



26  
24  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
ZARAGOZA

ESTUDIO MUTAGENICO DE LA  
FRACCION ORGANICA VOLATIL  
DEL TEQUILA EN LINFOCITOS  
HUMANOS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO  
P R E S E N T A:  
MIGUEL ANGEL MENDEZ VILLASANA



México  
1991



## **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

INTRODUCCION	
I - EL ALCOHOLISMO EN MEXICO .....	1
II - EL TEQUILA .....	4
a) Historia .....	5
b) Producción .....	7
c) Componentes .....	9
III - EL ETANOL Y SU PAPEL DENTRO DEL ORGANISMO .....	10
IV - PAPEL MUTAGENICO DE LAS BEBIDAS ALCOHOLICAS .....	13
V - LOS CROMOSOMAS .....	14
VI - INTERCAMBIO DE CROMATIDES HERMANAS (IChs).....	16
FUNDAMENTACION DEL TEMA .....	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	22
OBJETIVOS .....	23
HIPOTESIS DE TRABAJO .....	25
MATERIAL .....	26
METODOLOGIA	
1.- Obtención de la fracción orgánica volátil del tequila Sauza Blanco .....	27

## 2.- Cultivo de linfocitos humanos

y exposición de los mismos a  
la fracción orgánica volátil  
obtenida del tequila Sauza

Blanco .....	28
a) " SIEMBRA " .....	28
b) " COSECHA " .....	30
c) PREPARACION DE LAMINILLAS .....	31
d) TINCION DIFERENCIAL .....	32
e) REVISION DE LAMINILLAS .....	33
f) TRATAMIENTO ESTADISTICO .....	39
RESULTADOS .....	40
ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADO .....	45
CONCLUSIONES .....	48
RECOMENDACIONES .....	50
BIBLIOGRAFIA .....	51
APENDICE .....	55

## I N T R O D U C C I O N

### I - EL ALCOHOLISMO EN MEXICO .

En nuestro país no se conocen a ciencia cierta las primeras manifestaciones del alcoholismo, en virtud de que el origen del pulque como bebida sagrada y fundamental de ciertas clases de gente en los pueblos indígenas esta lleno del encanto de los mitos y de lo incierto de las leyendas.

Sin embargo existen hallazgos arqueológicos, como raspadores de obsidiana similares a los que hoy en día se utilizan para obtener el aguamiel del maguey, de cerca de 25 mil años de antigüedad, que nos hace pensar que en aquella época ya se conocía el pulque (1).

Todas las sociedades han dispuesto de alguna sustancia con propiedades psicotrópicas de las cuales el alcohol es y ha sido de las más utilizadas; el consumo de alcohol lejos de ser un fenómeno natural es un hecho socio-cultural, con características propias según la sociedad en que se observe (2).

El alcoholismo en nuestro país es el problema más grave de farmacodependencia, se considera que a principios de los 90's, existirán al rededor de 12 millones de mexicanos con problemas de alcoholismo muy graves (1). Esto implica consecuencias y costos socioeconómicos así tambien como de salud muy elevados y severamente graves, como se verá posteriormente.

La disponibilidad y publicidad de las bebidas alcohólicas en nuestro país, ha tenido serias repercusiones en el incremento en el consumo y los índices de alcoholismo.

La propaganda en este aspecto juega un papel reforzador en la conducta del individuo y modifica patrones de consumo; al mismo tiempo que contribuye a crear una idea errónea de la realidad y de los atributos del alcohol. Así, ciertas marcas de las bebidas son asociadas con el éxito, prestigio y felicidad; pretendiendo hacer creer a los consumidores que es posible alcanzar mayor bienestar a través de las bebidas específicas (4).

Analizando la producción de bebidas alcohólicas en nuestro país, observamos que sigue este orden: cerveza 58%, vinos y licores 32%, aguardientes 0.2% y pulque 3.4%. Y las empresas que mayor influencia tienen en la sociedad mexicana se escalafonan como sigue:

- 1.- Cervecera
- 2.- Tequilera
- 3.- Ronera
- 4.- Vinos y Brandis (4).

A principios de los años 80's, la producción se comporta de la siguiente manera:

Brandy .....	93,600 lts.	Vodka .....	6,570 lts.
Tequila .....	45,900 lts.	Ginebra.....	3,420 lts.
Ron .....	16,200 lts.	Wiskey .....	3,510 lts.
Vino de mesa .	13,500 lts.		(4).

En cuanto a los costos de producción tenemos :

Aguardientes a base	
de agaves .....	511.9 millones*
Vinos y licores .....	2,691.8 millones*
Pulque y otras	
bebidas fermentadas .....	182.3 millones*
Cervezas .....	4,818.6 millones*
TOTAL = 8,304.6 millones* (4).	

(\*)= millones de pesos.

De lo anterior podemos observar que se trata de industrias económicamente fuertes que incluso exportan sus productos a nivel mundial.

Variando un poco el tema de la producción, observemos que los costos económicos del alcoholismo nos reportan los siguientes datos : de los ingresos personales por día, el 40% de la población gasta entre 1,000 y 5,000 pesos en bebidas alcohólicas, mientras que un 12.5% gasta entre 5,000 y 10,000 pesos (4). No obstante si los aspectos económicos mencionados anteriormente son sorprendentes, los principales problemas sociales que acarrea el alcoholismo lo son más. Tenemos por ejemplo, que la desintegración familiar en cuanto a divorcios es debida en un 50% a problemas de personas alcohólicas; en cuanto a pérdidas humanas, el 57.6% de los suicidios; el 60% de los accidentes, lesiones, enfermedades e incapacidades permanentes, son también originados por el alcoholismo. La delincuencia y prostitución se encuentran implicadas en un 80% y por último en el 50% de las aprehensiones se ven implicadas personas que son alcohólicas (4).

Otro de los principales problemas del alcoholismo a nivel socio-económico es el abandono del trabajo, incluyendo la pérdida del mismo, así como también el despilfarro del salario, que como consecuencia lógica acarrea pobreza y mendigüez.

Por último desde el punto de vista de salud, se tiene que el consumo crónico de bebidas alcohólicas afecta a todo el organismo humano; principalmente al sistema nervioso central, entre otras afecciones causa desnutrición, trastornos en el sistema hematopoyético y en el sistema endócrino; es la principal causa de cirrosis hepática que es a su vez la principal causa de muerte en personas de entre 25 y 40 años de edad en México. También se relaciona con diferentes tipos de cáncer según la bebida alcohólica que se acostumbre a consumir, por ejemplo: Cerveza = cáncer de colon y recto, Vinos = cáncer de estómago, Aguardientes = cáncer de cabeza y cuello (3,7,15,24,30). Provoca malformaciones congénitas y causa daños en el material genético, que es la cuestión principal del presente trabajo (7,8,9,12,13,17,18,19) .

## II - EL TEQUILA .

El tequila es la bebida alcohólica que se utilizó en el presente trabajo y por eso revisaremos brevemente algunos de sus aspectos más interesantes .



#### a) HISTORIA DEL TEQUILA .

El tequila es en la actualidad un aguardiente genuino y típicamente mexicano, con un amplio mercado dentro y fuera del país, la denominación de TEQUILA, proviene tanto del nombre del volcán como de la población localizados a 48 Km al Norte de la Ciudad de Guadalajara en el Estado de Jalisco, cercanos al paralelo 36.

Al parecer esta bebida ya se conocía en la época de las culturas prehispánicas y aún en las precolombinas; se dice que fue la tribu de los "Tiquila" ó los "Tiquilos" quienes después de que habían aprendido a cocer el cogoyo del maguey y su proceso complementario, elaboraron en Amatitlan Jalisco dicha bebida (1). Se cuenta que solo tomaban tequila los sacerdotes y ancianos y según el médico español Jerónimo Hernández (1651), era utilizado para curar la falta de movimiento de articulaciones frotando con el la parte afectada (3).

El día 2 de Noviembre de 1758, podría considerarse fecha de nacimiento de La Industria Tequilera Mexicana, cuando el corregidor Jesús López Portillo y Galindo dió en posesión a Don José Antonio Cuervo de unas tierras que habían pertenecido a la Cofradía de las Benditas Animas, en donde comenzó agricolamente la siembra del maguey. Pero fué hasta el año de 1795 que uno de sus descendientes, José Ma. Guadalupe Cuervo, recibió la primera autorización de la Corona Española para producir el aguardiente.

Posteriormente hacia la primera mitad del siglo pasado José Ma. Castañeda, estableció en La Antigua Cruz estado de Jalisco una fábrica destiladora de tequila, a la cual llamó " La Providencia", esta fué adquirida el 1º de Septiembre de 1873 por Don Cenobio Sauza, quien ese mismo año inició la exportación del producto hacia los E.U.. Quince años más tarde cambió de nombre a esa destilería y la denominó " La Perseverancia", razón social que aún hoy en día conserva.

Actualmente el tequila se exporta a más de 70 países y los industriales jalisienses lograron el 22 de Noviembre de 1974 que el nombre de "TEQUILA" quedara reconocido y protegido en México como una Denominación de Origen , figura jurídica reconocida mundialmente, por medio de la cual se impide que pasen a ser de uso genérico los nombres que han alcanzado prestigio y notoriedad a nivel mundial (3).

## b) PRODUCCION DEL TEQUILA .

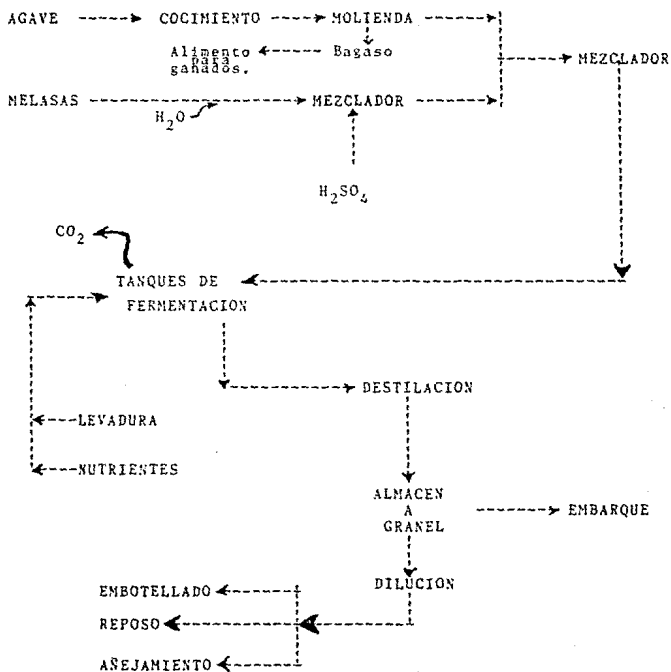
Para la producción del tequila la principal materia prima es el Agave tequiliana (Wever), en sus variedades azul y xinguin, en el estado de Jalisco, principal productor, podrían sembrarse al rededor de 75,000 hectáreas con aproximadamente 200 millones de estas plantas. También se cultiva en tierras de temporal de los estados de Nayarit, Michoacan y Guanajuato; siendo más bien la verdadera zona de producción de clima frío y no templado, la altura en que la planta crece es de 2,200 a 2,700 metros sobre el nivel del mar y como terreno predilecto esta el de la tierra llamado tepetate (4).

En el lenguaje de producción se denomina Tequila al licor que se obtiene de la fermentación y destilación del maguey cocido y picado, es una bebida nacional por excelencia (4).

Las principales calidades del tequila son tres : El Blanco, El reposado y El añejo. El Blanco es el que se destila a 55° Gay-Lussac y se envasa de inmediato; El Reposado es el blanco que se mantiene por dos o tres meses en barricas de roble ó encino y El Añejo prolonga su reposo en este mismo tipo de barricas por un año ó más hasta que adquiere su característico color ámbar (3).

En la figura #1, se esquematiza a grosso modo un diagrama de los pasos que se siguen en la industria para la elaboración del tequila.

FIGURA # 1 .



c) COMPONENTES DEL TEQUILA .

Entre los componentes más abundantes del tequila tenemos: agua en un 50 a 64% y alcohol etílico entre un 36 a 49%. Este último proviene de la fermentación del mosto; otros constituyentes encontrados en menor proporción son aquellos denominados aceites de fusel, que también son sustancias producidas en el proceso de fermentación, de estos podemos mencionar como los más abundantes a otros alcoholes, éteres, aldehídos y acetal (5).

En un estudio realizado en el Instituto de Química de la UNAM, se analizaron varias muestras de tequilas obteniéndose las siguientes concentraciones en partes por millón (p.p.m.) de sus componentes volátiles:

COMPONENTE VOLATIL	CONCENTRACION (p.p.m.)
Acetaldehído	6.0 - 84.0
Formiato de etilo	20.0 - 783.0
Acetato de etilo	24.0 - 134.0
Acetal	2.4 - 412.0
Alcohol metílico	110.0 - 1,256.0
ALCOHOL ETILICO	388,135.5 - 491,860.7
Alcohol n-propílico	174.0 - 636.0
Alcohol isobutílico	114.0 - 586.0
Alcohol isoamílico	618.0 - 2,082.0

como se puede observar en la tabla anterior, el etanol es el componente en mayor proporción después del agua que es más abundante(5).

### III - EL ETANOL Y SU PAPEL DENTRO DEL ORGANISMO.

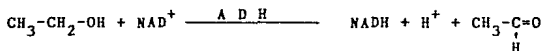
Como se mencionó anteriormente, el principal componente de las bebidas alcoholicas es el Etanol ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ ), en el tequila se encuentra entre un 36 y 49%, por lo tanto es importante resaltar algunos aspectos de su metabolismo en el ser humano.

Primeramente el Etanol que se consume, es rápidamente absorbido por el tracto gastrointestinal, normalmente se metaboliza y excreta en pocas horas. Gran cantidad del Etanol es absorbido en el estómago pero es en el intestino delgado donde se tiene un 80 % de absorción.

Una vez que pasa a la sangre, se distribuye con bastante uniformidad en todos los líquidos y tejidos del organismo; es metabolizado al rededor de un 50% de lo ingerido principalmente en el hígado por el sistema microsomal, grupo de enzimas que se encargan de la función de desintoxicación. El Etanol restante también se metaboliza en los pulmones y riñones dando como resultado que de un 90 a 98% del Etanol que entra en el organismo se oxida completamente. El Etanol que logra escapar a la oxidación, se elimina atravez de la respiración vía pulmonar ó de la orina vía riñones (6).

En los hepatocitos, la oxidación es realizada por una enzima que se denomina Alcohol-deshidrogenasa (ADH); ésta contiene cinc, utiliza NAD como acceptor de hidrógeno y depende de sus grupos -SH libres en la proteína para su actividad.

La reacción catalizada por la ADH podría esquematizarse de la siguiente forma:



Esta es una reacción enzimática de tipo REDOX donde el  $\text{NAD}^+$  es reducido durante el proceso para formar  $\text{NADH}_2$  y el Etanol se oxida dando lugar a la formación de acetaldehído cuya fórmula es  $\text{C}_2\text{OH}_4 = \text{CH}_3\text{-}\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}\text{=O}$  (6,30) .

El acetaldehído, principal metabolito del etanol, es convertido en acetil-coenzima-A (AcCoA), aún no se conoce si esta conversión es directa o a través del intermediario ácido - acético; esta AcCoA así formada, sigue las mismas rutas metabólicas que la demás AcCoA producida por otras fuentes en el metabolismo celular, esto es: la oxidación en el ciclo del ácido cítrico y su utilización en las diversas reacciones anabólicas comprendidas en la síntesis de colesterol, ácidos grasos y algunos otros componentes de los tejidos (6,7,30).

Otro mecanismo implicado en el metabolismo del etanol se dice que es el de la enzima catalasa, que acoplada a un sistema donde la eliminación de peróxido de hidrógeno juega un papel importante, oxida directamente el etanol formando acetaldehído (6,30).

Por último cabe mencionar que muchos son los cambios que acompañan al etanol dentro del organismo, por ejemplo; aumenta la producción de ácidos grasos y lactato, hay hiperuricemia y posiblemente una disminución de la realización del ciclo del ácido cítrico en el hígado y al parecer la alta producción de  $\text{NADH}_2$  durante la oxidación, aumenta la cantidad de almacenaje de ácidos grasos (6,7,30).



#### IV - PAPEL MUTAGENICO DE LAS BEBIDAS ALCOHOLICAS .

Existen hoy en día gran cantidad de reportes sobre los efectos de la bebidas alcoholicas y de sus componentes sobre el material génético. Se han probado en distintos sistemas biológicos, unos son los cultivos celulares que son basicos para observar los efectos sobre los cromosomas; otros son sistemas bacterianos donde se observan los daños a nivel de genes evaluando la capacidad de las bacterias de revertir en algunas de sus características metabólicas y por último también se utilizan células vegetales donde se observan efectos sobre sus cromosomas de la misma manera que con las células animales (9,12, 13,15,17,18,23,27).

Cabe destacar que la mayoría de estas investigaciones esta encaminada a establecer cierta relación entre los efectos mutagénicos de las bebidas alcoholicas y el cáncer, esto es : entre alcoholismo y cáncer. Postulándose que si alguna bebida alcoholica o alguno de sus componentes o metabolitos poseen efectos mutagénicos entonces podrían causar cáncer o bien, estimular la predisposición que tienen ciertos individuos a adquirirlo. Pues como se mencionó anteriormente (pag.4), se ha relacionado a ciertos tipos de cáncer con el consumo crónico de determinadas bebidas alcoholicas.

Por último, existen datos que relacionan el consumo crónico de bebidas alcoholicas durante el embarazo y alteraciones genéticas en el humano, como malformaciones y retraso mental, síndrome fetal alcoholico y embriopatía alcoholica (8,9,18).

## V - LOS CROMOSOMAS .

Al comenzar a hablar de material genético, es necesario que hablemos también de los cromosomas, localizados en el núcleo de las células eucarióticas y constituidos principalmente por ácido desoxirribonucleico (DNA) y unas proteínas asociadas a este llamadas histonas. Estos cromosomas son el material genético encargado de transmitir por generaciones la información de las funciones que deberá realizar la célula durante toda su existencia.

Los cromosomas son cuerpos filiformes que durante la división celular, se contraen haciéndose más gruesos y cortos, en ellos se puede distinguir un centrómero y dos brazos cromosómicos o cromátides hermanas. Dependiendo de la posición del centrómero, los cromosomas se clasifican como sigue:

- 1.- METACENTRICOS: cuando los dos brazos de las cromátides tienen casi la misma longitud, esto es; el centrómero esta casi a la mitad del cromosoma.
  - 2.- ACROCENTRICOS: cuando los dos brazos tienen una longitud diferente, es decir el centrómero esta más cerca de un extremo del cromosoma.
  - 3.- TELOCENTRICOS: cuando hay un solo brazo claramente distinguible de cada cromátide y aquí el centrómero está en el extremo o muy cerca del extremo del cromosoma.
- Ver figura número 2 .

- 4.- **SUBMETACENTRICOS:** cuando un extremo de los brazos de las dos cromátidas es ligeramente más corto que los otros; así el centrómero se encuentra desplazado ligeramente del centro del cromosoma. (FIGURA # 2).

FIGURA # 2 .



1



5



13



TELOCENTRICO

CROMOSOMAS HUMANOS 1, 5 y 13. QUE SON RESPECTIVAMENTE EJEMPLO DE CROMOSOMAS METACENTRICO, SUBMETACENTRICO Y ACROCENTRICO. LOS CROMOSOMAS TELOCENTRICOS NO EXISTEN EN LOS HUMANOS.

## VI - INTERCAMBIO DE CROMATIDES HERMANAS .

Existen en citogenética varias técnicas que permiten observar el daño que provocan diversos agentes sobre los cromosomas, esto es, daño sobre el DNA ó efectos mutagénicos. Entre estas técnicas podemos mencionar la búsqueda y detección de aberraciones cromosómicas, la detección de micronúcleos, la determinación de la frecuencia de intercambios de cromátides hermanas (ICHs). Todas ellas se realizan con cultivos celulares ya sea de vegetales ó de animales incluyendo al hombre. Otras técnicas como la detección de revertantes se realizan en cultivos bacterianos (7,16,31).

Puesto que en el presente trabajo se utiliza la técnica de Intercambio de Cromátides Hermanas (ICHs), revisaremos sus principales características.

Para hablar de ICHs, debemos mencionar que estos son observados gracias a un método de tinción diferencial de las dos cromátides de los cromosomas. Esta metodología se comienza a aplicar desde el momento en que se inicia el cultivo celular; incorporando en el medio una base análoga a la timina y que se conoce como 5-bromo desoxiuridina (BrdU); pasados dos ciclos de replicación celular la BrdU se ha incorporado al ADN cromosómico y las células quedan listas para el proceso de tinción diferencial con los colorantes Hoescht 33258 y Giemsa (25,26).

Una vez teñidas, las células en metafase presentan sus cromosomas con diferente intensidad de coloración en cada una de sus cromátides (Fig:3b).

Esta diferencia de intensidad de coloración en las dos cromátides de cada cromosoma es debida a que en la doble cadena de ADN de una cromátide se encuentra incorporada la base análoga BrdU (cromátide clara), mientras que en la otra cromátide la base análoga solo se ha incorporado en una sola hebra de ADN (cromátide oscura). Así, esta metodología nos permite observar intercambios de fragmentos simétricos entre las dos cromátides hermanas a los cuales se les denomina ICHs. (intercambios de cromátides hermanas) figura: 4.

Por otra parte se ha observado que al agregar a cultivos de linfocitos ( en los cuales se aplica esta metodología) distintos agentes mutagénicos y carcinogénicos, el número de ICHs se incrementa considerablemente; comparado con cultivos testigo donde la incidencia de ICHs es relativamente constante entre los individuos y es independiente de la edad y sexo, dando una frecuencia de ICHs de entre 5 y 9 por célula en metafase (16,21).

El aumento de ICHs como consecuencia del daño producido por el agente sobre el ADN, demostró que la medición de este parámetro es el índice más sensible para detectar daño sobre el material genético y comparado con la prueba estándar de búsqueda de aberraciones cromosómicas, resultó ser alrededor de 100 veces más sensible (16,21).

Los ICHs se han asociado a mutación, puesto que al haber un intercambio de material de una cromátide a otra, puede decirse que ha existido una ruptura o lesión del material genético (ADN). Y también esta combinación de ADN de cadenas madres con cadenas hijas por un proceso de reparación, puede acarrear como se ha demostrado en bacterias una mutación debida a delección o inserción de bases a la hebra de ADN (16, 21, 31,32).

Todo lo anterior nos indica que el estudio de los ICHs químicamente inducidos, además de ser muy sensible y relativamente rápido y sencillo, es un método eficaz para detectar agentes que dañan a los cromosomas, esto es al ADN (16,21).

## FUNDAMENTACION DEL TEMA

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación bastante amplio; que evalúa los efectos que tienen las bebidas alcoholicas dentro del organismo humano.

Hemos visto en paginas anteriores un pequeño panorama de lo que es el consumo de bebidas alcoholicas, sus efectos a nivel socio-económico y sus repercusiones en la salud. Se realizó cierto análisis histórico de la producción y consumo del Tequila debido a que es la bebida que se fraccionó para su estudio mutagénico en el presente trabajo.

Si nace ahora la interrogante de ¿Porqué el Tequila y porqué estudio citogenético de Intercambio de Cromátides Hermanas? Se puede responder que primeramente la bebida tiene un origen genuino y típicamente nacional y nunca se ha reportado en la literatura estudio alguno que mencione efectos genotóxicos de esta; en segundo lugar, el Tequila como buen aguardiente que es, contiene gran cantidad de etanol (5) y existen autores que mencionan que este compuesto tiene efectos mutagénicos e incrementa el número de intercambios de cromátides hermanas (10,11,12,18,23,27,30); y por último, el Tequila es una bebida de gran consumo dentro y fuera del país y considerando que la ingestión de este tipo de productos se relaciona con el cáncer (15,18,24,30), nace el interes de investigar por principio si el Tequila posee efectos mutagénicos.

Como datos importantes que apoyan la realización de este estudio tenemos que la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de personas alcoholicas es alta cuando se compara con la de personas que no lo son y esto concuerda en forma paralela con datos epidemiológicos que indican que los alcoholicos tienen alto riesgo de adquirir cáncer en varios sitios del cuerpo, en especial cabeza, cuello y tracto digestivo en general (7,15,18,24).

También distintos autores han fraccionado bebidas alcoholicas y las han ensayado en diferentes sistemas de cultivos celulares. Estas fracciones catalogadas como fracción volátil y congéneres que es la fracción no volátil; contienen gran variedad de compuestos.

Los resultados obtenidos por estos investigadores sugieren que estas fracciones contienen sustancias con capacidad de acción mutagénica (13,15,17).

Por último la citogenética nos sugiere técnicas relativamente sencillas, rápidas, confiables y muy sensibles para evaluar los efectos mutagénicos. Una es el estudio de Intercambios de Cromátidas Hermanas, técnica que se seleccionó en el presente trabajo por ser 100 veces más sensible que la prueba estándar para detectar aberraciones cromosómicas (16,21).

Además se ha demostrado que el estudio de los ICHs químicamente inducidos es el método más sencillo para detectar agentes que dañan el ADN (16,21).



De todo lo anterior se deduce que es interesante e importante probar si la fracción orgánica volátil obtenida del Tequila, bebida tradicionalmente mexicana, tiene capacidad de acción mutagénica, evaluando su acción en cuanto a la frecuencia de ICHs sobre cultivos de linfocitos humanos.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El principal problema consiste en definir si la fracción orgánica volátil obtenida del Tequila Sauza Blanco tiene algún efecto mutagénico directo sobre linfocitos humanos en cultivo. Tomando como parametro de mutagenicidad la frecuencia de Intercambios de Cromátidas Hermanas a diferentes dosis de la fracción incorporada al medio de cultivo celular.

## O B J E T I V O S

-Obtener la fracción orgánica volátil del Tequila Sauza Blanco, por medio de un -- proceso de destilación simple, para eliminar agua y los probables sólidos o congéneres.

-Observar el comportamiento de los cultivos de linfocitos humanos tratados con la fracción orgánica volátil a distintas dosis, en comparación con los cultivos testigo; en cuanto a las siguientes características:

- a) Cinética celular
- b) Índice mitótico
- c) Índice de replicación.

-Definir si la fracción orgánica volátil del Tequila aplicada sobre los cultivos a diferentes dosis, incrementa la frecuencia de Intercambios de Cromátidas Hermanas.

-Designar en base a lo anterior si la fracción orgánica volátil obtenida del Tequila Sauza Blanco, posee o no acción mutagénica directa.

## HIPOTESIS DE TRABAJO

Si existen evidencias de que el Etanol, principal componente de las bebidas alcoholicas no incrementa la frecuencia de Intercambios de Cromátides Hermanas(14,22,28) y por lo tanto no tiene un efecto mutagénico directo; entonces es de esperarse que nuestra muestra ó fracción orgánica volátil obtenida del Tequila Sauza Blanco, compuesta principalmente de Etanol, no eleve de manera significativa la frecuencia de ICHs y de hecho no provoque efectos mutagenicos detectables a este nivel.

Aunque bien podría afectar de alguna manera la cinética celular, el índice mitotico o el índice de replicación.

## MATERIAL Y METODOS

### MATERIAL

Baño maria  
Soporte universal (dos)  
Filtros Millipore (NA 0.45 micras)  
Adaptador de filtro Millipore para jeringa  
Jeringas desechables nuevas (cinco)  
Ligadura de hule  
Torundas de algodón  
Puntas para pipeta automática 5 - 50 ul  
Bulbos de hule para pipetas Pasteur  
Lampara de Luz negra (Phillips)  
Cuaderno, bolígrafo, lápiz  
Calculadora

### MATERIAL DE VIDRIO

Equipo de destilación (Pyrex)  
Termómetro -10 a 110 °C (Brannan)  
Frascos amber tapon baquelita 250 ml (10Pza.)  
Pipetas de 1,5 y 10 ml (cinco de c/u)  
Tubos para centrifuga 10 ml (Fyrex)  
Pipetas Pasteur 10 pzas. (S/P)  
Vases Coplin para tinción (cinco)  
Charola de 5cm de profundidad para tinción  
Caja de portaobjetos (Corning)  
Caja de cubreobjetos (Corning)

### EQUIPO

Farrilla de calentamiento (Corning)  
Pipeta automática de volumen variable (Oxford)  
de 5 a 50 microlitros  
Estufa de cultivo (Riosa)  
Campana de flujo laminar  
Centrifuga para 16 tubos con reloj (Sol-Bar)  
Microscopio óptico objetivos 10X, 25X, 40X, 100X  
Contador de células de cinco teclas (Clay-Adams)  
Computadora y programas Estadística Básica y  
Prueba "T de Student"  
Autoclave  
Estufa de secado  
Pinzas metálicas

## REACTIVOS BIOLÓGICOS Y SOLUCIONES

Sangre humana fresca 5 ml.  
Medio de cultivo celular RPMI 1640 (In Vitro)  
Fitoheماغلوتینا (Difco)  
5-Bromo-desoxiuridina (sigma) 4mg/ml en agua destilada  
Tequila Sauza Blanco un litro  
Mitomicina C (Sigma) 18 microgramos/ml en agua destilada  
Colchicina (sigma) 0.00mg/ml en agua dest.  
Solución Metanol/Ácido acético 3:1 (v/v)  
Cloruro de potasio (Baker) grado reactivo al 0.075 M  
Hoescht 33258 (sigma) 100 microgramos/ml en agua destilada  
Giensa (Merck) al 4% en agua destilada  
Amortiguador de Citratos/Fosfatos pH7.0  
Xileno (Sigma) grado reactivo  
Balsamo de Canadá (Sigma)

## M E T O D O L O G I A

### 1.- Obtención de la fracción orgánica volátil del Tequila Sauza Blanco.

Se utilizó un equipo de destilación simple limpio y esterilizado previamente (Fig: 5). Se destiló por un periodo de seis horas un litro de tequila Sauza Blanco entre 75 y 80 °C, hasta obtener toda la fracción orgánica volátil posible en ese periodo de tiempo.

Se dejó alcanzar la temperatura ambiente y se esterilizaron a través de filtro Millipore 100 ml del destilado, almacenándose en frasco amber con tapon de rosca entre 2 y 3 °C hasta el momento de utilizarse para la realización de los cultivos.

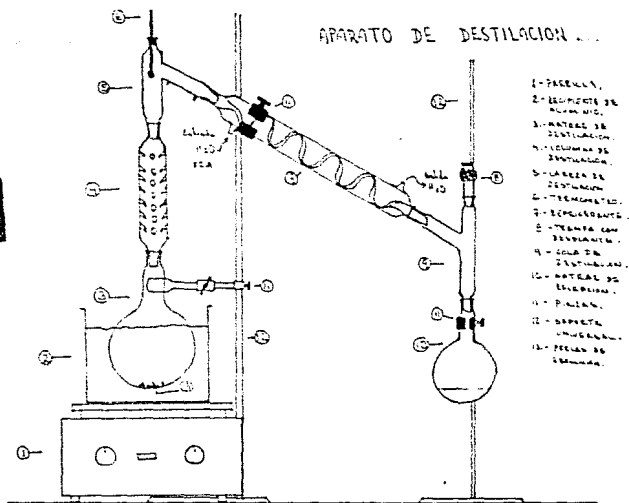


FIGURA # 5 .



2.- Cultivo de Linfocitos Humanos y  
exposición de los mismos a la  
Fracción Orgánica Volátil obtenida  
del Tequila Sauza Blanco.

a) SIEMBRA: El trabajo de la siembra se realizó en el área estéril del laboratorio, dentro de una campana de flujo laminar, teniendo cuidado de que todo el material y soluciones de trabajo se encontraran a la mano y a temperatura ambiente.

El material previamente al ensayo se lavó cuidadosamente y se esterilizó en autoclave a 121°C por 20 minutos y las soluciones se esterilizaron con filtros Millipore.

La muestra de sangre se tomó aproximadamente 10 minutos antes de comenzar la preparación de los cultivos. Se extrajeron con una jeringa desechable nueva y heparinizada cinco mililitros de sangre venosa periférica en forma habitual. El donador se encontraba clínicamente sano, reportando no ser alcohólico ni fumador, no haberse expuesto a tratamiento médico alguno en los últimos tres meses, de sexo femenino, 25 años de edad y no farmacodependiente.

Una vez que todo quedó listo, se etiquetan los frascos de cultivo y se enumeran del uno al siete, ya marcados se les adicionó a cada uno los siguientes componentes en el orden en que aparecen anotados:

- 5.0 ml de medio de cultivo celular
- 0.5 ml de sangre heparinizada fresca
- 0.4 ml de fitohemaglutinina

Los frascos se cerraron bien con su tapa de rosca y se metieron a incubar en la estufa de cultivo a 37°C por un periodo de 24 horas.

Una vez que transcurrió ese periodo de tiempo, los frascos se sacaron de la estufa y dentro de la campana de flujo laminar se destaparon y se les adicionó a cada uno 45 microlitros de la solución de 5-bromo desoxiuridina, al mismo tiempo también se les incorporó la dosis de la fracción obtenida del tequila; siguiendo el esquema que a continuación se indica:

FRASCO	DENOMINACION	DOSIS (v/v)	MICROLITROS DE LA FRACCION
1	Testigo (-)	0.00%	0
2	Testigo (+)	0.00%	(*)
3	Dosis I	0.05%	4
4	Dosis II	0.10%	9
5	Dosis III	0.20%	17
6	Dosis IV	0.60%	53
7	Dosis V	1.40%	125

(\*) Al frasco marcado como testigo positivo se le adicionaron 50 microlitros de la solución de Mitomicina C.

Los frascos se cerraron bien, se agitaron suavemente para mezclar bien su contenido y se colocaron nuevamente dentro de la estufa de cultivo a 37 °C por un periodo de 38 horas más.

b) COSECHA CELULAR: Al finalizar un periodo de incubación total de 62 horas, se agregó a cada frasco de cultivo 0.35 ml de la solución de colchicina, se dejaron a 37°C por un periodo de 50 minutos, comenzando así, la cosecha celular. Al transcurrir este lapso de tiempo se vaciaron los contenidos de los frascos en tubos de centrifuga previamente marcado para cada uno como: T(-), T(+), DI, DII, DIII, DIV y DV; se metieron a centrifugar por 10 minutos a 1,550 rpm, se eliminó el sobrenadante con pipeta Pasteur, utilizando una distinta para cada tubo. El botón celular remanente se resuspendió en cada uno y se adicionaron 7 ml de la solución de KCl 0.075 M. Se incubaron a 37 °C por 20 minutos (tratamiento hipotónico) e inmediatamente después se centrifugaron por 10 minutos a 1,500 rpm eliminándose el sobrenadante con pipetas Pasteur.

El siguiente paso fue el proceso de fijación, este consistió en adicionar a cada tubo con botón celular resuspendido 7 mililitros de solución fijadora de Metanol/Ac. acético 3:1, se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 minutos y pasado este lapso se centrifugaron a 1,500 rpm por 10 minutos.

Nuevamente se elimina el sobrenadante con su respectiva pipeta Pasteur para cada tubo, se resuspende el botón celular en el remanente de solución fijadora y se repite el proceso de fijación por un mínimo de tres veces ó bien hasta que el sobrenadante es completamente transparente.

Los botones celulares ya fijados se resuspendieron en 0.5 ml de solución fijadora y así se almacenaron en refrigeración hasta el momento de preparar las laminillas.

c) PREPARACIÓN DE LAMINILLAS: Se utilizaron portaobjetos nuevos, limpios, desengrasados con metanol (atraves de un baño de estos en un vaso de Coplin) y bien secos.

Los portaobjetos se colocaron en plano horizontal sobre la mesa de trabajo y se marcaron en grupos de tres como: T(-), T(+), DI, DII, DIII, DIV y DV; 21 laminillas en total.

Utilizando una pipeta Pasteur para cada tubo de centrifuga que contenian el boton de celulas cosechadas; se tomó un poco de la suspensión celular y desde una altura de entre 15 y 20 centímetros se dejaron caer de dos a tres gotas por laminilla, preparando tres laminillas por cada tubo.

Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente y se almacenaron en estuches hasta el momento de realizar la tinción diferencial.

d) TINCIÓN DIFERENCIAL PARA ICHs. : La tinción se realizó de acuerdo a la metodología de la bibliografía (25,26). Primero se colocaron las laminillas en un vaso coplin que contenía colorante de Hoescht 33258, por un periodo de 20 minutos y protegiéndose de la luz; transcurrido ese tiempo, se sacaron las laminillas de los vasos coplin con unas pinzas y se enjuagaron con agua destilada una por una. Una vez que se tienen todas las laminillas enjuagadas se deshidratan en una estufa a 70°C durante 15 minutos.

Posteriormente se colocaron las laminillas en la charola de tinción, con la cara donde se encontraban las gotas de los botones celulares hacia arriba, se cubrieron por completo con el amortiguador de Citratos/Fosfatos pH 7.0 y se expusieron a la luz negra por 50 minutos, teniendo cuidado de protegerlas de cualquier otra fuente luminosa cubriéndoles con una franela negra. Transcurridos los 50 minutos se sacaron las laminillas cuidadosamente de la charola con unas pinzas, se enjuagaron con agua destilada y dejaron secar a temperatura ambiente. Y por último se tñieron en vaso coplin con colorante de Giemsa al 4% por un lapso de 15 minutos, se lavaron de una en una con agua destilada, se dejaron secar a temperatura ambiente, se deshidrataron con Xileno en un vaso coplin y se les montaron los cubreobjetos con bálsamo de Canadá. Así las laminillas se almacenan indefinidamente y están listas para su revisión.

e) REVISION DE LAMINILLAS: Con ayuda del microscopio y de un contador de células, se procedio a la revisión de laminillas. Para cada dosis y testigos se evaluaron los siguientes cuatro parámetros:

- 1.- Índice Mitótico: Se determinó el número de células "vivas" (núcleos no picnóticos), células en metafase y células "muertas" (núcleos picnóticos) por cada mil células.
- 2.- Cinética Celular: Se conto el número de metafases de primera, segunda y tercera división mitotica por cada cien metafases, en base al siguiente criterio:
  - a) Metafases de 1ª División: son las que presentan cromosomas con ambas cromátides oscuras.
  - b) Metafases de 2ª División: son las que presentan cromosomas con una cromátide clara y una cromátide oscura.
  - c) Metafases de 3ª División: son las que presentan cromosomas con ambas cromátides claras y algunos con una cromátide oscura.

FIGURA #3.

FIGURA # 3.



Figura 3a : Metafase de primera división mitótica, notese la misma intensidad de coloración en ambas cromátides hermanas de los cromosomas; de cultivo de linfocitos humanos expuestos a ErdU.

FIGURA #3.

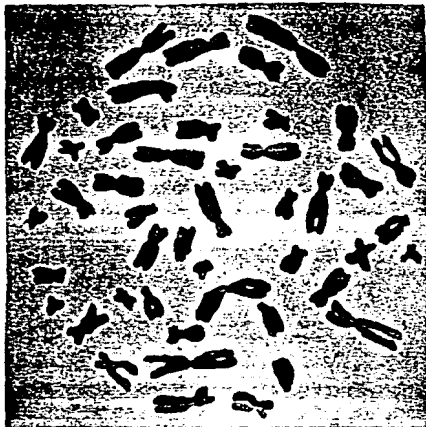


Figura 3b : Metafase de segunda división mitótica, notese la diferencia de intensidad de coloración entre ambas cromátides hermanas en los cromosomas; de cultivo de linfocitos humanos expuestos a BrdU.



FIGURA # 3.



Figura 3c : Metafase de tercera división mitótica, se observan cromosomas con una cromátide teñida intensamente, mientras que la mayoría presenta coloración clara en ambas cromátides hermanas; de cultivo de linfocitos humanos expuestos a BrdU.

3.- Índice de Replicación: se calculó utilizando los datos obtenidos en la Cinética Celular, mediante la siguiente fórmula:

$$I R = \frac{(1 \times M 1^a) + (2 \times M 2^a) + (3 \times M 3^a)}{100}$$

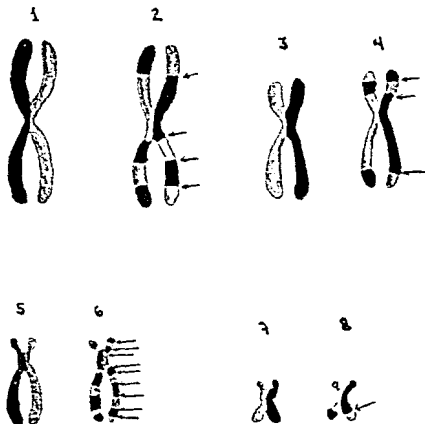
Donde:

- IR = índice de replicación
- M1<sup>a</sup> = número de metafases en primera división mitótica.
- M2<sup>a</sup> = número de metafases en segunda división mitótica.
- M3<sup>a</sup> = número de metafases en tercera división mitótica.

4.- Intercambios de Cromátides Hermanas :  
Estos se contaron en un mínimo de 30 metafases en segunda división mitótica el ejemplo de como se contaron se puede observar en la figura # 4.

Todos estos datos son registrados en la libreta para su posterior análisis estadístico.

FIGURA #4.



INTERCAMBIOS DE CROMATIDES HERMANAS

Los cromosomas 1, 3, 5 y 7; no presentan ICHs. Y los cromosomas 2, 4, 6 y 8; presentan 4,3,9 y 1 ICHs respectivamente estos señalados con flechas.

f) TRATAMIENTO ESTADISTICO DE DATOS: Para los datos obtenidos en el punto #4 (ICHs), se calcularon las medias, varianzas y desviaciones estándar, para cada dosis y testigos; utilizando en la computadora el programa de Estadística Básica. Despues se realizó la comparación de las medias de ICHs de las diferentes dosis y testigo positivo contra la media del testigo negativo, utilizando para esto el programa de la prueba " T de Student " en la misma computadora.

## R E S U L T A D O S

Los resultados del presente trabajo seran mostrados en las siguientes cuatro tabla.

TABLA # 1 .

DOSIS	CELS.MUERTAS	CELS. VIVAS	METAFASES	TOTAL
T(-)	141	796	63	1,000
0.05%	178	772	50	1,000
0.10%	214	751	36	1,000
0.20%	366	619	15	1,000
0.60%	366	618	16	1,000
1.40%	389	598	13	1,000
T(+)	252	639	09	1.000

Esta tabla representa el indice mitótico de los cultivos de linfocitos humanos expuestos a diferentes dosis de fracción orgánica volátil del tequila Sauza Blanco.

TABLA # 2 .

DOSIS	1ª Div.Mit.	2ªDiv.Mit.	3ªDiv.Mit.	TOTAL
T(-)	40	52	08	100
0.05%	54	41	05	100
0.10%	49	46	05	100
0.20%	65	31	04	100
0.60%	67	30	03	100
1.40%	72	28	00	100
T(+)	81	16	03	100

En la presente tabla se observa la cinética celular de los cultivos de linfocitos humanos tratados con diferentes dosis de la fracción orgánica volátil del tequila Sauza Blanco.

TABLA # 2a .

DOSIS	INDICE DE REPLICACION
T(-)	1.68
0.05%	1.51
0.10%	1.56
0.20%	1.39
0.60%	1.36
1.40%	1.28
T(+)	1.22

La tabla 2a nos muestra el indice de replicacion obtenido a partir de los datos de la tabla #2, utilizando la formula de la pagina 37. El indice de replicación nos da una idea del número de ciclos celulares que realizaron los linfocitos humanos en cada cultivo (dosis y testigos).

TABLA # 3 .

DOSIS	MEDIA DE ICHs ( $\bar{x}$ )	VARIANZA ( $s^2$ )	DESVIACION ESTANDAR	n
T(-)	8.66	9.40	3.05	30
0.05%	8.76	13.63	3.69	30
0.10%	9.70	8.42	2.90	30
0.20%	9.40	8.11	2.84	30
0.60%	9.96	13.89	3.72	30
1.40%	10.64	16.70	4.08	14
T(+)	28.63	35.48	5.95	30

NOTA: Datos obtenidos con el programa de Estadística básica en la computadora; introduciendo los valores de ICHs observados en cada dosis y testigos.

En la tabla #3 podemos observar los valores de los parámetros estadísticos que reportan los cultivos de linfocitos humanos expuestos a fracción orgánica volátil del tequila Sauza Blanco, en cuanto a los intercambios de cromátides hermanas. (VER APENDICE).



TABLA # 4 .

PRUEBA T	T CALCULADA	GRADOS DE LIBERTAD	$\bar{x} \pm t \frac{G}{\sqrt{n}}$ (*)
T(-) v.s. DI	0.114	57.94	8.76 $\pm$ 1.34
T(-) v.s. DII	1.351	59.82	9.70 $\pm$ 1.06
T(-) v.s. DIII	0.970	59.65	9.40 $\pm$ 1.03
T(-) v.s. DIV	1.478	57.77	9.96 $\pm$ 1.36
T(-) v.s. DV	1.616	21.13	10.64 $\pm$ 2.18
T(-) v.s. T(+)	16.347	44.32	28.63 $\pm$ 2.17

Valor de T para T(-) = 8.66  $\pm$  1.11  
obtenido de (\*).

DI = 0.05%      DII = 0.10%      DIII = 0.20%

DIV = 0.60%      DV = 1.40%

En esta tabla se expresan los resultados obtenidos con el programa Prueba T de Student en la computadora; utilizando las medias de los ICHS de la tabla # 3.

# ESTA YESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En la tabla #1, que corresponde a la evaluación del índice mitótico, podemos observar como la población de células vivas disminuye conforme la dosis de la fracción orgánica volátil del tequila es adicionada a los cultivos de linfocitos en mayor proporción. También en esta misma tabla nos daremos cuenta de que las células que se encontraron en metafase por cada dosis, son menos conforme la cantidad de fracción orgánica volátil es adicionada en mayor proporción. En la literatura (14), se menciona un estudio que utiliza etanol sobre cultivos de linfocitos humanos en concentraciones que van de 0.0% a 2.0 % (V/V), evaluando un buen número de ICHs.

En el presente trabajo se observa que a una concentración de nuestra fracción por encima de 0.10%, el número de células en metafase disminuye considerablemente, siendo estas muy escasas como para evaluar fácilmente los ICHs. Este efecto probablemente es ocasionado por la presencia de otros componentes y no exclusivamente etanol en la fracción orgánica volátil obtenida; los cuales tal vez resultaron tóxicos para las células en los cultivos.

En la tabla #2 correspondiente a la cinética celular, se observa que las células de primera división mitótica aumentan y las de tercera división mitótica disminuyen conforme la dosis utilizada de la fracción es mayor. Esto nos demuestra de manera indirecta que el tiempo que necesitan las células para realizar una mitosis o bien para alcanzar la fase M del ciclo celular, se ha prolongado, siendo más difícil o tardado cuando la fracción obtenida del tequila se ha adicionado en una mayor cantidad. Lo anterior concuerda con lo expuesto en la tabla #2a, que esquematiza el índice de replicación. Parámetro que nos indica el promedio de ciclos celulares completos que se realizan dentro del cultivo de linfocitos. Se puede observar aquí que conforme la dosis aumenta, las células requieren de mayor tiempo para realizar un ciclo celular completo y así tenemos que mientras el cultivo testigo negativo durante el tiempo de incubación de 62 horas realiza 1.68 ciclos celulares el cultivo expuesto a la dosis mayor de la fracción (1.40%) sólo realizó 1.28 ciclos en el mismo periodo de tiempo.

En la tabla #3, podemos observar que existe un ligero incremento en el promedio de ICHs cuando la dosis de la fracción orgánica volátil del tequila se incrementa, este aumento a simple vista no es de gran consideración si se compara con el resultado obtenido en el cultivo marcado como testigo positivo, al cual se adicionó Mitomicina C, agente, que como claramente se observa incrementa de manera significativa el número de ICHs en el cultivo

Alvarez et.al.(1980), menciona que el etanol incrementa de manera significativa el número de ICHs en cultivos de linfocitos y T.Jansson(1982) utilizando dosis de etanol sobre los cultivos que van de 0.0 a 0.5% indica un promedio de diez ICHs por célula en metafase; cosa que al parecer concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Por último, en la tabla #4, correspondiente a la prueba T de Student para la comparación de las medias de los cultivos problema contra la media del cultivo testigo negativo; podemos observar claramente que no existe una diferencia significativa entre los cultivos en que se adiciono la fracción orgánica volátil obtenida del tequila y el cultivo testigo negativo. Mientras que al confrontar el resultado del cultivo positivo donde se adicionó la Mitomicina C, contra el resultado del cultivo testigo negativo, si observamos una diferencia significativa bastante considerable.

Estos resultados van de acuerdo con diferentes autores (22,14,28), que mencionan que el etanol no induce un incremento de ICHs en los cultivos de linfocitos humanos y otros cultivos celulares. Postulando que es el metabolito de este alcohol quien puede tener un efecto directo sobre el incremento de la frecuencia de ICHs. Sin descartar a otros constituyentes de las bebidas alcoholicas como candidatos a poseer acción mutagénica directa.

## C O N C L U S I O N E S

- Se puede llegar a obtener una fracción orgánica volátil rica en etanol a partir del tequila Sauza Blanco, si este se destila a presión atmosférica entre 78 y 80 °C por un periodo de seis horas.
- Esta fracción orgánica volátil obtenida, es moderadamente tóxica para las células de cultivos de linfocitos en las dosis utilizadas; pues permite obtener más del 50% de mil células "vivas" en la cosecha de los cultivos celulares. Obteniéndose un índice de mortalidad relativamente bajo.
- La fracción orgánica volátil obtenida, a las dosis utilizadas, provoca un efecto retardante en el ciclo celular y por ello una disminución del número de células en metafase. Observándose este efecto mayor al incrementar la dosis.

- La fracción orgánica volátil obtenida del tequila Sauza Blanco, NO INCREMENTA DE MANERA SIGNIFICATIVA EL NUMERO DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDES HERMANAS, en las dosis que se emplearon y en un tiempo de exposición de 38 horas, sobre los cultivos de linfocitos humanos.
  
- En base a lo anterior, la fracción obtenida, NO POSEE ACCION MUTAGENICA -- DIRECTA. Sin embargo posee un efecto retardante al ciclo celular, siendo este mayor al aumentar la dosis.

## R E C O M E N D A C I O N E S

Puesto que el presente trabajo fue la realización de un experimento "in vitro", se recomienda realizar un ensayo con la misma fracción orgánica volátil obtenida del tequila Sauza blanco, en sistemas vivos ó tambien "in vitro" utilizando la fracción microsomal S9, que es un sistema de enzimas y coenzimas que realiza cierta actividad metabólica dentro del medio de cultivo celular. Pues existen reportes que mencionan que es el acetaldehído, principal metabolito del etanol, quien posee una acción mutagénica.

También resultara muy interesante probar si la fracción acuosa resultante de la destilación, posee algunos congénères y estos ensayarlos para tratar de detectar si poseen en forma directa o através de sus metabolitos alguna acción mutagénica.

Tal vez hoy en dia estos ensayos estan ó han sido realizados, pues el proyecto del cual forma parte este trabajo abarca el estudio de varias bebidas alcoholicas así como también de sus diferentes fracciones.

## B I B L I O G R A F I A

(Literatura citada)

- 1.- Molina Pineiro V. (1983); El alcoholismo en México III.;Memorias del seminario de análisis; Ed. Fundación de Investigaciones Sociales A.C. Mexico.
- 2.- Madden, J.S. (1986); Alcoholismo y Farmacodependencia; Ed. Manual Moderno, 2ª ed.; México.
- 3.- Molina P.V.; et.al.;(1982); El alcoholismo en México I.; (patología); Ed Fundación de Investigaciones Sociales A.C.; México.
- 4.- Bernal Sahagún V.; et.al.; (1985); El alcoholismo México negocio y manipulación.;Ed Nuestro Tiempo; 2ª ed.; México.
- 5.- Manjarrez A.; Llama M.; (1969); Cuantificación de los componentes volátiles de tequilas y mezcales por cromatografía en fase de vapor.;(química analítica); Rev.Soc.Quím.Méx.; Vol.XIII (1); p:1A-5A.
- 6.- Casarett & Doullis J.;(1980); TOXICOLOGY " The Basic Cience of Poisons".; Mac Millan Publishing Co. Inc.; 2ª ed.; New York,; p;476-478,687.
- 7.- Tuyns A.J.; (1979); Alcohol and Cancer Workshop,; Can.Res.; 39; p: 2840-2885.
- 8.-Gardner L.I.; Mitter,N.; et.al.;(1978); Isochromosome 9q in an infant exposed to ethanol prenataly.; The England Jour. of Med.; Vol.312; #3; p:1521.
- 9.- Nnet K.;(1973); Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers.; The Lancet.;Jun.9; p:1268-1271.



- 10.- Alvarez M.R.; Cinino L.E.; Cory M.J.; (1980); Ethanol induction of sister chromatids exchanges in human cells in vitro.; *Cit.Cell. Gen.*; 27; p:66 - 69.
- 11.- Cadette M.; Allard S.; Verdy M.; (1980); Lack of effect of ethanol in vitro on human chromosomes.; *An. Gen.*; 16; p: 55-56.
- 12.- Czajka M.R.; Tucci S.M.; Cays G.J.; (1980); Sister chromatid exchanges frequency in mouse embryo chromosomes; after in utero ethanol exposure.; *Tex.Let.*; 6; p: 257-261.
- 13.- Hoeft H.; Obe G.; (1983); Sister chromatid exchanges inducing congeneres in alcoholic beverages.; *Mut. Res.*; 121; p:247-251.
- 14.- Jansson Tomy;(1982); The frequency of sister chromatid exchanges in human lymphocytes treated with ethanol and acetaldehyde.; *Hereditas.*; 97; p: 301-303.
- 15.- Loquet C.;Toussaint G.; LeTalaer J.Y.; (1981); Estudios on mutagenic constituents of apple brandy and various alcoholic beverages collected in western of France, a high incidence area for oesophageal cancer.; *Mut.Res.*; 88; p: 155-164.
- 16.- Latt S.A.; (1974); Detection and induction of sister chromatid exchanges.; *Proc.Natn.Acad.Sci. USA*; 71; p:3162-3166.
- 17.- Nagao M.; Takahashi Y.; Sugimura T.;Watakabashi K.; (1981); Mutagenicity of alcoholic beverages.; *Mut. Res.*; 65;p: 147-154.

- 18.- Obe G.; Ristow H.; (1979); Mutagenic, carcinogenic and teratogenic effects of alcohol. ; Mut. Res.; 65; p: 229 - 259.
- 19.- Obe G.; Gobel D.; Engel H.; Herna J.; Natarajan A.; (1980); Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of alcoholics.; Mut. Res.; 73; p:377-386.
- 20.- Obe G.; natarajan A.T.; Meyers M.; Ce Hartog A.; (1979); Induction of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of human blood in vitro, and of sister chromatid exchanges in bone-marrow cells of mice in vivo by ethanol and its metabolite acetaldehyde.; Mut.Res.; 68; p: 291-294.
- 21.- Perry P.; Evans H.J.; (1975); Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchanges.; Nature.; 258; p: 121 - 125.
- 22.- Ristow H.; Obe G.;(1978); Acetaldehyde induces cross-links in DNA and causes sister chromatid exchanges in human cells.; Mut. Res.; 58; p: 115-119.
- 23.- Tates A.D.; Vogel H.; Neuteboom J.;(1980); Cytogenetic effects in hepatocytes, bone-marrow cells and lymphocytes of rats exposed to ethanol in drinking water.; Mut. Res.; 79; p: 285 - 288.
- 24.- Tuyns A.T.; (1970); Cancer of oesophagus; further evidence on the relation to drinking habits in France.; Int. Jour. of Can.; 5; p: 152 - 156.
- 25.- Sugiyama T.; Goto K.; Eano Y.;(1976); Mechanism of differential giemsa method for sister chromatids.; Nature.; 259; 7 & 8; p: 5-6 .

- 26.- Perry P.; Wolff S.; (1974); New giemsa method for the differential staining of sister chromatids.; Nature.; 257; p: 156 - 158.
- 27.- Hayes S.; (1985); Ethanol induced genotoxicity.; Mut. Res.; 143; p: 23 - 27.
- 28.- Obe G.; Jonas R.; (1986); Metabolism of ethanol in vitro produces compound which induces sister-chromatid-exchanges in human peripheral lymphocytes in vitro; Acetaldehyde not ethanol is mutagenic.; Mut. Res.; 174; p:47 - 51.
- 29.- Tuyns A.J.;(1979); Epidemiology of alcohol and cancer.; Can. Res.; 39; p: 2840 - 2843.
- 30.- Ames B.N.; Cann J.M.; Yamasaki E.; (1975); Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test.; Mut. Res.; 31; p: 347 - 364 .
- 31.- Painter R.B.; (1980); A replication model for sister chromatid exchange.; Mut. Res.; 70; p: 337-341.

APENDICE

RESULTADOS DE ICHS OBSERVADOS EN LAS LAMINILLAS  
PARA LOS TESTIGOS Y LAS DIFERENTES DOSIS.

0.05%	0.10%	0.20%	0.60%	1.40%	T(+)	T(-)
10	10	07	05	15	24	09
04	05	11	08	10	31	11
04	10	04	11	06	40	08
08	11	07	05	13	35	09
05	09	15	06	13	24	08
15	06	08	11	05	28	08
13	09	09	08	08	22	04
10	12	12	08	14	21	08
06	05	08	09	08	26	11
10	11	09	07	15	37	12
05	14	16	07	05	23	10
12	10	09	16	18	25	04
10	11	09	16	09	32	02
08	09	09	12	10	35	08
08	09	04	13		40	10
04	09	12	23		35	11
18	10	09	08		28	06
16	06	10	09		24	10
09	10	09	12		22	11
06	11	12	10		27	02
08	06	13	09		34	12
13	20	12	09		27	07
05	11	13	11		35	16
07	11	09	13		21	12
06	09	06	06		28	09
05	11	06	12		26	06
05	10	09	08		40	11
07	10	09	08		31	08
11	06	07	09		22	08
12	10	09	10		26	09
$\bar{x}=8.76$	$\bar{x}=9.70$	$\bar{x}=9.40$	$\bar{x}=9.96$	$\bar{x}=10.64$	$\bar{x}=28.63$	$\bar{x}=8.66$
n=30	n=30	n=30	n=30	n=14	n=30	n=30