

27
209

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“CUAUTITLAN”



ANALISIS DEL EFECTO CITOGENETICO PRODUCIDO
POR LA FRACCION ALCOHOLICA DEL BRANDY EN
CELULAS DE MEDULA OSEA DE RATON

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A

HORTENSIA JIMENEZ DIAZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. EDUARDO MADRIGAL BUJAJDAR

ASESORA: Q. F. B. SANDRA DIAZ BARRIGA ARCEO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1987



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.

I N D I C E

1. RESUMEN.	1
2. ABREVIATURAS	3
3. INTRODUCCION	
3.1. Antecedentes	4
3.2. Alcoholismo.	6
3.3. Cáncer y alcoholismo	9
3.4. Mutagénesis y alcoholismo.	11
3.5. Justificación.	14
Cuadro I: Especificaciones fisicoquímicas del Brandy.	16
Cuadro II: Efectos sistémicos del alcoholismo	17
Figura 1: Representación gráfica de tres ci- clos de replicación celular en pre- sencia de BrdU.	18
4. OBJETIVOS.	19
5. MATERIAL Y METODOS	
5.1. Material biológico	20
5.2. Obtención de la FAB.	20
5.3. Determinación de los componentes de la FAB.	20
5.4. Determinación de la DL50 de la FAB	20
5.5. Estudio citogenético	21
5.6. Observaciones.	23
5.7. Tratamiento estadístico.	24

Figura 2: Metafase de segunda división de la médula ósea de ratón tratado con FAB (825 mg/kg)25
Figura 3: Metafase de segunda división de la médula ósea de ratón tratado con MMC (2.8 mg/kg)26
Figura 4: Metafase de primera división de la médula ósea de ratón tratado con FAB (825 mg/kg)27
Figura 5: Metafase de tercera división de la médula ósea de ratón tratado con FAB (825 mg/kg)28

6. RESULTADOS

6.1. Determinación de los componentes de la FAB.29
6.2. Determinación de la DL50 de la FAB29
6.3. Estudio citogenético	
6.3.1. Intercambio de Cromátidas Hermanas30
6.3.2. Proliferación Celular.31
Cuadro III: Porcentaje de mortalidad para cada una de las dosis de FAB utilizadas en la determinación de la DL50.32
Cuadro IV: Efecto de la FAB sobre la frecuencia de ICH33
Cuadro V: Efecto de la FAB sobre la proliferación celular.34

Figura 6: Gráfica de "x" vs "l" para determi- nar la DL5035
Figura 7: Gráfica del efecto de la FAB sobre la frecuencia de ICH.36
7. DISCUSION.37
8. CONCLUSIONES41
9. BIBLIOGRAFIA42

1. RESUMEN

Como parte de los estudios citogenéticos para determinar la capacidad mutagénica de una fracción alcohólica del brandy (FAB), se realizó una evaluación in vivo de la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) y de la proliferación celular en médula ósea de ratón. Las dosis de FAB utilizadas fueron de 165, 330, 495, 660 y 825 mg/kg de peso. Como testigo positivo se utilizó mitomicina-C (MMC) en dosis de 2.8 mg/kg de peso y, como testigo negativo, solución salina fisiológica (SSF) en dosis de 20 ml/kg de peso.

Para la evaluación de la frecuencia de ICH se analizaron 100 células para cada dosis (4 ratones por dosis, 25 células por ratón), determinando el número de ICH/célula. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), con el que se demostró que las diferencias observadas entre las distintas dosis son significativas estadísticamente. También se aplicó la prueba "t" de Student, resultando significativos los aumentos de ICH provocados por las dosis de 660 y 825 mg/kg con respecto al testigo negativo ($p=0.01$). El análisis de regresión nos da la ecuación de la curva obtenida, que es una parábola con una ordenada al origen de 5.6818, un coeficiente de linealidad de 5.8203×10^{-4} y un coeficiente de curvatura de 2.9844×10^{-6} . Por último, se determinaron el coeficiente de correlación, que tiene un valor de 0.9877, y el coeficiente de determinación, que es de 0.9756, lo cual nos indica que el 97.56% del efecto obser-

vado se debe al tratamiento aplicado.

Con respecto a la proliferación celular, se examinaron 400 células para cada dosis (4 ratones por dosis, 100 células por ratón), determinando, en cada caso, el porcentaje de células en primera, segunda y tercera o posteriores divisiones para, a partir de estos datos, calcular el índice de replicación (IR) y el tiempo promedio de generación (TPG), los cuales no fueron afectados por la FAB.

2. ABREVIATURAS

Acido desoxirribonucléico.	ADN
Acido ribonucléico.	ARN
Bromodesoxiuridina.	BrdU
Centímetros.	cm
Cloruro de potasio.	KCl
Decilitros.	dl
Dosis letal media.	DL50
Fracción alcohólica del brandy.	FAB
Grados centígrados.	°C
Gramos.	g
Horas.	hrs
Indice de replicación.	IR
Intercambios de cromátidas hermanas	ICH
Intraperitoneal.	IP
Kilogramos.	kg
Microgramos.	ug
Miligramos	mg
Mililitros.	ml
Milímetros.	mm
Minutos.	min
Mitomicina-C.	MMC
Molar.	M
Revoluciones por minuto.	rpm
Solución salina fisiológica.	SSF
Tiempo promedio de generación.	TPG

3. INTRODUCCION .

3.1. Antecedentes.

El consumo de bebidas alcohólicas por el hombre es casi tan antiguo como él. Se tienen evidencias de que desde unos 6000 años a.C. se producían en diversas zonas del mundo bebidas como vino y cerveza, utilizando para ello la acción fermentativa de las levaduras sobre algunos azúcares (10). Existen también testimonios escritos sobre el conocimiento que los hebreos, egipcios, griegos y romanos tenían del vino y sus efectos en el organismo. Estos pueblos dieron crédito a los dioses por haber introducido el vino, reconociendo tal acción como buena y enriquecedora de sus culturas (35).

El cultivo de la vid (Vitis vinifera) para producir vino fue conocido por los asirios y egipcios desde el año 3500 a.C. y por los griegos en 1400 a.C., quienes llevaron la uva a Marsella alrededor del año 600 a.C., y su cultivo se fue extendiendo por Europa hasta llegar a su máximo en el siglo XV (2).

En la Edad Media, un árabe conocido como Jahir ibn Hayyan introdujo la técnica de la destilación, siendo así el primero en producir una bebida con mayor concentración de etanol, que es el ingrediente activo de las bebidas alcohólicas (10) y que fue considerado por los alquimistas como el elixir de la vida y remedio de todas las enfermedades, lo cual se refleja en el término "whisky", del gaélico "usquebaugh", que significa "agua de la vida" (6).

Otra de las bebidas alcohólicas que se obtienen con esta técnica es el brandy, que es de las más populares en México. Se afirma que en los últimos años ha desplazado al tequila y al ron (27). Se obtiene por la destilación de vinos 100% de uva fresca cuyos mostos se someten a fermentación alcohólica (31). Durante y después de la destilación se eliminan algunos aldehídos y el aceite de fusel, constituido por alcoholes superiores. Posteriormente se procede a añadir caramelo y se diluye con agua para, finalmente, añejar la bebida en barricas de roble blanco o encino durante por lo menos 4 años. A lo largo del añejamiento se eliminan algunas sustancias y se forman otras nuevas que le dan un olor y sabor agradables, mejorando su carácter y calidad (2, 31).

El brandy debe tener un color ambarino, así como un olor y sabor característicos de la bebida. En el Cuadro I se muestran las especificaciones físicas y químicas con las que debe cumplir el brandy en México.

Además de lo enlistado en el Cuadro I, el brandy contiene caramelo como colorante y un máximo del 1.5% de azúcar u otros edulcorantes para abocarlo. Con respecto a contaminantes químicos, el brandy no debe exceder de los siguientes límites (31):

PLOMO (como Pb)	0.5 mg/dl
ARSENICO (como As)	1.5 mg/dl
COBRE (como Cu)	1.0 mg/dl
ZINC (como Zn)	15.0 mg/dl

Entre los alcoholes que se encuentran en el brandy además del etanol, podemos mencionar al metanol, n-propanol, sec-butanol, isobutanol, n-butanol, 2-metil-1-butanol, alcohol isoamílico, n-hexanol y 2-feniletanol. También se encuentran algunos aldehídos (acetaldehído, propanal, butiraldehído, acetal, heptanal y furfural), ésteres (acetato de etilo, ésteres de los alcoholes propílico y butílico y de los ácidos caprílico, cáprico, láurico, butírico y valérico), ácidos orgánicos (acético, láctico, caprílico, cáprico y láurico), terpenos, dióxido de azufre, amoníaco y productos nitrogenados de degradación (2).

3.2. Alcoholismo.

Desde que existen las bebidas alcohólicas, existe también el alcoholismo, aunque no se le había dado la importancia debida a su estudio hasta el presente siglo. Este término apareció por primera vez en una obra del médico sueco Magnus Huss, en 1849, quien lo definió como "todos los problemas, triviales o clínicamente reconocibles, debido al consumo excesivo de bebidas alcohólicas" (35). A partir de esta definición han surgido muchas otras, que podemos clasificar en tres grupos:

- a) las que se refieren al alcohol mismo,
- b) las que enfatizan factores sociales, y
- c) las que se basan en la patología subyacente (35).

Debido a las múltiples acepciones del término "alcoholismo" resulta difícil formular conclusiones con validez universal. Por ello, se ha tratado de proponer una definición basada

en los elementos considerados como esenciales (17). Una de las más aceptadas es la del doctor Mark Keller (1958), quien dice que "el alcoholismo es una enfermedad crónica, un desorden de la conducta caracterizado por la ingestión repetida de bebidas alcohólicas hasta el punto de que excede a lo que está socialmente aceptado y que interfiere con la salud del bebedor, así como con sus relaciones interpersonales o con su capacidad de trabajo" (35). E.M. Jellinek da una definición vaga, pero clasifica a los alcohólicos en cinco grupos, según la gravedad de su estado. Como éstas, existen muchas otras definiciones, de las cuales podemos extraer que algunos de los rasgos esenciales del concepto de alcoholismo son:

- la actitud del ser humano relacionada con el uso de etanol como bebida,
- la cantidad de alcohol que se bebe es excesiva,
- el uso excesivo de las bebidas alcohólicas es crónico, y
- se da una pérdida de la libertad del individuo.

Con base en los puntos anteriores, se define el alcoholismo como una pérdida definitiva, en acto o en potencia, de la libertad del ser humano para controlar su conducta con respecto al alcohol una vez que éste penetra en su organismo en cantidad suficiente, pérdida que parece estar condicionada por factores somáticos (17).

A lo largo de estudios epidemiológicos se ha observado que el alcoholismo muestra una fuerte tendencia familiar, aunque no se ha definido con certeza la naturaleza de un factor heredi

tario. Se ha visto que por lo menos el 33% de los alcohólicos en Estados Unidos tienen un padre alcohólico, lo cual es un alto porcentaje con respecto a la población en general (7, 34).

Como se menciona en las definiciones de alcoholismo, éste se considera como una enfermedad y desorden conductual, relacionado con un gran número de problemas, tanto orgánicos como sociales. Estos problemas pueden ser consecuencia de un episodio agudo de consumo excesivo de alcohol. Podemos citar hechos relacionados con agresividad, accidentes, exposición a las condiciones meteorológicas, trastornos físicos y psíquicos. Según estadísticas, el consumo de alcohol es responsable de 2/3 de los incidentes de violencia doméstica, 1/3 de los casos de abuso de niños, 50% de los accidentes fatales de tránsito, 50% de las muertes por fuego, 67% de ahogados, 67% de homicidios y asaltos, 40% de violaciones y 35% de suicidios en los Estados Unidos (19).

También podemos citar problemas que son consecuencia del beber excesivo por un tiempo prolongado. Entre éstos se encuentran una gran cantidad de trastornos orgánicos tales como problemas gastrointestinales, cardiovasculares, neurológicos y otros que se enlistan en el Cuadro II.

Además de tales alteraciones, se puede observar una pérdida del control personal, se deteriora la capacidad de trabajo y se presentan el síndrome de dependencia del alcohol y la psicosis alcohólica. Todo esto resulta en problemas familiares como disolución de la familia, discordia conyugal, maltrato a los

hijos, pérdida de la autoestima, pérdida del empleo, y tiene repercusiones en los hijos, tanto físicas como sociales (problemas de desarrollo infantil, deserción escolar, delincuencia y embriaguez juvenil) (19).

El trastorno físico más notable en los hijos de mujeres alcohólicas es el Síndrome Fetal Alcohólico (SFA), que está considerado como el daño teratógeno más frecuente en el hombre, y se presenta en un tercio de los niños cuyas madres beben 150 o más gramos diarios de etanol durante el embarazo. Este síndrome se caracteriza por un crecimiento retardado pre y post-natal, bajo coeficiente intelectual, microcefalia, fisuras palpebrales pequeñas, bulbos oculares pequeños, hipoplasia maxilar, pliegues epicánticos, nariz pequeña y respingada, área pigmentada de los labios pequeña, anormalidad de las articulaciones, pulso tembloroso, coordinación pobre entre ojos y manos, malformaciones cardíacas y genitales (19). El sistema nervioso central es muy susceptible a la exposición intrauterina al etanol, y en autopsias se ha detectado una migración celular anormal en el cerebro, aumento del tamaño de los ventrículos y disminución del espesor de la corteza cerebral (36).

3.3. Cáncer y alcoholismo.

Otro de los problemas orgánicos relacionados con el consumo excesivo de alcohol es el cáncer. Se observa un aumento de hasta 10 veces más en el riesgo de sufrir cáncer entre los alcohólicos, principalmente en cavidad oral, laringe, faringe y esófago.

fago (21, 22). También se correlaciona frecuentemente con la aparición de cirrosis hepática, a partir de la cual, en una pequeña proporción de los casos, se desarrolla el carcinoma hepatocelular (23). Entre las mujeres que beben alcohol se observa una tasa de cáncer mamario entre 1.5 y 2 veces mayor que entre las no bebedoras (28).

En estudios realizados en Francia se encontró una correlación elevada entre la tasa de mortalidad por alcoholismo y la debida a cáncer esofágico, observando que el riesgo de sufrirlo aumenta a medida que es mayor la concentración de etanol en las bebidas consumidas, aunque también se atribuye a la presencia de mutágenos en ellas (15).

Se sabe que el etanol, así como otros alcoholes y aldehídos, inhiben la síntesis de RNA en las células y en sistemas transcripcionales aislados, lo cual puede tener un papel importante en la carcinogénesis. Los posibles mecanismos por los cuales el etanol puede producir cáncer son:

- a) El etanol puede cambiar la reactividad de los tejidos por efectos tóxicos, desnutrición o cirrosis hepática.
- b) Pueden existir sustancias carcinogénicas en las bebidas alcohólicas.
- c) El alcohol puede aumentar la difusión de las sustancias carcinogénicas hacia las células.
- d) El alcohol puede aumentar la capacidad de activación de procarcinógenos en el intestino.
- e) El alcohol inhibe la salivación, lo cual aumenta la con

centración de procarcinógenos en la boca (19).

El último punto influye en el sinergismo que se observa entre el alcohol y el tabaco en cuanto al aumento en el riesgo de sufrir cáncer, que es mayor entre los alcohólicos que fuman (3, 19, 21, 22).

3.4. Mutagénesis y alcoholismo.

Con respecto al origen del cáncer, se correlaciona con la actividad mutagénica que se observa en las bebidas alcohólicas. Se han hecho numerosos estudios en linfocitos periféricos de individuos alcohólicos, encontrándose un aumento notable en la frecuencia de aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales, entre las que podemos citar lesiones acromáticas, rupturas cromatídicas e isocromatídicas, translocaciones cromatídicas y cromosómicas, dicéntricas, anillos e inversiones pericéntricas. También se observan cambios de número y rearrreglos cromosómicos (3, 8, 16, 18, 21, 22). En estudios con animales sometidos a tratamientos crónicos con alcohol se observan otras alteraciones como el aumento de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea, lo cual se asocia con una hipoplasia de la médula y macrocitos de eritrocitos, alteraciones encontradas frecuentemente en alcohólicos. Este daño citogenético en la médula ósea debe tener un significado más general que las consecuencias puramente hematológicas, pues puede estar involucrado un mecanismo similar en los efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos del alcohol (4).

Con respecto a los estudios in vitro, se tienen resultados contradictorios en relación con el efecto directo del etanol sobre las células, pues algunos autores mencionan efectos positivos, aunque también hay estudios en los que no se observaron efectos (8, 19). Sin embargo, estudiando al primer metabolito del etanol, el acetaldehído, se tienen aumentos significativos en la frecuencia de alteraciones cromosómicas cuando éste se aplica en cultivos de células vegetales, animales y humanas (11, 20), por lo que los efectos mutagénicos del etanol se le atribuyen al acetaldehído (8, 19, 20).

Además de los estudios de aberraciones cromosómicas, se ha analizado la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) como un indicador de la actividad mutagénica del etanol, observándose un aumento de ésta relacionado con el de aberraciones (8, 11, 19, 20, 22). El fenómeno de ICH fue visualizado por primera vez por Taylor en 1958 (33), quien marcó el ADN con timidina tritiada ($^3\text{[H]}$ -timidina) y analizó las metafases por autorradiografía, lo que constituye un proceso lento e inexacto. Actualmente se utiliza la bromodesoxiuridina (BrdU) en sustitución de la timidina tritiada, y posteriormente se tiñen los cromosomas con colorantes fluorescentes como Hoechst 33258, naranja de acridina o 4'6-diamino-2-fenilindol (DAPI), lo cual resulta en una fluorescencia diferencial en las cromátidas. En 1974, Perry y Wolff (25) encontraron un método alternativo, tratando las células con Hoechst 33258 y Giemsa, obteniendo así una tinción diferencial que puede observarse en el

microscopio de luz (5, 12).

El mecanismo de la tinción diferencial de los cromosomas se basa en tres premisas:

- a) La replicación del ADN es semiconservativa.
- b) La cromátida está constituida solamente por una doble hélice.
- c) Los cromosomas se segregan al azar en la división celular.

En la Figura 1 se ilustra el proceso de sustitución del ADN con la BrdU y cómo se obtiene la tinción diferencial.

Las cromátidas que tienen una sola cadena de ADN sustituida con BrdU presentan una mayor fluorescencia o tinción con Giemsa más intensa en comparación con las que tienen sus dos cadenas de ADN sustituidas, y la proporción de estas últimas va aumentando a medida que aumenta el número de replications celulares en presencia de BrdU. Las células en que se estudian los ICH son las del segundo ciclo de replicación, pues en ellas se visualizan fácilmente los intercambios de los brazos cromatídicos (12).

Una segunda área de aplicación del marcaje con BrdU es la diferenciación de metafases de distinta generación en cultivos y sistemas celulares no sincronizados, con lo cual es posible estimar la duración del ciclo celular y su modificación por agentes exógenos (5).

El marcado con BrdU puede aplicarse in vitro, directamente en los cultivos (principalmente fibroblastos y linfocitos) e

in vivo en mamíferos, por inyecciones múltiples subcutáneas o intraperitoneales, implantación de tabletas de liberación retardada o infusión intravenosa continua. Las células más adecuadas para los estudios in vivo son las de médula ósea, obtenidas del fémur, por su alto índice mitótico. Se pueden cosechar también linfocitos de bazo, células de hígado en regeneración y células espermatogónicas, pero el índice mitótico es menor y muy variable (12).

Por su alta sensibilidad y fácil manejo, el análisis de ICH se ha hecho muy popular en los últimos años como prueba de mutagenicidad, aunque se sugiere utilizarlo como un método adicional a los demás estudios citogenéticos que se usan para determinar la actividad mutagénica de una sustancia (5).

3.5. Justificación.

Debido a que la mayor parte de los estudios sobre el etanol y las bebidas alcohólicas se han llevado a cabo utilizando, en el primer caso, etanol puro, y, en el segundo, las bebidas completas, y tomando en cuenta el gran número de componentes - que éstas contienen, entre los cuales se encuentran varios compuestos considerados como mutágenos, la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional está llevando a cabo un estudio mutagénico con algunas de las bebidas alcohólicas destiladas de mayor consumo en México, como son brandy, tequila y ron, en el cual se están analizando la bebida completa, la fracción alcohólica (volátil), los residuos no

volátiles y algunos componentes individuales, en sistemas in vitro e in vivo, y del cual forma parte la presente tesis, en la que se utilizó la fracción alcohólica del brandy in vivo, aplicándola en un tratamiento agudo. Este estudio es parte del proyecto titulado "ALCOHOLISMO: Un estudio clínico, inmunológico, teratogénico y mutagénico", apoyado por el Consejo del Sistema Nacional de Educación Tecnológica (COSNET), la Dirección de Graduados del IPN y el Hospital General de la Secretaría de Salud.

CUADRO I: ESPECIFICACIONES FISICOQUIMICAS DEL BRANDY (31).

ESPECIFICACIONES	MINIMO	MAXIMO
Grado alcohólico G.L. real a 288°K (15°C)	38.00	55.00
Extracto seco, g/dl	0.75	33.00
Cenizas, g/dl	0.05	0.60
mg/100 ml referidos a alcohol anhidro		
Acidez total (como ácido acético)	9.0	315.0
Acidez volátil (como ácido acético)	7.0	200.0
Acidez fija (como ácido acético)	2.0	115.0
Aldehidos (como acetaldehído)	4.0	80.0
Esteres (como acetato de etilo)	25.0	150.0
Metanol	huellas	180.0
Alcoholes superiores (aceite de fusel o alcoholes de peso molecular superior al etanol) (como alcohol amilico)	huellas	335.0
Furfural	huellas	5.0

CUADRO II: EFECTOS SISTEMICOS DEL ALCOHOLISMO (36)

TEGUMENTO: pelagra, infestación.

BOCA: estomatitis nutricional, quilosis, alta incidencia de cáncer.

OJOS: ambliopía "tabaco-alcohol", oftalmoplejia (Síndrome de Wernicke-Korsakoff).

GASTROINTESTINALES: esófago: esofagitis, espasmo esofágico difuso, ruptura con mediastinitis, alta incidencia de cáncer.

estómago y duodeno: gastritis erosiva aguda, gastritis hipertrófica crónica, úlcera péptica, hematemesis, alta incidencia de cáncer.

intestino: malabsorción, "diarrea alcohólica".

hígado: esteatosis, hepatitis alcohólica, cirrosis.

páncreas: pancreatitis aguda, pancreatitis crónica recurrente, pancreatitis calcificada, insuficiencia pancreática exocrina, pseudoquistes.

RESPIRATORIOS: alta susceptibilidad a infecciones, atelectasis, pneumotórax, depresión respirato
alta prevalencia de tabaquismo.

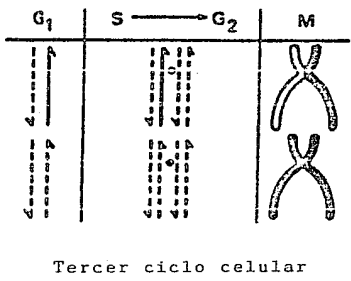
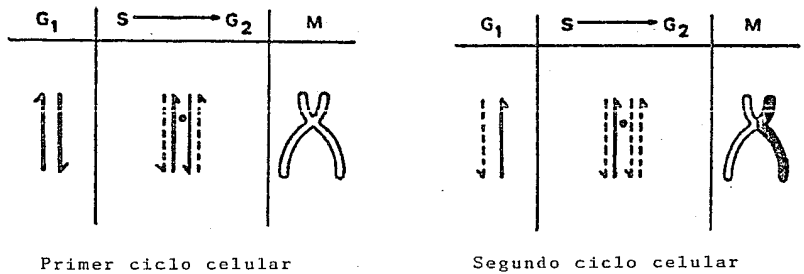
CARDIOVASCULARES: cardiomiopatía, beriberi.

TRACTO GENITO-URINARIO: hipogonadismo masculino, impotencia, esterilidad.

ENDOCRINOS Y METABOLICOS: disminución de testosterona, hiperglucemia, hipoglucemia, hiperlactemia, hiperuricemia, acidosis metabólica, acidosis respiratoria, cetoacidosis alcohólica, hipofosfatemia, hipermetabolismo, hipokalemia, hipomagnesemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, desnutrición protéica, hipotransferrinemia, deficiencia de vitamina B.

NEUROLOGICOS: síndromes de abstinencia de intoxicación aguda, ambliopía, síndrome de Wernicke-Korsakoff, degeneración cerebelar, polineuropatía, enfermedad de Marchiafava-Bignami, atrofia cerebral, demencia, miopatía, pelagra.

FIGURA 1



REPRESENTACION GRAFICA DE TRES CICLOS DE REPLICACION CELULAR EN PRESENCIA DE BrdU.

*Las líneas continuas representan cadenas de ADN no sustituido, y las punteadas son cadenas de ADN sustituidas con BrdU.

4. OBJETIVOS

1. Determinar si la fracción alcohólica del brandy produce aumento en la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas in vivo con un tratamiento agudo.
2. Determinar el efecto de la fracción alcohólica del brandy sobre la proliferación celular.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1. Material biológico.

Se utilizaron ratones machos de la cepa NIH (SW) con pesos entre 20 y 26 g.

5.2. Obtención de la FAB.

Se realizó la destilación simple de 750 ml de brandy, manteniendo la temperatura entre 75 y 78°C y desechando la cabeza y la cola del destilado. Posteriormente el líquido obtenido se filtró a través de sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), con el fin de eliminar la mayor parte del agua. De esta manera se obtuvieron 200 ml de fracción alcohólica.

5.3. Determinación de los componentes de la FAB.

La FAB se sometió a una cromatografía de gases, utilizando un cromatógrafo VARIAN modelo 1400, con columna de vidrio PORAPAK Q y detector de ionización de flama de hidrógeno.

5.4. Determinación de la DL50 de la FAB.

La FAB se administró por vía IP. Se realizó un estudio preliminar para situar el intervalo de dosis, en el cual se utilizaron 15 ratones. La FAB se diluyó en SSF al 50%. Las dosis usadas fueron de 1650, 3300, 4950, 6600, 8250, 9900, 11550 y 13200 mg de FAB/kg de peso. A partir de este estudio se estableció el intervalo de dosis entre 1650 y 11550 mg de FAB/kg de peso.

En el estudio definitivo se utilizaron 7 lotes de 6 ratones cada uno, con las dosis de 1650, 3300, 4950, 6600, 8250, 9900 y 11550 mg de FAB/kg de peso. Los ratones se observaron durante los siete días posteriores a la administración de la FAB. A los resultados se les aplicó el método de Lehman (14) para determinar la DL50.

5.5. Estudio citogenético.

Para este estudio, las dosis se determinaron a partir de la DL50, tomando como referencia la dosis correspondiente a 1/10 de la DL50 y estableciendo dos dosis menores y dos mayores a ella, siendo éstas de 165, 330, 495, 660 y 825 mg de FAB/kg de peso, diluídas en SSF de tal manera que en todos los casos se utilizó un volumen de 0.5 ml de la dilución correspondiente para un ratón de 25 g. Para el testigo positivo se utilizó MMC en dosis de 2.8 mg/kg, y para el negativo, SSF (20 ml/kg), todo ésto por vía IP.

Para cada dosis se utilizó un lote de 7 ratones, con los cuales se trabajó de la siguiente manera:

a) A cada ratón se le implantó subcutáneamente una tableta de 40 mg de BrdU mezclada con 60 mg de colesterol, con un diámetro de 6.35 mm y un espesor de 1.87 mm. La implantación se hizo en el flanco izquierdo del ratón.

b) Una hora después se administró la FAB en las dosis indicadas o, en su caso respectivo, la MMC y la SSF.

c) A las 22 hrs de la administración de BrdU, se les inyec

tó colchicina por vía IP en dosis de 0.5 ug/g de peso, a partir de una solución que contenía 0.4 mg de colchicina/ml.

d) 3 hrs después de administrar la colchicina, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se procedió a hacer una disección para obtener ambos fémures, de los cuales se extrajo la médula ósea con ayuda de una jeringa con aguja que contenía 5 ml de KCl 0.075 M a 37°C. La médula así obtenida se incubó a la misma temperatura durante 20 min en tubos para centrífuga.

Después de la incubación, se aplicó el siguiente tratamiento de fijación:

a) Se centrifugó durante 10 min a 1500 rpm, se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 7 ml de solución fijadora de Carnoy (metanol-ácido acético en proporción de 3:1) fría, dejándose reposar así por 20 min.

b) Se centrifugó por 10 min a 1500 rpm, se eliminó el sobrenadante y se volvió a resuspender el botón en la solución fijadora fría, reposando ahora durante 10 min.

c) Se repitió el punto anterior, se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y se eliminó el sobrenadante, resuspendiendo el botón en 1 ml de fijador.

La preparación y tinción de las laminillas se llevó a cabo de la siguiente manera:

a) Los portaobjetos a utilizar se limpiaron y desengrasaron con etanol al 50%. Se dejaron sumergidos en el mismo hasta su utilización.

b) Para montar las laminillas, se sacó el portaobjetos del etanol y se flameó. Mientras el alcohol estaba ardiendo, se dejaron caer sobre el portaobjetos 3 gotas del botón suspendido en solución fijadora, desde una altura aproximada de 20 cm.

c) Las laminillas se dejaron en reposo por dos días a temperatura ambiente antes de ser teñidas.

d) El primer paso de la tinción fue sumergir las laminillas en el colorante Hoechst 33258 (solución de 5 mg en 50 ml de agua destilada) durante 30 min. Posteriormente se enjuagaron con agua destilada y se secaron en la estufa a 60°C por 30 min.

e) Se cubrieron las laminillas con una solución amortiguadora de citrato-fosfato con pH de 7.0, colocando sobre ellas cubreobjetos para evitar la evaporación del amortiguador, y se expusieron a luz negra durante 30 min. Se enjuagaron con agua destilada y se secaron en la estufa a 60°C por 30 min.

r) Se sumergieron en colorante Giemsa al 4% en solución amortiguadora de Sorensen (fosfatos, pH = 6.8) durante 10 min, enjuagando con agua destilada y dejando secar al aire.

5.6. Observaciones.

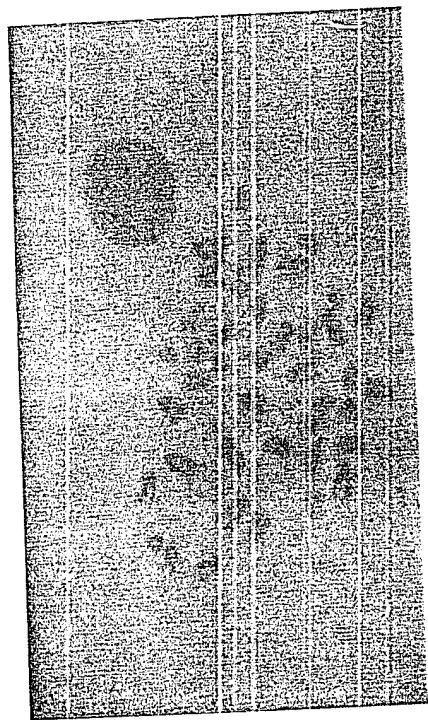
Para efectuarlas, se utilizaron las laminillas de los cuatro mejores ratones de cada lote en cuanto a tinción diferencial. Se hicieron dos tipos de observaciones. La primera fue el recuento de ICH, para lo cual se revisaron 25 células de segunda división (Figuras 2 y 3) para cada animal, contando en cada una de ellas el número de ICH. La segunda fue para deter-

minar el índice de replicación y el tiempo promedio de generación (proliferación celular), y se realizó contando las primeras 100 células encontradas al azar en la laminilla (para cada ratón) y determinando qué porcentaje de ellas era de primera (Figura 4), segunda (Figuras 2 y 3) y tercera (Figura 5) o posteriores divisiones.

5.7. Tratamiento estadístico.

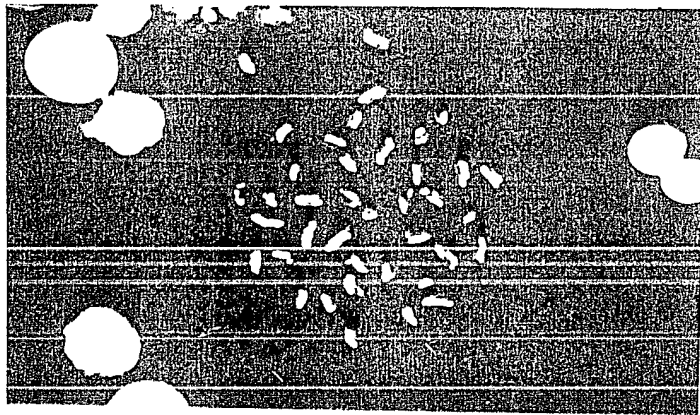
A los resultados de la frecuencia de ICH se les aplicó, en primera instancia, un análisis de varianza (ANDEVA) para determinar si existían diferencias significativas entre las distintas dosis estudiadas. Posteriormente se aplicó la prueba "t" de Student para saber a partir de qué dosis se consideraba significativo el aumento de la frecuencia de ICH. Por último, se practicó un análisis de regresión y correlación para determinar la ecuación de la curva que relaciona las dosis de FAB con la frecuencia de ICH y el coeficiente de correlación entre ellas.

FIGURA 2



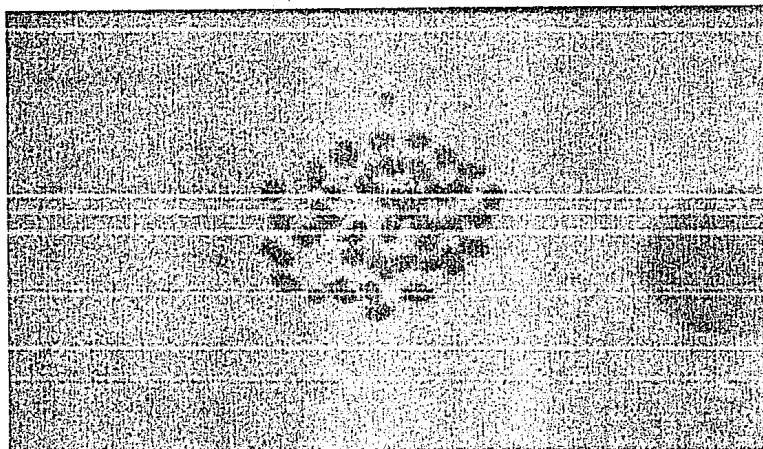
Metafase de segunda división de la médula ósea de ratón tratado con FAB (825 mg/kg)

FIGURA 3



Metafase de segunda división de la médula ósea de ratón tratado con MMC (2.8 mg/kg)

FIGURA 4



Metafase de primera división de la médula ósea de ratón tratado con FAB (825 mg/kg)

FIGURA 5



Metafase de tercera división de la médula ósea de ratón tratado con FAB (825 mg/kg)

6. RESULTADOS

6.1. Determinación de los componentes de la FAB.

La cromatografía de gases reveló la presencia de 5 componentes en la FAB, así como los porcentajes en que éstos se encontraban. Los componentes son:

Etanol	99.556%
Metanol	0.271%
Acetato de etilo	0.110%
Acetaldehído	0.054%
Otras sustancias*	0.009%

* probablemente propionaldehído, butiraldehído o una mezcla de ellos, pues son compuestos que pueden encontrarse en el brandy y su punto de ebullición es menor al del etanol (propionaldehído: 49°C; butiraldehído: 74.8°C).

6.2. Determinación de la DL50 de la FAB.

Con la dosis más baja utilizada en este ensayo (1650 mg/kg) no se observó el efecto letal de la FAB, pero la mortalidad fue del 100% a partir de la dosis de 8250 mg/kg. En el Cuadro III se muestra el número de animales muertos para cada lote, el porcentaje de mortalidad y los valores obtenidos con el método de Lehman, que se graficaron en la Figura 6. A partir de ellos se determinó la DL50, que es de 5211 mg/kg.

6.3. Estudio citogenético.

6.3.1. Intercambio de Cromátidas Hermanas.

La FAB produjo un aumento en la frecuencia de ICH a medida que la dosis aumentó, como puede observarse en el Cuadro IV. En el análisis de varianza se obtuvo un valor de $F = 7.483$ contra valores de tablas de 2.77 para un nivel de significancia del 95%, y de 4.25 para el nivel de significancia del 99%. Con respecto a la prueba "t" de Student, las "t" calculadas para cada una de las dosis son las siguientes:

dosis 1 (165 mg/kg)	t = 0.9262
dosis 2 (330 mg/kg)	t = 1.6271
dosis 3 (495 mg/kg)	t = 2.1399
dosis 4 (660 mg/kg)	t = 3.7869
dosis 5 (825 mg/kg)	t = 3.8219
testigo positivo	t = 36.2200

Estos valores se compararon con los valores de tablas, que son de 1.9432 cuando $p = 0.05$ y de 3.1430 cuando $p = 0.01$.

Con el análisis de regresión se determinó la ecuación de la curva que relaciona la frecuencia de ICH con las dosis de FAB, que es una parábola, cuya ordenada al origen tiene un valor de 5.6818, su coeficiente de linealidad de 5.8203×10^{-4} y su coeficiente de curvatura es de 2.9844×10^{-6} . En la Figura 7 se muestra la parábola determinada por esta ecuación.

Por último, se calcularon los coeficientes de correlación y de determinación, teniendo el primero un valor de 0.9877 y

el segundo de 97.56%.

6.3.2. Proliferación Celular.

No se observó ningún efecto de la FAB sobre la proliferación celular, como se puede observar en el Cuadro V, ya que las variaciones de los IR y TPG son mínimas con respecto al testigo negativo.

CUADRO III: PORCENTAJE DE MORTALIDAD PARA CADA UNA DE LAS DOSIS DE FAB UTILIZADAS EN LA DETERMINACION DE LA DL50 (Método de Lehman).

$x = \ln$ dosis;

$l = \ln (p/q)$

$p = N^{\circ}$ ratones muertos/ N° ratones del lote; $q = 1 - p$

DOSIS (mg/kg)	Nº DE ANIMALES	Nº DE MUERTOS	PORCENTAJE DE MORTALIDAD (%)	"x"	"l"
1650	6	0	0.00	---	---
3300	6	1	16.66	8.10167	-1.60941
4950	6	3	50.00	8.50714	0.00000
6600	6	4	66.66	8.79482	0.69316
8250	6	6	100.00	---	---
9900	6	6	100.00	---	---
11550	6	6	100.00	---	---

CUADRO IV: EFECTO DE LA FAB SOBRE LA FRECUENCIA DE ICH EN CELULAS DE MEDULA OSEA DE RATON (Cepa NIH (SW)).

DOSIS (mg/kg)	N° DE ANIMALES	N° DE CELULAS	INTERVALO	MEDIA ± D.E.	SIGNIFICATIVO ("t" de Student)	
					p=0.01	p=0.05
000.0	4	100	1 - 16	5.55 ± 0.82	-	-
165.0	4	100	2 - 12	6.06 ± 0.73	-	-
330.0	4	100	2 - 12	6.30 ± 0.42	-	-
495.0	4	100	3 - 16	6.51 ± 0.36	-	+
660.0	4	100	3 - 17	7.30 ± 0.42	+	+
825.0	4	100	3 - 20	8.28 ± 1.17	+	+
MMC (2.8 mg/kg)	4	100	13 - 23	22.10 ± 0.16	+	+

CUADRO V: EFECTO DE LA FAB SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR EN LA MEDULA OSEA DE -
RATON (Cepa NIH (SW)).

DOSIS (mg/kg)	Nº DE ANIMALES	Nº DE CELULAS	PROLIFERACION CELULAR (%)			I.R.	T.P.G. (horas)
			1ª div.	2ª div.	3ª div.		
000.0	4	400	50.75	46.50	2.75	1.5200	14.47
165.0	4	400	47.75	49.75	2.50	1.5475	14.22
330.0	4	400	48.75	50.50	0.75	1.5200	14.47
495.0	4	400	48.25	49.75	2.00	1.5375	14.31
660.0	4	400	47.74	51.50	0.75	1.5300	14.38
825.0	4	400	49.25	49.75	1.00	1.5175	14.50
MMC (2.8 mg/kg)	4	400	53.75	42.75	3.59	1.4975	14.69

$$I.R. = \text{Indice de Replicación} = \frac{1(M1) + 2(M2) + 3(M3)}{100} \quad (29)$$

$$T.P.G. = \text{Tiempo Promedio de Generación} = \frac{N^{\circ} \text{ hrs. BrdU}}{1(M1) + 2(M2) + 3(M3)} \times 100 \quad (30)$$

M1 = % de células en 1ª división;

M2 = % de células en 2ª división;

M3 = % de células en 3ª división.

FIGURA 6: GRAFICA DE "x" vs "l" PARA DETERMINAR LA DL50 POR EL METODO DE LEHMAN.

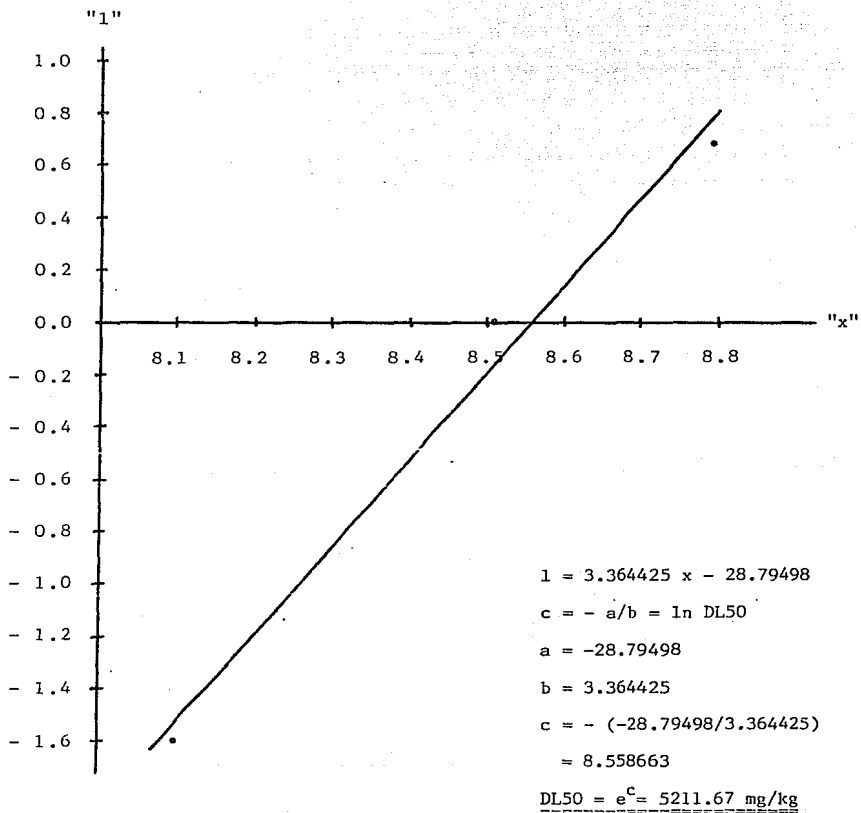
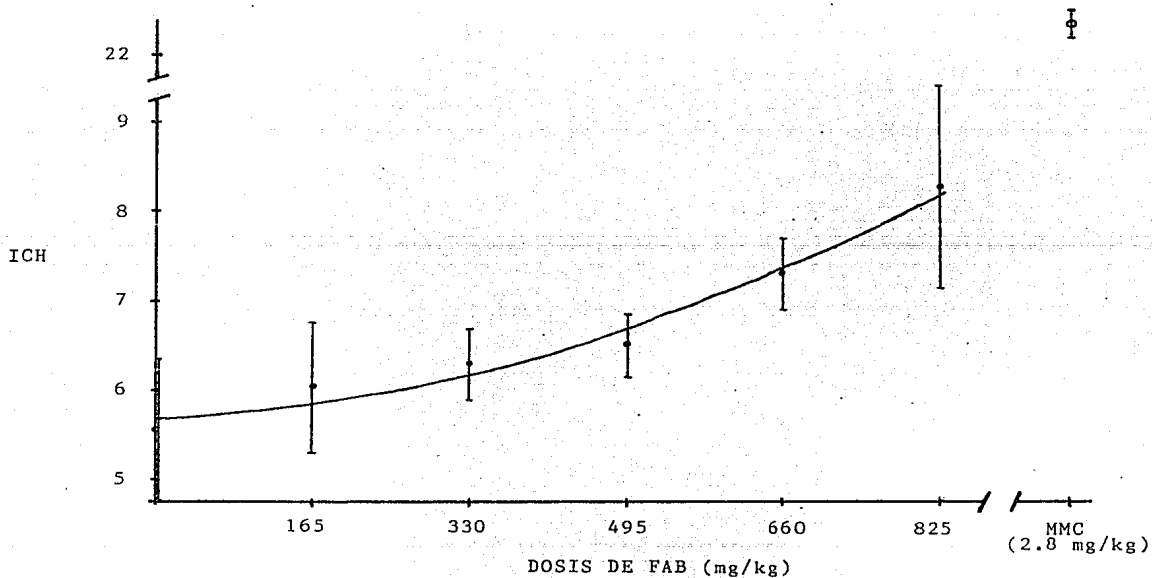


FIGURA 7: GRAFICA DEL EFECTO DE LA FAB SOBRE LA FRECUENCIA DE ICH EN CELULAS DE MEDULA OSEA DE RATON (Cepa NIH (SW)).



$$y = 5.6818 + 5.8203 \times 10^{-4}x + 2.9844 \times 10^{-6}x^2$$

y = ICH; x = DOSIS DE FAB

7. DISCUSION

En los últimos años se han realizado numerosos estudios sobre la actividad mutagénica del etanol, la mayoría de los cuales se enfoca hacia el análisis de aberraciones cromosómicas en alcohólicos crónicos (3, 8, 16, 18, 21, 22). En ellos se observa que el etanol, al ser ingerido durante períodos prolongados, produce un aumento notable de aberraciones cromosómicas. También se han hecho investigaciones sobre los efectos del etanol in vitro, utilizando cultivos de linfocitos humanos y de células de otros mamíferos (1, 8, 11, 19, 20), aunque en estos últimos los resultados no siempre son positivos, lo que sugiere que la actividad mutagénica del etanol se debe principalmente a la acción del acetaldehído, que es su primer metabolito dentro del organismo, y que ha demostrado ser mutagénico in vitro en dosis muy pequeñas en comparación con el etanol (3, 11, 19, 26). En la presente investigación se estudió el efecto que produce una fracción alcohólica del brandy, que en su mayor parte está constituida por etanol, sobre la frecuencia de ICH, que es una de las pruebas que se utilizan en la determinación de la actividad mutagénica de una sustancia (5), cuando se aplica un tratamiento agudo in vivo. En esta investigación, el análisis de varianza aplicado a los resultados obtenidos de la frecuencia de ICH demostró que las diferencias observadas entre las dosis utilizadas son significativas estadísticamente con un nivel de significancia del 99%, lo cual nos indica que la

FAB sí provoca alteraciones en la frecuencia de ICH. Tales alteraciones son dependientes de la dosis, como lo demuestra la parábola obtenida a partir del análisis de regresión, cuyo coeficiente de correlación es de 0.987, y, aunque los coeficientes de linealidad y curvatura son pequeños (5.8203×10^{-4} y 2.9844×10^{-6} , respectivamente), el aumento de la frecuencia de ICH va siendo más notable a medida que la dosis aumenta. Tales aumentos dependen en su mayor parte del tratamiento aplicado, como lo demuestra el coeficiente de determinación (97.56%), y son estadísticamente significativos a partir de la dosis de 660 mg/kg para una $p = 0.01$, y desde la dosis de 495 mg/kg cuando el valor de p es de 0.05 (prueba "t" de Student).

La FAB utilizada en el presente estudio contiene, además del etanol, sustancias como metanol, acetato de etilo y acetaldehído en pequeños porcentajes. Sobre el primero de ellos existen investigaciones en las que se sugiere que es mutagénico vía su primer metabolito (formaldehído), pues éste último produce un aumento en la frecuencia de ICH dependiente de la dosis cuando se aplica en cultivos celulares (19). Por otra parte, el hecho de que las bebidas alcohólicas sean mezclas de una gran cantidad de sustancias además del etanol y el agua (2, 9, 31) ha provocado que se inicien estudios sobre la posible mutagenicidad de dichas sustancias, que se conocen como "congéneres". En ellos se ha demostrado que los residuos no volátiles de bebidas como whisky, ron y brandy también producen aumentos dependientes de la dosis en la frecuencia de ICH cuando se aplican in

vitro (9). Dentro de estos residuos no volátiles se encuentran también algunos metales tales como el plomo, cuyos efectos tóxicos son ampliamente conocidos, y el arsénico que, dentro de su toxicidad, se ha observado que produce rupturas en los cromosomas de linfocitos humanos en cultivo, es teratógeno para hamsters, y existen evidencias de que algunos compuestos arsenicales están relacionados con la aparición de ciertos tipos de cánceres (6).

En este estudio, la FAB produjo un aumento del 50% en la frecuencia de ICH, con respecto al testigo negativo, con la dosis de 825 mg/kg, que fue la mayor utilizada en el experimento realizado, pero la tendencia parabólica que siguen los puntos nos sugiere que, bajo las condiciones estudiadas (tratamiento agudo in vivo), la mutagenicidad de la FAB es moderada a dosis bajas, pero va siendo mas severa conforme aumenta la cantidad administrada de FAB, y que tal mutagenicidad puede ser el resultado de un sinergismo entre las distintas sustancias que contiene, algunas de las cuales son mutagénicas por sí solas (3, 11, 19).

Con respecto a la proliferación celular, ésta no se vió afectada por la FAB, lo que indica que ésta, en el intervalo de dosis utilizado, es genotóxica, pero no llega a ser citotóxica.

Estos resultados sugieren que la ingestión de una cantidad importante de etanol, aunque sea en una sola ocasión, puede provocar daños a nivel cromosómico en el ser humano, y que tales

daños van a ser más graves mientras mayor sea la cantidad de etanol ingerida, aunque con ellos no es posible determinar si las alteraciones producidas son de tipo reversible o no. Asimismo, no es factible inferir si pueden llegar a afectar a la descendencia, por lo que, a modo de sugerencia, se plantea realizar estudios futuros en los que la investigación se encamine a observar los efectos a largo plazo de un tratamiento agudo con etanol y utilizando dosis mayores para determinar si la tendencia parabólica se mantiene.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que la fracción alcohólica del brandy utilizada en la presente investigación produce un aumento significativo en la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas in vivo cuando se aplica en un tratamiento agudo, a partir de una dosis de 660 mg/kg, administrada por vía intraperitoneal en ratones machos de la cepa NIH (SW), y que tal aumento sigue una tendencia parabólica. Sin embargo, la proliferación celular no se ve afectada por la FAB en las dosis estudiadas, por lo que se sugiere que, dentro de este intervalo de dosis, la FAB es genotóxica, pero no llega a ser citotóxica.

9. BIBLIOGRAFIA

- 1) Alvarez, M.R., Cimino, L.E., Cory, M.J. and Gordon, R.E.: Ethanol induction of sister chromatid exchanges in human cells in vitro. *Cytogenet. Cell Genet.* 27: 66-69 (1980).
- 2) Amerine, M.A., Berg, H.W., Kunkee, R.E., Ough, C.S., Singleton, V.L. and Webb, A.D.: *Technology of wine making*. AVI Publishing Co., Inc. Connecticut, U.S.A. pp 1, 582-634 (1980).
- 3) Badr, F.M. and Hussain, F.H.: Chromosomal aberrations in chronic male alcoholics. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 6(4): 122-129 (1982).
- 4) Baraona, E., Guerra, M. and Lieber, C.S.: Cytogenetic damage of bone marrow cells produced by chronic alcohol consumption. *Life Sciences* 29: 1797-1802 (1981).
- 5) Gebhart, E.: Sister chromatid exchange (SCE) and structural chromosome aberrations in mutagenicity testing. *Human Genetics* 58: 235-254 (1981).
- 6) Goodman, A., Goodman, L.S. and Gilman, A.: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Editorial Médica Panamericana, México, D.F. pp 379, 1572-1590 (1982).

- 7) Goodwin, D.: Hereditary factors in alcoholism. Hospital Practice May: 121-130 (1978).
- 8) Halkka, O. and Eriksson, K.: Alcohol as a mutagen in vivo and in vitro, in Genetic Damage in Man Caused by Environmental Agents. Edited by Kare Berg. Academic Press, Inc. London (1979).
- 9) Hoeft, H. and Obe, G.: SCE-inducing congeners in alcoholic beverages. Mutation Research 121: 247-251 (1983).
- 10) Jaffe, J., Petersen, R. y Hodgson, R.: Vicios y Drogas: problemas y soluciones. Editorial Harla. México, D.F. (1980).
- 11) Janson, T.: The frequency of sister chromatid exchanges in human lymphocytes treated with ethanol and acetaldehyde. Hereditas 97: 301-303 (1982).
- 12) Kram, D., Bynum, G.D. and Tice, R.R.: Bromodeoxyuridine labeling of mammalian chromosomes for the analysis of sister chromatid exchanges and cell replication kinetics, in Current Trends in Morphological Techniques. J.E. Johnson, Ed., CRC Press Inc., FLA., U.S.A. pp 147-176 (1981).
- 13) Longnecker, M.P., Wolz, M. and Parker, D.A.: Ethnicity, distilled spirits consumption and mortality in Pennsylvania.

Journal of Studies on Alcohol 42(9): 791-796 (1981).

- 14) Lehman, Pedro: Dosis letal o efectiva media: un cálculo manual fácil y rápido. Archivos de Farmacología y Toxicología (Madrid) 6(2): 161-178 (1980).
- 15) Loquet, C., Toussaint, G. and LeTalaer, J.Y.: Studies on mutagenic constituents of apple brandy and various alcoholic beverages collected in Western France, a high incidence area for oesophageal cancer. Mutation Research 88: 155-164 (1981)
- 16) Mitelman, F. and Wadstein, J.: Chromosome aberrations in chronic alcoholics. The Lancet Jan 28: 216 (1981).
- 17) Naveillan, P.: Sobre el concepto de alcoholismo. Bolctín de la Oficina Sanitaria Panamericana 91(4): 340-348 (1981).
- 18) Obe, G. and Herha, J.: Chromosomal damage in chronic alcohol users. Humangenetik 29: 191-200 (1975).
- 19) Obe, G. and Ristow, H.: Mutagenic, cancerogenic and teratogenic effects of alcohol. Mutation Research 65: 229-259 (1979).
- 20) Obe, G.: Induction of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of human blood in vivo, and of sister chromatid

exchanges in bone marrow cells of mice in vivo by ethanol and its metabolite acetaldehyde. Mutation Research **68**: 291-294 (1979).

21) Obe, G.: Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of alcoholics. Mutation Research **73**: 377-386 (1980).

22) Obe, G.: Mutagenicity and carcinogenicity of alcohol. Mutation Research **85**: 221 (1982).

23) Onishi, K., Iida, S., Iwama, S., Goto, N., Nomura, F. and Takashi, M.: The effect of chronic habitual alcohol intake on the development of liver cirrhosis and heparocellular carcinoma: relation to hepatitis B surface antigen carriage. Cancer **49**: 672-677 (1982).

24) Organización Mundial de la Salud, 35^a Asamblea: Consumo de alcohol y problemas afines. Reseñas, Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana, Febrero: 199-208 (1983).

25) Perry, P. and Wolff, S.: New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. Nature **261**: 156-158 (1974).

26) Ristow, H. and Obe, G.: Acetadehyde induces cross-links in DNA and causes sister-chromatid exchanges in human cells.

Mutation Research 58: 115-119 (1978).

- 27) Román Celis, C.: El vino: alegría de los dioses y perdición de los hombres, en El Alcoholismo en México. Fundación de Investigaciones Sociales, A.C. México, D.F. Tomo 1, pp 3-24 (1982).
- 28) Rosenberg, L., Shapiro, S., Slone, D., Kaufman, D. and Helmrich, S.P.: Breast cancer and alcoholic beverage consumption. The Lancet Jan 30: 267-270 (1982).
- 29) Schneider, E. and Lewis, J.: Comparison of in vivo and in vitro SCE's induction. Mutation Research 106: 85-90 (1982).
- 30) Sharma, R., Lemmon, M. and Bakke, J.: Studies of in utero SCE's induction and cell replication kinetics. 14th Annual - Meeting. Environmental Mutagen Society, San Antonio, Texas. p 97 (1983).
- 31) Sría. de Comercio y Fomento Industrial: Norma Oficial Mexicana (NOM-V-18-1983) "Bebidas alcohólicas destiladas - Brandy". Dirección General de Normas (1983).
- 32) Smart, R.G., Natera, G. y Almendares.: Ensayo de un método para estudiar el consumo de alcohol y sus problemas en tres países de las Américas. Boletín de la Oficina Sanitaria Pa-

namericana 91(6): 499-509 (1981).

33) Taylor, J.H.: Sister chromatid exchanges in tritium labelled chromosomes. *Genetics* 43: 515-529 (1958).

34) Thacker, S.B.: Genetic and biochemical factors relevant to alcoholism. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 8(4): 375-383

35) Velasco F., R.: Salud Mental, Enfermedad Mental y Alcoholismo. ANUIES, México, D.F. pp 43-94 (1980).

36) West, L.J. (moderator): Alcoholism. UCLA Conference. *Annals of Internal Medicine* 100: 405-416 (1984).