay incremento en las alteraciones cromatídicas respecto al testigo.

Esto no significa que la única manera en que las cromátidas son rotas, sea por un ataque enzimático, sino que las interacciones directas de la substancia con el ADN o su interferencia con los procesos de reparación, pueden ocurrir de igual manera (Allison y Paton, 1965). No obstante, la activación enzimática puede representar una vía de acción que contribuye al daño cromosómico inducido por radiaciones y agentes químicos.

En el caso del DMSO, esta opción puede ayudar a esclarecer su posible mecanismo de acción. Como se menciona anteriormente, de acuerdo con el tipo de alteraciones inducidas, se le puede considerar como un agente de tipo S-dependiente, aquéllos que producen únicamente aberraciones cromatídicas no importando la etapa del ciclo celular en que están las células al momento de la exposición (Bender *et al.*, 1974; Kihlman *et al.*, 1978; Natarajan y Obe, 1978). Pero la aparición de las aberraciones para este tipo de agentes es de efecto "retardado" (Kihlman *et al.*, 1978) y el registro de una respuesta a las 6 horas después de iniciado el tratamiento, como ocurre en el presente estudio, expresa el daño provocado en  $G_2$ , que no debe presentarse. Posiblemente esta respuesta sea una consecuencia indirecta sobre el material genético por activación enzimática de los lisosomas, como se acaba de describir y no a un comportamiento, que de acuerdo con el criterio de Kihlman (1977) y Kihlman *et al.*, (1978), sería del tipo S-independiente.

Callen y Philpot (1977), plantean la posibilidad de que el DMSO sea metabolizado por los sistemas biológicos como ocurre con *Saccharomyces cerevisiae* y que sus metabolitos puedan presentar una actividad mutagénica.

Ha sido demostrado que el DMSO puede ser reducido a sulfuro de dimetilo (DMS) por bacterias bajo condiciones anaeróbicas especiales (Ando *et al.*, 1957 citado por Rammler y Zaffaroni, 1967). En el hombre y animales (Distefano y Borgstedt, 1964; Gerhardz *et al.*, 1965; Denko *et al.*, 1967; Gerhardz y Gibian, 1967; Hucker *et al.*, 1967; Kolb *et al.*, 1967; Wood, 1971), así como en plantas (Smale *et al.*, 1975), la dimetilsulfona (DMSO<sub>2</sub>) y el DMS, han sido identificados como metabolitos.

Su metabolismo en brotes de papa es acompañado de una simple reducción u oxidación, con la formación de DMS y DMSO<sub>2</sub> como los metabolitos principales. Sin embargo, una gran proporción de éste permanece inalterada. En esta planta la reacción predominante es de naturaleza reductora (Dimalla y Van Staden, 1980). En animales el mecanismo opuesto ha sido descrito (Wood, 1971).

El esquema metabólico hipotético presentado en la figura 2, es útil, ya que indica, en forma general, las principales reacciones que pueden realizarse en el metabolismo completo del DMSO a sulfato. Se observa que las

reacciones bioquímicas dominantes son de naturaleza oxidante o reductora. El esquema indica que puede presentarse una desmetilación, pero esto probablemente no ocurre debido a que los grupos metilo se eliminan por oxidación (Rammler y Zaffaroni, 1967).

Cuando se suministra  $^{14}\text{C}$ -DMSO a *Aerobacter aerogenes* y se determina la distribución de la radioactividad, se observa que casi el 80% de ésta es detectada como dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y 6% como DMS, indicando que la principal vía metabólica es oxidante. Una pequeña proporción de la radioactividad es retenida por las células, la mayor parte de ésta puede ser removida con ácido tricloroacético caliente, lo cual sugiere su incorporación en los ácidos nucleicos (Schneider 1957), unido a las purinas o, probablemente, como grupos metilo al ARN. La pérdida de la radioactividad después de una hidrólisis con hidróxido de potasio sugiere que el carbono derivado del DMSO es incorporado en el ácido ribonucleico (Rammler y Zaffaroni, 1967).

Con base en lo anterior, la posibilidad de que el DMSO sirva como donador de grupos metilo no debe ser excluida, aunque lo haga en una proporción muy baja. Es así que éste tiene la facultad para actuar como agente alquilante en cuanto a la producción de aberraciones, cuyos efectos son del tipo "retardado" y S-dependiente (Bender *et al.*, 1974; Kihlman *et al.*, 1978; Natarajan y Obe, 1978).

Dichos agentes se caracterizan por su incapacidad para producir daño cromosómico después de que se ha completado la síntesis de ADN e histonas, lo que indica que actúan sobre los precursores cromosómicos más que sobre los cromosomas en sí (Revell, 1952).

Por otra parte, no existe información disponible, referente a la mutagenicidad de los principales metabolitos del DMSO (Callen y Philpot, 1977).

El centrómero también es afectado por el disolvente. Esta acción es detectada desde las primeras horas de recuperación y se traduce en una inactivación del mismo (Tomkins y Grant, 1972), dando origen a los cromosomas con el centrómero inactivado (Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1983) o provoca su división anormal en sentido transversal, en vez de longitudinal y forma los isocromosomas (Ramanna y Natarajan, 1966; Nicoloff y Gecheff, 1976), en ambos casos los cromosomas afectados quedan fuera de la cinética normal de la anafase, ya que no se integran a los núcleos hijos y pueden dar como resultado micronúcleos y aneuploidías (Ramanna y Natarajan, 1966; Gómez-Arroyo, 1980; Gómez-Arroyo *et al.*, 1986).

Se han considerado otros posibles mecanismos por los cuales los cromosomas pueden quedar fuera de la cinética de la anafase. Barthelmeß (1957), atribuye este fenómeno a que en la prometafase, durante la mitosis, hay un impedimento del movimiento de éstos hacia la placa ecuatorial, debido a la adhesión de los centrómeros de uno o más cromosomas a la membrana nuclear o a la capa externa del plasma. Por otro lado, Schmid (1973, 1975), así como Matter y Grauwiler (1974), señalan que el daño parcial o los disturbios en el huso mitótico pueden dar como resultado cromosomas con el centrómero inactivado.

En este trabajo los isocromosomas y los cromosomas con centrómero inactivado, no muestran dependencia con las diferentes concentraciones usadas.

Además del daño cromosómico inducido por el DMSO, y del producido en el centrómero, se observan disturbios en el huso acromático. Esta estructura está formada por fibras de dos tipos: cromosómicas, que están unidas a los centrómeros y continuas que corren de uno a otro polo de la célula (Bajer, 1961), constituidas por microtúbulos, que son el resultado de la polimerización lineal de las moléculas de tubulina, unidas mediante enlaces -S-S- (disulfuro). Los microtúbulos están agrupados paralelamente entre sí por puentes de hidrógeno (Brachet, 1975). Además de las proteínas, otros de sus constituyentes son los polisacaridos, los lípidos y el ARN (Mazia, 1961).

La alteración en la formación y el funcionamiento del huso pueden traer como consecuencia la producción de anafases multipolares, integrándose más de los dos grupos normales de cromosomas, que en telofase se presentan como núcleos separados, los cuales pueden ser divididos por paredes celulares individuales, formándose células con números cromosómicos menores de  $2n$  (Baiza, 1980; Gómez-Arroyo, 1980).

Uno de los hallazgos relevantes en un estudio sobre el efecto del DMSO en *Euglena gracilis* (Vannini y Poli, 1983), se refiere a la inducción de anomalías en la distribución del material genético. Esta alteración no se atribuye a defectos en los microtúbulos del huso debido a que un arreglo característico de estas estructuras, se establece dentro de los núcleos que experimentan mitosis. Por otra parte, determinan que el disolvente no afecta las estructuras que intervienen en la constricción nuclear y el término de la mitosis.

La explicación del origen de núcleos con una masa de cromatina reducida puede ser el hecho de que algunas proteínas nucleares contráctiles, sensibles al DMSO, pueden estar involucradas en actividades tales como la replicación de los genes y el control de la estructura cromatínica (Le Stougeron *et al.*, 1975; Fukui y Katsumaru, 1980; Sanger *et al.*, 1980).

En el presente estudio, al igual que con los efectos sobre el centrómero, las alteraciones en el huso mitótico no tienen una clara dependencia con las concentraciones, siendo este daño el que, en forma general, presenta las frecuencias más bajas de incidencia (Tabla XII y Fig. 5).

Otro criterio para estimar el daño genético provocado tanto por agentes físicos como químicos (Evans *et al.*, 1959; Heddle, 1973; Schmid, 1973; Von Ledebur y Schmid, 1973; Matter y Grauwiler, 1974), es la prueba de micronúcleos, los cuales son la manifestación en interfase de los fragmentos acéntricos (Read, 1959) y de los cromosomas con daños en la región centromérica (Ramanna y Natarajan, 1966; Tomkins y Grant, 1972; Schmid, 1973; Nicoloff y Gecheff, 1976).

Generalmente la mayor contribución en la formación de micronúcleos, depende de las aberraciones. Los fragmentos acéntricos producidos como resultado de tratamientos con agentes capaces de producir rompimientos en las cromátidas, no son transportados por el huso a los polos durante la anafase (Schmid, 1975) y generalmente no se incorporan a los núcleos hijos quedando en el citoplasma formando estas alteraciones (Revell, 1953).

Otro elemento que interviene en la producción de micronúcleos, son cromosomas completos que se han quedado fuera de la cinética normal de la anafase debido a disturbios en el huso mitótico (Schmid, 1973, 1975; Matter y Grauwiler, 1974).

En el caso del DMSO, aunque no se nota relación entre la producción de micronúcleos y las diversas concentraciones usadas (Tabla XII y Fig. 5), es posible usarlos como sensores, para determinar, de una manera rápida, si un compuesto induce daño cromosómico al menos en *Vicia faba* (Baiza, 1980; Gómez-Arroyo, 1980).

El índice mitótico puede ser un criterio de evaluación del daño fisiológico que provocan los diversos agentes. Se ha demostrado que tanto las radiaciones (Davidson, 1959, 1960; Evans *et al.*, 1959; Haber y Foard, 1964; Burholt y Van't Hof, 1972), como las sustancias (Kihlman, 1966; Bruchovsky, 1967; Kovacs y Van't Hof, 1971; Webster, 1973; Mc Gill *et al.*, 1974), producen inhibición de la división celular.

Estos agentes pueden influir principalmente en ciertas fases del ciclo celular, como evitar la entrada de las células en la mitosis, la formación del huso funcional y la citocinesis (Kihlman, 1966), suprimiendo la división de la célula, del núcleo, de los cromosomas (cuando actúan en  $G_1$  ó S), así como la separación de las cromátidas (actúan en  $G_2$ ), pero no necesariamente la replicación cromosómica (Kihlman, 1966).

Generalmente el estado afectado de la célula es la interfase y en ocasiones la profase temprana, cuando esto sucede es posible una reversión de las células a la interfase (D'Amato, 1949).

Edmunds (1964), ha demostrado que si se impide la síntesis de ADN no hay división celular. Dentro de los agentes que afectan al ADN y su metabolismo se encuentran los inhibidores de la síntesis y de los precursores del ADN y aquéllos que modifican su estructura (Kihlman, 1966).

La inhibición de la formación (Mueller, 1969) y función del huso mitótico impiden las divisiones celulares (Kihlman, 1966; George *et al.*, 1970) y nucleares (Kihlman, 1966).

Por otra parte, se ha demostrado que la supresión de los procesos necesarios para que se lleven a cabo tanto el ciclo celular como la síntesis de ARN y de proteínas, reprimen la proliferación de las células (Donnelly y Sisken, 1967; Mueller, 1969; Webster y Van't Hof, 1970).

Los inhibidores de la respiración y de la fosforilación oxidante evitan la mitosis, tanto en células de plantas (Amoore, 1961) como de animales (Epel, 1963). Otra causa de la disminución de la frecuencia de divisiones celulares, es la producción de aberraciones, ya que éstas pueden causar la muerte de las células (Davidson, 1959, 1960; Wu y Grant, 1966, 1967; George *et al.*, 1970).

En este modelo experimental se observa que el DMSO afecta el índice mitótico. El número de anafases observadas en las diferentes concentraciones varía en la forma ya descrita (Tabla XII), al aplicar la prueba estadística correspondiente, se encuentran diferencias significativas. En la concentración de 1% se detecta efecto estimulante y en 20 y 30% hay inhibición, pero en 40% no se observa (Tabla XIII y Fig. 7).

Con una concentración de 5% , en un período de 48 horas de tratamiento, se suprime la proliferación celular y las células de *Euglena gracilis* son 2 ó 3 veces más grandes de lo normal (Vannini y Poli, 1983), pero 12 horas después de removerlo éstas recuperan su tasa de división celular.

Resultados similares se obtienen con células de *Dictyostelium sp.*, encontrándose que el DMSO inhibe en forma reversible la reproducción celular (Fukui, 1980).

Probablemente, si se observa únicamente el número de anafases, las diferencias notadas se deben, en el caso de las dos concentraciones más bajas (0.10 y 1%), a un efecto estimulante y a una inhibición en las concentraciones superiores (de 5 a 40%), pero que se desvanecieron como consecuencia de los tiempos de recuperación dados.

Queda claro en este estudio que el DMSO tiene la capacidad de alterar la estructura cromosómica en *Vicia faba*, aunque su mecanismo de acción no está completamente definido.

Existen algunas cuestiones de sus efectos como dependientes de la concentración y proponen que, posiblemente, provoque diferentes respuestas a diversas concentraciones (Richmond, 1982).

Parece ser que el DMSO puede tener múltiples sitios de acción y efectos en la misma célula (Richmond, 1982), de tal manera que los resultados aquí obtenidos probablemente sean la suma de su acción directa e indirecta sobre el material cromosómico.

Este trabajo sugiere la necesidad de tener precauciones tanto en su elección por las propiedades únicas que como disolvente presenta, como por sus controvertidas aplicaciones terapéuticas (Leake, 1967; Jacob *et al.*, 1970).

El DMSO penetra rápidamente en la piel y ha sido capaz de transportar compuestos disueltos en éste (Stouhgton y Fritsch, 1964; Chandrasekaran *et al.*, 1977). Lo que puede ser un problema para las personas que manejan este compuesto, como ya se mencionó en la introducción, éste ha sido empleado para llevar a cabo ensayos sobre el potencial mutagénico (Abbondandolo *et al.*, 1980) de compuestos insolubles en agua, así como el potencial carcinogénico de otros (Schwope *et al.*, 1981).

En caso de que su empleo sea indispensable para llevar a cabo determinadas pruebas, es recomendable usar las concentraciones más bajas posibles, con el propósito de minimizar sus efectos irreversibles sobre los sistemas biológicos, y con las precauciones debidas.



## BIBLIOGRAFIA

- Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corsi, C., Corti, G., Fiorio, R., Leporini, C., Mazzaccaro, A. y Nieri, R. 1980. The use of organic solvents in mutagenicity testing. *Mutation Res.* 79: 141-150.
- Agami, C. 1965. Le diméthylsulfoxyde en chimie organique (mise au point) *Bull. Soc. Chem.* 1: 1021.
- Allison, C.A. y Paton, G.R. 1965. Chromosome damage in human diploid cells following activation of lysosomal enzymes. *Nature* 207: 1170-1173.
- Amoore, J.E. 1961. Dependence of mitosis and respiration in roots upon oxygen tension. *Proc. R. Soc. B.* 154: 109-129.
- Anderson, D. y McGregor, D.B. 1980. The effect of solvents upon the yield of revertants in the *S. lmonella*/activation mutagenicity assay. *Carcinogenesis* 1: 363-366.
- Andrae, M.O. 1980a. Determination of trace quantities of dimethylsulfoxide in aqueous solution. *Anal. Chem.* 52: 150-153.
- Andrae, M.O. 1980b. Dimethylsulfoxide in marine and freshwaters. *Limnol. Oceanog.* 25: 1054-1063.
- Ashby, J. y Styles, J.A. 1978. Factors influencing mutagenic potency *in vitro*. *Nature* 274: 20-22.
- Ashton, H., Frenk, E. y Stevenson, C.J. 1971. Therapeutics XIV. Herpes simplex virus infections and idoxuridine. *Brit. J. Dermatol.* 84: 496.
- Ashwood-Smith, M.J. 1967. Radioprotective and cryoprotective properties of dimethyl sulfoxide in cellular systems. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 141: 45-62.

- Baiza, A. 1980. Efectos producidos por el malation en los cromosomas de las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*. Tesis.Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Bajer, A. 1961. A note on the behaviour of spindle fibers at mitosis. *Chromosoma* 12: 64-71.
- Barthelmess, A. 1957. Chemisch induzierte multipolare mitosen. *Protoplasma* 48: 546-561.
- Becker, D.P., Young, H.F., Nulsen, F.E. y Jane, J.A. 1969. Physiological effects of dimethyl sulfoxide on peripheral nerves: possible role in pain relief. *Exp. Neurol.* 24: 272.
- Bell, S. y Wolff, S. 1964. Studies on the mechanism of the effect of fluorodeoxyuridine on chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 51: 195-202.
- Bell, S.L. Schuarz, O.J. y Hughes, K.W. 1976. Studies of the herbicide paraquat. I. Effects on the cell cycle and DNA synthesis in *Vicia faba*. *Can. J.Genet. Cytol.* 18: 93-99.
- Bender, M.A., Griggs, H.G. y Walker, P.L. 1973. Mechanisms of chromosomal aberrations production. I. Aberrations inductions by ultraviolet light. *Mutation Res.* 20: 387-402.
- Bender, M.A., Griggs, H.G. y Bedford, J.S. 1974. Mechanisms of chromosomal aberrations production. III. Chemicals and ionizing radiation. *Mutation Res.* 23: 197-212.
- Bernardi, G. y Sadron, C. 1964. Studies on acid deoxyribonuclease. I. Kinetics of the initial degradation of deoxyribonucleic acid by acid deoxyribonuclease. *Biochemistry* 3: 1411-1418.
- Berthet, J., Berthet, L., Appelmans, F. y de Duve, C. 1951. Tissue fractionation studies. 2. The nature of the linkage between acid phosphatase and mitochondria in rat-liver tissue. *Biochem. J.* 50: 182-189.
- Birkmayer, W., Danielczyk, W. y Werner, H. 1966. DMSO bei spondylonogenen neuropathien. Herausgegeben von Priv.-Doz. En: *DMSO Symposium*, Vienna. G. Laudahn y K. Gertich (Eds.), Saladruck, Berlin, Alemania, p. 134.
- Bonnaardeaux, J.L. 1971. A comparison of the effects of three organic solvents: dimethyl sulfoxide, formamide and propylene glycol, on spontaneous activity of isolated smooth muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 49: 632.
- Bostock, C. J. y Sumner, A. T. 1978. *The Eukaryotic Chromosome*, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, pp. 337-473.

- Boyco, A. L., Morgan, M. E. y Libbey, L.M. 1978. *Analysis of Foods and Beverages*, G. Charalambous (Ed.), Academic Press, Nueva York, pp. 57-59.
- Brachet, J. 1975. *Introducción a la Embriología Molecular*, H. Blume, Madrid, pp. 125-128.
- Brown, V.K., Robinson, J. y Stevenson, D.E., 1963. A note on the toxicity and solvent properties of dimethyl sulfoxide. *J. Pharm. Pharmacol.* 15: 688-692.
- Bruchovsky, N. 1967. Effects of  $\beta$ -phenethyl alcohol on mouse L cells in suspension culture. II. Effects on the cell division cycle. *Mol. Pharmacol.* 3: 133-141.
- Burholt, D.R. y Van't Hof, J. 1972. Cell population kinetics of *Pisum* root meristem cell during and after a mitotic inhibitory exposure to protracted gamma irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 21: 307-319.
- Burnett, C., Fuchs, C., Corberth, J. y Menkart, J. 1982. The effect of dimethylsulfoxide on the mutagenicity of the hair dye p-Phenylene-diamine. *Mutation Res.* 103: 1-4.
- Callen, D.F. y Philpot, R.M. 1977. Cytochrome p-450 and the activation of promutagens in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.* 45: 309-324.
- Canova, L. 1971. *Congresso International De O'leos Essenciais*, Río de Janeiro, Academia Brasileira De Cinencias 44, Oct. 11-16, pp. 273-277.
- Chandrasekaren, S.K., Campbell, P.S. y Michaelis, A.S. 1977. Effect of dimethyl sulfoxide on drug permeation through human skin. *Am. Inst. Chem. Eng. J.* 23: 810-816.
- Chang, C. y Simon, E. 1968. The effect of DMSO on cellular systems. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 28: 60-66.
- Conger, A.D. 1965. The metaphase aberrations. *Radiation Bot.* 5: 81-96.
- Conger, A.D. y Fairchild, L.M. 1953. A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain Technol.* 28: 281-283.
- Cowie, J.M.G. y Toporowski, P.M. 1961. Association in the binary liquid system dimethyl sulfoxide-water. *Can. J. Chem.* 39: 2240.
- D'Amato, F. 1949. Prophase poisoning by chemical agents. *Cariologia* 1: 327-328.
- Dabney, B. 1981. The role of human genetic monitoring in the workplace. *J. Occup. Med.* 23: 626-631.
- Davidson, D. 1959. A method for estimating mitotic rates in *Vicia* roots after X irradiation. *Brit. J. Radiol.* 32: 612-614.
- Davidson, D. 1960. Meristem initial cells in irradiated roots of *Vicia faba*. *Ann. Bot.* 24: 287-295.

- de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. y Appelmans, F. 1955. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* 60: 604-617.
- de Duve, C., Wattiaux, R. y Wibo, M. 1962. Effects of fat-soluble compounds on lysosomes *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* 9: 97-116.
- de la Torre, J.C., Rowed, D.W., Kawanaga, H.M. y Mullan, S. 1973. Dimethyl sulfoxide in the treatment of experimental brain compression. *J. Neurosurg.* 38: 345.
- de la Torre, J.C., Surgeon, J.W., Ernest, T. y Woilmann, R. 1981. Subacute toxicity of intravenous dimethyl sulfoxide in Rhesus monkeys. *J. Toxicol. Environ. Health* 7: 49-57.
- De Serres, F.J. 1978. Introduction: Utilization of higher plants systems as monitors of environmental mutagens. *Environ. Health Perspect.* 27: 3-6.
- Denko, C.W., Goodman, R.M., Miller, R. y Donovan, T. 1967. Distribution of dimethyl sulfoxide<sup>35S</sup> in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 141: 77-84.
- Dimalla, G.G. y Van Staden, J. 1980. Metabolism of dimethyl sulfoxide in sprouting potato tubers. *Environ. Exp. Bot.* 20: 55-59.
- Distefano, V. y Borgstedt, H.H. 1964. Reduction of dimethylsulfoxide to dimethylsulfide in the cat. *Science* 144: 1137-1138.
- Djan, T.I. y Gunberg, D.L. 1967. Percutaneous absorption of two steroids dissolved in dimethyl sulfoxide in the immature female rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 141: 406-413.
- Donnelly, G.M. y Siskin, J.E. 1967. RNA and protein synthesis required for entry of cells into mitosis and during the mitotic cycle. *Exp. Cell Res.* 46: 93-105.
- Edmunds, L.N. 1964. Replication of DNA and cell division in synchronously dividing cultures of *Euglena gracilis*. *Science* 145: 266-268.
- Engel, M.F. 1972. Dimethyl sulfoxide in the treatment of scleroderma. *Southern Med. J.* 65: 71.
- Environmental Mutagen Society 1975. Environmental mutagenic hazards. *Science* 187: 503-514.
- Epel, D. 1963. The effects of carbon monoxide inhibition of ATP level and the rate of mitosis in the sea urchin egg. *J. Cell Biol.* 17: 315-319.
- Evans, H.J. 1962. Chromosome aberrations induced by ionizing radiations. *Intern. Rev. Cytol.* 13: 221-321.
- Evans, H.J. 1966. Repair and recovery from chromosome damage after fractionated X-ray dosage. En: *General Aspects of Radiosensitivity: Mechanisms of Repair*, Int. Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 31-48.

- Evans, H.J. 1977. Molecular mechanisms in the induction of chromosome aberrations. En: *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B.A. Bridges y F.H. Sobels (Eds.), Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp. 57-74.
- Evans, H.J. y Scott, D. 1964. Influence of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by X-rays and maleic hidrazide in *Vicia faba*. *Genetics* 49: 17-38.
- Evans, H.J., Neary, G.J. y Tomkinson, S.M. 1959. The effect of oxigen on the induction by gamma radiation of mitotic delay in root tips of *Vicia faba*. *Exp. Cell Res.* 17: 144-159.
- Ferretti, A. y Flanagan, P.V. 1972. Steam volatile constituents of stale nonfat dry milk. The role of the maillard reaction in staling. *J. Agric. Food Chem.* 20: 695-698.
- Fishbein, L., Flamm, W.G. y Falk, H.L. 1970. *Chemical Mutagens*, Academic Press, Nueva York.
- Formanek, K. y Suckert, R. 1966. Diuretische wirkung von DMSO. En: *DMSO Symposium*, Saladruck, Berlin, Alemania, p. 21.
- Friedman, M. 1968. Chemical reactivities of protein functional groups in DMSO and related solvents. *Quart. Rep. Sulfur Chem.* 3: 125.
- Fukui, Y. 1980. Formation of multinuclear cells induced by dimethyl sulfoxide inhibition of cytokinesis and occurrence of novel nuclear division in *Dictyostelium* cells. *J. Cell Biol.* 86: 181-189.
- Fukui, Y. y Katsumaru, H. 1980. Dynamics of nuclear actin bundle induction by dimethyl sulfoxide and factors affecting its development. *J. Cell Biol.* 84: 131-140.
- Gander, E.S. y Moppert, J.M. 1969. Der Einfluss von Dimethylsulfoxid auf die Permeabilität der Lysosomenmembran bei quantitativer und qualitativer Darstellung der sauren Phosphatase. *Histochemie* 20: 211-214.
- Garren, R., Jr. 1967. Uptake and distribution of labeled dimethyl sulfoxide and its influence on nutritive element transport in plants. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 141: 127-130.
- George, M.K., Aulakh, K.S. y Dhesi, J.S. 1970. Morphological and cytological changes induced in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings following seed treatment with fungicides. *Can. J. Genet. Cytol.* 12: 415-419.
- Gerhardz, E. y Gibian, H. 1967. The metabolism of dimethyl sulfoxide and its metabolic effects in man and animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 141: 65-76.
- Gerhardz, E., Gibian, H. y Kutzsche, A. 1965. Sulfonamidausscheidung und Bacteriostatische Aktivität im Harn nach oraler Verabreichung

des Langzeitsulfonamids 2-Sulfanilamido-5-methoxy-pyrimidin (Sulfamethoxydiazin) und des Kurzzeitsulfonamids N-Sulfanil carbamid. *Arzna. 15*: 512-515.

- Goldman, L., Igelman, J.M. y Kitzmiller, K. 1967. Investigative studies with DMSO in dermatology. *Ann N.Y. Acad. Sci. 141*: 428-436.
- Gómez-Arroyo, S. 1980. Efectos cromosómicos del tiner y algunos de sus principales componentes en *Vicia faba*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Gómez-Arroyo, S. y Catillo-Ruiz, P. 1985. Sister chromatid exchanges induced by thinner in *Vicia faba*. *Contam. Ambient. 1*: 17-23.
- Gómez-Arroyo, S. y Villalobos-Pietrini, R. 1983. Chromosomal alterations induced by some chromium salts. *Cytologia 48*: 185-193.
- Gómez-Arroyo, S., Castillo-Ruiz, P. y Villalobos-Pietrini, R. 1986. Chromosomal alterations induced in *Vicia faba* by different industrial solvents: thinner, toluene, benzene, n-hexane, n-heptane and ethyl acetate. *Cytologia 51*: 133-142.
- Görög, P. y Kovács, I.B. 1968. Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on various experimental inflammations. *Current Therap. Res. 10*: 486.
- Görög, P. y Kovács, I.B. 1969. Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on various experimental cutaneous reactions. *Pharmacology 2*: 313.
- Grant, W.F., Zinov'eva-Stahevitch, A.E. y Zura, K.D. 1981. Plant genetic test systems for the detection of chemical mutagens. En: *Short-Term Test for Chemical Carcinogens*, H.F. Stick y R.H.C. San (Eds.), Springer-Verlag, Nueva York. pp. 200-216.
- Gries, G., Bublitz, G. y Linder, J. 1967. The effect of dimethyl sulfoxide on the components of connective tissue (clinical and experimental investigations). *Ann. N.Y. Acad. Sci. 141*: 630-637.
- Haber, A.H. y Foard, D.E. 1964. Further studies of gamma-irradiated wheat and their relevance to use of mitotic inhibition for developmental studies. *Amer. J. Bot. 51*: 151-159.
- Harris, R.J.C. (Ed.) 1964. *Cytogenetics of Cells in Culture*, Academic Press, Londres.
- Heddle, J.A. 1973. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutation Res. 18*: 187-190.
- Henderson, T.R. y Henderson, R.F. 1975. Effects of dimethyl sulfoxide on subunit proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci. 243*: 38-53.
- Henderson, R.F., Henderson, T.R. y Woodfin, B.M. 1970. Effects of D<sub>2</sub>O on the association-dissociation equilibrium in subunit proteins. *J. Biol. Chem. 245*: 3733.

- Kaul, B.L. y Kak, S.N. 1973. Influence of post-irradiation treatment with some chemicals on the recovery of chromosomal aberrations in barley *Hordeum vulgare*. Egypt. J. Genet. Cytol. 2: 76-83.
- Kapp, R.W. Jr. y Eventoff, B.E. 1980. Mutagenicity of dimethyl sulfoxide (DMSO): *in vivo* cytogenetics study in the rat. Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis 1: 141-145.
- Kihlman, B.A. 1962. The production of chromatid aberrations by 5-fluorodeoxyuridine alone and in combination with X-rays and 8-ethoxycaffeine. Caryologia 15: 261-277.
- Kihlman, B.A. 1963. Relations to radiation induced aberrations. En: *Radiation Induced Chromosome Aberrations*, S. Wolff (Ed.), Columbia University Press, Nueva York, pp. 100-122.
- Kihlman, B.A. 1966. *Action of Chemicals on Dividing Cells*, Prentice Hall, Nueva Jersey, pp. 260.
- Kihlman, B.A. 1971a. Root tips for studying the effects of chemicals on chromosomes. En: *Chemical Mutagens* Vol. 2, A. Hollander (Ed.), Plenum, Nueva York, pp. 489-514.
- Kihlman, B.A. 1971b. Molecular mechanisms of chromosome breakage and rejoining. En: *Advances in Cell and Molecular Biology* Vol. 1, E.J. Dupraw (Ed.), Academic Press Nueva York, pp. 59-107.
- Kihlman, B.A. 1975. Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations. Mutation Res. 31: 401-412.
- Kihlman, B.A. 1977. *Caffeine and Chromosomes*, Elsevier, Amsterdam, pp. 304.
- Kihlman, B.A., Natarajan, A.T. y Anderson, H.C. 1978. Use of the 5-bromodeoxyuridine labelling technique for exploring mechanism involved in the formation of chromosomal aberrations. Mutation Res. 52: 181-198.
- Kligman, A.M. 1965a. Topical pharmacology and toxicology of dimethyl sulfoxide (DMSO). Part I. J. Amer. Med. Assoc. 193: 796-804.
- Kligman, A.M. 1965b. Topical pharmacology and toxicology of dimethyl sulfoxide (DMSO). Part II. J. Amer. Med. Assoc. 193: 923-928.
- Kolb, K.H., Jaenicke, G., Kramer, M. y Schulze, P.E., 1967. Absorption, distribution and elimination of labeled dimethyl sulfoxide in man and animals. Ann. N.Y. Acad. Sci. 141: 85-95.
- Kovacs, C.J. y Van't Hof, J. 1971. Mitotic delay and the regulating events of plant cell proliferation: DNA replication by a G<sub>1</sub>/S population. Radiation Res. 48: 95-106.

- Herman, M., Bedouelles, H. y Hofnung, M. 1978. Influence of solvents in the *Salmonella*/microsome assay. *Mutation Res.* 53: 199.
- Herman, M., Chaude, O., Weill, N., Bedouelles, H. y Hofnung, M. 1980. Adaptation of the *Salmonella*/mammalian microsome test to the determination of the mutagenic properties of mineral oils. *Mutation Res.* 77: 327-339.
- Herskovits, T.T. 1962. Nonaqueous solutions of DNA: factors favoring the stability of the helical configuration in solution. *Arch. Biochem. Biophys.* 97: 474.
- Hovermale, R.A. y Sears, P.G. 1956. Dipolar ions in non-aqueous solvents. I. Dielectric increments as supporting evidence for the dipolar structure of sulfamic acid. *J. Phys. Chem.* 60: 1579-1580.
- Hucker, H.B., Miller, J.K., Hochberg, A., Brobyn, R.D., Riordan, F.H. y Calesnick, B. 1967. Studies on absorption excretion and metabolism of dimethyl sulfoxide (DMSO) in man. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 155: 309.
- Inglot, A.D. y Woyton, A. 1971. Topical treatment of cutaneous *herpes simplex* in humans with the non-steroid antiinflammatory drugs: mefenamic acid and indomethacin in dimethylsulfoxide. *Arch. Immunol. Therap. Exp.* 19: 555.
- Jacob, S.W. y Herschler, R. (Eds.) 1975. Biological actions of dimethyl sulfoxide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 243: 1-510.
- Jacob, S.W. y Rosebaum, E.E. (Eds.) 1967. Biological actions of dimethyl sulfoxide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 141: 1-671.
- Jacob, S.W., Bischel, M. y Herschler, R.S. 1964. Dimethyl sulfoxide (DMSO) A new concept in pharmacotherapy. *Curr. Theor. Res. Clin. Exp.* 6: 134-135.
- Jacob, S.W., Rosebaum, E.E. y Wood, D.C. 1970. *Dimethyl Sulfoxide: Basic Concepts of DMSO*, M. Dekker (Ed.), Nueva York.
- Jacob, S.W., Rosebaum, E.E. y Wood, D.C. 1971. *Dimethyl-Sulfoxide*, Vol. 1, M. Dekker (Ed.), Nueva York, pp. 479.
- Joly, M. 1965. *A Physico-Chemical Approach to the Denaturation of Proteins*, Academic Press, Nueva York.
- Juel-Jensen, B.E., MacCallum, F.O., Mackenzie, A.M.R. y Pike, M.C. 1970. Treatment of zoster with idoxuridine in dimethyl sulfoxide. Results of two double-blind controlled trials. *Brit. Med. J.* 4: 776.
- Kaul, B.L. 1969. Protection against radiation induced chromosome breakage by dimethyl sulfoxide in *Vicia faba*. *Radiation Bot.* 9: 111-114.
- Kaul, B.L. 1970. Studies on radioprotective role of dimethyl sulfoxide in plants. *Radiation Bot.* 10: 69-78.



- Kunze, M. y Klein, H.J. 1971. The effect of dimethyl sulfoxide upon experimental staphylococcal infection of the Swiss albino mouse. *Zentr. Bakteriol. Parasitenk. Abt. I. Orig.* 216: 175.
- Lapeyre, J.N. y Bekhor, I. 1974. Effects of 5-bromodeoxyuridine and dimethyl sulfoxide on properties and structure of chromatin. *J. Mol. Biol.* 87: 137-162.
- Le Stougeron, W.M., Forer, A., Yang, Y., Bertram, J.S. y Rusch, M.P. 1975. Major components of nuclear and 'chromosome non-histone proteins. *Biochem. Biophys. Acta* 379: 529-552.
- Leake, C.D. 1967. Biological actions of dimethyl sulfoxide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 141: 1-2.
- Lee, D. 1971. The effect of dimethylsulfoxide on the permeability of the lysosomal membrane. *Biochem. Biophys. Acta* 233: 619-623.
- Leonard, C.D. 1967. Use of dimethyl sulfoxide as a carrier for iron in nutritional foliar sprays applied to citrus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 141: 148-158.
- Levine, H.B., Cobb, J.M. y Friedman, R.H. 1971. Griseofulvin in dimethyl sulfoxide: penetration into guinea-pig skin and clinical findings in feline ringworm. *Sabouraudia* 9: 43.
- Lewin, S. 1967a. The conformation stabilizing potential of water in biopolymers and its stabilization by deuteration. *Studia Biophys.* 4: 29.
- Lewin, S. 1967b. Some aspects of hydration and stability of native state of DNA. *J. Theor. Biol.* 17: 182.
- Ma, T.H. 1982. *Vicia* cytogenetics tests for environmental mutagens. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Gene tox program. *Mutation Res.* 99: 257-271.
- Maibach, H.I. y Feldman, R.J. 1967. The effect of DMSO on percutaneous penetration of hydrocortisone and testosterone in man. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 141: 423-427.
- Matsumoto, J. 1967. Clinical trials of dimethyl sulfoxide in rheumatoid arthritis patients in Japan. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 141: 560-568.
- Matter, B.E. y Grauwiler, J. 1974. Micronuclei in mouse bone-marrow cells. A simple *in vivo* model for the evaluation of drug-induced chromosomal aberrations. *Mutation Res.* 51: 239-249.
- Mazar, B. 1972. Radioprotective effects of dimethyl sulfoxide in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 51: 134-141.
- Mazia, D. 1961. Mitosis and the physiology cell division. En: *The Cell*, Vol. 3, J. Brachet y A.E. Mirsky (Eds.), Academic Press, Nueva York, pp. 77-412.

- McCann, J., Chroi, E., Yamasaki, E. y Ames, B.N. 1975. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72: 5135-5139.
- McGill, M., Pathak, S. y Hsu, T.C. 1974. Effects of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: a possible material basis for chromosome stickness. *Chromosoma* 47: 157-167.
- McGregor, W.S. 1967. The chemical and physical properties of DMSO. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 141: 3-12.
- Miers, J.C. 1966. Formation of volatile sulfur compounds in processed tomato products. *J. Agric. Food Chem.* 14: 419-423.
- Misch, D.W. y Misch, M.S. 1967. Dimethyl sulfoxide: activation of lysosomes *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 58: 2462-2467.
- Misch, D.W. y Misch, M.S. 1968. Lysosomes: histochemical demonstration of latency using dimethyl sulfoxide. *Third Intern. Congr. Histochem. Cytochem. Summary Reports*. Springer-Verlag, Nueva York pp. 179-180.
- Misch, D.W. y Misch, M.S. 1969. Reversible activation of lysosomes by dimethyl sulfoxide. *Nature* 221: 862-863.
- Misch, D.W. y Misch, M.S. 1973. Histochemical activation of rat-liver lysosomes by dimethyl sulfoxide. *Histochemia* 37: 131-140.
- Misch, D.W. y Misch, M.S. 1975. The effect of dimethyl sulfoxide on a lysosomal membrane. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 243: 54-59.
- Mollet, P. 1976. Lack of proof of induction of somatic recombination and mutation in *Drosophila melanogaster* by methyl-2-benzimidazole carbamate, dimethyl sulfoxide and acid acetic. *Mutation Res.* 40: 382-388.
- Mollet, P., Graf, U. y Würgrer, F.E. 1974. Toxicity of dimethyl sulfoxide in two strains of *Drosophila melanogaster*. *Archiv. Für Genetik* 47: 184-190.
- Mueller, G.C. 1969. Biochemical events in the animal cell cycle. *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp.* 28: 1780-1789.
- Natarajan, A.T. 1976. Molecular aspects of the origin of chromosomal structural changes. *Biol. Zbl.* 95: 139-156.
- Natarajan, A.T. y Obe, G. 1978. Molecular mechanisms involved in production of chromosomal aberrations. I. Utilization of *Neurospora* endonuclease for the study of aberration production in G<sub>2</sub> stage of the cell cycle. *Mutation Res.* 52: 137-149.
- Nicoloff, H. y Gecheff, K. 1976. Methods of scoring induced chromosome structural changes in barley. *Mutation Res.* 34: 233-244.

- Nilan, R.A., Konzak, C.F. Heiner, R.E. y Frosse-Gretzen, E. 1963. Chemical mutagenesis in barley. *Proc. Int. Barley Genetics Symposium*, Wageningen, pp. 35-54.
- Nilson, J.R. 1980. Effect of dimethyl sulfoxide on ATP content and protein synthesis in *Tetrahymena*. *Protoplasma* 103: 189-200.
- Osborn, M. Weber, K. 1980. Dimethyl sulfoxide and the ionophore A 23187 affect the arrangement of actin and induce nuclear actin para crystals in PtK 2 cells. *Exp. Cell Res.* 129: 103-114.
- Pearson, T.W., Dawson, H.J. y Lackey, H.B. 1981. Natural occurring levels of dimethyl sulfoxide in selected fruits, vegetables, grains and beverages. *J. Agric. Food Chem.* 29: 1089-1091.
- Paul, M.M. 1966. Comparison of dimethyl sulfoxide and conventional treatment of sports injuries. En: *Dimethyl Sulfoxid*, G. Laudahn y K. Gertich (Eds.), DMSO Internationales Symposium am 8./9., Saladruck, Berlin, Alemania.
- Paul, M.M. 1967. Interval therapy with dimethyl sulfoxide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 141: 586-598.
- Penrod, D.S., Bacharach, B. y Templeton, J.Y. III 1967. Dimethyl sulfoxide for incisional pain after thoracotomy: preliminary report. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 141: 493-495.
- Perlman, F. y Wolfe, H.F. 1966. Dimethylsulfoxide as a penetrant carrier of allergens through intact human skin. *J. Allergy* 38: 299.
- Pluenneke, R.H. y Burson, B.L. 1973. Soybean (*Glycine max* 'L.' Merr.) seed resistance to dimethyl sulfoxide  $^{35}\text{S}$  penetration. *Bot. Gaz.* 134: 243-246.
- Ramanna, M.S. y Natarajan, A.T. 1966. Chromosome breakage induced by alkyl-alkane-sulfonates under different physical treatment conditions. *Chromosoma* 18: 44-49.
- Rammler, D.H. 1967. The effect of DMSO on several enzyme systems. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 141: 291-299.
- Rammler, D.H. 1971. Use of DMSO in enzyme-catalized reactions. En: *Dimethyl Sulfoxide*, Vol. 1, S.W. Jacob, E.E. Rosebaum y D.C. Wood (Eds.), M. Dekker, Inc., Nueva York, p. 189.
- Rammler, D.H. y Zaffaroni, A. 1967. Biological implications of DMSO based on a review of its chemical properties. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 141: 13-23.
- Read, J. 1959. Mitosis and the inhibition of mitosis by radiations. En: *Radiation Biology of Vicia faba in Relation to the General Problem*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 48-69.

- Reuvers, A.P., Greenstock, C.L., Borsa, J. y Chapman, J.D. 1973. Studies on the mechanism of chemical radioprotection by dimethyl sulfoxide. *Int. J. Radiat. Biol.* 24: 533-536.
- Revell, S.H. 1952. En: *Symposium on Chromosome Breakage*, Oliver and Boyd, Londres.
- Revell, S.H. 1953. Chromosome breakage by X-rays and radiomimetic substances in *Vicia*. *Hereditas* 6 (Supl.): 107-124.
- Revell, S.H. 1955. A new hypothesis for chromatid changes. En: *Proceedings of the Radiobiology Symposium* (Liège, 1954), Z.M. Bacq y P. Alexander (Eds.), Butterworths, Londres, pp. 243-253.
- Revell, S.H. 1958. A new hypothesis for the interpretation of chromatid aberrations, and its relevance to theories for the mode of action of chemical agents. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 68: 802-807.
- Revell, S.H. 1963. Chromatid aberrations, the generalized theory. En: *Radiation Induced Chromosome Aberrations*, S. Wolff (Ed.), Nueva York, pp. 41-72.
- Richmond, J.E. 1982. Low concentrations of dimethyl sulfoxide accelerate conjugation and incorporation of glycine and glucosamine in *Tetrahymena*. *Protoplasma* 110: 34-38.
- Robinson, T.W.E. y Dover, J.R. 1972. Experimental zosteriform herpes simplex virus infection in mouse skin. *Brit. J. Dermatol.* 86: 40.
- Roubal, W.T. y Tappel, A.L. 1966. Damage to proteins, enzymes, and amino acids by peroxidizing lipids. *Arch. Biochem. Biophys.* 113: 5.
- Sams, W.M. Jr., Carroll, N.V. y Crantz, P.L. 1966. Effect of dimethyl sulfoxide on isolated-innervated skeletal smooth and cardiac muscle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 122: 103.
- Sanger, J.E., Sanger, J.M., Kreis, T.E. y Jockusch, B.M. 1980. Reversible traslocation of cytoplasmic actin into the nucleus cause by dimethyl sulfoxide. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77: 5268-5272.
- Savage, J.R.K. 1975. Radiation-induced chromosomal aberrations in the plant *Tradescantia*: dose-response curves. I. Preliminary considerations. *Radiation Bot.* 15: 87-140.
- Scherbel, A.L. y McCormack, L.J. 1967. Collagen alterations in patients with generalized scleroderma (progressive systemic sclerosis) treated with dimethyl sulfoxide (DMSO). *Arthritis Rheum.* 10: 309.
- Schläfer, H.L. y Schaffernicht, W. 1960. Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel für Anorganische Verbindungen. *Angew. Chem.* 72: 618-626.
- Schmid, W. 1973. Chemical mutagen testing on *in vivo* somatic mammalian cells. *Agents and Actions* 3: 77-85.

- Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Res.* 31: 9-15.
- Schneider, W. 1957. *Methods in Enzymology*, Vol. III. S. Colowick y Kaplan (Eds.). Academic Press, Nueva York.
- Schwoppe, A.D., Randel, M.A. y Broome, M.G. 1981. Dimethyl sulfoxide permeation through glove materials. *Am. Ind. Hyg. Assoc.* 42: 722-725.
- Seibert, F.B., Farrelly, F.K. y Shepherd, C.C. 1967. DMSO and other combatants against bacteria isolated from leukemia and cancer patients. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 141: 175-201.
- Self, R., Casey, J.C. y Swain, T. 1963. The low-boiling volatiles of cooked foods. *Chem. Ind. (London)*: 863-864
- Shealy, C.N. 1966. The physiological substrate of pain. *Headache* 6: 101.
- Singh, D.R., Mahajan, J.M. y Krishnan, D. 1976. Effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on radiation induced heteroallelic reversion in diploid yeast. *Mutation Res.* 37: 193-200.
- Smale, B.C., Lasater, N.J. y Hunter, B.T. 1975. Fate and metabolism of dimethyl sulfoxide in agricultural crops. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 243: 228-236.
- Spiegel, M.R. 1970. *Estadística*, serie de compendios Schaum, McGraw-Hill, México, pp. 168-171.
- Steinberg, A. 1967. The employment of dimethyl sulfoxide as an anti-inflammatory agent and steroid-transporter in diversified clinical deceases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 141: 532-550.
- Stewart, B.H., Branson, A.C., Hewitt, C.B., Kiser, W.S. y Straffon, R.A. 1972. The treatment of patients with interstitial cystitis, with special reference to intravesical DMSO. *J. Urol.* 107: 377.
- Stoughton, R.B. y Fritsch, W. 1964. Influence of dimethyl sulfoxide on human percutaneous absorption. *Arch. Dermatol.* 90: 512-517.
- Sulzberger, M.B., Cortese, T., Jr., Fishman, L., Wiley, H.S. y Peyakovich, P.S. 1967. Some effects of DMSO on human skin *in vivo*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 141: 437-450.
- Szmant, H.H. 1975. Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 243: 20-23.
- Taylor, J.H., Haut, W.P. y Taung, J. 1962. Effect of fluorodeoxyuridine on DNA replication chromosome breakage and reunion. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 48: 190-198.
- Tomkins, D.J. y Grant, W.F. 1972. Comparative cytological effects of the pesticides menazon, metabromuron and tetrachloroisophthalonitrile, in *Hordeum* and *Tradescantia*. *Can. J. Genet. Cytol.* 14: 245-256.

- Tressl, R., Bahri, D., Holzer, M. y Kossa, T. 1977. Formation of flavor components in asparagus. 2. Formation of flavor components in cooked asparagus. *J. Agric. Food Chem.* 25: 459-463.
- Vannini, G.L. y Poli, F. 1983. Binucleation and abnormal chromosome distribution in *Euglena gracilis* cells treated with dimethyl sulfoxide. *Protoplasma* 114: 62-66.
- Von Ledebur, M. y Schmid, W. 1973. The micronucleus test methodological aspects. *Mutation Res.* 19: 109-117.
- Webb, S.J. 1965. *Bound Water in Biological Integrity*, C.C. Thomas (Ed.), Springfield, Illinois.
- Webster, P.L. 1973. Effects of cycloheximide on mitosis in *Vicia faba* root-meristem cells. *Exp. Bot.* 21: 239-244.
- Webster, P.L. y Van't Hof, J. 1970. Initiation of DNA synthesis and mitosis in stationary, transitional and proliferative phase meristems: requirements for RNA and protein synthesis. *Amer. J. Bot.* 57: 130-139.
- Wehland, J., Weber, K. y Osborn, M. 1980. Translocation of actin from the cytoplasm into the nucleus in mammalian cells exposed to dimethylsulfoxide. *Biol. Cell* 39: 109-111.
- Weissmann, G., Sessa, G. y Bevans, V. 1968. Effect of DMSO on the stabilization of lysosomes by cortisone and chloroquine *in vitro*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 141: 326-332.
- Wolff, S. 1960. Radiation studies on the nature chromosome breakage. *Amer. Naturalist.* 94: 85-93.
- Wolff, S. 1961a. Radiation genetics. En: *Mechanisms in Radiobiology*, Vol. I, M. Errera y A. Forsberg (Eds.), Academic Press, Nueva York, pp. 419-475.
- Woff, S. 1961b. Some post irradiation phenomena that affect the induction of chromosome aberrations. *J. Cell Comp. Physiol.* 58: (Suppl. 1): 151-162.
- Wood, D.C. 1971. Fate and metabolism of DMSO (dimethyl sulfoxide). En: *Dimethyl Sulfoxide*, Vol. 1, S.W. Jacob, E.E. Rosebaum y D.C. Wood (Eds.), M. Dekker, Inc., Nueva York, p. 133.
- Wood, D. C. y Wood J. 1975. Pharmacologic and biochemical consideration of dimethyl sulfoxide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 243: 7-19.
- Wood, D. C., Sweet, D., Van Dolah J., Smith, J. C. II y Contaxis, I. 1967. A study of DMSO and steroids in rabbit eyes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 141: 346-380.
- Wuu, K.D. y Grant, W.F. 1966. Morphological and somatic chromosomal aberrations induced by pesticides in barley (*Hordeum vulgare*). *Can. J. Genet. Cytol.* 8: 481-501.

- Wuu, K.D. y Grant, W.F. 1967. Chromosomal aberrations induced in somatic cells of *Vicia faba* by pesticides. *Nucleus* 10: 37-46.
- Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T. y Okada, M. 1977. Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*. *Mutation Res.* 48: 121-130.
- Yee, B., Tsuyumu, S. y Adams, B.G. 1972. Biological effects of dimethyl sulfoxide on yeasts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 49: 1336-1342.
- Zetler, G. y Langhof, H.J. 1971. Dimethyl sulfoxide, a reversible inactivator of receptor-effector systems in the isolated guinea-pig ileum. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 270: 361.
- Zuckner, J., Uddin, J. y Gantner, G.E. Jr. 1967. Local application of dimethyl sulfoxide and DMSO combined with triamcinolone acetonide in rheumatoid arthritis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 141: 555-559.

TABLA I

## PROPIEDADES FISICAS DEL DMSO

PROPIEDAD	VALOR	
PUNTO DE CONGELACION, °C	18.56	°*
PUNTO DE EBULLICION A 1 ATM, °C	189.00	°*
DENSIDAD, g/ml A 25°C	1.0958	*
CONSTANTE DIELECTRICA, 25°C, 8 mc	46.7	,
MOMENTO DIPOLAR, D A 20°C	4.3	°

° Hovermale y Sears, 1956.

° Schläfer y Schaffernicht, 1960.

\* Lindberg, 1961 (citado por McGregor, 1967).



TABLA II

FRECUENCIA DE ALTERACIONES (—TESTIGO) EN LOS CROMOSOMAS DE *Vicia faba*  
INDUCIDAS POR 0.10 % DE DMSO DURANTE 4 HORAS Y DIFERENTES  
TIEMPOS DE RECUPERACION

Tiempo de Recuperación (HORAS)	Total de Anafases	Anafases Anormales	Aberraciones Totales	Fragmentos		Puentes*		Cromosomas con Centrómero Inactivado	Iso-cromosomas	Anafases Multipolares	Micronúcleos**
		%	%	Sencillos	Dobles	Sencillos	Dobles				
2	844	0.00	0.20	0.15	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.25
18	1753	2.35	2.45	0.70	0.00	1.75	0.00	0.40	0.00	0.20	0.05
44	1879	0.53	0.17	0.15	0.00	0.17	0.00	0.26	0.00	0.05	0.05

\* con y sin fragmentos

\*\* se analizaron 2000 células en interfase para cada caso

**TABLA III**

**FRECUENCIA DE ALTERACIONES (-TESTIGO) EN LOS CROMOSOMAS DE *Vicia faba*  
INDUCIDAS POR 1 % DE DMSO DURANTE 4 HORAS Y DIFERENTES  
TIEMPOS DE RECUPERACION**

Tiempo de Recuperación (HORAS)	Total de Anafases	Anafases Anormales	Aberraciones Totales	Fragmentos		Puentes*		Cromosomas con Centrómero Inactivado	Isocromosomas	Anafases Multipolares	Micronúcleos**
		%		Sencillos	Dobles	Sencillos	Dobles				
2	1532	1,71	2,03	0,02	0,00	2,77	0,00	0,00	0,02	0,05	0,70
18	2635	2,30	1,92	0,63	0,00	1,29	0,00	0,00	0,76	0,00	0,85
44	1265	3,41	3,12	0,74	0,59	1,04	0,74	0,15	0,15	0,00	0,35

\* con y sin fragmentos

\*\* se analizaron 2000 células en interfase para cada caso

TABLA IV

FRECUENCIA DE ALTERACIONES (-TESTIGO) EN LOS CROMOSOMAS DE *Vicia faba*  
INDUCIDAS POR 5 % DE DMSO DURANTE 4 HORAS Y DIFERENTES  
TIEMPOS DE RECUPERACION

Tiempo de Recuperación (HORAS)	Total de Anafases	Anafases Anormales	A aberraciones Totales	Fragmentos		Puentes*		Cromosomas con Centrómero Inactivado	Iso-cromosomas	Anafases Multipolares	Micronúcleos**
		%		%	Sencillos	Dobles	Sencillos				
2	1029	6.97	9.01	1.20	0.00	7.82	0.00	1.50	0.00	0.00	1.20
18	1120	1.86	0.93	0.47	0.00	0.46	0.00	0.94	0.00	0.00	0.25
44	1858	1.73	0.64	0.29	0.00	0.23	0.12	1.44	0.00	0.00	0.23

\* con y sin fragmentos

\*\* se analizaron 2000 células en interfase para cada caso

TABLA V

FRECUENCIA DE ALTERACIONES (-TESTIGO) EN LOS CROMOSOMAS DE *Vicia faba*  
 INDUCIDAS POR 10 % DE DMSO DURANTE 4 HORAS Y DIFERENTES  
 TIEMPOS DE RECUPERACION

Tiempo de Recuperación (HORAS)	Total de Anafases	Anafases Anormales	Aberraciones Totales	Fragmentos		Puentes*		Cromosomas con Centrómero Inactivado	Iso-cromosomas	Anafases Multipolares	Micro-núcleos**
		%	%	Sencillos	Dobles	Sencillos	Dobles				
2	665	6.78	7.77	0.84	0.00	6.99	0.00	0.00	0.39	0.10	0.50
18	469	10.02	10.06	3.72	0.39	4.99	0.91	0.13	0.13	1.65	0.55
44	1028	4.87	4.16	1.96	0.31	1.22	1.22	0.51	0.31	0.10	0.50

\* con y sin fragmentos

\*\* se analizaron 2000 células en interfase para cada caso

TABLA VI

FRECUENCIA DE ALTERACIONES (—TESTIGO) EN LOS CROMOSOMAS DE *Vicia faba*  
INDUCIDAS POR 20 % DE DMSO DURANTE 4 HORAS Y DIFERENTES  
TIEMPOS DE RECUPERACION

Tiempo de Recuperación (HORAS)	Total de Anafases	Anafases Anormales	Aberraciones Totales	Fragmentos		Puentes*		Cromosomas con Centrómero Inactivado	Isocromosomas	Anafases Multipolares	Micronúcleos**
		%	%	Sencillos	Dobles	Sencillos	Dobles				
2	456	23.73	39.18	1.60	0.00	37.58	0.00	1.48	0.00	0.00	0.55
18	613	14.02	14.48	0.50	0.00	11.43	2.50	3.22	0.00	0.00	1.30
44	385	32.75	36.91	4.88	0.00	24.01	8.10	1.45	0.00	0.55	0.60

\* con y sin fragmentos

\*\* se analizaron 2000 células en interfase para cada caso

TABLA VII

FRECUENCIA DE ALTERACIONES (—TESTIGO) EN LOS CROMOSOMAS DE *Vicia faba*  
 INDUCIDAS POR 30 % DE DMSO DURANTE 4 HORAS Y DIFERENTES  
 TIEMPOS DE RECUPERACION

Tiempo de Recuperación	Total de Anafases	Anafases Anormales	Aberraciones Totales	Fragmentos		Puentes*		Cromosomas con Centrómero Inactivado	Iso-cromosomas	Anafases Multipolares	Micro-núcleos**
(HORAS)		%	%	Sencillos	Dobles	Sencillos	Dobles	%	%	%	%
2	854	8.06	12.14	4.18	0.00	8.12	0.00	0.00	0.00	0.20	1.30
18	376	11.51	11.45	0.57	1.10	9.03	0.74	0.60	0.37	0.30	0.75
44	305	8.99	9.19	1.45	0.00	5.19	2.55	0.00	0.85	0.15	0.45

\* con y sin fragmentos

\*\* se analizaron 2000 células en interfase para cada caso

TABLA VIII

FRECUENCIA DE ALTERACIONES (-TESTIGO) EN LOS CROMOSOMAS DE *Vicia faba*  
INDUCIDAS POR 40 % DE DMSO DURANTE 4 HORAS Y DIFERENTES  
TIEMPOS DE RECUPERACION

Tiempo de Recuperación	Total de Anafases	Anafases Anormales	Aberraciones Totales	Fragmentos		Puentes*		Cromosomas con Centrómero Inactivado	Iso-cromosomas	Anafases Multipolares	Micro-núcleos**
(HORAS)		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
2	796	5.05	6.47	1.15	0.00	5.27	0.00	1.60	0.00	0.20	1.35
18	658	4.67	4.15	0.00	0.00	4.50	0.00	2.24	0.00	0.40	0.55
44	567	5.83	6.39	0.99	0.00	5.85	0.00	0.40	0.33	0.45	0.55

\* con y sin fragmentos

\*\* se analizaron 2000 células en interfase para cada caso

TABLA IX

FRECUENCIA DE ALTERACIONES (-TESTIGO) EN LOS CROMOSOMAS DE *Vicia faba*  
INDUCIDAS CON VARIAS CONCENTRACIONES DE DMSO DURANTE 4 HORAS  
DE TRATAMIENTO Y 2 DE RECUPERACION

Concen- tración	Total de Anafases	Anafases Anormales	Aberra- ciones Totales	Fragmentos		Puentes		Cromosomas con Centró- mero Inac- tivado	Iso- cromo- somas	Anafases Multipo- lares	Micro- nú- cleos
%		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
0.10	844	0.00	0.20	0.15	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.25
1.00	1532	1.71	2.03	0.02	0.00	2.77	0.00	0.00	0.02	0.05	0.70
5.00	1029	6.97	9.01	1.20	0.00	7.82	0.00	1.50	0.00	0.00	1.20
10.00	665	6.78	7.77	0.84	0.00	6.99	0.00	0.00	0.39	0.10	0.50
20.00	456	23.73	39.18	1.60	0.00	37.58	0.00	1.48	0.00	0.00	0.55
30.00	854	8.06	12.14	4.18	0.00	8.12	0.00	0.00	0.00	0.20	1.30
40.00	796	5.05	6.47	1.15	0.00	5.27	0.00	1.60	0.00	0.20	1.35



TABLA X

FRECUENCIA DE ALTERACIONES (—TESTIGO) EN LOS CROMOSOMAS DE *Vicia faba*  
INDUCIDAS CON VARIAS CONCENTRACIONES DE DMSO DURANTE 4 HORAS  
DE TRATAMIENTO Y 18 DE RECUPERACION

Concen- tración	Total de Anafases	Anafases Anormales	Alter- aciones Totales	Fragmentos		Puentes		Cromosomas con Centró- mero Inac- tivado	Iso- cromo- somas	Anafases Multipo- lares	Micro- nú- cleos
%		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
0.10	1753	2.35	2.45	0.70	0.00	1.75	0.00	0.04	0.00	0.20	0.05
1.00	2635	2.30	1.92	0.63	0.00	1.29	0.00	0.00	0.76	0.00	0.85
5.00	1120	1.86	0.93	0.47	0.00	0.46	0.00	0.94	0.00	0.00	0.25
10.00	469	10.02	10.06	3.72	0.39	4.99	0.91	0.13	0.13	1.65	0.55
20.00	613	14.02	14.48	0.50	0.00	11.43	2.50	3.22	0.00	0.00	1.30
30.00	376	11.51	11.45	0.57	1.10	9.03	0.74	0.60	0.37	0.30	0.75
40.00	658	4.67	4.15	0.00	0.00	4.50	0.00	2.24	0.00	0.40	0.55

TABLA XI

FRECUENCIA DE ALTERACIONES (-TESTIGO) EN LOS CROMOSOMAS DE *Vicia faba*  
INDUCIDAS CON VARIAS CONCENTRACIONES DE DMSO DURANTE 4 HORAS  
DE TRATAMIENTO Y 44 DE RECUPERACION

Concen- tración	Total de Anafases	Anafases Anormales	Aberra- ciones Totales	Fragmentos		Puentes		Cromosomas con Centró- mero Inac- tivado	Iso- cromo- somas	Anafases Multipo- lares	Micro- nú- cleos
%		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
0.10	1879	0.53	0.17	0.15	0.00	0.17	0.00	0.26	0.00	0.05	0.05
1.00	1265	3.41	3.12	0.74	0.59	1.04	0.74	0.15	0.15	0.00	0.35
5.00	1858	1.73	0.64	0.29	0.00	0.23	0.12	1.44	0.00	0.00	0.23
10.00	1028	4.87	4.16	1.96	0.31	1.22	1.22	0.51	0.31	0.10	0.50
20.00	385	32.75	36.91	4.88	0.00	24.01	8.02	1.45	0.00	0.55	0.60
30.00	305	8.99	9.19	1.45	0.00	5.19	2.55	0.00	0.85	0.15	0.45
40.00	567	5.83	6.39	0.99	0.00	5.85	0.00	0.40	0.33	0.45	0.55

TABLA XII

FRECUENCIA PROMEDIO DE ALTERACIONES (-TESTIGO) EN LOS CROMOSOMAS DE *Vicia faba*  
INDUCIDAS POR 4 HORAS DE TRATAMIENTO CON DIVERSAS CONCENTRACIONES  
DE DMSO Y VARIOS TIEMPOS DE RECUPERACION

Concen- tración	Total de Anafases	Anafases Anormales	Abe- ra- ciones Totales	Fragmentos		Puentes		Cromosomas con Centró- mero Inac- tivado	Iso- cromo- somas	Anafases Multipo- lares	Micro- nú- cleos
				Senci- llos	Dobles	Senci- llos	Dobles				
%		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
0.10	4476	0.96	0.94	0.33	0.00	0.66	0.00	0.22	0.00	0.08	0.12
1.00	5432	2.47	2.36	0.46	0.20	1.70	0.25	0.05	0.31	0.02	0.63
5.00	4007	3.52	3.53	0.65	0.00	2.84	0.04	1.29	0.00	0.00	0.56
10.00	2162	7.22	7.33	2.17	0.23	4.40	0.71	0.21	0.28	0.62	0.52
20.00	1454	23.50	30.19	2.33	0.00	24.34	3.51	2.05	0.00	0.18	0.82
30.00	1535	9.52	10.93	2.07	0.37	7.45	1.10	0.20	0.41	0.22	0.83
40.00	2021	5.18	5.67	0.71	0.00	5.21	0.00	1.41	0.11	0.35	0.82

TABLA XIII

**INDICES MITOTICOS OBTENIDOS CON DIVERSAS  
CONCENTRACIONES DE DMSO EN LAS CELULAS  
MERISTEMATICAS DE LA RAIZ DE *Vicia faba***

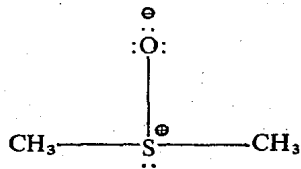
CONCENTRACION %	IM	VALOR DE Z	
0.00	5.60		
0.10	5.90	0.41	NS
1.00	6.93	1.74	*
5.00	5.46	0.19	NS
10.00	4.63	1.39	NS
20.00	3.66	2.92	**
30.00	4.36	1.80	**
40.00	5.00	0.85	NS

$z (0.05) = \pm 1.645$

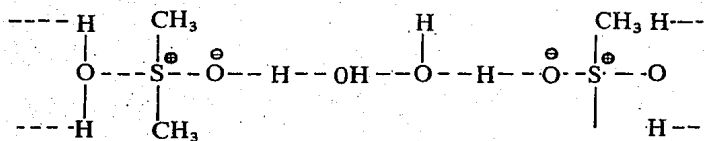
\* Efecto estimulante

\*\* Efecto inhibidor

NS No significativo

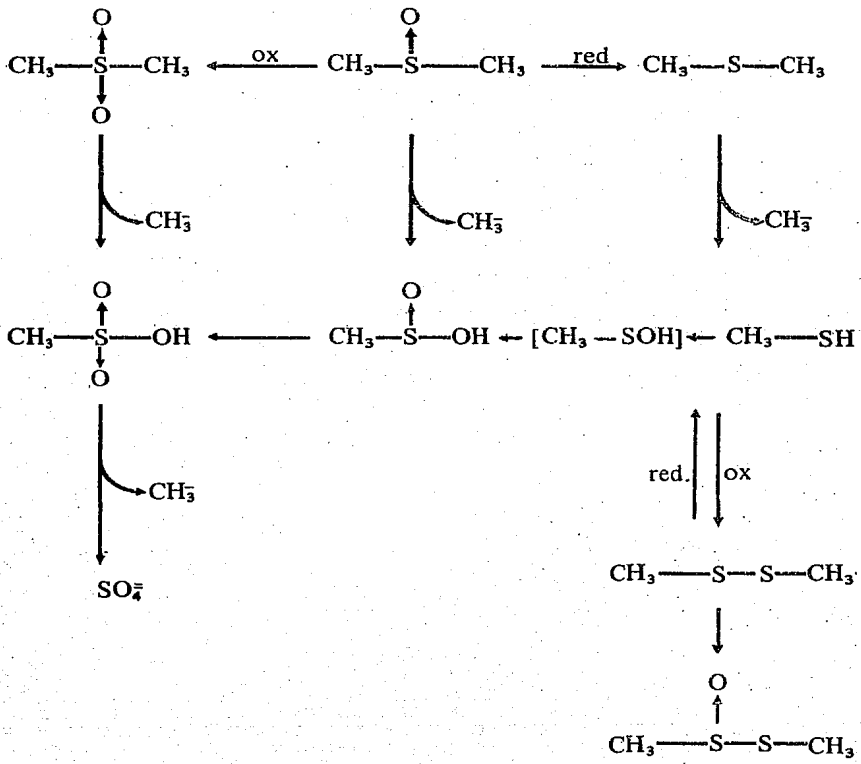


A. FORMA POLARIZADA



B. POSIBLE FORMA HIDRATADA

FIGURA 1 ESTRUCTURA QUIMICA DEL DMSO



**FIGURA 2. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE UNA VIA METABOLICA PROBABLE PARA EL DMSO. (Rammler y Zaffaroni, 1967)**

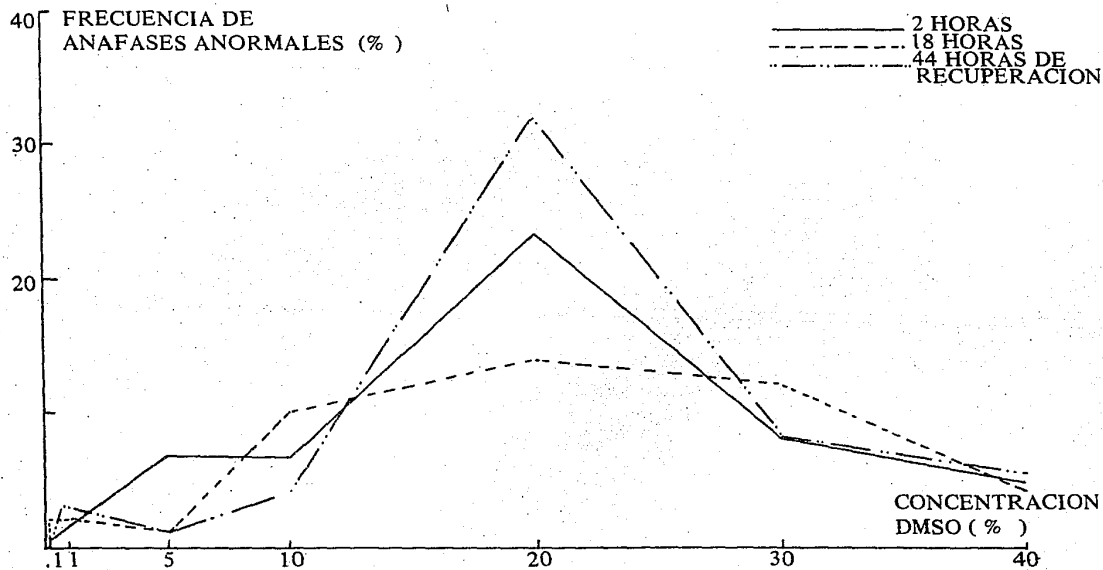
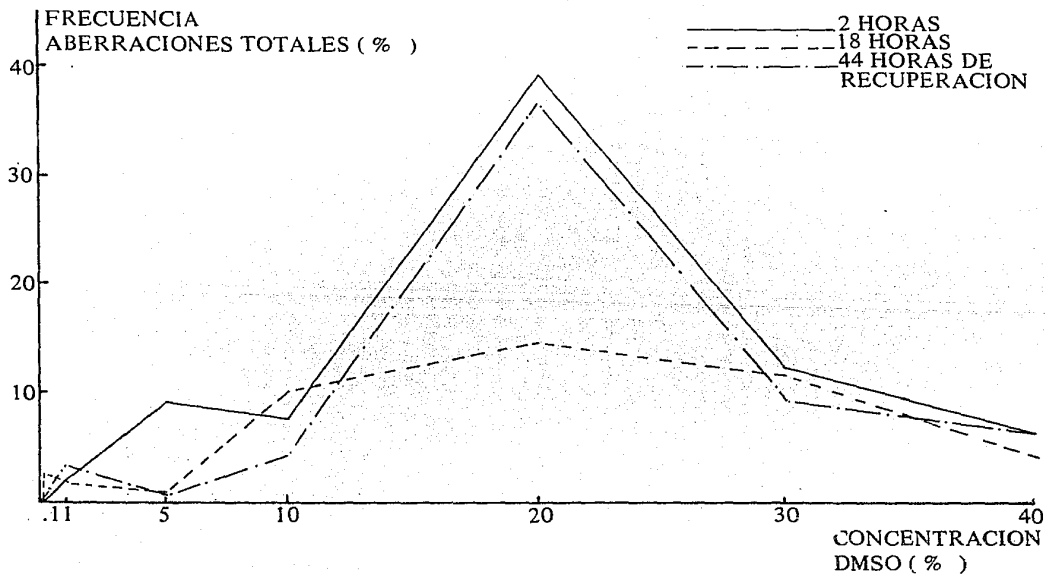


FIGURA 3. FRECUENCIA DE ANAFASES ANORMALES INDUCIDAS POR VARIAS CONCENTRACIONES DE DMSO APLICADAS EN *Vicia faba* POR 4 HORAS



FRECUENCIA DE ABERRACIONES TOTALES  
INDUCIDAS POR VARIAS CONCENTRACIONES DE DMSO  
APLICADAS EN *Vicia faba* POR 4 HORAS

FIGURA 4



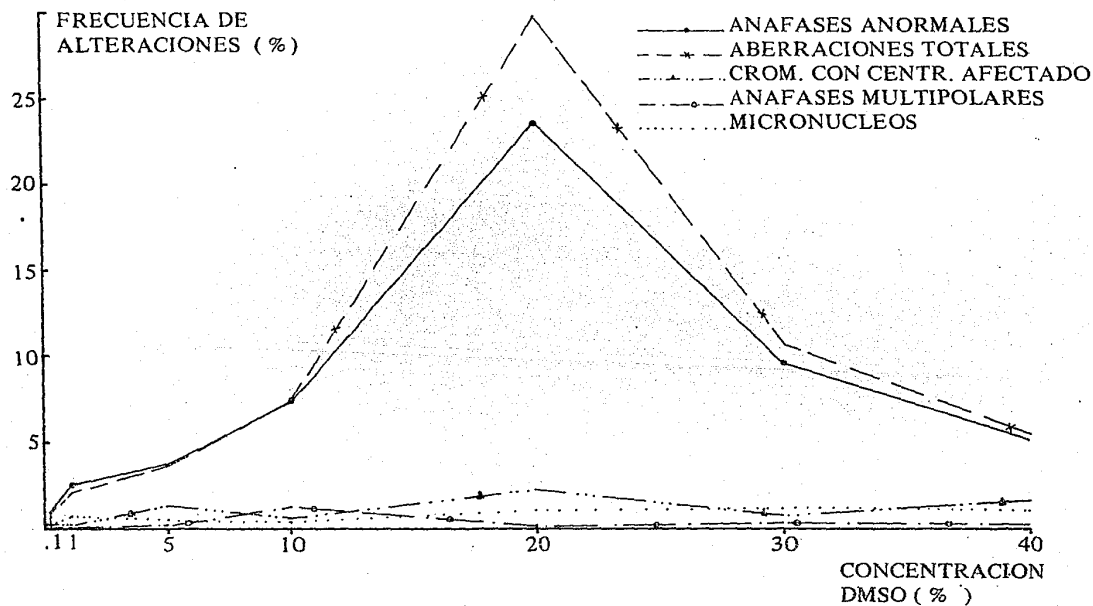


FIGURA 5. FRECUENCIA DE ALTERACIONES INDUCIDAS POR VARIAS CONCENTRACIONES DE DMSO APLICADAS EN *Vicia faba* POR 4 HORAS

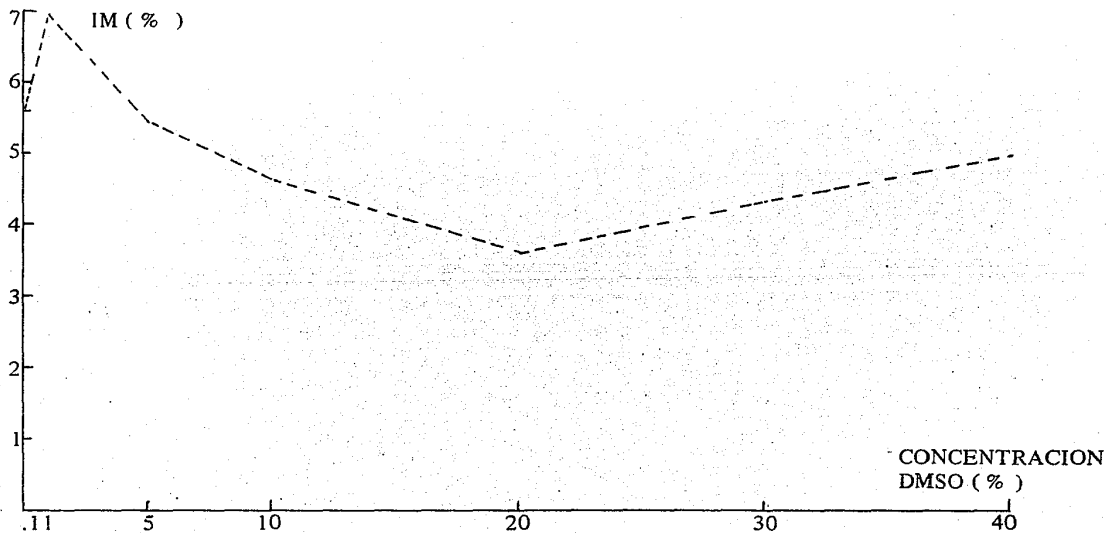


FIGURA 7  
INDICE MITOTICO EN LAS CELULAS MERISTEMATICAS  
DE LA RAIZ DE *Vicia faba* TRATADAS CON VARIAS  
CONCENTRACIONES DE DMSO APLICADAS POR 4 HORAS

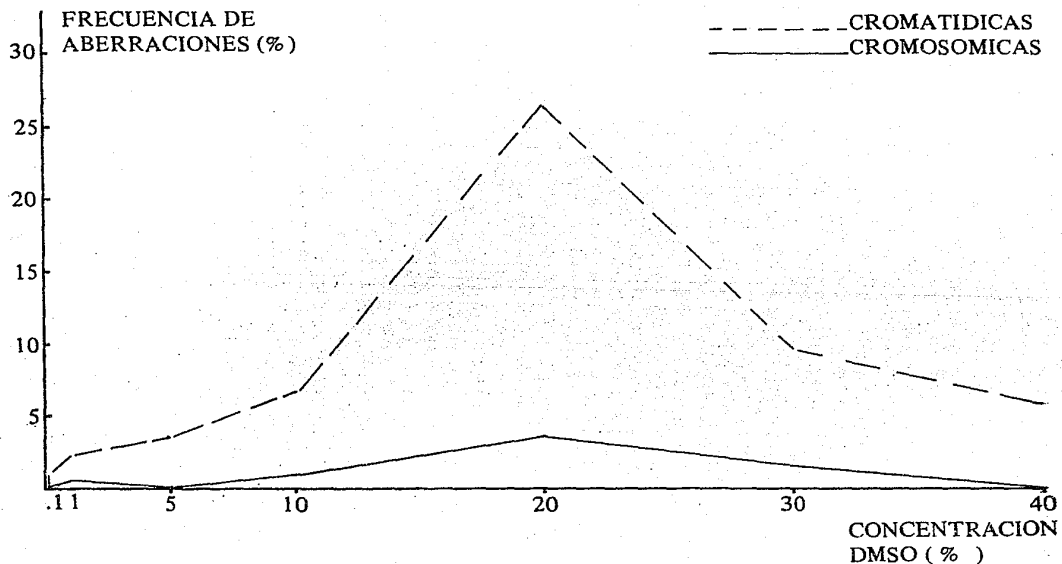


FIGURA 6: FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMATIDICAS Y CROMOSOMICAS INDUCIDAS POR DMSO EN *Vicia faba*