

00337
7



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO EN AGUAS
SUPERFICIALES DE LA CUENCA ALTA DEL CURSO
ALTO DEL RÍO LERMA EN LAS CÉLULAS
MERISTEMÁTICAS DE LA RAÍZ DE *Vicia faba*

TESIS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA
SUSANA CEDILLO CUADROS

DIRECTORA DRA. SANDRA GÓMEZ ARROYO

México, D.F.

Noviembre, 2002





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de octubre de 2002, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Cedillo Cuadros Susana**, con número de cuenta 99809717, y número de expediente 3991061, con la tesis titulada: **"Evaluación del efecto genotóxico en aguas superficiales de la Cuenca Alta del Curso Alto del Río Lerma en las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*."**, bajo la dirección de la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo.

Presidente:	Dr. Rafael Villalobos Pietrini
Vocal:	Dra. Judith Isabel Guzmán Rincón
Secretario:	Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo
Suplente:	Dra. Anne Margrethe Hansen Hansen
Suplente:	Dr. Luis Felipe Jiménez García

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de noviembre de 2002

Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c p. Expediente del interesado

APOYOS RECIBIDOS

Este trabajo se realizó con los apoyos económicos otorgados por el
CONACyT,
con la Beca-Crédito para Estudios de Posgrado
(número de registro 130056),
por el período septiembre 1998-agosto 2000
y por la
DGEP.
Beca complementaria
por el período septiembre 1998–agosto 2000.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo (Tutora).

Dr. Rafael Villalobos Pietrini.

Dra. Anne Margrethe Hansen Hansen.

DEDICATORIA

Dedico con todo mi AMOR este trabajo a mi esposo Fernando y a mi hija María Fernanda.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profunda y sinceramente el apoyo que me brindaron las siguientes personas:

A la Dra. Sandra Gómez Arroyo por su acertada dirección en la realización de éste trabajo.

A la Dra. Josefina Cortés Eslava por su valiosa colaboración en la técnica de intercambio de cromátidas hermanas.

A la M en C. Ana Rosa Flores Márquez por su contribución en el análisis de aberraciones cromosómicas.

A los Doctores Rafael Villalobos Pietrini y Anne Margrethe Hansen Hansen, miembros del Comité Tutoral por sus aportaciones y recomendaciones.

A los compañeros de los Laboratorios de Citogenética y Mutagénesis Ambientales del Centro de Ciencias de la Atmósfera por su amistad, ayuda y apoyo en todo momento, así como a todos los que contribuyeron a la realización del presente trabajo

1. RESUMEN	8.
2. INTRODUCCIÓN	10.
2.1. La contaminación del agua y sus efectos genotóxicos	10.
2.2. Las plantas superiores como biomonitores ambientales	12.
2.2.1. Ventajas de las plantas superiores como biomonitores ambientales	14.
2.2.2. <i>Vicia faba</i> un excelente biomonitor ambiental	15.
2.3. Aberraciones cromosómicas	17.
2.3.1. Descripción	17.
2.3.2. Rompimientos cromosómicos	18.
2.3.3. Rompimientos inducidos	18.
2.3.4. Mecanismos de reparación	19.
2.3.5. Aberraciones cromosómicas en <i>Vicia faba</i>	19.
2.3.6. Análisis y observación de las aberraciones cromosómicas en <i>Vicia faba</i>	19.
2.3.7. Clasificación de las aberraciones cromosómicas en <i>Vicia faba</i>	20.
2.4. Micronúcleos	21.
2.4.1. Descripción	21.
2.4.2. Inducción de micronúcleos	22.
2.4.3. La prueba de micronúcleos	22.
2.4.4. La prueba de micronúcleos y el agua contaminada	23.
2.4.5. Ventajas de la prueba de micronúcleos	23.
2.5. Intercambio de cromátidas hermanas	24.
2.5.1. Descripción	24.
2.5.2. Inducción de ICH	24.
2.5.3. La técnica de ICH	25.
2.5.4. Ventajas y desventajas de ICH	26.

2.5.5. Significado biológico de ICH	26.
2.5.6. El intercambio de cromátidas hermanas en <i>Vicia faba</i>	27.
2.5.7. Ventajas de <i>Vicia faba</i> para detectar el intercambio de cromátidas hermanas	29.
3. ANTECEDENTES	30.
3.1. Situación de la cuenca hidrológica Lerma- Santiago	30.
3.2. La contaminación en el Curso Alto de la Cuenca Alta del Río Lerma	31.
3.2.1. Estudios sobre la contaminación	32.
3.2.2. Estudios sobre los efectos genotóxicos	33.
4. OBJETIVO	34.
5. MATERIALES Y MÉTODOS	35.
5.1. Localización de la zona de estudio	35.
5.1.1. Descripción de la Cuenca Lerma-Santiago	35.
5.1.2. Ubicación y descripción de los dos sitios de muestreo	36.
5.2. Toma de muestras	37.
5.3. Metodología para aberraciones cromosómicas	37.
5.3.1. Técnica para aberraciones en anafase, micronúcleos e índice mitótico	37.
5.3.2. Técnica para metafase	39.
5.4. Metodología para el intercambio de cromátidas hermanas	41.
5.4.1. Técnica de tinción diferencial para ICH	41.
6. RESULTADOS	44.
6.1. Toma de muestras	44.
6.2. Aberraciones cromosómicas	45.
6.2.1. En anafase	45.
6.2.2. En metafase	48.

6.3.	Índice mitótico	52.
6.3.1.	Tratamientos sin recuperación Punto 1 y Punto 2	53.
6.3.2.	Tratamientos con recuperación Punto 1 y Punto 2	53.
6.3.3.	Comparación de los resultados de los tratamientos sin recuperación entre los dos puntos	53.
6.3.4.	Comparación de los resultados de los tratamientos con recuperación entre los dos puntos	54.
6.4.	Micronúcleos	55.
6.4.1.	Tratamientos sin recuperación Punto 1 y Punto 2	55.
6.4.2.	Tratamientos con recuperación Punto 1 y Punto 2	56.
6.4.3.	Comparación de los resultados de los tratamientos sin recuperación entre los dos puntos	57.
6.4.4.	Comparación de los resultados de los tratamientos con recuperación entre los dos puntos	57.
6.5.	Intercambio de cromátidas hermanas	58.
7.	DISCUSIÓN	60.
7.1.	Aberraciones cromosómicas	62.
7.1.1.	En anafase y en metafase	62
7.1.2.	Daños al centrómero y al huso acromático	66.
7.2.	Índice mitótico	69.
7.3.	Micronúcleos	71.
7.4.	Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH)	73.
8.	CONCLUSIONES	78.
9.	REFERENCIAS	80.
10.	ANEXOS	101.
10.1.	Figuras	101.
10.2.	Mapas	112.

1. RESUMEN

El agua es un elemento esencial para la vida, pero la contaminación y la sobreexplotación de los mantos acuíferos, entre otros factores, se han convertido en uno de los problemas más serios a los que se enfrenta nuestro país y el mundo.

La Cuenca Alta del Curso Alto del Río Lerma se ubica en el Valle de Toluca, Estado de México y recibe las descargas de alrededor de 2500 industrias, 29 municipios y los escurrimientos de una vasta zona agrícola (el 65.4% de la superficie total de la Cuenca) y es la más contaminada del País.

El presente trabajo es un acercamiento al problema de la contaminación de las aguas superficiales en dos sitios del río (llamados: Punto1 y Punto2), y está enfocado a evaluar los efectos sobre el material genético mediante el análisis citogenético de los meristemos radiculares de *Vicia faba*.

La diversidad de las descargas forma una mezcla muy compleja lo que hace muy difícil determinar el o los agentes causantes de la genotoxicidad de las aguas, pero las pruebas citogenéticas muestran daños al material genético.

Las pruebas citogenéticas aplicadas en esta investigación fueron: aberraciones cromosómicas en anafase y metafase, la determinación del índice mitótico, la prueba de micronúcleos y la estimación de la frecuencia del intercambio de cromátidas hermanas.

Las aberraciones cromosómicas observadas en anafase fueron cromatídicas en las primeras horas después del tratamiento (2 y 3 horas), siendo estadísticamente significativas ($p < 0.001$) en los dos puntos de estudio. En metafase se observaron aberraciones de tipo cromosómico después de 4 horas de tratamiento con 20 y 44 horas de recuperación, siendo estadísticamente significativas ($p < 0.001$) en los dos puntos de estudio. Los

agentes que las provocaron de acuerdo con los criterios de Kihlman fueron s-independientes. También se observaron daños al centrómero, especialmente, cromosomas con centrómero inactivado, así como retraso en la duración del ciclo celular.

El índice mitótico mostró un efecto estimulante estadísticamente significativo ($p < 0.001$) únicamente después de 3 horas de exposición en el Punto 1 y después 4 horas de exposición con 44 horas de recuperación en los dos puntos de estudio.

En la prueba de micronúcleos se observó que la frecuencia de éstos se incrementó significativamente ($p < 0.001$) después de 3 horas de tratamiento y de 4 horas de tratamiento con 20 y 44 horas de recuperación en el Punto 1 y de 44 horas de recuperación en el Punto 2.

Finalmente, la frecuencia de los intercambios de cromátidas hermanas fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en los dos puntos de estudio.

Los resultados obtenidos evidencian claramente que las aguas superficiales de la Cuenca Alta del Curso Alto del Río Lerma inducen daño genético y pueden ser calificadas como sumamente, clastogénicas y tóxicas.

Después de analizar los resultados se concluyó que estas aguas tienen actividad genotóxica y en todas las pruebas citogenéticas realizadas (en la mayoría de los casos) indujeron de manera altamente significativa daño cromosómico en *Vicia faba*, lo que podría representar un grave problema para la vida humana y la conservación del ecosistema.

2. INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental, en particular la del agua, es uno de los problemas más serios del mundo y toma dimensiones alarmantes en México y en los demás países en proceso de desarrollo por diversas causas, como son: el incremento de la población, el crecimiento de la pobreza, el caótico desarrollo industrial y agropecuario, la falta de una cultura (actitudes y comportamientos humanos) a favor del ambiente, la corrupción y la ausencia de un marco legal adecuado a la realidad. A esta problemática hay que agregarle el hecho de que en las ciudades de estos países no existen redes de drenaje y alcantarillado completas y eficientes, y que las aguas de desecho se vierten en lagos, ríos y canales (Grover y Kaur, 1999).

2.1. La contaminación del agua y sus efectos genotóxicos

Como las aguas de los ríos y lagos son la principal fuente para el consumo humano, la agricultura, la ganadería, las actividades recreativas e industriales, el estudio de los efectos de la contaminación de estas aguas cobra especial importancia, no sólo por su daño a la salud del hombre, sino por el mismo bienestar del Ecosistema (Gopalan, 1999).

Los elevados índices de contaminación registrados en el agua han obligado a evaluar los efectos adversos que los contaminantes tienen sobre el ambiente y los seres vivos, especialmente aquellos que por su toxicidad son muy peligrosos.

Asimismo, la presencia de sustancias tóxicas y la elevada concentración de desechos en los sistemas acuáticos, alteran las propiedades físicas, químicas y biológicas del agua: pH, densidad, demanda bioquímica de oxígeno, presión osmótica, salinidad, eutrofización, etc. Lo que provoca la muerte de especies acuáticas y afecta directa o indirectamente a las especies terrestres que están en contacto con la fuente de contaminación, llegando de esta manera a todos los eslabones de las cadenas tróficas.

El potencial genotóxico de las aguas tiene su origen en la contaminación causada por los desechos industriales y domésticos, los productos para la agricultura y la reacción que potencialmente éstos pueden tener con los compuestos naturales (Knasmuller *et al.*, 1998 a, b; Liu *et al.*, 1999). Lo que ocasiona que la calidad del agua disminuya por la contaminación con mutágenos y carcinógenos, tales como: metales pesados, sustancias orgánicas tóxicas como benceno, benzopireno, pesticidas, por hidrocarburos aromáticos policíclicos y aminas aromáticas (Umbuzeiro *et al.*, 2001). De esta manera, los agentes químicos en el ambiente pueden inducir cambios en los procesos hereditarios.

Se sabe que organismos que habitan en áreas influidas por descargas de aguas contaminadas pueden sufrir efectos somáticos deletéreos (Paranjpe *et al.*, 1994) o daño genético como aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas, y que las personas que beben agua contaminada pueden tener un alto riesgo de presentar efectos genotóxicos similares (Stahl, 1991). Evidencias epidemiológicas sugieren que la arterosclerosis, las enfermedades cardiovasculares, el envejecimiento prematuro, los nacimientos de niños sin cerebro y, especialmente, el cáncer tienen un gran componente ambiental e incluso este último puede ser considerado como una enfermedad ambiental (Grover y Kaur, 1999).

Se han realizando muchos estudios para evaluar la genotoxicidad de la contaminación en ambientes acuáticos, por ejemplo: agua de mar (Kira *et al.*, 1989; De Flora *et al.*, 1991), agua de ríos (Valent *et al.*, 1993; Vargas *et al.*, 1993; Kusamran *et al.*, 1994; Villalobos-Pietrini *et al.*, 1994, Vargas *et al.*, 1995; Filipic *et al.*, 1995; Rehana *et al.*, 1996), agua para consumo humano (Park *et al.*, 2000), y de efluentes industriales (Houk y De Marini, 1988; Houk, 1992).

Moreno (1991), menciona que el ser humano está habitualmente expuesto, aproximadamente, a 66,000 sustancias tóxicas, ya sea de manera natural o por la creciente contaminación del ambiente. Además, la mitad de las enfermedades del mundo dependen del agua para su transmisión (Cuello, 1997).

Por todo lo anterior, hacer evaluaciones sobre el daño citogenético es un importante paso en la gama de los diferentes acercamientos usados en toxicología genética (Brusick *et al.*, 1992), para tener una estimación sobre los efectos de los contaminantes en los seres vivos y en el Ecosistema.

2.2. Las plantas superiores como biomonitores ambientales

Las plantas superiores se han utilizado, desde hace muchos años, en los bioensayos genéticos para detectar aberraciones cromosómicas y mutaciones génicas (Levan, 1992), por ejemplo: el estudio de los efectos mutagénicos de la radiación ionizante desde principios de la década de los treinta (Duan *et al.*, 1999), con *Allium* (Marshak, 1937), *Crepis* (Navashin, 1931) y *Tradescantia* (Riley, 1936). *Vicia faba* fue empleada en ensayos biogenéticos desde 1913 (Read, 1959).

A partir de los años setenta, los bioensayos con plantas empezaron a ser reconocidos como sistemas de prueba sensibles, seguros y autorizados y han sido objeto de múltiples estudios (Stich *et al.*, 1980), por organismos

internacionales, tales como: La Real Academia Sueca de Ciencias, en 1973 y El XVII Comité de la Sociedad de Mutágenos Ambientales, en 1975.

En 1978, el US National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) patrocinó un curso-taller, bajo el título de "Las Plantas Superiores como Sistemas para Monitorear Mutágenos Ambientales", en donde se mostró que las plantas superiores son aptas para poner en evidencia y monitorear actividades mutagénicas (de Serres *et al.*, 1978). Este curso-taller, además, sirvió de base para que, en la década de los ochenta, se estableciera el Programa de Toxicología Genética (Gene-Tox) (Grant, 1999).

En 1979, la US Office of Toxic Substances (OFS) de la US Environmental Protection Agency (EPA) inició el Programa Gene-Tox (Grant, 1999), un programa muy amplio y en el que se revisaron más de 26 sistemas biológicos que incluyeron microorganismos, plantas y animales, para evaluar la situación de los bioensayos en toxicología genética. Las plantas incluidas en el programa Gene-Tox fueron: *Arabidopsis thaliana*, *Allium cepa*, *Hordeum vulgare*, *Zea mays*, *Tradescantia paludosa*, *Glycine max* y *Vicia faba* (sobre ésta última se estudio especialmente lo que se refiere a aberraciones cromosómicas) (Ma, 1982, 1999b; USEPA, 1980), las cuales fueron reconocidas por su alta sensibilidad y eficacia como sistemas de alarma para detectar la presencia de riesgos en el ambiente (Ma 1994, Ma *et al.*, 1997; Grant, 1994; 1999).

En 1984, se iniciaron estudios a nivel internacional sobre el uso de las plantas como biomonitores de genotoxicidad en ambientes contaminados, tanto en laboratorio, como *in situ*, auspiciados por el Programa Internacional de Seguridad Química (IPCS) del Programa Ambiental de Naciones Unidas (UNEP) y la Organización Mundial de la Salud (WHO) (Ma, 1999a). Estos estudios han continuado bajo el nombre de Programa Internacional sobre las Plantas como Bioensayos (IPPB), los cuales, también, forman parte del UNEP

(Ma, 1999a). Es importante destacar que *Vicia faba* fue seleccionada en estos estudios, como parte de los bioensayos para aberraciones cromosómicas (Ma, 1999a).

En 1994, seis laboratorios evaluaron las cuatro plantas más usadas en la detección de efectos mutagénicos en ambientes contaminados, entre las que se encontró *Vicia faba* (Kanaya *et al.*, 1994) y concluyeron que estas plantas son altamente rentables y eficientes como sistemas de prueba para evaluar agentes químicos, clastógenos y mutágenos de manera rápida (Sandhu 1994a, b).

En 1995, el UNEP organizó un curso-taller en Qingdao, China, con la colaboración de la Universidad del Oeste de Illinois, Estados Unidos y la Universidad del Océano Qingdao, China, en el cual participaron 20 laboratorios de 14 países con estudios sobre genotoxicidad en agua, aire y suelos contaminados (Ma, 1999a). Una de las conclusiones de este curso-taller fue que el uso de plantas para la detección de mutágenos ambientales en el aire (Arutyunyan *et al.*, 1999), el agua (Steinkellner *et al.*, 1999) y el suelo (Wang *et al.*, 1999) es un método sencillo, eficiente y rápido.

2.2.1. Ventajas de las plantas superiores como biomonitores ambientales

Las plantas son organismos esenciales en los ecosistemas y son más sensibles al “*stress*” ambiental (Ma, 1994; Ma *et al.*, 1997; de Serres, 1992, 1994; Grant, 1994) que otros sistemas de bioensayos actualmente disponibles. Más de 2,000 experimentos muestran que los experimentos con éstas son, en general, más sensibles para detectar los efectos genotóxicos en ambientes contaminados (USEPA, 1980). Tienen la ventaja, en comparación con otras pruebas citogenéticas, como las que se realizan con células animales y bacterias, que no se restringen al laboratorio, sino que son usadas en el campo (de Serres, 1992), son baratas y de fácil manejo. Además, estos sistemas pueden ser expuestos

directamente a muestras de agua, sin ningún proceso de filtración o de variación de la concentración (Steinkellner *et al.*, 1999).

Las plantas tienen gran diversidad de aplicaciones en el estudio del medio y se utilizan para monitorear mutágenos ambientales de tipo físico y químico, tales como: radiaciones ionizantes (Villalobos-Pietrini *et al.*, 1999; Wang, 1999); disolventes y plaguicidas (Valencia-Quintana *et al.*, 1993; De Marco *et al.*, 1999); desechos municipales (Cabrera *et al.*, 1999); activación metabólica de productos químicos (Calderón-Segura *et al.*, 1999); efectos genotóxicos de metales pesados (Villalobos-Pietrini *et al.*, 1993; Minissi y Lombi, 1997; Knasmüller *et al.*, 1998 a, b; Steinkellner, *et al.*, 1998; Gómez-Arroyo *et al.*, 2001); materiales de desecho mutagénicos provenientes de industrias que los descargan en ríos y arroyos (Villalobos-Pietrini *et al.*, 1994; Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1995); etc.

2.2.2. *Vicia faba* un excelente biomonitor ambiental

Una de las especies vegetales más usadas en mutagénesis es *Vicia faba*. En efecto, el 36.4 % de los estudios hechos con plantas se han realizado con esta especie (Grant, 1982), por las siguientes razones:

- a. Presenta un número pequeño de grandes cromosomas ($2n=12$) que designados de acuerdo con la posición del centrómero son metacéntricos y submetacéntricos.
- b. El único par de cromosomas metacéntricos de *Vicia faba* tiene grandes satélites en los brazos cortos y es dos veces mayor en tamaño que los cromosomas submetacéntricos. Los cinco pares cromosómicos restantes son submetacéntricos y de tamaño similar, cariotipos por reareglos estructurales muestran pocas diferencias en su tamaño (Grant, 1982) (Figura 1).

- c. El ciclo celular de esta planta es corto, tiene una duración de 19.3 horas a 19 °C de temperatura. La fase de G₁ (presíntesis) tarda 4.9 horas, la S (síntesis) 7.5 horas, la G₂ (postsíntesis) 4.9 horas y la M (mitosis) 2 horas (Evans y Scott, 1964) (Figura 2).
- d. Los meristemos radiculares contienen un alto índice de células en división (mitosis).
- e. La respuesta de las raíces de *Vicia faba*, como bioensayo para determinar la genotoxicidad de mutágenos ambientales, ha presentado una buena correlación con los llevados a cabo con bacterias y mamíferos (Juárez *et al.*, 1994).
- f. *Vicia faba* ha sido muy útil para evaluar los efectos citogenéticos de productos químicos como plaguicidas (Valencia-Quintana *et al.*, 1993; Cortés-Eslava *et al.*, 1994; Xing, 1997; Calderón-Segura *et al.*, 1999; De Marco *et al.*, 1999), metales pesados (Gómez-Arroyo *et al.*, 2001), detergentes y metales pesados (Villalobos-Pietrini *et al.*, 1993), disolventes industriales (Gómez-Arroyo *et al.*, 1986), y sedimentos y aguas contaminadas (Villalobos-Pietrini *et al.*, 1994; Gómez-Arroyo *et al.*, 1997; Minissi y Lombi, 1997).

Estas cualidades hacen de *Vicia faba* un excelente biomonitor citogenético en ambientes contaminados (Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1995), mediante el cual se obtienen buenos resultados, especialmente en lo que se refiere a aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas (Kihlman y Andersson, 1984).

Por todo esto se decidió utilizar *Vicia faba* para este estudio.

2.3. Aberraciones cromosómicas

2.3.1. Descripción

Las aberraciones cromosómicas son el resultado de lesiones al ADN que se manifiestan como alteraciones en la estructura de los cromosomas o en su número (Alberts *et al.*, 1994).

Las aberraciones estructurales pueden ser clasificadas como intracromosómicas e intercromosómicas (Figura 3). La primera clase comprende aberraciones en un solo cromosoma (deleciones intersticiales y terminales o inversiones cromosómicas) y la segunda comprende rearrreglos entre dos o más cromosomas (translocaciones y cromosomas dicéntricos) (Therman y Susman, 1992).

2.3.2. Rompimientos cromosómicos

Las aberraciones cromosómicas generalmente implican un rompimiento espontáneo o inducido (Gryffths, 1995) y a menudo una reunión (Therman y Susman, 1992).

Los rompimientos (Figura 3) pueden ocurrir en cualquier fase del ciclo celular G_1 , S , G_2 o mitosis (M), o bien en la meiosis. Varios tipos celulares y fases del ciclo celular muestran respuestas muy diferentes a los agentes que inducen rompimientos cromosómicos en el mismo organismo (Evans, 1974), por esta razón la medida del tiempo en estos eventos es decisiva, para hacer un correcto análisis e interpretación de las aberraciones.

2.3.3. Rompimientos inducidos

Los rompimientos inducidos se producen cuando los organismos están expuestos a agentes mutagénicos físicos y químicos. Entre los primeros, están los rayos X, los rayos gama, la luz UV y la luz visible cuando está seguida de la absorción de ciertos colorantes intercalantes (Bender *et al.*, 1973; Kihlman, 1966, 1971). Entre los agentes químicos se encuentran: agentes alquilantes, metales pesados, conservadores, antibióticos, derivados de purinas y pirimidinas, aminas aromáticas, compuestos nitrogenados y un gran número de mezclas (Kihlman, 1966; Rieger y Michaelis, 1967; Auerbach, 1976; Ma, 1982).

Recientemente se ha visto que las endonucleasas, también, pueden inducir aberraciones en cualquier fase del ciclo celular (Bryant, 1990), por ejemplo, la topoisomerasa II provoca aberraciones actuando de manera similar a la radiación ionizante (Palatti, 1993).

En su actividad genética, los agentes químicos pueden clasificarse en: directos o indirectos, de acuerdo a la manera como lesionan el ADN. Los primeros ejercen sus efectos sin modificación alguna en su estructura química y los segundos necesitan ser metabolizados para producirlos (Therman y Susman, 1992).

En 1977, Kato agrupó a los agentes químicos, de acuerdo con su capacidad para inducir aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas, en tres categorías:

- a. Agentes cuyos efectos no dependen de la fase de síntesis del ADN, tales como: la bleomicina. Éstos no aumentan significativamente la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas, pero sí la de aberraciones cromosómicas.

- b. Agentes cuyo efecto depende de la síntesis del ADN, por ejemplo: la mitomicina C y la gran mayoría de agentes alquilantes.
- c. Agentes inhibidores de los procesos metabólicos, como la hidroxiurea, que tiene un efecto indirecto sobre la estructura del ADN.

2.3.4. Mecanismos de reparación

Las células han desarrollado una serie de sistemas enzimáticos que reparan o toleran los daños en el ADN antes, durante y después de la replicación del material genético, para conservar la integridad de la información y permitir la sobrevivencia. La replicación del ADN se lleva a cabo en la fase S del ciclo celular con la intervención de varias enzimas. Si la magnitud de la(s) lesión(es) es muy severa al grado que los sistemas de reparación son insuficientes, la célula ya no se recupera y muere (Pfeiffer *et al.*, 2000).

2.3.5. Aberraciones cromosómicas en *Vicia faba*

Vicia faba es una de las especies vegetales más usadas para detectar aberraciones cromosómicas inducidas en ambientes contaminados. Las aberraciones son generalmente analizadas, mediante las técnicas citogenéticas, en células en metafase y/o anafase.

2.3.6. Análisis y observación de las aberraciones cromosómicas en *Vicia faba*

Las aberraciones en anafase pueden ser más fácilmente analizadas que las de metafase, pero éstas últimas ofrecen una información más precisa y detallada (Kihlman, 1971; Kihlman y Kronborg, 1975).

En las primeras, se puede estimar más rápidamente el daño cromosómico y se observan los efectos a nivel del centrómero y anafases multipolares, lo cual no sucede con las otras (Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1983).

Las aberraciones cromosómicas, que se observan en células en anafase, son las siguientes: puentes subcromatídicos simples y dobles, puentes cromosómicos simples y dobles, fragmentos, isocromosomas y cromosomas con el centrómero inactivado (Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1983, 1995), y las que se observan en metafase son: fragmentos terminales e intersticiales, intercambios complejos, rompimientos isocromatídicos con uniones hermanas, intercambios cromatídicos, y anillos cromosómicos céntricos, dicéntricos o acéntricos (Gómez-Arroyo y Villalobos Pietrini, 1995).

2.3.7. Clasificación de las aberraciones cromosómicas en *Vicia faba*

Para analizar las aberraciones cromosómicas es necesario establecer las etapas del ciclo celular que son más sensibles a los efectos de los agentes químicos y físicos para producir el rompimiento cromosómico.

En el caso de *Vicia faba*, las aberraciones cromosómicas son de dos tipos, considerando el momento en que aparecen: *de efecto no retardado* y *de efecto retardado* de acuerdo con lo propuesto por Kihlman en 1966 (Kihlman, 1966) (Figura 4).

Las *de efecto no retardo* (s-independientes) se presentan 3 horas después de iniciado el tratamiento, su frecuencia máxima está entre las 4 y 10 horas, y su expresión es independiente de la síntesis de ADN. Cabe aclarar que, si estas aberraciones se producen en profase, son subcromatídicas y la unidad de rompimiento es la media cromátida; si se provocan en S y en G₂, son

cromatídicas, y el origen del rompimiento es la cromátida y, si se induce en G_1 , es cromosómica, entonces la unidad de rompimiento es el cromosoma.

Los agentes (s-independientes) que causan este tipo de aberraciones son los rayos X, los antibióticos (bleomicina, pleomicina estreptomicina); oxipurinas metiladas, etc. (Kihlman *et al.*, 1978).

Las *de efecto retardado* (s-dependientes) se manifiestan 8 horas después del tratamiento y su frecuencia mayor se encuentra entre las 24 y las 48 horas. Este tipo de aberraciones puede aparecer en cualquier fase del ciclo celular, su manifestación requiere de la síntesis de ADN y siempre son de tipo cromatídico. Los agentes (s-dependientes) que las provocan son los alquilantes, la radiación ultravioleta y la mitomicina C, entre otros (Kihlman *et al.*, 1978).

2.4. Micronúcleos

2.4.1. Descripción

Los micronúcleos son pequeños núcleos independientes del núcleo celular, formados por una membrana nueva y una porción de cromatina procedente de anomalías en la disyunción de los cromosomas. Estas anomalías son causadas por alteraciones en las fibras del huso acromático o por rompimientos cromosómicos espontáneos o inducidos (Ji *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2000), y originan fragmentos acéntricos, cromosomas dicéntricos y puentes cromatídicos que no migran a los polos durante la anafase y aparecen en el siguiente ciclo de división celular (Grover y Kaur, 1999).

2.4.2. Inducción de micronúcleos

Los micronúcleos pueden ser inducidos por sustancias que atacan directamente al huso acromático como la colchicina, la colcemida y la bleomicina (Frackowiak *et al.*, 1986; Degrassi y Tanzarella, 1988; Thompson y Perry, 1988) o por elementos clastogénicos presentes en ambientes contaminados (Lin, 1987, Zeng y Pi, 1988). Asimismo, Schriever-Schwemmer y Adler (1993) han mostrado que las proteínas del cinetocoro son afectadas por agentes químicos tales como la mitomicina C (Schriever-Schwemmer y Adler 1994). Estos cromosomas con las proteínas del cinetocoro químicamente modificadas no interactúan con las fibras del huso, dando lugar a cromosomas con el centrómero inactivado (Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1995), estos cromosomas alterados también forman un micronúcleo en la siguiente interfase (Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1983).

2.4.3. La prueba de micronúcleos

La prueba de micronúcleos fue desarrollada sobre la base de que los rompimientos de las bandas del ADN ó de las fibras del huso permiten que un cromosoma o cromosomas completos formen un pequeño núcleo después de un ciclo de división celular (Ji *et al.*, 1999). Esta prueba es la más sensible para indicar daño al ADN (Heddle *et al.*, 1991; Evans, 1997) y es un método relativamente sencillo y rápido, para detectar y cuantificar daño cromosómico inducido (Matter y Schmid, 1971). Además, tiene un intervalo amplio de aplicaciones en ambientes contaminados por mutágenos (Grant *et al.*, 1992), por ejemplo: en la contaminación de agua de mar, humo de tabaco y cosméticos (Ji *et al.*, 1999); en peces (Al-Sabti y Metcalfe, 1995) y en otros organismos acuáticos (Jaylet *et al.*, 1989; Fernández *et al.*, 1993); en el cultivo de linfocitos humanos para monitorear poblaciones humanas expuestas por trabajo y por riesgos

ambientales (Torres de Lemus y Erdtmann, 2000); o en personas expuestas a la radiación ionizante (Krepnisky y Heddle, 1983).

2.4.4. La prueba de micronúcleos y el agua contaminada

La prueba de micronúcleos aplicada a las raíces de *Vicia faba* se ha usado para la detección de clastogenicidad desde 1982 (Degrassi y Macro, 1982). El protocolo mejorado para el ensayo de micronúcleos en las raíces de *Vicia faba* tiene un estándar internacional establecido por el Programa Internacional sobre Bioensayos en Plantas bajo el cobijo del Programa Ambiental de Naciones Unidas (Ma *et al.*, 1995).

Esta prueba ha sido utilizada para evaluar el agua de los ríos en varios países como México (Villalobos-Pietrini *et al.*, 1994), China (Miao *et al.*, 1999), India (Grove y Kaur, 1999), Italia y Alemania (Monarca *et al.*, 2001), y se han obtenido resultados satisfactorios en todos los casos.

2.4.5. Ventajas de la prueba de micronúcleos

La prueba de micronúcleos en *Vicia faba* tiene varias ventajas: es simple, rápida, muy eficiente para determinar la clastogenicidad de muestras de agua contaminada y económica (Grant *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1995; Ji *et al.*, 1999). Esto se debe a la sencillez del proceso, al hecho de que los micronúcleos sean fácilmente cuantificados, al número importante de células que pueden ser analizadas en un lapso de tiempo muy corto y a los bajos costos de los materiales utilizados.

2.5. Intercambio de cromátidas hermanas

2.5.1. Descripción

El intercambio de cromátidas hermanas (ICH) fue descrito al final de la década de los cincuenta con el mismo tipo de experimento con que fue demostrada la replicación semiconservadora de los cromosomas (Therman y Susman, 1992).

Los ICH son eventos que involucran ruptura, intercambio y reparación de las moléculas de ADN. Estos intercambios se dan entre las moléculas de ADN en los *loci* homólogos, en cromosomas que se están replicando y se observan como segmentos que pasan de una cromátida a su cromátida hermana. Es importante señalar que se requieren dos lesiones para que se produzca un intercambio (Kihlman *et al.*, 1978) (Figura 5).

Desde el punto de vista molecular se trata de un fenómeno que implica transposiciones simétricas de ADN de doble cadena, equivalentes entre las dos cromátidas de un mismo cromosoma. Algunos estudios han evidenciado que el proceso de ICH requiere que la célula pase por la etapa de síntesis (S) del ADN (Wolff, 1974, 1977) y se ha sugerido que es durante o inmediatamente después de que se ha formado la horquilla de replicación, cuando se lleva a cabo el intercambio de doble cadena de ADN (Kato, 1980).

2.5.2. Inducción de ICH

Los ICH pueden generarse espontáneamente o pueden ser inducidos por un gran número de agentes causantes de rompimientos cromosómicos (Latt, 1981; Schubert y Rieger, 1981; Sandberg, 1982), especialmente por mutágenos y carcinógenos (Latt, 1974; Perry y Evans, 1975). La mayor incidencia de ICH se

ha obtenido con agentes alquilantes bifuncionales y de éstos, los más efectivos han sido el metilmetanosulfonato, la mitomicina C, el dimetilsulfonato, el etilmetanosulfonato y el gas mostaza (Latt, 1981).

Los agentes que inducen ICH pueden causar daños al ADN (Perry y Evans, 1975; Nakanishi y Schneider, 1979), inhibición al proceso de síntesis del ADN (Ishii y Bender, 1980; Rainaldi y Mariani, 1982), supresión de las enzimas involucradas en dicho proceso (Ishii y Bender, 1980) o la inhibición de enzimas involucradas en la respiración (Oikawa *et al.*, 1980; Morgan y Cleaver, 1982).

Los intercambios de cromátidas hermanas son un fenómeno común entre los seres vivos y se han observado en mamíferos (incluyendo a los humanos), pájaros, peces, insectos y plantas (Schubert y Rieger 1981) y su incremento en cantidad es ciertamente indicador de la presencia de agentes con potencial mutágeno o carcinógeno (Therman y Susman, 1992).

2.5.3. La técnica de ICH

La técnica para analizar los intercambios está basada en la observación de los cromosomas en los que se ha reemplazado a la timina por la bromodesoxiuridina (BrdU) y son teñidos diferencialmente (Zakharov y Egolina, 1972).

La tinción diferencial se basa en la incorporación de un análogo de la timina, como la 5-bromodesoxiuridina (BrdU), a través de uno o dos ciclos de duplicación del ADN. Por este proceso las células, que sólo han pasado por un ciclo de duplicación del ADN, muestran en metafase, todos sus cromosomas oscuros, ya que ambas cromátidas se encuentran monosustituidas (TB). Por el contrario, los cromosomas de las que han pasado dos ciclos presentan una cromátida monosustituida (TB) y una doblemente sustituida (BB). Hay que

anotar que, cuando sólo existe un ciclo de replicación, en presencia de BrdU y el segundo en timidina, la diferenciación se obtiene de la siguiente manera: una cromátida es monosustituida (TB) por el análogo y la otra cromátida no es sustituida (TT) (Kihlman y Kronborg 1975, Kihlman y Andersson 1982).

2.5.4. Ventajas y desventajas de ICH

El intercambio de cromátidas hermanas es un indicador más sensible de la actividad mutagénica que los rompimientos cromosómicos (Schubert y Rieger 1981) y, gracias al desarrollo de nuevas técnicas, se ha convertido en un importante y rápido ensayo para evaluar el daño cromosómico (Perry y Evans, 1975, Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1995). Además, tiene la ventaja que son más frecuentes y más fáciles de analizar que los rompimientos cromosómicos (Therman y Susman, 1992).

A pesar de las ventajas descritas, hay que tener presente varias consideraciones: en algunos organismos el rango de ICH espontáneo es estimado (Therman y Susman, 1992), la frecuencia de ICH está relacionada con el contenido de ADN (Kihlman y Andersson, 1982) y la BrdU no sólo hace visibles los ICH, sino que los induce.

2.5.5. Significado biológico de ICH

El significado biológico de los ICH no está claro y muchas de las cuestiones básicas están sin resolver (Therman y Susman, 1992) pero se han hecho varias investigaciones para tratar de explicar la función celular y el proceso molecular que los origina y se han propuesto varios modelos para explicarlos: modelo de la recombinación meiótica, modelo de Holliday (Kato, 1977), modelo del *bypass* (Shafer, 1977), modelo de desviación duplicadora (Ishii y Bender, 1980) y modelo de Painter (Painter, 1980). El último es el más

aceptado y considera que el ICH se presenta con mayor frecuencia en los sitios de unión entre grupos de replicones. De acuerdo con este modelo, cuando el ADN es afectado por algún agente químico o físico que produce elongación en la cadena de polinucleótidos, dicho daño provoca retraso en la duplicación de ciertos agrupamientos de replicones. Este hecho conduce a la existencia de regiones del ADN no replicadas adyacentes a regiones replicadas, en donde se originan rompimientos de banda doble, posiblemente, por la acción de topoisomerasas que inducen ruptura y reunión de la cadena doble. En ocasiones la ruptura es sellada por la unión de la banda hija de la molécula replicada con la molécula no replicada dando lugar al intercambio de banda doble (Figura 6).

2.5.6. El intercambio de cromátidas hermanas en *Vicia faba*

Taylor fue el primero en observar el ICH en cromosomas de *Vicia faba* a través de la incorporación de timidina tritiada, para marcar el ADN, por medio de la autorradiografía (Taylor, 1958). Pero, el bajo poder de resolución logrado con esta técnica hizo difícil estimar con exactitud la frecuencia de ICH.

El procedimiento para analizar el ICH para cromosomas vegetales, usando el colorante Feulgen, fue descrito por Tempelaar *et al.* (1982). En este procedimiento se involucran varias modificaciones a la técnica Fluorescente más Giemsa (FPG, usada para cromosomas humanos). En contraste con la técnica FPG, Tempelaar *et al.* (1982) encontraron que no es necesario el uso del fluorocromo Hoechst 33258 y, además, sustituyeron el colorante Giemsa por el reactivo de Feulgen, el cual es específico para ADN. Gracias a este procedimiento se hizo innecesario utilizar enzimas para remover el ARN del citoplasma.

Es importante señalar que con la tinción Feulgen, se obtiene la diferenciación de cromátidas hermanas inversa a la diferenciación que se presenta cuando se usa la técnica de FPG, ya que las cromátidas más sustituidas con BrdU (BB), tiñen más intensamente que las menos sustituidas (TB) (Figura 7) (Tempelaar *et al.*, 1982) (Figura 8). El contraste de la tinción diferencial en las cromátidas hermanas se observa después de la incorporación de la BrdU y para obtener una buena tinción es muy importante la hidrólisis del ADN con HCl.

La reacción de Feulgen-Schiff está basada en la conversión ácido-catalizada del ADN por el ácido polialdehídoapúrico, seguida por la tinción de este aldehído con el reactivo de Schiff y se encontró que la intensidad de la tinción está influida por diversos factores, como el tipo de fijación, el procedimiento de la hidrólisis, la composición del reactivo de Schiff y la menor compactación de la cromatina (Duijndam y Van Duijn, 1975).

Gordon *et al.* (1976) describen que el ADN sustituido con BrdU tiene una afinidad más fuerte por las proteínas, que el ADN que contiene timina. Por esta razón, existe una diferencia en la despolimerización del ADN cuando las cromátidas hermanas difieren en el contenido de timina y BrdU. Los cromosomas de las raíces, tratados con BdrU, resisten la despolimerización y consiguen un contraste diferencial entre las partes de una cromátida hermana conteniendo ADN bifilarmente sustituido (oscuro) y unifilarmente sustituido (claro) (Tempelaar *et al.*, 1982).

La técnica de Fuelgen para la tinción diferencial de los cromosomas de las plantas es corta y menos complicada que la técnica de FPG, además, la diferenciación de las cromátidas hermanas es buena y los resultados son fácilmente reproducibles (Gómez-Arroyo *et al.*, 1988 a, b; Gesters y Grant, 1989).

2.5.7. Ventajas de *Vicia faba* para detectar el intercambio de cromátidas hermanas

Vicia faba es un sistema altamente sensible y barato para la detección de ICH inducidos por agentes químicos, por esta razón, se han realizado varios estudios para evaluar los efectos citogenéticos de productos químicos por medio del análisis de ICH usando *Vicia faba*, por ejemplo: disolventes industriales (Gómez-Arroyo *et al.*, 1986); plaguicidas carbámicos (Valencia-Quintana *et al.*, 1993); insecticidas organofosforados (Cortés-Eslava, 1993; Cortés-Eslava *et al.*, 1994); metales pesados y sedimentos (Minissi y Lombi, 1997); activación metabólica de herbicidas por *Vicia faba* en linfocitos humanos (Calderón-Segura *et al.*, 1999); agua contaminada con arsénico (Gómez-Arroyo *et al.*, 1997); efectos de dNTPs sobre la frecuencia de ICH (Xing, 1997), metales pesados (Gómez-Arroyo *et al.*, 2001).

Por lo dicho anteriormente se optó por usar también la prueba de intercambio de cromátidas hermanas en este estudio.

3. ANTECEDENTES

Los ríos han sido, a lo largo de la historia, depósitos de diferentes tipos de descargas provenientes de las múltiples actividades humanas, las cuales incrementan la contaminación xenobiótica y forman complejas y desconocidas mezclas que tienen efectos tóxicos en los ecosistemas acuáticos y su entorno (Torres de Lemus y Erdtman, 2000). Esta contaminación y sus consecuencias han provocado que, en todo el mundo, se estudien los efectos genotóxicos y se evalúen daños al material genético de los organismos que están expuestos a sus aguas, por ejemplo: Japón (Kusamram *et al.*, 1994; Sakamoto *et al.*, 1996; Ohe, 1997); Chile (Pérez-Azola y Santos, 1997); Brasil (Torres de Lemus y Erdman, 2000); Italia (Vargas *et al.*, 1993; Galassi *et al.*, 1992); España (Grifoll *et al.*, 1992); México (Villalobos-Pietrini *et al.*, 1994).

3.1. Situación de la cuenca hidrológica Lerma- Santiago

Uno de los sistemas hidrológicos más importantes de nuestro país es el Lerma-Santiago (Gobierno del Estado de México, 1993), cuya cuenca tiene un área de 137,144 km². En esta cuenca, se concentra una de las poblaciones urbanas y agrícolas más grandes de México, caracterizada por el incremento de la actividad económica y cuyo crecimiento demográfico ha provocado la explotación irracional de los recursos del sistema, con las siguientes consecuencias: el deterioro de la calidad del agua, la alteración de las condiciones naturales de los cauces, el aumento de la erosión en la zona; la contaminación con descargas industriales y municipales, y los escurrimientos agrícolas (Hansen *et al.*, 2001). Este sistema hidrológico se encuentra en un estado de franca eutrofización y con un nivel de alta contaminación, como lo ha

reconocido el mismo Gobierno Federal, en 1988, a través de la Comisión Nacional de Ecología, la cual considera esta cuenca como la más contaminada del país (Lugo de la Fuente *et al.*, 2000).

3.2. La contaminación en el Curso Alto de la Cuenca Alta del Río Lerma

De acuerdo con la Red Nacional de Monitoreo, el Curso Alto de la Cuenca Alta del sistema (tramo comprendido entre la Carretera México-Toluca y la Presa José Antonio Alzate) es la más contaminada de la cuenca (Barceló *et al.*, 1995) y ha sido seleccionada para el presente estudio.

En esta zona se encuentran establecidas aproximadamente 2,524 industrias, con giros tales como: papeleros y sus derivados, alimentario, tabacalero, textil, maderero, químico, cementero, automotriz, hulero y de plásticos, de polímeros, de tenerías, de minerales no metálicos, del acero, de maquinaria y equipo, entre otras, (Secretaría de Recursos Hidráulicos, 1990; Barceló *et al.*, 1995), y 29 municipios los cuales vierten sus aguas residuales y sus descargas urbanas al río (Ávila-Pérez *et al.*, 2000a). A esto hay que sumar los escurrimientos de las aguas utilizadas en la agricultura (el 65.4 % de la superficie total de la Cuenca son tierras de labor (SEDAGRO, 1995). Para tener una idea de las dimensiones del problema hay que señalar que se estima que durante un año se vierten al curso del río 536×10^6 m³ de aguas de desecho, cargadas con 350,946 toneladas de lodos orgánicos. El 33 % de estas aguas proviene de descargas urbanas y el 67 % restante de las industriales (Ávila-Pérez *et al.*, 2000a).

Varios aspectos de la contaminación de la Cuenca Alta del Curso Alto del río han sido estudiados por investigadores de diversas instituciones UAEMéx, UAM-Azcapozalco, ININ, UNAM y La Universidad de Montpellier, Francia,

los resultados obtenidos muestran la gravedad del problema. Es importante hacer notar que la mayoría de los estudios realizados en esta parte del Río Lerma se refieren a la contaminación provocada por los metales pesados presentes en el agua y sedimentos, especialmente en la Presa José Antonio Alzate y son muy pocos los estudios sobre los efectos de la contaminación sobre el material genético.

3.2.1. Estudios sobre la contaminación

- a. En leche y pelo de bovinos provenientes de ganado pastoreado en la Laguna del Valle del Lerma se observaron valores altos de plomo con promedio de 11.40 y 0.27 ppm respectivamente (Montes de Oca, 1993 a, b).
- b. En los suelos cercanos a la orilla de esta presa, se encontraron altas concentraciones de cromo, plomo y cobre (Benavides *et al.*, 1995) y en un cultivo a nivel de invernadero de *Vicia faba*, en el cual se usaron suelos de las orillas cercanas a la presa, hubo diferencias significativas en altura, número de folios y área basal. Además, algunas hojas presentaron zonas necrosadas durante su desarrollo, sin determinar que metal provocó esta situación (Benavides *et al.*, 1995).
- c. La concentraciones de hierro, mercurio y plomo en el agua de la Presa José Antonio Alzate, sobrepasan los límites máximos permitidos (Ávila *et al.*, 1995). En la raíz del lirio acuático se detectaron concentraciones tan altas de estos metales, que la Secretaría de Ecología del Estado de México recomendó no usarlo porque lo consideró como residuo peligroso (Ávila *et al.*, 1995).

- d. Se han realizado otros estudios que indican el alto grado de contaminación de la Presa José Antonio Alzate en sedimentos (Ávila-Pérez *et al.*, 2000b), lodos residuales; efectos en el zooplancton (Rodríguez *et al.*, 2000), y la acumulación de cobre, zinc, cromo y mercurio en *Daphnia pulex* (Zarzaúa *et al.*, 2000).

3.2.2. Estudios sobre los efectos genotóxicos

La mutagenicidad del agua y de los sedimentos de la Presa José Antonio Alzate fueron evaluadas mediante la prueba de Ames con *Salmonella typhimurium* cepas TA 98 y TA 100 con y sin activación metabólica con la fracción S9. Los resultados muestran que, existe un efecto genotóxico directo por sustitución de los pares de bases, inducidos por las fracciones polar y no polar de las muestras de agua en dos sitios; la fracción intermedia de las muestras de sedimentos, muestra una acción indirecta de los mutágenos que inducen genotoxicidad por corrimiento del marco de lectura (Valencia-Centeno *et al.*, 2000).

4. OBJETIVO

Evaluar los efectos de la genotoxicidad de las aguas superficiales de la Cuenca Alta del Curso Alto del Río Lerma, mediante el análisis de micronúcleos, aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas en células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Localización de la zona de estudio

5.1.1. Descripción de la Cuenca Lerma-Santiago

El sistema hidrológico Lerma-Santiago nace al Este de la Ciudad de Toluca, Estado de México, se dirige hacia el Oeste para verter sus aguas en el Lago de Chapala, atraviesa el bajío guanajuatense y termina en el Estado de Nayarit. El sistema cruza cinco estados de la República Mexicana y tiene un área de 137,144 km².

La Cuenca Lerma-Chapala ha sido subdividida en tres: Alta, Media y Baja. La alta se subdivide, a su vez, en tres cursos: Alto, Medio y Bajo. El Curso Alto tiene una superficie de 2,097 km² (dividida políticamente en 32 municipios) (Mapa 1). Se localiza entre los 99 ° 20' y 100 ° 5' longitud Oeste y 19° 05' y 20° 17' latitud Norte, dando origen a la mayor parte del Valle de Toluca y comprende la vertiente norte de la Sierra Nahuatlaca-Matlazinca y la vertiente nororiental del Nevado de Toluca (Mapas 1 y 2)

El punto más elevado del Curso Alto se encuentra a 2,580 msnm y el más bajo a 2,570 msnm (Morquecho, 1997).

Sobre la base de estudios previos hechos en esta zona del río (ver antecedentes) se ha determinado hacer un muestreo de dos sitios que, por sus características y ubicación, se han considerado como representativos de la situación que prevalece en Curso Alto de la Cuenca Alta.

5.1.2. Ubicación y descripción de los dos sitios de muestreo

Los dos sitios elegidos, para la toma de muestras, están en el cauce del río y tienen las siguientes características (Figuras 9 y 10):

El Punto 1 se ubica debajo del puente de la Autopista México-Toluca, recibe los desechos domésticos de una parte del Valle de Toluca y las descargas de la industria del zapato del pueblo de San Mateo Atenco, y capta los escurrimientos de la zona agrícola aledaña. Es importante señalar, que algunos metros antes de este punto, está la Planta Tratadora de Aguas Toluca Oriente (Mapa 2).

El Punto 2 se encuentra debajo del puente de la Carretera Toluca-Naucalpan, recibe el conjunto de las descargas anteriores y las descargas domésticas de varios poblados, capta los escurrimientos de una vasta zona agrícola, y acoge los desechos industriales del corredor Lerma, el Cerrillo I y el Cerrillo II (Mapa 2).

5.2. Toma de muestras

Las muestras de agua se colectaron en frascos limpios y previamente etiquetados. Se midieron el pH y la temperatura del agua en el momento de colectarla y se anotaron algunas características físicas del agua como olor y color, inmediatamente después se colocaron en hielo para ser transportadas al laboratorio, donde se mantuvieron a 4 °C hasta el momento de usarlas.

5.3. Metodología para aberraciones cromosómicas

El procedimiento se realizó conforme a la metodología establecida por Villalobos-Pietrini, 1994 y de todos los experimentos se hizo una réplica.

Se utilizaron semillas de haba (*Vicia faba*, variedad *minor*) sin tratamientos con fungicidas o herbicidas en el campo y mediante análisis preliminares se comprobó que no presentaban alteraciones cromosómicas elevadas de origen.

Las semillas se lavaron en agua corriente durante 2 horas y se embebieron en agua por 24 horas a 21 °C. Antes de ponerlas a germinar se lavaron durante 10 minutos, se colocaron entre dos capas de algodón humedecido a 21 °C hasta que aparecieron las radículas, y, entonces se les quitó la testa para evitar que se contaminaran con hongos. Todo este proceso se realizó en la oscuridad

5.3.1. Técnica para aberraciones en anafase, micronúcleos e índice mitótico

a. Tratamiento

Cuando las raíces alcanzaron longitudes de 4 a 5 cm., se separaron en lotes de 10 plántulas por experimento y se expusieron a las muestras de agua durante 1, 2 y 3 horas de tratamiento sin recuperación y sin colchicina. Inmediatamente después, se enjuagaron con agua corriente. El testigo se puso en agua destilada.

b. Fijación

Una vez tratadas las raíces, se les cortaron 2 mm. de la punta; se colocaron en frascos limpios etiquetados y forrados con papel aluminio; se fijaron en una solución de etanol-ácido-acético (3:1) y se congelaron.

c. Tinción

Los meristemas se sacaron del congelador y cuando alcanzaron la temperatura ambiente, se colocaron en etanol al 70 % durante 15 minutos. Posteriormente, se hidrolizaron con HCl 5N a una temperatura de 28 °C de 20 a 25 minutos con agitación constante y se lavaron 3 veces con agua destilada.

Una vez lavados y secados, se tiñeron con el reactivo de Schiff en portaobjetos excavados durante 15 minutos y en la oscuridad. Enseguida, se transfirieron a portaobjetos planos (previamente etiquetados), se les colocó un cubreobjetos y se realizó el aplastamiento en monocapa (*squash*) de los meristemas con ácido acético al 45 %.

d. Preparaciones permanentes

Las preparaciones se realizaron por el método de hielo seco descrito por Conger y Fairchild (1953). Los portaobjetos con los meristemas se colocaron en hielo seco hasta que se les formó escarcha. Posteriormente, se les retiró el portaobjetos, se deshidrataron 2 veces en butanol absoluto, se dejaron secar y se sellaron con bálsamo de Canadá.

e. Observaciones

• Aberraciones en anafase

Se leyeron todas las células en anafase de 5 laminillas, tratadas y testigos.

• Micronúcleos

Se contabilizaron, en campos al azar 1,000 células en interfase por experimento incluyendo a los testigos. Los criterios que se siguieron para la observación de micronúcleos fueron los siguientes: textura y tinción igual a la del núcleo. El porcentaje se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de micronúcleos} = \frac{\text{Número de células con micronúcleos}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100$$

- **Índice Mitótico**

Se observaron 1,000 células en división, para determinar el índice mitótico (IM) en campos al azar en los tratados y en los testigos. El IM se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IM} = \frac{\text{Número de células en mitosis}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100$$

f. **Pruebas estadísticas**

En las tres pruebas se aplicó la prueba de ji cuadrada.

5.3.2. Técnica para metafase

a. **Tratamiento**

Cuando las raíces alcanzaron longitudes de 4 a 5 cm., se separaron en lotes de 10 plántulas por experimento y se expusieron a las muestras de agua durante 4 horas de tratamiento. Inmediatamente después, se enjuagaron con agua corriente. El testigo se puso en agua destilada.

Posteriormente, se les aplicaron los siguientes tiempos de recuperación: un período corto de 2 horas y períodos largos de 20 y 44 horas en una cámara con agua corriente y airación constante, para determinar el

período más sensible del ciclo celular a los efectos del agua contaminada. Las raíces de cada grupo se colocaron en una solución de colchicina al 0.05 % por 3 horas antes de finalizar la etapa de recuperación, con el objeto de observar las células en metafase.

b. Fijación

Una vez tratadas las raíces, se les cortaron 2 mm de la punta, se colocaron en frascos limpios, etiquetados y forrados con papel aluminio, se fijaron en una solución de etanol-ácido acético (3:1) y se congelaron.

c. Tinción

Los meristemos se sacaron del congelador y cuando alcanzaron la temperatura ambiente, se enjuagaron con agua destilada por 2 minutos. Posteriormente, se hidrolizaron con HCl 1N de 7 a 8 minutos y una temperatura de 60 °C con agitación constante, se tiñeron en la oscuridad con reactivo de Schiff en portaobjetos excavados durante 45 minutos, se trataron en una solución amortiguadora de citratos con 2 % de pectinasa pH 4.7 durante 15 minutos a 28 °C, en la oscuridad, y se colocaron en ácido acético al 45 % por 10 minutos.

Enseguida, se transfirieron a portaobjetos planos, previamente etiquetados, se les colocó un cubreobjetos y se realizó el aplastamiento en monocapa (*squash*) de los meristemos con ácido acético al 45 %. Después, se pasaron dos veces por la flama de una lámpara de alcohol y se colocaron en el congelador.

d. Preparaciones permanentes

Los portaobjetos con los meristemos se colocaron en hielo seco hasta que se les formó escarcha. Enseguida, se les retiró el portaobjetos, se

deshidrataron 2 veces en butanol absoluto, se dejaron secar y se sellaron con bálsamo de Canadá, de acuerdo con el método de hielo seco descrito por Conger y Fairchild (1953).

e. Observaciones

- Aberraciones en metafase

Se observaron 300 células en metafase por cada experimento, con sus testigos correspondientes.

f. Prueba estadística

Se aplicó la prueba de ji cuadrada.

5.4. Metodología para el intercambio de cromátidas hermanas

La variedad de semillas de *Vicia faba* utilizada y el método de germinación fue el mismo que para la observación de aberraciones cromosómicas.

5.4.1. Técnica de tinción diferencial para ICH

a. Tratamiento

Cuando las radículas alcanzaron entre 2 y 3 cm. de longitud, se colocaron en la solución de análogos que contiene 100 μM de 5-bromodesoxiuridina (5-BrdU), 0.1 μM de fluorodesoxirudina (FdU) y 5 μM de uridina (U) a pH 6.8 durante un ciclo de replicación celular, es decir, 20 horas.

Después se hicieron grupos de 10 plántulas por experimento, que se expusieron a las muestras del agua del Río Lerma por 4 horas, más el testigo que se puso en agua destilada. Posteriormente se enjuagaron con agua corriente.

Enseguida, se colocaron en una solución fresca de análogos durante 20 horas (segundo ciclo de replicación), se cortaron 2 mm de las puntas de los meristemos y se pusieron en una solución de colchicina al 0.05 % durante 3 horas.

Todo el tratamiento se llevó a cabo a una temperatura de 19 °C y en la oscuridad.

b. Fijación

Una vez hecho el tratamiento, se fijaron con ácido acético glacial por 1 hora y se colocaron en una solución de etanol-ácido acético (3:1) durante 2 días a una temperatura de -20 °C.

c. Tinción

Los meristemos se sumergieron en etanol al 70 % durante 15 minutos y se hidrolizaron en una solución de HCl 5N, por 80 minutos, a una temperatura de 28 °C. Posteriormente, se lavaron 3 veces con agua bidestilada y se tiñeron con el reactivo de Schiff durante 15 minutos en la oscuridad. Inmediatamente después, se trataron en una solución amortiguadora de citratos con 2 % de pectinasa pH 4.7 durante 12 minutos a 28° C y en la oscuridad.

Una vez hecho esto, se pusieron en una solución de ácido acético al 45 % durante 10 minutos. Finalmente, se colocaron en etanol frío al 70 % por 15 minutos. Enseguida, se transfirieron a portaobjetos planos, previamente etiquetados, se les colocó un cubreobjetos y se realizó el aplastamiento en monocapa (*squash*) de los meristemos con ácido acético al 45 %.

d. Preparaciones permanentes

Los portaobjetos con los meristemas se colocaron en hielo seco hasta que se les formó escarcha. Enseguida, se les retiró el portaobjetos, se deshidrataron 2 veces en butanol absoluto, se dejaron secar y se sellaron con bálsamo de Canadá, de acuerdo con el método de hielo seco descrito por Conger y Fairchild (1953).

e. Observaciones

Se analizaron 25 células en metafase por cada experimento y por cada testigo para determinar la frecuencia de ICH.

f. Análisis estadístico

Se aplicó un análisis de varianza para comparar las diferencias entre grupos se obtuvo un valor de $F < 0.001$ y se realizó la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls.

6. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente estudio son los siguientes:

6.1. Toma de muestras

A las muestras de agua se les tomó el pH y la temperatura y se anotaron algunas características físicas.

Tabla 1. Parámetros físicos y químicos de las muestras de agua.

Localización	pH	Temperatura en centígrados	Olor	Color
PUNTO 1	7.5	19.3	Intenso y picante	Gris oscuro
PUNTO 2	7.0	19.7	Menos intenso	Rojo ladrillo

En la tabla 1 se observa que el pH es moderadamente básico en los dos puntos, aunque el del Punto 1 es ligeramente más básico que el del punto dos. La temperatura es prácticamente igual en ambos puntos. En la muestra del Punto 1 se percibió un olor más fuerte y picante que en la del Punto 2, y el color de la primera fue gris oscuro, mientras que el de la segunda fue rojizo. Hay que añadir que el agua de la segunda muestra era más densa.

6.2. Aberraciones cromosómicas

6.2.1. En anafase (Figura 11)

a. Aberraciones observadas

Las raíces de *Vicia faba* fueron sometidas a tratamientos de 1, 2 y 3 horas. Las aberraciones cromosómicas observadas en anafase fueron: puentes (Figura 12), cromosomas con el centrómero inactivado (Figura 13), isocromosomas (Figura 14) y anafases multipolares. Los resultados se muestran en la Tabla 2 y son los siguientes:

- Punto 1

En el tratamiento de una hora no hubo fragmentos. Los puentes, cromosomas con el centrómero inactivado (CCI), isocromosomas y anafases multipolares son prácticamente iguales en frecuencia que en el testigo, por lo que se consideran como aberraciones espontáneas.

A las 2 horas de tratamiento, la frecuencia de aberraciones se incrementó significativamente con respecto a su testigo y a la muestra de la primera hora. Los fragmentos se hicieron presentes con una frecuencia de 2.49 %, los puentes de 2.27 %, los isocromosomas de 1.24 %, las anafases multipolares de 0.11 % y los CCI aumentaron considerablemente: de 0.44 % en la primera hora a 5.57 % en la segunda.

A las 3 horas de tratamiento, la frecuencia de aberraciones también fue significativa con respecto a su testigo y a los dos tratamientos anteriores (1 y 2 horas). Las frecuencias observadas fueron: CCI 8.73 %, fragmentos 5.62 %, puentes 3.26 %, isocromosomas 1.24 % y anafases multipolares 0.07 %.

- Punto 2

En la primera hora de tratamiento, las frecuencias observadas son muy similares al testigo por lo que se consideraron como aberraciones espontáneas.

En la segunda hora de tratamiento, las aberraciones se incrementaron significativamente con respecto a su testigo y a la primera hora. Se presentaron las siguientes frecuencias: puentes 1.04 %, fragmentos 0.90 %, CCI 0.82 %, isocromosomas 0.29 % y no se observaron anafases multipolares.

En la tercera hora de exposición, las aberraciones aumentaron significativamente con respecto a su testigo y a los tratamientos anteriores (1 y 2 horas). Las frecuencias fueron: 1.55 % puentes, 1.47 % CCI, 1.26 % fragmentos, 0.32 % isocromosomas y 0.07 % anafases multipolares.

Para el análisis estadístico se aplicó la prueba de ji cuadrada y los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Aberraciones cromosómicas en **anafase** de las células meristemáticas de *Vicia faba* inducidas por aguas superficiales del Río Lerma en los puntos de estudio.

	Tiempo de exposición (horas)	Tratamiento	Total de anafases	Anafases normales %	Anafases anormales %	Fragmentos %	Puentes %	C.C.I. %	Isocromosomas %	Anafases multipolares %
PUNTO 1	1	Testigo	672	98.04	1.96	0	0.78	0.59	0.59	0
		Muestra	900	98.90	1.10 n.s	0	0.22	0.44	0.44	0
	2	Testigo	660	98.20	1.80	0	0.6	0.6	0.6	0
		Muestra	1762	88.22	11.78*	2.49	2.27	5.67	1.24	0.11
	3	Testigo	600	98.88	1.12	0	0.52	0.6	0	0
		Muestra	2632	80.43	19.57*	5.62	3.26	8.73	1.89	0.07
PUNTO 2	1	Testigo	964	99.18	0.82	0.31	0.51	0	0	0
		Muestra	1201	98.77	1.23 n.s	0.49	0.58	0.16	0	0
	2	Testigo	906	99.67	0.33	0	0	0.33	0	0
		Muestra	1222	96.95	3.05*	0.90	1.04	0.82	0.29	0
	3	Testigo	994	98.80	1.20	0.10	0.50	0.40	0.20	0
		Muestra	1341	95.33	4.67*	1.26	1.55	1.47	0.32	0.07

C.C.I Cromosomas con centrómero inactivado.

p < 0.001.

n.s no significativo.

* significativo.

b. Comparación de los resultados obtenidos en anafase en los Puntos 1 y 2.

Se compararon los resultados obtenidos en los dos puntos de muestra por medio de la prueba estadística de ji cuadrada (Tabla 2).

La frecuencia de aberraciones entre los dos puntos, en la primera hora de tratamiento, no fue estadísticamente significativa, pero, en los tratamientos de 2 y 3 horas, sí hubo una diferencia significativa entre las frecuencias del Punto 1 y las del Punto 2 ($p < 0.001$).

La frecuencia de aberraciones se incrementó conforme aumentó el tiempo de exposición, tanto en el Punto 1, como en el Punto 2, y en el Punto 1 fue mucho más notorio el incremento que en el Punto 2. La frecuencia más alta se observó en el Punto 1 después de 3 horas de tratamiento.

6.2.2. En metafase (Figura 15)

a. Aberraciones observadas

Las raíces de *Vicia faba* fueron sometidas a 4 horas de tratamiento, con diferentes tiempos de recuperación. Las aberraciones cromosómicas observadas en metafase fueron: rompimientos cromosómicos (Figuras 16), rompimientos isocromatídicos (Figura 17) y anillos cromosómicos (Figura 18). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.

- Punto 1

Después de 4 horas de tratamiento, con 2 horas de recuperación, se observó un ligero incremento en la frecuencia de aberraciones con respecto al testigo, pero no fue estadísticamente significativo.

En los tratamientos de 4 horas con 20 horas de recuperación, la frecuencia de aberraciones aumentó de manera significativa con respecto al testigo y con relación al primer tratamiento. Los rompimientos cromosómicos aumentaron considerablemente de 0.26 % a 9.33 %. Las otras frecuencias observadas fueron: rompimientos cromatídicos 1.0 %, rompimientos isocromatídicos 0.33 % y anillos cromosómicos 0.33 %.

Después 4 horas de tratamiento, con 44 horas de recuperación, la frecuencia de aberraciones fue significativa con respecto al testigo, pero menor que la muestra anterior (20 horas de recuperación). Las frecuencias observadas fueron: rompimientos cromosómicos 8 % y rompimientos isocromatídicos 1.33 %.

- Punto 2

En 4 horas de tratamiento, con 2 horas de recuperación, se observó un ligero incremento en la frecuencia de aberraciones con respecto al testigo, pero no fue estadísticamente significativo.

Después de 4 horas de tratamiento, con 20 horas de recuperación, la frecuencia de aberraciones aumentó de manera significativa con respecto al testigo y con respecto al tratamiento anterior. Los rompimientos cromosómicos fueron los más frecuentes con 7 %, seguidos de rompimientos isocromatídicos 1 %, rompimientos cromatídicos 1 % y anillos cromosómicos 0.33 %.

En tratamientos de 4 horas, con 44 horas de recuperación, la frecuencia de aberraciones fue exactamente igual al anterior y significativa con respecto al testigo y al primer tratamiento. Se observaron rompimientos cromosómicos con el 8.66 %.

En los tratamientos con 4 horas y 2 de recuperación, los rompimientos cromatídicos fueron los que presentaron la mayor frecuencia. En tanto que, con 20 y 44 horas de recuperación, los rompimientos cromosómicos fueron las aberraciones más frecuentes en los dos puntos de estudio.

Se aplicó la prueba de ji cuadrada para el análisis estadístico y los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Aberraciones cromosómicas en **metafase** de las células meristemáticas de *Vicia faba* inducidas por aguas superficiales del Río Lerma en los puntos de estudio.

	4 horas de tratamiento más horas de recuperación		Total de células observadas	Metafases Normales %	Aberraciones totales %	Rompimientos			Anillos Cromosómicos %
						Cromatídicos %	Isocromatídicos %	Cromosómicos %	
PUNTO 1	2	Testigo	285	99.65	0.35	0.35	0	0	0
		Muestra	300	98.07	1.93 n.s.	1.00	0.66	0.26	0
	20	Testigo	300	97.33	2.66	1.33	0	1.33	0
		Muestra	300	88.33	11.00 *	1.00	0.33	9.33	0.33
	44	Testigo	300	97.33	2.66	0	0	2.66	0
		Muestra	300	90.33	9.66 *	0	1.33	8.00	0
PUNTO 2	2	Testigo	285	99.65	0.35	0.35	0	0	0
		Muestra	300	98.66	1.67 n.s.	1.00	0.67	0	0
	20	Testigo	300	97.33	2.66	1.33	0	1.33	0
		Muestra	300	91.33	8.66 *	0.33	1.00	7.00	0.33
	44	Testigo	300	97.33	2.66	0	0	2.66	0
		Muestra	300	91.33	8.66 *	0	0	8.66	0

p < 0.001.

n.s no significativo.

* significativo.

b. Comparación de los resultados obtenidos en los Puntos 1 y 2.

Al comparar las frecuencias obtenidas en metafase, los tratamientos no presentaron diferencias significativas entre el Punto 1 y el Punto 2 (Tabla3).

6.3. Índice mitótico

El índice mitótico se evaluó en todos los tratamientos (1, 2 y 3 horas de tratamiento sin recuperación y sin colchicina y 4 horas de exposición con 2, 20 y 44 horas de recuperación). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Índice mitótico en las células meristemáticas de *Vicia faba* tratadas con aguas superficiales del Río Lerma.

Tiempo de exposición en horas	Testigo	Punto 1	Punto 2
1	10.7	10.7 n.s	11.9 n.s
2	10.7	13.2 n.s	12.3 n.s
3	10.3	19.3 *	13.5 n.s
4 con 2 de recuperación	7.6	6.5 n.s	7.5 n.s
4 con 20 de recuperación	7.9	8.2 n.s	9.5 n.s
4 con 44 de recuperación	8.2	16.1 *	11.6 *

Total de células observadas por tratamiento 1000.

p < 0.001.

n.s no significativo.

* significativo.

6.3.1. Tratamientos sin recuperación Punto 1 y Punto 2

a. Punto 1

En las dos primeras horas de exposición no se encontraron diferencias significativas con respecto a los testigos, pero en la tercera hora, el índice mitótico de las raíces aumentó de manera extremadamente significativa ($p < 0.001$).

b. Punto 2

No se observaron diferencias significativas en ningún caso.

6.3.2. Tratamientos con recuperación Punto 1 y Punto 2

El índice mitótico, en los tratamientos con recuperación, fue incrementándose conforme se aumentó el tiempo. Al aplicar la prueba estadística de ji cuadrada, el tratamiento con 4 horas y 44 de recuperación en los Punto 1 y 2 fueron estadísticamente significativos ($p < 0.001$) con respecto a los testigos como se muestra en la tabla 4.

Se compararon los datos del índice mitótico del Punto 1 con respecto al Punto 2 y se aplicó la ji cuadrada, los resultados se muestran en la tabla 4.

6.3.3. Comparación de los resultados de los tratamientos sin recuperación entre los dos puntos

Las frecuencias observadas en los dos puntos de estudio fueron muy similares. En la primera y segunda horas de exposición no hay diferencia estadísticamente significativa entre ambos puntos. Pero, en la tercera hora de

exposición la frecuencia del índice mitótico del Punto 1, con respecto al Punto 2, fue muy significativa ($p < 0.001$), como se muestra en la tabla 4.

6.3.4. Comparación de los resultados de los tratamientos con recuperación entre los dos puntos

En los tratamientos de 4 horas con 2 y 20 de recuperación, las frecuencias del índice mitótico no fueron estadísticamente significativas entre los dos puntos. En los tratamientos de 4 horas y 44 de recuperación, fueron estadísticamente muy significativas ($p < 0.001$) las del Punto 1, con respecto al Punto 2, como se muestra en la tabla 4.

6.4. Micronúcleos

Se observaron micronúcleos (Figura 19) y la frecuencia obtenida en los tratamientos realizados en las raíces de *Vicia faba* se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 5. Frecuencia de **micronúcleos** en las células meristemáticas de *Vicia faba* tratadas con aguas superficiales del Río Lerma.

Tiempo de exposición en horas	Testigo	Punto 1	Punto 2
1	0.3	0.3 n.s	0.4 n.s
2	0.9	2.3 n.s	1.0 n.s
3	0.5	7.6*	0.6 n.s
4 y 2 de recuperación	0.5	1.6 *	1.1 n.s
4 y 20 de recuperación	0.6	5.4 *	1.3 n.s
4 y 44 de recuperación	0.3	5.2 *	1.4 *

Total de células observadas por tratamiento.1000.

p < 0.001

n.s no significativo.

* significativo.

6.4.1. Tratamientos sin recuperación Punto 1 y Punto 2

a. Punto 1

La frecuencia de micronúcleos presentó un incremento conforme aumentó el tiempo de exposición. En las dos primera horas, no hubo

diferencia significativa con respecto a los testigos, pero, en la tercera, la diferencia fue extremadamente significativa ($p < 0.001$) como se observa en la tabla anterior.

b. Punto 2

No se observaron diferencias significativas en los tratamientos expuestos durante 1, 2 y 3 horas, con respecto a los testigos. La frecuencia observada en los tres tratamientos es prácticamente la misma.

6.4.2. Tratamientos con recuperación Punto 1 y Punto 2

a. Punto 1

La frecuencia de micronúcleos presentó el siguiente comportamiento: en el tratamiento con 2 horas de recuperación no hubo diferencia significativa, con respecto al testigo, pero, en los tratamientos con 20 y 44 horas de recuperación, la frecuencia aumentó considerablemente y la diferencia fue muy significativa ($p < 0.001$), con respecto a los testigos como se nota en la tabla 5.

b. Punto 2

No se observaron diferencias significativas en los tratamientos con 2 y 20 horas de recuperación, pero, en el tratamiento con 44 horas de recuperación, sí hubo diferencia significativa ($p < 0.001$), con respecto al testigo, como se observa en la tabla 5.

Para determinar la diferencia en la frecuencia de micronúcleos entre el Punto 1 y el Punto 2, se aplicó la prueba estadística de ji cuadrada y los resultados obtenidos se presentan en la tabla 5.

6.4.3. Comparación de los resultados de los tratamientos sin recuperación en los dos puntos

En la primera hora de exposición, la frecuencia fue igual en ambos puntos y no existe diferencia significativa.

En la segunda hora de exposición, la frecuencia en el Punto 1 fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$), con respecto al Punto 2.

En la tercera hora de exposición, la frecuencia de micronúcleos en el Punto 1 aumentó de manera muy significativa ($p < 0.001$), con respecto al punto 2.

6.4.4. Comparación de los resultados de los tratamientos con recuperación en los dos puntos

En el tratamiento con 2 horas de recuperación y 4 de exposición, la frecuencia de micronúcleos en el Punto 1 fue mayor que en el Punto 2, pero, estadísticamente no fue significativa.

En los tratamientos con 20 y 44 horas de recuperación y 4 de exposición, la frecuencia de micronúcleos en el Punto 1 fue mayor que en el Punto 2 y estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

6.5. Intercambio de cromátidas hermanas

Los resultados del intercambio de cromátidas hermanas (Figura 20) se muestran en las tablas 6 y 7.

Tabla 6. Intercambio de cromátidas hermanas inducidas por aguas superficiales del Río Lerma en los puntos de estudio.

	Tratamiento (horas)		$\bar{X} \pm$ E.E	Newman-Keuls
	4	Testigo		
PUNTO 1	4	Testigo	29.000 2.62	< 0.001*
	4	Muestra	74.000 3.19	
PUNTO 2	4	Testigo	29.000 2.62	< 0.001 *
	4	Muestra	41.500 2.93	

F= 63.323.

p< 0.001.

* significativo.

a. Punto 1

La frecuencia promedio de ICH observados en el testigo fue de 29 y en el tratamiento fue de 74. La diferencia (45 intercambios) fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

b. Punto 2

La frecuencia promedio de ICH observados en el testigo fue de 29 y en el tratamiento fue de 41.5. La diferencia (12.5 intercambios) fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

Se evaluó la diferencia de ICH entre los dos puntos de estudio, aplicando la prueba estadística de *t* de student y los resultados fueron los siguientes:

Tabla 7. Diferencia de **Intercambio de cromátidas hermanas** inducidas por aguas superficiales de Río Lerma con 4 horas de exposición entre el Punto 1 y el Punto 2.

	X +/- E.E	t de student
PUNTO 1	74.000 3.19	<0.001*
PUNTO 2	41.500 2.93	

p<0.001
* significativo.

La diferencia de ICH encontrados entre los Punto 1 y 2 fue estadísticamente significativa (p<0.001), como se muestra en la tabla anterior.

7. DISCUSIÓN

La grave contaminación de la Cuenca Alta del Curso Alto del Río Lerma se debe a desechos industriales y domésticos, residuos de las actividades agrícola y ganadera y materia orgánica. Entre los contaminantes que han sido reportados en los estudios realizados en esta cuenca destacan los siguientes: fenoles; plaguicidas como Malatión, Lindano y 2-4 D, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, detergentes, fertilizantes, y metales pesados (Ávila, 1995, 2001; Barceló, 2000). Algunos de ellos son los probables responsables de los efectos genotóxicos observados en el trabajo.

Los contaminantes presentes en el agua del río forman una mezcla muy compleja que experimenta diversos procesos de biotransformación (Buhler y Williams, 1988; Villalobos-Pietrini *et al* 1994). Esto hace muy difícil el análisis y la discusión de los resultados, y complica aún más la determinación de un posible agente causal de los efectos genotóxicos, que sobre los organismos no son provocados por un sólo agente xenobiótico, sino por mezclas complejas (Rainbow *et al.*, 1990).

Se han realizado estudios específicos de agentes químicos y los efectos genotóxicos que producen. La información recabada ha sido importante, porque ha permitido entender la acción de los agentes genotóxicos y las posibles consecuencias de la contaminación del agua con estos productos (Shugart y Theodorakis, 1994). Para estos estudios *Vicia faba* ha sido un biomonitor muy útil.

Cabe aclarar que el presente estudio es un primer acercamiento para evaluar los riesgos genotóxicos de las aguas superficiales de la Cuenca Alta del Curso Alto del Río Lerma, sobre las cuales no existen datos. La mayoría de las investigaciones realizadas hasta ahora se han hecho en la Presa José Antonio Alzate y han sido enfocados a determinar las concentraciones de diversos contaminantes, especialmente la presencia de metales pesados en sedimentos, en lodos residuales y en suelo. Existen pocos trabajos sobre la contaminación del agua de la presa y un solo estudio sobre sus efectos genotóxicos.

Los puntos de muestra escogidos para este estudio (Puente de la Autopista México-Toluca y Puente de la Carretera Naucalpan-Toluca) coinciden, en parte, con las zonas seleccionadas por Zarazúa para sus recientes descripciones sobre la calidad del agua en la Cuenca Alta del Curso Alto del Río Lerma (Zarazúa, 2002). Esta investigadora ha llevado a cabo sus estudios en la zona del Puente de la Autopista México-Toluca, la zona del Puente de la Carretera Naucalpan-Toluca y la zona de Cortina de la Presa Alzate.

Zarazúa (2002) evaluó 18 parámetros fisicoquímicos del agua con los cuales determinó su calidad y concluyó que el embalse presenta condiciones graves de eutrofización, valores muy altos de fosfatos, condiciones prácticamente anóxicas y un serio problema de contaminación bacteriana (muy alta presencia de coliformes). La mala calidad del agua en las tres zonas (Z1>Z2>Z3) rebasó los límites permitidos para la protección de la vida acuática, el uso como agua de riego agrícola y como fuente de abastecimiento de agua potable. A pesar del grado de la contaminación, el agua está siendo utilizada para el riego agrícola. Los parámetros químicos y físicos registrados en este estudio coinciden con los reportados por Zarzaúa (2002).

En el presente trabajo, se realizaron distintas pruebas citogenéticas en las raíces de *Vicia faba*, para evaluar ampliamente los efectos genotóxicos provocados por la contaminación de las aguas superficiales de la Cuenca Alta del Curso Alto del Río Lerma en los dos puntos de estudio seleccionados y se observó lo siguiente:

7.1. Aberraciones cromosómicas

Las aberraciones que aparecen en las células meristemáticas de *Vicia faba* en anafase y metafase, de acuerdo con la clasificación establecida por Kihlman (1966), son de tipo subcromatídico, cromatídico y cromosómico.

7.1.1. En anafase y en metafase

No se observaron **aberraciones subcromatídicas**.

Las **aberraciones cromatídicas** se inducen en G_2 y S (Kihlman 1966) y, en el presente trabajo, se observaron frecuencias significativas en **anafase**, como fragmentos sencillos y puentes cromatídicos (Tabla 2), que probablemente se originaron en G_2 . Mientras que, en **metafase**, no se presentaron de manera significativa, como rompimientos cromatídicos e isocromatídicos (Tabla 3).

Las **aberraciones cromosómicas** se generan en G_1 y se observan entre las 14 y 18 horas de recuperación (Kihlman, 1966). En el presente trabajo, se observaron, en **metafase**, como rompimientos cromosómicos y anillos cromosómicos de manera muy significativa (Tabla 3). También, se notaron, aunque con muy baja frecuencia, aberraciones cromatídicas en los dos puntos de estudio (Tabla 3).

La mezcla de aberraciones cromatídicas y cromosómicas observadas en los tratamientos con 20 y 44 horas de recuperación, en el Punto 1, y en el tratamiento con 20 horas de recuperación, en el Punto 2, se debió, probablemente, a un efecto producido al final de G_1 ó al inicio de S y/ó por un retraso del ciclo celular. La presencia única de aberraciones cromosómicas en el tratamiento con 44 horas de recuperación en el Punto 2 confirma este retraso.

Lo anterior sugiere que las aguas superficiales de la Cuenca Alta del Curso Alto del Río Lerma provocaron un alargamiento en la duración del ciclo celular de *Vicia faba* y es muy probable que este retraso se haya efectuado en todas las fases del ciclo celular, incluyendo la profase.

De acuerdo con los criterios de Kihlman (1966), los agentes que indujeron las aberraciones cromatídicas tienen un comportamiento **S-independiente**, es decir, que la expresión de las aberraciones no requiere de la síntesis del ADN (Bender *et al.*, 1973, 1974; Kihlman *et al.*, 1978; Natarajan y Obe, 1978). Además son *de efecto no retardado* (Kihlman 1966) ya que las aberraciones aparecieron en las primeras horas después del tratamiento y se generaron en G_2 .

En tanto que los agentes que indujeron las aberraciones cromosómicas también tienen un comportamiento **S-independiente** puesto que se originaron en G_1 , con *efecto no retardado*. El hecho de que se hayan manifestado después de 24 y 48 horas de tratamiento, indica que efectivamente existe un retraso en la duración del ciclo celular de *Vicia faba*.

Considerando la situación que prevalece en la zona de estudio y tomando en cuenta que los metales pesados están formando parte de los contaminantes presentes en el agua del Río Lerma, quizás éstos sean los posibles causantes de los efectos genotóxicos del agua. Se ha comprobado que el Cr, Mn, Fe, Zn, Cd y

Hg son mutagénicos (Rodríguez-Ariza *et al.*, 1992; Guerrero, 1996) y tienen un efecto directo sobre el material genético.

En determinaciones realizada con aguas superficiales de la Presa Alzate, se observó, que en el punto en donde se mezclan las aguas provenientes del Río Lerma y las de la presa (en la entrada de la presa), el Cr, Cd, Cu y Hg, y algunas especies de hierro (Fe II y Fe III) y de manganeso (II y IV) se encontraron en altas concentraciones (Barceló *et al.*, 1999; Ávila, 2001). Esto fue atribuido a que el río lleva una carga mayor de estos metales, ya que en otros puntos de la presa los valores fueron menores.

En un estudio realizado en *Salmonella thyphimurium* se obtuvieron resultados genotóxicos positivos en el mismo punto donde se une las aguas del río y de la presa, y se consideraron como posibles responsables los metales pesados, especialmente al Cr, Cd y Hg (Ávila, 2001).

Sí se consideran los estudios antes mencionados, en los cuales se ve que las concentraciones más altas de los metales pesados y el efecto genotóxico en *Salmonella thyphimurium* se presentaron en el sitio donde se mezclan las aguas del río con las de la presa, se puede deducir que la carga de estos metales es mayor en las aguas del río. Por lo tanto, es muy probable que las aberraciones observadas en anafase y metafase, en las primeras horas después del tratamiento (2 y 3 horas sin recuperación y 6 con recuperación), pudieron ser inducidas principalmente por metales pesados, pero, como en las aguas se dan mezclas muy complejas, también pudieron haber intervenido otros agentes.

En estudios hechos con *Vicia faba*, aplicando agentes químicos se indujeron aberraciones subcromatídicas, cromatídicas y cromosómicas en las raíces de esta especie, durante las primeras horas después de los tratamientos,

por ejemplo: el dicromato de potasio y el cromato de calcio (Gómez-Arroyo *et al.*, 1981; Gómez-Arroyo y Villalobos Pietrini 1983), el óxido de cromo III (Gómez-Arroyo *et al.*, 1987), el dicromato de potasio (Villalobos-Pietrini *et al.*, 1993), los insecticidas Heptacloro y Malatión (Gómez-Arroyo *et al.*, 1985) y disolventes industriales como: tiner, tolueno, benceno, n-hexano, n-heptano y acetato de etilo (Gómez-Arroyo *et al.*, 1986). Por lo cual, estos agentes químicos se consideran como agentes S-independientes y de efecto no retardado de acuerdo con Kihlman *et al.*, (1978). Asimismo, se han observado resultados positivos con sales de cobalto en *Vicia faba* y *Allium cepa* como aberraciones cromosómicas y aneuploidias (Herich, 1965).

Las aberraciones cromosómicas, que se observaron en los tratamientos con tiempos largos de recuperación, probablemente se deban al retraso en la duración del ciclo celular.

Existen varios estudios en los que se muestra que algunos productos químicos, especialmente disolventes, pueden inducir alargamiento del ciclo celular en *Vicia faba*, por ejemplo: el dietil sulfato (Heiner, 1971); el metanol (López-Rosales, 1980); el tiner (Gómez-Arroyo, 1980) y disolventes industriales (Gómez-Arroyo *et al.*, 1986). En lo que se refiere a estos últimos, Gómez-Arroyo *et al.*, (1986) observaron aberraciones cromosómicas, después de 22 y 44 horas de recuperación, en los meristemas radiculares de *Vicia faba*, que fueron tratados con diferentes disolventes industriales, tales como: tiner, tolueno, benceno, n-hexano, n-heptano y acetato de etilo (Gómez-Arroyo *et al.*, 1986). Por lo que se puede considerar que los posibles responsables de la presencia de estas aberraciones y del retraso en el ciclo celular hayan sido los disolventes industriales presentes en el agua del Río Lerma. También, se ha reportado la presencia de fenoles y de hidrocarburos aromáticos y alifáticos en las aguas de este río (Ávila, 1995, 2001; Barceló, 2000).

7.1.2. Daños al centrómero y al huso acromático

En este estudio se observaron daños al centrómero, en anafase, que dieron lugar a isocromosomas (Ramanna y Natarajan, 1966; Nicoloff y Gecheff, 1976), a cromosomas con centrómero inactivado (Gómez-Arroyo y Villalobos Pietrini 1983; Gómez-Arroyo *et al.*, 1985, 1986, 1987) y a alteraciones del huso acromático que provocaron anafases multipolares (Gómez-Arroyo *et al.*, 1986).

Los isocromosomas (rompimiento transversal del centrómero) y los cromosomas con el centrómero inactivado, quedan fuera de la cinética normal de la anafase, por lo que no se integran a los núcleos hijos y pueden generar micronúcleos y aneuploidías (Ramanna y Natarajan, 1966; Gómez-Arroyo, 1980; Gómez-Arroyo *et al.*, 1986). Barthelmess apuntó que hay dos posibles razones para que los cromosomas queden fuera de la cinética normal de la anafase: porque los centrómeros de uno o más cromosomas se adhieren a la membrana nuclear o a la capa externa del citoplasma y porque, durante la mitosis, el movimiento hacia la placa ecuatorial de estos cromosomas sufre un retraso o impedimento (Barthelmess, 1957). Además, se ha señalado que los disturbios en el huso acromático o el daño parcial al mismo, pueden dar lugar a cromosomas con centrómero inactivado (Schmid, 1973, 1975; Matter y Grauwiler, 1974).

Los cromosomas con centrómero inactivado y los isocromosomas se presentaron de manera significativa desde las primeras horas después del tratamiento (2 y 3 horas), en los dos puntos de estudio (Tabla 2), lo que indica que hubo una acción directa e inmediata sobre el centrómero.

Gómez-Arroyo *et al.* (1986) observaron que algunos disolventes industriales, como tiner, tolueno, benceno, n-hexano, n-heptano y acetato de etilo, afectaron el centrómero de los cromosomas de *Vicia faba*, generando cromosomas con centrómero inactivado e isocromosomas, en las primeras horas después del tratamiento. Además, se percataron que el insecticida Malatión, también, produjo anomalías centroméricas en esta misma especie, durante las primeras horas de tratamiento (Gómez-Arroyo *et al.*, 1985).

Es importante mencionar que las sales de cromo (dicromato de potasio y cromato de calcio), también causan daños al centrómero desde las primeras horas después del tratamiento en los cromosomas de *Vicia faba*, como lo han descrito Gómez-Arroyo y Villalobos Pietrini (1983).

Los cromosomas, en una anafase normal, constituyen dos grupos, uno en cada polo de la célula. Pero, cuando hay alteraciones en la formación y funcionamiento del huso acromático, se generan más de los dos grupos, dando origen a anafases multipolares. Éstas, en telofase, se presentan como núcleos separados que pueden ser divididos por paredes celulares individuales y originan células con números cromosómicos menores a $2n$ (Baiza, 1980; Gómez-Arroyo, 1980).

El huso acromático consiste en una serie de fibras que corren entre los polos de la célula. Las fibras del huso están constituidas por microtúbulos de tubulina (resultado de la polimerización lineal de las moléculas de tubulina, unidas mediante enlaces disulfuro S-S). Las regiones de cada polo de la célula de las cuales emanan las fibras y contienen el centro organizador de los microtúbulos (MTOCs) se llaman centrosomas. El centrosoma es una definición operacional que comprende estructuras iguales con MTOCs y no

necesariamente toma la misma forma estructural en todos los tipos celulares (Mitchison, 1988; Lewin, 1994).

Algunas fibras se extienden entre los polos de la célula; otras conectan las regiones polares con los cromosomas. El punto de conexión con cada cromosoma es un cuerpo granular denso llamado cinetocoro, el cual está en la región constrictional definida por el centrómero. Los microtúbulos que componen las fibras, que corren a través del huso, terminan en los cromosomas y pueden cambiar su longitud por la adición ó remoción de subunidades de tubulina al final de cada fibra. La elongación de las fibras está involucrada en el establecimiento del huso y su acortamiento es el mecanismo por el cual los cromosomas son movidos durante la mitosis (Mitchison, 1988; Lewin, 1994).

Las anafases multipolares (tri y tetrapolares), en el presente trabajo, se presentaron con poca frecuencia después de 2 y 3 horas de tratamiento en el Punto 1, y después de 3 horas en el Punto 2 (Tabla 2).

Desde hace varias décadas se ha observado que los insecticidas propician la formación de anafases multipolares. Wilson *et al.* (1951) observaron alteraciones en el huso acromático al emplear el insecticida hexaclorociclohexano (Lindano). También, Giménez-Martín (1960) y Wu y Grant (1966) describieron anafases tripolares y tetrapolares al aplicar este mismo insecticida en *Allium cepa* y *Hordeum vulgare*.

El Malatión, también, indujo daño al huso mitótico en los meristemos radiculares de *Vicia faba* después de las primeras horas de tratamiento (Gómez-Arroyo *et al.*, 1985). Venkat *et al.*, (1995) evaluaron la genotoxicidad de diversos insecticidas con el cromosoma a través de la actividad de la beta-galactosidasa

en *Escherichia coli* y encontraron que el Malatión presenta una elevada actividad genotóxica y lo consideraron como un mutágeno fuerte.

Asimismo, Anderson *et al.* (1983) reportaron que el cadmio es un fuerte inhibidor del huso acromático.

Entre los contaminantes que se han descrito en el agua del Río Lerma figuran los plaguicidas Malatión, Lindano y 2-4D; fenoles; e hidrocarburos alifáticos y aromáticos (Ávila, 2001; Barceló, 2000). Por lo tanto, quizás estos productos sean los posibles responsables de los daños observados al centrómero y al huso acromático.

7.2. Índice mitótico

El índice mitótico es un criterio para evaluar el daño citotóxico que causan los agentes físicos y químicos. Estos agentes influyen de diversas maneras en el proceso de la división celular, evitando que las células entren en mitosis, se forme un huso acromático funcional y se lleve a cabo la citocinesis. Los agentes que evitan la entrada de las células en mitosis, inhiben la división celular, la nuclear y la cromosómica, y, la formación de las cromátidas hermanas, pero no hacen lo mismo con la replicación cromosómica (Kihlman, 1966).

Los estados afectados del ciclo celular, por estos agentes, son la interfase (G_1 , S y G_2) y en ocasiones la profase temprana. Los agentes químicos que actúan sobre G_1 ó S pueden inhibir la duplicación y la división de los cromosomas, pero si actúan en G_2 se impide la separación de las cromátidas hermanas (Kihlman, 1966).

La división celular depende fundamentalmente de tres eventos: la duplicación del ADN, la síntesis del ARN y la síntesis de las proteínas. Por lo tanto, la duplicación del ADN no es el único requisito para la división celular, pero la inhibición de ésta, generalmente, afecta el proceso. Por lo que, los agentes que alteran la síntesis o la estructura del ADN o de sus precursores pueden, de igual manera, inhibir la producción de energía requerida para la mitosis (Kihlman, 1966).

Otra causa que provoca la disminución de la división celular es la inducción de aberraciones cromosómicas, ya que algunas de ellas pueden provocar la muerte celular (Davison, 1960 y Gómez-Arroyo, 1980). Pero se ha visto que algunos agentes, provocan el efecto contrario, es decir, estimulan la división celular.

En el presente trabajo, se observó que las aguas superficiales de la Cuenca Alta del Curso Alto del Río Lerma estimularon la división celular en todos los tratamientos de los dos puntos de estudio (Tablas 4).

Este mismo fenómeno fue observado por Gómez-Arroyo en 1980, quien describe una acción estimulante del tiner (que es una mezcla balanceada de disolventes) en la división celular de *Vicia faba* y considera que dicho efecto puede ser provocado por alguno de los componentes de esta sustancia. En otro estudio, López-Rosales (1980) reporta el mismo efecto estimulante en las raíces de *Vicia faba* tratadas con metanol.

Martín del Campo (2002), en una investigación realizada con lodos residuales provenientes de la Cuenca Alta del Curso Alto del Lerma utilizados como acondicionadores del suelo agrícola en el cultivo de *Vicia faba* (en el Valle de Toluca), reportó que el rendimiento de semillas fue tres veces mayor con el

suelo acondicionado. A las semillas se les realizó una evaluación sobre el estado nutricional y se encontró que no existían diferencias significativas en cuanto al contenido de grasas, proteínas y fibras con respecto a los testigos, y tampoco se encontraron valores significativos de metales pesados (Martín del Campo, 2002). Lo anterior indica, probablemente, que existen en el agua de la Cuenca Alta del Curso Alto del Río Lerma agentes estimulantes de la división celular en *Vicia faba*.

Los probables candidatos del efecto estimulante de la división celular de *Vicia faba* observada en el presente estudio, pueden ser los disolventes encontrados en el agua del río por Ávila (1995, 2001) y Barceló (2000).

7.3. Micronúcleos

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la frecuencia de micronúcleos fue significativa en el Punto 1, después de 3 horas de tratamiento (Tabla 5). Esto se relaciona, probablemente, con la alta frecuencia de cromosomas con centrómero inactivado y fragmentos que se registraron en las aberraciones en anafase (Tabla 2). Asimismo, fue muy significativa la frecuencia de micronúcleos en los tratamientos con 20 y 44 horas de recuperación en el Punto 1 (Tabla 5). En el Punto 2 fue significativa después de 44 horas de recuperación (Tabla 5), lo que probablemente tenga relación con la frecuencia alta de rompimientos cromosómicos observados en metafase (Tabla 3).

En estudios realizados con metales pesados se ha observado, que la frecuencia de micronúcleos en *Vicia faba* se incrementó en presencia de arsénico (As III), de cadmio (Cd II), de plomo (Pb II) y de zinc (Zn II) (especialmente con los tres primeros) (Steinkellner *et al.*, 1998).

Además, se ha descrito que en muestras de suelo contaminado con cromo la frecuencia de micronúcleos en *Vicia faba* fue alta y directamente proporcional a la cantidad de cromo hallado en las mismas (Wang, 1999).

Por otro lado, se ha visto que el cromo (VI y III) incrementa significativamente la frecuencia de micronúcleos en *Tradescantia* (Steinkellner *et al.*, 1998).

Varios estudios realizados en ríos contaminados muestran una alta frecuencia de micronúcleos, por ejemplo: en China, el agua del Río Kuihe provocó una alta frecuencia de micronúcleos en las células de *Vicia faba*. El grado de contaminación en los diferentes sitios a lo largo del río fue asociado con la industria y con actividades humanas (Ji *et al.*, 1999). Asimismo, en el Río Xiaoqing, China, se muestrearon ocho puntos en 40 Km. del curso y el estudio mostró que la frecuencia de micronúcleos, en todas las muestras con una concentración del 100% de agua, fue muy significativa ($p < 0.001$) con respecto al testigo. La frecuencia más alta de este estudio se atribuyó a los fertilizantes fosforados y especialmente a la presencia de metales pesados vertidos por las compañías químicas, principalmente por las plantas de cromo (Miao *et al.*, 1999).

En India se examinaron muestras de agua contaminada con desechos fecales y descargas industriales, y se encontró que inducen en *Allium cepa* de manera muy significativa de aberraciones en anafase y micronúcleos (Grover y Kaur, 1999).

Los rompimientos cromatídicos y cromosómicos (fragmentos) y las alteraciones al centrómero (CCI), que probablemente formaron los micronúcleos observados en el presente trabajo, fueron quizá causados por la

mezcla de los efectos producidos por: metales pesados, insecticidas y disolventes que están presentes en las aguas del Río Lerma.

7.4. Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH)

Se ha descrito que la frecuencia basal de ICH para *Vicia faba* es de 29 intercambios por célula en los cromosomas que han pasado dos ciclos en presencia de BrdU con sustitución TB/BB (Kihlman y Andersson, 1984). Lo anterior, coincide exactamente con los 29 intercambios por célula obtenidos en los testigos de esta investigación, en la que, la frecuencia de ICH fue altamente significativa en los dos puntos de estudio (Tabla 6 y 7).

Se han realizado varios trabajos con sales de diversos metales pesados en los que se ha observado un importante incremento de los intercambios de cromátidas hermanas. Algunos ejemplos son los siguientes: el dicromato de potasio (Barrena, 1986); el nitrato de cadmio (Abarca, 1989); el cloruro y nitrato de cobalto (Bedolla, 1997) y los nitratatos de níquel, cobalto, cadmio y zinc (Gómez-Arroyo *et al.*, 2001). Estas sales incrementaron de manera significativa la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas conforme aumentó su concentración.

En un estudio realizado en la Región Lagunera (Coahuila, México) con *Vicia faba* se constató que las altas concentraciones de arsénico en el agua de consumo humano propiciaron el aumento de ICH (Gómez-Arroyo *et al.*, 1988). De igual manera en Zimapán (Hidalgo, México) los resultados de una investigación con agua contaminada con arsénico muestran que, a medida que se incrementa la concentración de este elemento, se eleva la frecuencia de ICH (Gómez-Arroyo *et al.*, 1997).

Investigaciones realizadas con tiner muestran que este disolvente eleva significativamente la frecuencia de ICH en *Vicia faba* (Romero, 1984; Gómez-Arroyo y Castillo Ruiz, 1985). Lo mismo que los estudios hechos con los insecticidas organofosforados, Metil Paratión y Folimat, que en concentraciones bajas indujeron de manera significativa ICH en este mismo bioensayo (Cortés-Eslava, 1985).

En Chile se evaluó la genotoxicidad de las descargas de pulpa de las fábricas de papel, y se observó que provocaron un incremento en la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas en células de criceto (Pérez-Alzola y Santos 1997).

Los resultados obtenidos con la técnica de ICH indican que las aguas superficiales de la Cuenca Alta del Curso Alto del Río Lerma indujeron intercambios de cromátidas hermanas en *Vicia faba*, lo cual confirma la presencia de mutágenos en las aguas y el daño que éstos causan al material genético.

En la presente investigación, cuando se compararon los resultados obtenidos en las pruebas de aberraciones cromosómicas en anafase y metafase, en micronúcleos, en índice mitótico y en intercambio de cromátidas hermanas realizadas en los Puntos 1 y 2, se observó que el Punto 1 registró mayores efectos genotóxicos en las raíces de *Vicia faba* causados por la contaminación de las aguas superficiales y fueron significativamente diferentes con respecto al Punto 2. La diferencia entre los resultados encontrados entre estos dos puntos puede deberse principalmente a las descargas de cromo, de los compuestos de este metal y de los disolventes utilizados en la fabricación de zapato en San Mateo Atenco, y por los insecticidas agrícolas. Hay que tener en cuenta que todas estas fuentes de contaminación están muy cercanas al Punto 1.

Los contaminantes en los cuerpos de agua pueden ser depositados en los sedimentos o mantenerse en la columna de agua, donde pueden permanecer inertes o sufrir cambios tomando una forma química biodisponible (Parry *et al.*, 1976) y generar daños en los organismos expuestos (Loper, 1980; Stalh, 1991; Houk, 1992; Valent *et al.*, 1992). De esta manera es probable que en el Punto 1 los procesos de biotransformación y sedimentación de los contaminantes no se hayan iniciado o estén en su fase inicial por lo que la mayoría de ellos se encuentran aún en la columna de agua. Además, los resultados obtenidos por Zarazúa (2002) sobre la calidad del agua, apoyan los resultados obtenidos en este trabajo ya que el Punto 1 presenta un agua de menor calidad que el Punto 2.

Es importante mencionar, que unos metros antes del Punto 1, se encuentra la Planta de Tratamiento Toluca Oriente, que elimina principalmente materia orgánica, pero no suprime compuestos altamente peligrosos como metales pesados, disolventes, insecticidas, hidrocarburos, etc. (Ávila, 1995).

En un estudio hecho en el río Yodo de Japón se encontró que las aguas de desecho de las plantas de tratamiento presentaron alta mutagenicidad (Maruoka *et al.*, 1982; 1985).

El Punto 2 recoge las descargas conjuntas de la zona industrial de Lerma, del El Cerrillo I y del El Cerrillo II, instaladas en el tramo comprendido entre el Punto 1 y el Punto 2. Las industrias tienen giros tan diversos como: papelería y sus derivados, alimentario, tabacalero, textil, maderero, químico, cementero, automotriz, hule y de plásticos, de polímeros, de tenerías, de minerales no metálicos, del acero, de maquinaria y equipo, entre otras (Secretaría de Recursos Hidráulicos, 1990). Este Punto, también, recibe las descargas domésticas de 29 municipios, más los insecticidas utilizados para la agricultura,

por lo que se esperaba que el Punto 2 indujera mayor efecto genotóxico que el Punto 1, pero no fue así.

Probablemente, porque en este Punto la calidad del agua presenta una ligera mejoría de acuerdo con lo reportado por Zarazúa (2002). Además, se encuentra después de una planta recicladora (RECICLAGUA) y está más alejado de las descargas industriales y domésticas, aunque no de las áreas de cultivo, por lo que los contaminantes han empezado algunos procesos de biotransformación y de sedimentación en su trayecto hasta el punto de muestra.

Estudios hechos en efluentes industriales han mostrado la inducción de efectos genotóxicos, por ejemplo: efluentes de las industrias del papel (Douglas *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1981), textil (Moller *et al.*, 1984), química cuya producción es ácido benzoico y nitrotolueno (Sundval *et al.*, 1984), de manufacturas textiles y de productos de limpieza (Houk, 1992), en un estudio realizado en el Sistema Hidrológico del Río Atoyac-Zahuapan (Tlaxcala, México) se observó que las aguas superficiales contaminadas por efluentes de industrias papelera y textil provocaron aberraciones cromosómicas y alteraciones centroméricas en las células meristemáticas de *Vicia faba* analizadas en anafase, en tres de los nueve sitios muestreados (Villalobos-Pietrini *et al.*, 1994), extractos de éter y metanol de una industria gráfica (Vázquez y Moretón, 1995). Estos estudios apoyan los resultados obtenidos en este trabajo ya que varias industrias con estos giros están presentes en la Cuenca Alta del Curso Alto del Río Lerma.

Los resultados obtenidos evidencian claramente que las aguas superficiales de la Cuenca Alta del Curso Alto del Río Lerma inducen daño genético y pueden ser calificadas como mutagénicas, clastogénicas y tóxicas. En todas las pruebas citogenéticas realizadas en este trabajo a los meristemas

radiculares de *Vicia faba* se obtuvieron resultados no solamente positivos, sino muy significativos con respecto a los testigos en la mayoría de los casos.

Es importante mencionar que no existen datos epidemiológicos que evalúen la situación de miles de personas que están en constante contacto con este río, ya que en el Estado de México se encuentran establecidos 32 municipios por esta razón sería muy importante realizar este tipo de estudios. Pero, es aún más importante encontrar respuestas políticas, sociales, culturales y científicas para disminuir la contaminación.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo en los meristemos radiculares de *Vicia faba* revelan la magnitud del potencial del daño genético que las aguas contaminadas de la Cuenca Alta del Curso Alto del Río Lerma pueden causar.

Después de analizar los resultados se concluyó que esta agua tiene actividad genotóxica y puede ser calificada como mutagénica, clastogénica y tóxica, como lo muestran de manera muy significativa todas las pruebas citogenéticas realizadas en este trabajo. Los daños observados son los siguientes:

- a. Aberraciones cromosómicas de tipo cromatídico y cromosómico, generadas por agentes S-independientes.
- b. Daños al centrómero, principalmente, cromosomas con centrómero inactivado.
- c. Micronúcleos (indicadores de un alto contenido de clastógenos).
- d. Alta frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas.
- e. Retraso en el ciclo celular.
- f. Efecto estimulante en la división celular.

Todo esto podría representar un grave problema para la vida humana y la conservación del ecosistema.

Estos resultados confirman que el monitoreo ambiental con bioensayos de plantas en especial con *Vicia faba* es sencillo, rápido, económico y muy eficiente

para evaluar los niveles de contaminación de las aguas contaminadas de los ríos.

Recomendación.

Es importante llevar a cabo técnicas químicas y biológicas para obtener una información integral del problema de la contaminación.

9. REFERENCIAS

- Abarca-Hernández. C. J. (1989). Intercambios de cromátidas hermanas inducidos por cadmio en *Vicia faba*. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Superiores. Iztacala, UNAM.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson, J.D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. 3ra. Ed., Nueva York. Garland Publishing, Inc.
- Al-Sabtini K. y Metcalfe C. D. (1995). Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.* 343, 121-135.
- Anderson O., Roenne M. y Nordberg G. F. (1983). Effects of inorganic metal salts on chromosome length in human lymphocytes. *Hereditas* 98, 65-70.
- Arutyunyan R.M., Pogosyan V.S., Simonya, E.H., Atoyants A.L. y Djigardjian E.M. (1999). *In situ* monitoring of the ambient air around the chloroprene rubber industrial plant using the *Tradescantia*-stamen-hair mutation assays. *Mutat. Res.* 426, 117-120.
- Auerbach C. (1976). *Mutation Research. Problems, results and perspectives* Chapman and Hall. Londres.
- Ávila P.P. (1995). Evaluación de los metales pesados Cr, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb y Hg en agua, sedimento y lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) de la Presa José Antonio Alzate, Estado de México. Tesis de Mestría. Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.
- Ávila P.P. (2001). Dinámica de metales pesados no esenciales en la interacción agua-sedimento biota de la Presa José Antonio Alzate. Tesis de Doctorado. Facultad de Ingeniería. Universidad Autónoma del Estado de México.

- Ávila P., Zarazúa O., Barceló Q., Sánchez M. y Solís C. (1995). Distribución de hierro, cadmio, mercurio y plomo en la Presa Alzate. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 11, 21 (Resumen).
- Ávila-Pérez P., Zarazúa-Ortega G., Barceló-Quintana, I.D. y Díaz-Delgado C. (2000a). Mercury in water and bottom sediments from a Mexican reservoir. *Memorias del First International Symposium on the Lerma-Chapala Basin*, p.71.
- Ávila-Pérez, P., Tejada-Vega J.A., García-Aragón C., Díaz-Delgado C. y Reyes R. (2000b). Sedimentary processes and heavy metal related polluted in José Antonio Alzate reservoir, México State. *Memorias del First International Symposium on the Lerma-Chapala Basin*, p. 73.
- Baiza A. (1980). Efectos producidos por el Malatión en los cromosomas de las células meristemáticas de *Vicia faba*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Barceló I. (2000). Estudio de la movilidad del Ca, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb y Zn en sedimentos de la Presa José Antonio Alzate en el Estado de México. Facultad de Ingeniería. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Barceló I., Avila P., Solís H., Flores J., Rodríguez J., Zarazúa G., Caballero S. y Orozco R. (1995). Estudio de la distribución de cadmio y plomo en el sedimento de tres zonas de la Presa Alzate en el Estado de México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 11, 64 (Resumen).
- Barceló I., Solís H., González C., Bussy A., Ávila P. y García J. (1999). Determinación experimental de las especies de Fe, Mn y Cu en el agua de la Presa J. A. Alzate, Estado de México. *Revista de la Sociedad Química de México* 43, 43-49.
- Barrena G. C. (1986). Intercambio de cromátidas hermanas inducidos por dicromato de potasio y cromato de calcio en *Vicia faba*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.

- Barthelmeß A. (1957). Chemist induzierte multipolare mitosen. *Protoplasma* 48, 546-561.
- Bedolla C. R.M. (1997). Intercambio de cromátidas hermanas inducidos por cobalto y zinc en *Vicia faba*. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Superiores. Iztacala, UNAM.
- Benavides M. A. M., Del Águila J. P., Acosta, L. E. y Sánchez P.L. (1995). Análisis de metales pesados en el suelo agrícola de la Presa "José Antonio Alzate". *Rev. Int. Contam. Ambient.* 11, 49 (Resumen).
- Bender M.A., Bedford J.S. y Mitchell J.B. (1973). Mechanisms of chromosomal aberration production, II. Aberrations induced by 5-bromodeoxyuridine and visible light. *Mutat. Res.* 20, 403-416.
- Bender M.A., Griggs H.G. y Bedford J.S. (1974). Mechanisms of chromosomal aberrations production. III. Chemicals and ionizing radiation. *Mutat. Res.* 23, 197-212.
- Bryant P.E. (1990). Restriction endonuclease and radiation induced DNA double-strand breaks and chromosomal aberrations. *Int. J. Radiat. Biol.* 46, 57-65.
- Buhler D. R. y Williams D. E. (1988). The role of biotransformation in the toxicity of chemicals. *Aquat. Toxicol.* 11, 19-28.
- Bukvic N., Bavaro P., Giuseppe E., Filippo C., Fanelli M. y Guanti G. (1998). Sister chromatid exchanges (SCE) and micronucleus (MN) frequencies in lymphocytes of gasoline station attendants. *Mutat. Res.* 415, 25-33.
- Cabrera G.L., Rodríguez D.M.G., Maruri A.B. (1999). Genotoxicity of the extracts from the compost of the organic and the total municipal garbage using three plant bioassays. *Mutat. Res.* 426, 201-206.
- Calderón-Segura M.E., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R. (1999). *In vivo* and *in vitro* promutagen activation by *Vicia faba* of thiocarbamate herbicides molinate and butylate to products inducing sister chromatid exchange in human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 438, 81-88.

- Committee 17. (1975). Environmental mutagenic hazards, Council of the Environmental Mutagen Society. *Science* 187, 503-514.
- Conger A. D. y Fairchild L. M. (1953). A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain Technol.* 28, 281-283.
- Cortés-Eslava J. (1985). Intercambios de cromátidas hermanas inducidos por los insecticidas organofosforados Folimat y Metil Paratión en *Vicia faba*. Tesis de Licenciatura, UNAM.
- Cortés-Eslava J. (1993). Evaluación el daño mutagénico provocado por los insecticidas organofosforados fomix y metil azinfos en *Salmonella typhimurium* a través del metabolismo vegetal. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Cortés-Eslava J., Gómez-Arroyo S. y Villalobos-Pietrini R. (1994). Efecto mutagénico de insecticidas organofosforados activados por el metabolismo vegetal. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 10, 116 (Resumen).
- Cuello S. (1997). *Atlas Mundial del Medio Ambiente*. Ed. Cultura. Madrid, pp.18-21.
- Davison D. (1960). Meristem initial cells in irradiated roots of *Vicia faba*. *Ann. Bot.* 24, 287-295.
- De Flora S., Bagnasco M. y Zancacchi P. (1991). Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. *Mutat. Res.* 258, 285-320.
- De Marco A., De Simone C., D'Ambrosio C. y Owczarek M. (1999). Buthionine prevents the reduction of the genotoxic activity of maleic hydrazide by soil humic substances in *Vicia faba* seedlings. *Mutat. Res.* 438, 89-95.
- de Serres F. J. (1978). Introduction: utilization of higher plant systems as monitors of environmental mutagens. *Environ. Health Perspect.* 27, 3-6.
- de Serres F.J. (1992). Environmental monitoring for genotoxicity with plant system. *Mutat. Res.* 270, 1-85.
- de Serres F.J. (1994). Environmental monitoring for genotoxicity with plant system. *Mutat. Res.* 310, 1-266.

- Degrassi F. y Macro R. (1982). Micronucleus test in *Vicia faba* tips to detect mutagen damage in fresh-water pollution. *Mutat. Res.* 97, 19-33.
- Degrassi F. y Tanzarella C. (1988). Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: a new assays for the detection of aneuploidy. *Mutat. Res.* 203, 339-345.
- Douglas G. R., Nestmann E. R., Best J. L., Mueller J. C., Lee E. G. H., Stich H. F., San R. H. C., Brouzes R. J. P., Chmelauskas A. L., Paavila H. D. y Walden C. C. (1980). Mutagenic activity in pulp mill effluents. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects* (R. L. Jolley, W. A. Brungs y R. B. Cummings, Eds.) Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI, Vol 3, 865-880 pp.
- Duan Chang Qun., Hu Bi., Jiang Xiao-Hua., Wen Chanan-Hao., Wang Zhenghong. y Wang Ying-Xue. (1999). Genotoxicity of water samples from Dianchi lake detected by the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutat. Res.* 426, 121-125.
- Duijndam W.A.L. y Van Duijn. (1975). The influence of chromatin compactness on the stoichiometry of the Feulgen-Schiff procedure studied in model films.II. Investigations on films containing condensed or swollen chicken erythrocyte nuclei. *J. Histochem. Cytochem.* 23, 891-900.
- Evans H. J. y Scott D. (1964). Influences of DNA synthesis on the production of chromatid aberration by X-ray and maleic hydrazine in *Vicia faba*. *Genetics* 49, 17-33.
- Evans, H.J. (1974). Effects of ionizing radiation on mammalian chromosomes. En: German J. (Ed) *Chromosomes and cancer*. Wiley, Nueva York, pp. 191-237.
- Evans, H.J. (1997). Historical perspectives on the development of the *in vitro* micronucleus test: a personal view. *Mutat. Res.* 392, 5-10.
- Fernández M., L'Aridon J., Gauthier L. y Zoll-Moreux C. (1993). Amphibian micronucleus test(s): a simple and reliable method for evaluating *in vivo*

- genotoxic effects for freshwater pollutants and radiations. Initial assessment. *Mutat. Res.* 292, 83-99.
- Filipic M., Lovincic D., Erjavec M., Glavic D., Planina P. (1995). Toxic and genotoxic activity of water samples from the river Ljubljana. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 237-244.
- Frackowiak S., Labidi B., Hernández-Verdun D. y Bouteille M. (1986). Preservation of chromosome integrity during micronucleation induced by colchicine in Ptk cells. *Chromosoma* 94, 468-474.
- Galassi J.B., Guzzella M., Mingazzini L., Vigano S., Capri S. y Sora. (1992). Toxicological and chemical characterization of organic micropollutants in river Po waters. (Italy). *Water Res.* 26, 19-27.
- Gesters J.L. y Grant W.F. (1989). A cytogenetic study of factors affecting sister chromatid differentiation in *Vicia faba* and *Hordeum vulgare*. *Cytologia* 54, 523-537.
- Giménez-Martín G. y López-Sáez J.F. (1960). Acción del gama-hexaclorociclohexano sobre la división celular. *Phyton* 14, 61-78.
- Gómez-Arroyo S. (1980). Efectos cromosómicos del tiner y algunos de sus principales componentes en *Vicia faba*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Gómez-Arroyo S. Altamirano M. y Villalobos-Pietrini R. (1981). Sister-Chromatid exchanges induced by some chromium compounds in human lymphocytes *in vivo*. *Mutat. Res.* 90, 425-431.
- Gómez-Arroyo S. y Castillo Ruiz P. (1985). Sister chromatid exchanges induced by thinner in *Vicia faba*. *Contam. Ambient.* 1, 17-23.
- Gómez-Arroyo S. y Villalobos-Pietrini R. (1983). Chromosomal alterations induced by some chromium salts. *Cytologia.* 48, 185-193.
- Gómez-Arroyo S., Baiza A. M., López G. y Villalobos-Pietrini R. (1985). A comparative study of the cytogenetic effects of the insecticides heptachlor, Malathion and methyl parathion in *Vicia faba*. *Contam. Ambient.* 1, 7-16.

- Gómez-Arroyo S., Castillo-Ruiz P. y Villalobos-Pietrini R. (1986). Chromosomal alterations induced in *Vicia faba* by different industrial solvents: thinner, toluene, benzene, n-hexane, n-heptane and ethyl acetate. *Cytologia* 51, 133-142.
- Gómez-Arroyo S., Villagómez M. L. y Villalobos-Pietrini R. (1987). Effects induced by chromium trioxide on root tip chromosomes of *Vicia faba*. *Contam. Ambient.* 3, 55-61.
- Gómez-Arroyo S., Hernández-García A. y Villalobos-Pietrini R. (1988a). Induction of sister chromatid exchange in *Vicia faba* by arsenic-contaminated drinking water. *Mutat. Res.* 208, 219-224.
- Gómez-Arroyo S., Castillo-Ruiz P., Cortés-Eslava J. y Villalobos-Pietrini R. (1988 b). *Vicia faba* sister chromatid exchanges of the organophosphorus insecticides methyl parathion, dimethoate, oxydemeton methyl, azinphos methyl and phoxim. *Cytologia* 53, 627-634.
- Gómez-Arroyo S. y Villalobos-Pietrini, R. (1995). Chromosomal alteration and sister chromatid exchanges in *Vicia faba* as genetic monitor of environmental pollutants. En: *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change*, Butterwoth F., Corkum L.D. y Gúzman-Rincón J.(Eds.), Plenum Press, Nueva York, pp. 95-113.
- Gómez-Arroyo S., Armienta M. A., Cortés-Eslava J. y Villalobos-Pietrini R. (1997). Sister chromatid exchanges in *Vicia faba* induced by arsenic-contaminated drinking water from Zimapán, Hidalgo, México. *Mutat. Res.* 349, 1-7.
- Gómez-Arroyo S., Cortés-Eslava J., Bedolla-Casino R M., Villalobos-Pietrini R., Calderón-Segura M. E., y Ramírez-Delgado Y. (2001). Sister chromatid exchanges induced by heavy metals in *Vicia faba*. *Biología Plantarum* 44, 591-594.
- Gopalan H. N. B. (1999). Ecosystem health and human well being: the mission of the international programme on plant bioassays. *Mutat. Res.* 426, 99-102.

- Gordon J. S., Bell G.I., Martinson H.C. y Rutter W.J. (1976). Selective interaction of 5' bromodeoxyuridine substituted DNA with different chromosomal proteins. *Biochemistry* 15, 4778-4786.
- Grant W. F. (1982). Plant mutagen assays based upon chromosome mutations. En: *Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Plant Biology*, Vol. I, Klekowsky, E.J. (Ed.), Praeger, Nueva York, pp. 1-24.
- Grant W. F. (1994). The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.* 310, 175-185.
- Grant W. F. (1999). Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations-a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. (1999). *Mutat. Res.* 426, 107-112.
- Grant W. F., Lee H. G., Logan D. M. y Salamone M. F. (1992). The use for *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the *in situ* detection of mutagens in an aquatic environment. *Mutat. Res.* 270, 53-64.
- Grifoll M., Solanas A. M. y Bayona J. M. (1992). Bioassays-directed chemical characterization of genotoxic agents in the dissolved and particulate water phases of the Besos and Llobregat Rivers (Barcelona, Spain). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23, 19-25.
- Grover I. S. y Kaur S. (1999). Genotoxicity wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutat. Res.* 426, 183-188.
- Gryffiths J. S. (1995). *Genética*. 5a. ed. Interamericana. 1850 p.p.
- Guerrero C. (1996). Determinación de la genotoxicidad de ostiones contaminados de la Laguna de Mancha, Veracruz y de Términos, Campeche en *Drosophila melanogaster* y *Salmonella typhimurium*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Hansen, A.M. y M. van Afferden (2001). Toxic substances sources, accumulation, and dynamics. En: *The Lerma-Chapala Watershed: evaluation*

- and management*. A.M. Hansen and M. van Afferden. (Eds.). Ch. 4: 95-121 Kluwer Academic/Plenum Publishers. London.
- Heddle J. A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., Vanparys, Ph., MacGregor, A. (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Mol. Mutagen.* 18, 277-29.
- Heiner R. E. (1971). Alterations in the nuclear cycle, mitotic index and chromosomes of *Vicia faba* as effected by diethyl sulfate. *Mutat. Res.* 12, 249-254.
- Herich R. (1965). The effect of cobal on the structure of chromosomes and on the mitosis. *Chromosoma* 17, 194-198.
- Houk V. S. y De Marini D.M. (1988). Use of the microscreen phage induction assay to assess the genotoxicity of 14 hazardous industrial wastes. *Environ. Mol. Mutagen.* 11, 13-29.
- Houk V. S. (1992). The genotoxicity of industrial wastes and effluents. A review. *Mutat. Res.* 277, 91-138..
- Ishii Y. y Bender M.A. (1980). Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light induced sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 79, 19-32.
- Jaylet A., Gauthier L. y Fernández, M. (1989). Detection of mutagenicity in drinking water using a micronucleus test in newt larvae. *Mutagenesis* 2, 211-214.
- Ji, Q., Yang, H. y Zhang, X. (1999). *Vicia* root-micronuclei assays on the clastogenicity of water samples from the Kui River near Xuzhou city, People's Republic of China. *Mutat. Res.* 426, 133-135.
- Juárez-Santacruz L., Valencia-Quintana R., Sánchez-Alarcón J., Villalobos-Pietrini R. y Gómez-Arroyo S. (1994). *Vicia faba* como monitor de contaminates ambientales con capacidad clastogénica. *Rev. Int. Contam. Ambient. Sup. 2*. Vol. 10, 110. (Resumen).

- Kanaya N., Gill B.S., Grover I.S., Murin A., Osiecka R., Sandhu S.S. y Andersson H.C. (1994). *Vicia faba* chromosomal aberration assays. *Mutat. Res.* 310, 231-247.
- Kato H. (1977). Spontaneous and induced sister chromatid exchanges as revealed by the BrdU-labelling method. *Int. Rev. Cytol.* 49, 55-97.
- Kato H. (1980). Evidence that the replication point is the site of sister chromatid exchange. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2, 67-77.
- Kihlman B.A. (1966). *Action of Chemicals on Dividing Cells*. Prentice Hall, Nueva Jersey,, 260 pp.
- Kihlman B.A. (1971). Roots tips for studying the effects of chemicals on chromosomes. En: *Chemical Mutagens, Principles and methods for their Detection*. Vol. 2. Hollaender (Ed.). Plenum Press, Nueva York, pp. 489-514.
- Kihlman B. A. y Kronborg D. (1975). Roots tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 31, 401-412.
- Kihlman B. A., Natarajan A. T. y Andersson H. C. (1978). Use of the 5-bromodeoxyuridine-labelling technique for exploring mechanisms involved in the formation of chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 52, 181-198.
- Kihlman B. A. y Andersson H. C. (1982). Sister chromatid exchanges in plant. En: *Sister Chromatid Exchanges*. Wolff S. (Ed.). Wiley, Nueva York, pp. 243-265.
- Kihlman B. A. y Andersson H. C. (1984). Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. En: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. Kilbey B. J., Legator M., Nichols W. y Ramel C. (Ed). Elsevier. Amsterdam. pp. 531-554.
- Kira S., Hayatsu H., Okata M. (1989). Detection of mutagenicity in mussels and their ambient water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 583-589.

- Knasmüller S., Gottmann E., Steinkellner H., Fomi, A., Pickl C., Paschke A., Göd R., Kundi M. (1998 a). Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soil with plant bioassays. *Mutat. Res.* 420, 37-48.
- Knasmüller S., Helma C., Eckl P.M., Gottmann E., Steinkellner H., Kassie F., Haider T., Parzefall W. y Schulte-Hermann R. (1998 b). Investigations on genotoxic effects of ground water from the Mitterndorfer Senke and from the vicinity of Wiener Neustadt; Wien. *Klin. Wochenschr.* 110, 824-833.
- Krepnisky A. B. y Heddle J. A. (1983). Micronuclei as a rapid and inexpensive measure of radiation-induced chromosomal aberrations. En: *Radiation-Induced Chromosome Damage in Man*. T. Ishihara and M. S. Sasaki. (Eds.) Alan R. Liss, New York, USA, pp. 103-109.
- Kusamram W. R., Wakabayashi K., Oguri A., Tepsuwan A., Nagao M. y Sugimura T. (1994). Mutagenicities of Bangkok and Tokyo river waters. *Mutat. Res.* 325, 99-104.
- Latt S. A. (1974). Sister chromatid exchanges, indices of human chromosomes damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 71, 3162-3166.
- Latt S. A. (1981). Sister chromatid exchange formation. *Annu. Rev. Genet.* 15, 11-55.
- Lee E. G. H., Mueller J. C., Walden C. C. y Stich H. (1981). Mutagenic properties of pulp mill effluents. *Pulp. Pap. Can.* 82, 1-6.
- Levan A. (1992). The effect of colchicine on root mitosis of *Allium*, *Hereditas.* 24, 471-486.
- Lewin B. (1994). Cells are organized into compartments. En: *Genes V*. Ed. Oxford University, Oxford.
- Lin G., (1987). Plant bioassays for environmental mutagen monitoring. *Environ. Sci.* 8, 78-81.

- Liu Q., Jiao Q.C., Hung X.M., Cui S.Q., Yao G.H., Zing Z.R., Zhao H.K. y Wang N.Y. (1999). Genotoxicity of drinking water from Chao Lake. *Environ. Res.* 80, 127-131.
- Loper J. C. (1980). Mutagenic effect of organic compound in drinking water. *Mutat. Res.* 76, 241-268.
- López-Rosales G. (1980). Efectos inducidos por el alcohol metílico en los cromosomas de la células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Lugo-De la Fuente J., Hernández S. G. y Marín L. E. (2000). Heavy metal concentration in the sediments of the Upper Lerma Basin, México. En *Aquatic Ecosystem of México*. (Eds.). Backhuys, Pub., Holanda. M. Munawar., Lawrence S. G. Munawar I. F. y Malley D. F. pp. 15-27.
- Ma Te-H. (1982). *Vicia* cytogenetic tests for environmental mutagens. A report of the U. S. environmental protection agency Gene-Tox program. *Mutat. Res.* 99, 257- 271.
- Ma T. H. (1994). Application of quick and simple plant bioassays to assess the genotoxicity of environmental pollutants-detection of potential health hazards of air, water and soil contaminants. En: *Proceedings of 1994 EUROTOX Congress* G. H. Degen, J.P. Seiler, P. Bentley (Eds.), Springer. 420-433.
- Ma T. H. (1999a). The International Program on Plant Bioassays Collaborative Studies with Plant Systems. Preface. *Mutat. Res.* 426, 97-98.
- Ma T. H. (1999b). The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. *Mutat. Res.* 426, 103- 106.
- Ma T. H., Xu Z., Xu C., McConnell F., Rabago E. V., Arreola G.A. y Zhang H. (1995). The improved *Allium* / *Vicia* root tip micronucleus assays for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat. Res.* 334,185-195.

- Ma T. H., Grant W.F., de Serres F.J. (1997). The genotoxicity monitoring of the air, water and soil-a preliminary report of the International Programm on Plant Bioassays (IPPB). *Mutat. Res.* 379, (Suppl. 1) S99.
- Marshak A. (1937). The effect of X-rays on chromosomes in mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 23, 362-369.
- Martín del Campo S. M. G. (2002). Aplicación de lodos residuales en el cultivo de haba (*Vicia faba*) como acondicionadores en el suelo agrícola del Valle de Toluca. Tesis de Maestría. Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de México.
- Maruoka S. y Yamanka S. (1982). Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* tester strains of XAD-2 ether extract recovered from Katsura River water in Kyoto City and its fractions. *Mutat. Res.* 102, 13-16.
- Maruoka S. Yamanka S. y Yamamoto Y. (1985). Mutagenic activity in organic concentrate from Nishitakase River water in Kyoto City, and its fractions separated by using liquid-liquid fractionation and thin layer chromatography. *Water Res.* 19, 249-256.
- Matter B. y Schmid W. (1971). Tremimon-induced chromosomal damage in bone marrow cells of six mammalian species evaluated by the micronucleus test. *Mutat. Res.* 12, 417-425.
- Matter B.E. y Grauwieeler J. (1974). Micronuclei in mouse bone-marrow cells. A simple *in vitro* model for the evaluation of drug-induced chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 51, 134-141.
- Miao M., Fu R., Yang D. y Zheng L. (1999). *Vicia faba* micronucleus assay on the clastogenicity of water samples from the Xiaoqing River in Shandong province of the People's Republic of China. *Mutat. Res.* 426, 143-145.
- Minissi S. y Lombi E. (1997). Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. *Mutat. Res.* 393, 17-21.
- Mitchison A. (1988). Reorganization of microtubules and their role in mitosis. *Review. Ann. Rev. Cell. Biol.* 4, 527-550.

- Moller M., Landmark L. H., Bjorseth A. y Renberg L. (1984). Characterization of industrial aqueous discharges by TLC/Ames assays. *Chemosphere*. 13, 873-879.
- Monarca S., Feretti D., Zanardini A., Moretti M., Villarini M., Spiegelhalder B., Zerbini I., Gelatti U. y Lebbolo E. (2001). Monitoring airborne genotoxicants in the rubber industry using genotoxicity test and chemical analyses. *Mutat. Res.* 490,159-169.
- Montes de Oca J. R., Velásquez O. V. y Castañeda R. A. (1993a). Niveles de plomo en el pelo de bovino criollo, que pastorean durante la época de lluvia, en la Laguna del Valle de Lerma, Estado de México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 9, 32 (Resumen).
- Montes de Oca J. R., Velásquez O. V., Silva A. P. y Álvarez G. (1993b). Niveles de plomo, cromo, cadmio y zinc en la leche de bovino criollo, bajo condiciones de pastoreo, en la Laguna del Valle de Lerma, Estado de México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 9, 34 (Resumen).
- Moreno S. A. R. (1991). Ecología, Contaminación y Salud. *Información Científica y Tecnológica* 13, 31-36.
- Morgan W. F. y Cleaver J. E. (1982). 3-amine benzamide synergistically increases sister chromatid exchanges in cells exposed to methane sulfonate but no to ultraviolet lighth. *Mutat. Res.* 104, 361-366.
- Morquecho C. A. (1997). Distribución de metales pesados en el sistema sedimento-suelo de la Presa "José Antonio Alzate", Estado de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Nakanishi Y. y Schneider E. L. (1979). Mutagenic activities of metal compounds in bacteria. *Mutat. Res.* 31, 185-189.
- Natarajan A. T. y Obe G. (1978). Molecular mechanisms involved in production of chromosomal aberrations. I. Utilization of *Neurospora* endonuclease for the study of aberration production in G₂ stage of the cell cycle. *Mutat. Res.* 52,137-149.

- Navashin M. (1931). A preliminary report on some chromosome alterations by X-rays in *Crepis*. *Am. Nat.* 65, 243-252.
- Nicoloff H. y Gecheff K. (1976). Methods of scoring induced chromosome structural changes in barley. *Mutat. Res.* 34,233-244.
- Ohe T. (1997). Quantification of mutagenis/carcinogenis heterocyclic amines, MeIQx, Trp-P-1, Trp-P-2, contributing highly to genotoxicity of river water. *Mutat. Res.* 393, 73-79.
- Oikawa H. I., Thoda H., Kanai M., Miwa M. y Sugimura T. (1980). Inhibitors of poli (adenosine diphosphate ribose), polymerase induce sister chromatid exchanges. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 97, 1311-1316.
- Painter R. B. (1980). A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.* 70, 337-341.
- Palatti F. (1993). Mechanism of induction of chromosomal aberrations by inhibitors of DNA topoisomerases. *Environ. Mol. Mutat.* 22, 275-277.
- Paranjpe M. G., Chandra A.M.S., Qualls C.W., Mc-Murry S.T., Rohrer M.D., Whaley M.M., Lochmiller R.L. y Mcbee K. (1994). Fluorosis in a wild cotton rat (*Sigmodon hispidus*) population inhabiting a petrochemical waste site. *Toxicol. Pathol.* 22, 569-578.
- Park J. H., Lee B. J., Lee S. K., Kim K., Lee K. H., Che J. H., Kang K. S. y Lee Y. S. (2000). Genotoxicity of drinking water from three Korean cities. *Mutat. Res.* 466, 173-178.
- Parry J. M., Tweasts D. J. y Al-Mossawi M. A. J. (1976). Monitoring the marine environment for mutagens. *Nature* 264,538-540.
- Pérez-Alzola L. P. y Santos M.J. (1997). *In vitro* genotoxic evaluation of conventional bleached and biobleached softwood pulp mill effluents. *Mutat. Res.* 395, 107-112.
- Perry P. y Evans H. J. (1975). Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*. (Londres) 258, 121-125.

- Pfeiffer P., Goedecke W. y Obe G. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*. 15, 289-302.
- Rainaldi R. y Mariani, T. (1982). The distribution of induced sister-chromatid exchanges: a tool for identifying agents directly interacting with DNA. *Mutat. Res.* 103, 333-337.
- Rainbow P. D., Phillips J. H y Depledge M. H. (1990). The significance of trace metals concentrations in marine invertebrates. A need for Laboratory investigation of Accumulation Strategies. *Mar. Pollut. Bull.* 21, 321-324.
- Ramanna M. S. y Natarajan A. T. (1966). Chromosome breakage induced by alkyl-alkane-sulfonates under different treatment conditions. *Chromosoma* 18, 44-59.
- Read J. (1959). *Radiation Biology of Vicia faba in Relation to the General Problem*. C.C.Thomas. Springfield, II.
- Rehana Z., Malik A., Ahmad M. (1996). Genotoxicity of the Ganges water at Narora (U.P.), India. *Mutat. Res.* 367,187-193.
- Rieger R. y Michaelis A. (1967). Die chromosome mutation. En: Gustav. Fischer, Jena 7-190.
- Riley H. P. (1936). The effect of X-rays on the chromosomes of *Tradescantia gigantea*. *Cytologia* 7, 131-142.
- Rodríguez S. A., Ávila-Pérez P. y Velásquez-Olvera, L. (2000). Effects on the zooplankton community of pollutants disposal into the "José Antonio Alzate" dam in the State of México, México. Memoria del First International Symposium on the Lerma-Chapala Basin, pp. 75 (Resumen).
- Rodríguez-Ariza A. N., Abril J. I., Navas G., Dorado J., López B. y Pueyo C. (1992). Metal mutagenicity and biochemical studies on bivalve mollusks from Spanish coast. *Environ. Mol. Mutagen.* 19, 112-124.
- Romero P. T. (1984). Intercambio de cromátidas hermanas inducido por tiner en *Vicia faba*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.

- Royal Swedish Academy of Sciences. (1973). Evaluation of genetic risks of environmental chemicals. *Ambio*. Special Report. No. 3
- Sakamoto H., Ohe T. y Hayatsu H. (1996). Evaluation of blue-rayon hanging, and XAD-resin column techniques for concentrating mutagens from two Japanese rivers. *Mutat. Res.* 371, 79-85.
- Sandberg A. A. (1982). Sister chromatid exchange in human states. En *Sister chromatid exchange*: Sandberg A. A. (Ed.). Liss, Nueva York, pp 619-651.
- Schmid W. (1973). Chemical mutagen testing on *in vivo* somatic mammalian cells. *Agents and Actions* 3, 77-85.
- Schmid W. (1975). The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31, 9-15.
- Schriever-Schwemmer G. y Adler I.D. (1993). Pitfalls in classification of micronuclei. 23rd Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society. Barcelona, September 27-October 2, (Resumen).
- Schriever-Schwemmer G. y Adler I. D. (1994). Differentiation of micronuclei in mouse bone marrow cells: a comparison between CREST staining fluorescent *in situ* hybridization with centromeric and telomeric DNA probes. *Mutagenesis* 9, 333-340.
- Schubert I. y Rieger R. (1981). Sister chromatid exchanges and heterochromatin. *Hum. Genet.* 57, 119-130.
- Schwartzman J. B. (1987). Sister-chromatid exchanges in higher plant cells: past and perspectives. *Mutat. Res.* 181, 127-145.
- Secretaría de Recursos Hidráulicos (SRH). Comisión Estatal para la Recuperación de la Cuenca Alta del Río Lerma. Comisión Nacional del Agua (1990). Plan para la Recuperación de la Cuenca Alta del Río Lerma, México.
- Shafer D. A. (1977). Replication bypass model of sister chromatid exchanges and implication for Bloom's syndrome and Fanconi's anemia. *Human. Genet.* 39, 177-190.
- Shandhu S. S., de Serres F. J., Gopalan H. N. B., Grant W. F., Veleminsky J. y Becking G. C. (1994a). International program on chemical safety's

- collaborative study on plant systems to detect genotoxic effects of environmental chemicals: Introduction and study design. *Mutat. Res.* 310, 169-173.
- Shandhu S. S., de Serres F. J., Gopalan H. N. B., Grant W. F., Veleminsky J. y Becking G. C. (1994b). International program on chemical safety's collaborative study on plant systems to detect genotoxic effects of environmental chemicals: result and recommendations. *Mutat. Res.* 310, 257-263.
- Shugart L. R. y Theodorakis C. (1994). Environmental genotoxicity. Probing the underlying mechanisms. *Environ. Health Perspect.* 102, 13-17.
- Stahl Jr. R. G. (1991). The genetic toxicology of organic compounds in natural waters and wastewaters. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 22, 94-125.
- Steinkellner H., Mun-Sik K., Helma C., Ecker S., Ma T.H., Horak O., Kundi M. y Knasmüller S. (1998). Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. *Environ. Mol. Mutagen.* 31, 183-191.
- Steinkellner H., Kassi F., Knasmüller S. (1999). *Tradescantia*-micronucleus assays for the assessment of the clastogenicity of Austrian water. *Mutat. Res.* 426, 113-116.
- Stich H. F. y San R. H. C. (1980). International workshop on short-term test for chemical carcinogens. *Genet. Soc. Can. Bull.* 11, 25-28.
- Sundval A., Marklund H. y Rannug U. (1984). The mutagenicity on *Salmonella thryphimurium* of nitrobenzoic acids and nitrotoluenes. *Mutat. Res.* 137, 51-78.
- Taylor J. H. (1958). Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes. *Genetics* 43, 515-529.
- Tempelaar M. J., de Both M. T. J. y Versteegh J. E. G. (1982). Measurement of SCE frequencies in plants: a simple Fulgen-staining procedure for *Vicia faba*. *Mutat. Res.* 103, 321-326.
- Therman E. y Susman H. (1992). *Human chromosomes. Structure, behavior and effects*. 3a. ed. Nueva York, USA. 240 p.

- Thompson E. J. y Perry P. (1988). The identification of micronucleated chromosomes; a possible assays for aneuploidy. *Mutagenesis* 3,415-418.
- Torres de Lemus C. y Erdtmann B. (2000). Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. *Mutat. Res.* 467, 1-9.
- U.S. EPA Publication. (1980). Current status of bioassays in genetic toxicology (Gene-Tox), December 3-5, pp. 1-69.
- Umbuzeiro G., Roubicek D., Sánchez P. y Sato M.A. (2001). The *Salmonella* mutagenicity assays in a surface water quality monitoring program based on a 20-year survey. *Mutat. Res.* 492, 119-126.
- Valencia-Centeno V., Ávila-Pérez P., Breña M. y Vázquez O. (2000). Genotoxic activity of water and sediments from "José Antonio Alzate" reservoir, State of México, México. First International Memorias del First Symposium on the Lerma-Chapala Basin, pp. 79. (Resumen).
- Valencia-Quintana R., Gómez-Arroyo S. y Villalobos-Pietrini R. (1993). Cytological effects of some carbamate insecticides. I. Methomyl and Oxamyl in *Vicia faba*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 9, 65-69.
- Valent G. V., Sato M. I., Coelho M. C. y Coimbrao C. A. (1992). Monitoring Sao Pablo State River in Brazil for mutagenic activity using the Ames test. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 67,312-319.
- Valent G. V., Sato M. I., Coelho M. C., Coimbrao C. A. y Sánchez P. S. (1993). Monitoring Sao Paulo state rivers in Brazil for mutagenic activity using the Ames test. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 8, 371-381.
- Vargas V. M. F., Motta V. E. P., Henriques J. A. P. (1993). Mutagenic activity detected by Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat. Res.* 319, 31-45.
- Vargas V. M. F., Guidibino R. R., Jordao C., Henriques J. A. P. (1995). Use of two short-term test to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration/extraction procedures. *Mutat. Res.* 343, 31-51.

- Vázquez M. A. y Moretton J. (1995). Detección de agentes genotóxicos en efluentes de la industria gráfica. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 8, 99-103.
- Venkat J. A., Shami S., Davis K., Nayak M., Plimmer J. R., Pfeil R. y Nair P. P. (1995). Relative genotoxic activities of pesticides evaluated by a modified SOS microplate assays. *Environ. Mol. Mutagen.* 25, 67-76.
- Villalobos-Pietrini R., Flores-Márquez A. R. y Gómez-Arroyo S. (1993). Cytogenetic evaluation of the effects of chromium and detergents in *Vicia faba*. *Cytologia* 58, 41-45.
- Villalobos-Pietrini R., Flores-Márquez A. R. y Gómez-Arroyo S. (1994). Cytogenetic effects in *Vicia faba* of the polluted water from rivers of Tlaxcala hydrological system, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 10, 83-88.
- Villalobos-Pietrini R., Flores-Márquez A.R., Meneses M.A., Tavera L., Balcázar M., López L. y Gómez-Arroyo S. (1999). Genetic effects observed in tetrads of *Tradescantia* induced by radon. *Mutat. Res.* 426, 215-219.
- Wang H. (1999). Clastogenicity of chromium contaminated soil samples evaluated by *Vicia* root-micronucleus assays. *Mutat. Res.* 426, 147-149.
- Wilson G. B., Hawthorne M.E. y Tsou T.M. (1951). Spontaneous and induced variations in mitosis. *J. Hered.* 42, 182-189.
- Wolff S. (1974). Sister chromatid exchanges: the most sensitive mammalian system for determining the effects of mutagenic, carcinogenic. *Expert. Conference Oslo, Noruega* pp. 11-13.
- Wolff S. (1977). Sister chromatid exchange. *Annu. Rev. Genet.* 11, 183-201.
- Wuu K. D. y Grant W. F. (1966). Morphological and somatic chromosomal aberrations induced by pesticides in barley (*Hordeum vulgare*). *Can. J. Genet. Cytol.* 8, 481-501.
- Xing W. (1997). Effects of dNTPs on the SCE frequency in plant root tip cells. *Mutat. Res.* 379, 117-119.

-
- Zakharov , A. F. y Egolina, N. A. (1972). Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. I. BudR-revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes. *Chromosoma* 38, 341-365.
- Zarazúa, O. G., Ávila-Pérez, P., Rosas, P. I. y Tejada, V. S. (2000). Accumulation of copper, zinc, chrome and mercury in *Daphnia pulex* from the "José Antonio Alzate" reservoir, State of México, México. First International Symposium on the Lerma-Chapala Basin, pp. 80.
- Zarazúa O. G. (2002). Determinación de la calidad del agua en un trayecto de la Cuenca Alta del Río Lerma. *Avances*.
- Zeng D. y M. Pi. (1988). Plant root tip micronucleus test on mutagens and the waste water samples from the affluent of factories, *J. Fujian Normal Univ. Nat. Sci. Sect.* 4, 73-77.

10. ANEXOS.

10.1. Figuras.

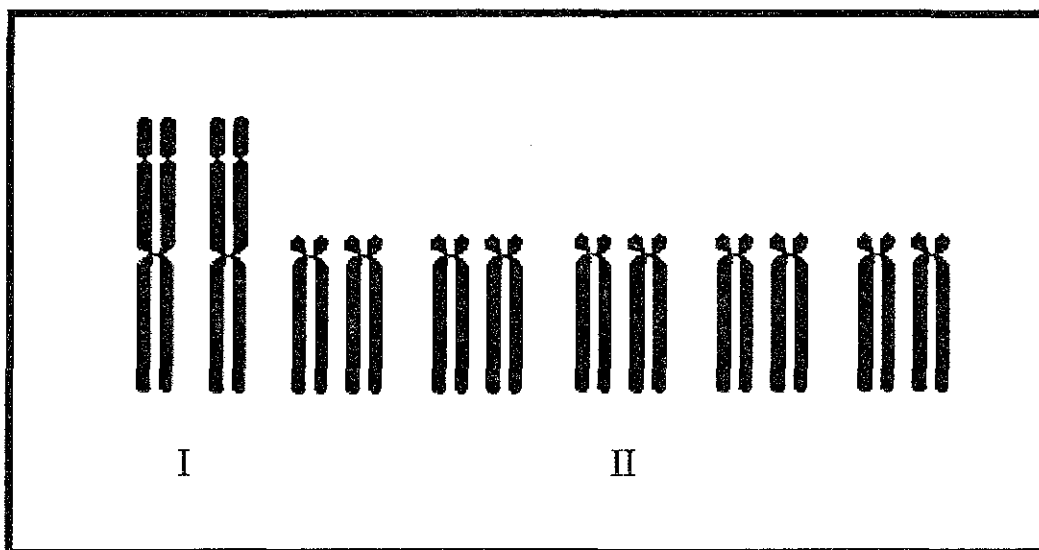


Figura 1. Cromosomas de *Vicia faba*.

- I. Par de cromosomas metacéntricos con satélites.
- II. Cinco pares de cromosomas submetacéntricos

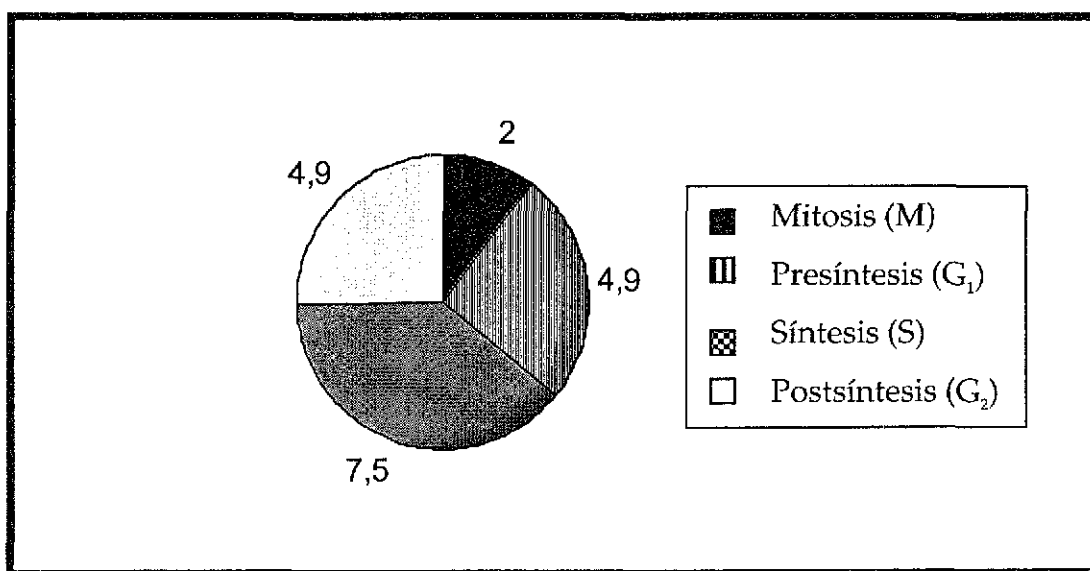


Figura 2. Ciclo celular de *Vicia faba* (tomado de Kihlman, 1966)

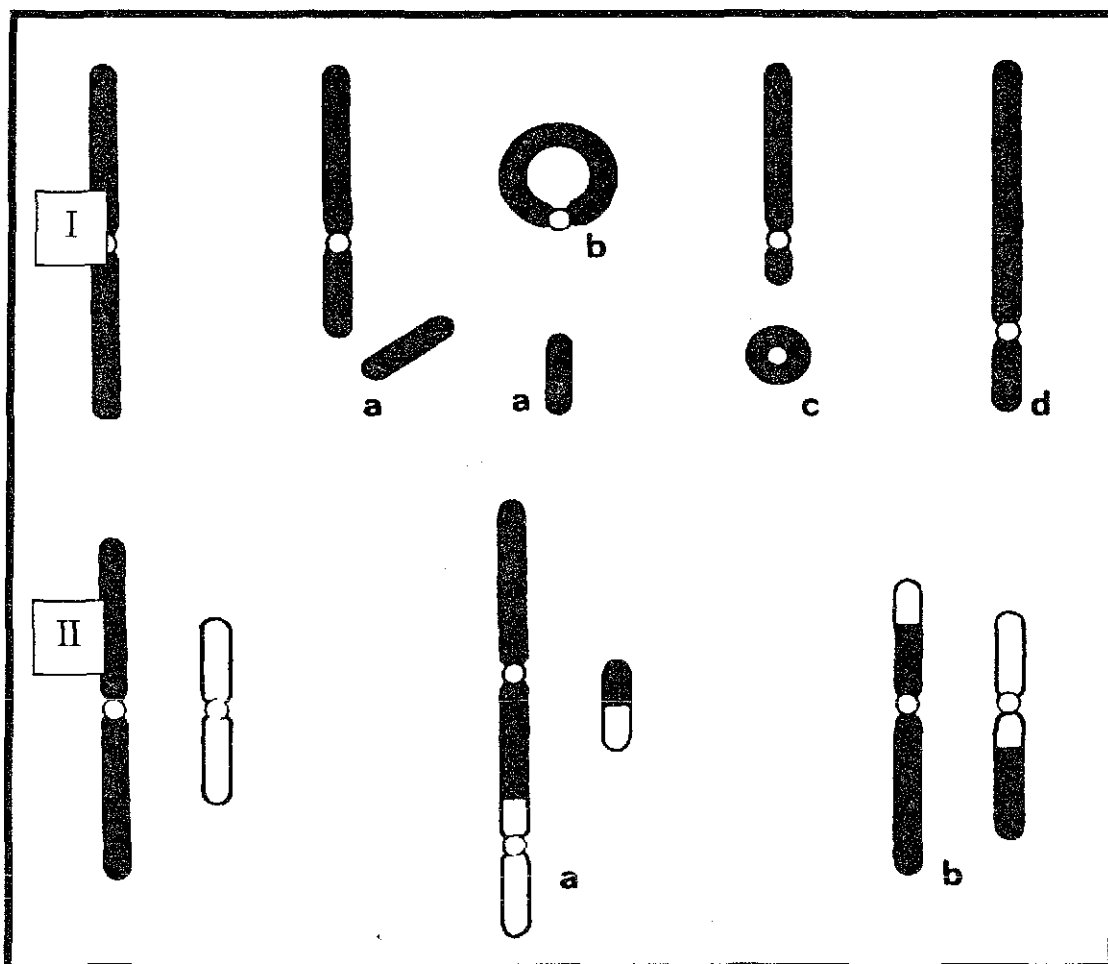


Figura 3. Rompimientos y rearrreglos cromosómicos
(Tomado de Therman y Susman, 1992).

- I. Intracromosómico.
 - a. Fragmentos acéntricos.
 - b. Anillo céntrico.
 - c. Anillo acéntrico.
 - d. Inversión pericéntrica.

- II. Intercromosómicos (entre cromosomas).
 - a. Cromosoma dicéntrico y fragmento acéntrico.
 - b. Traslocación recíproca balanceada.

Tipos de Aberraciones	Intercambio Subcromatídico (intracromosómico)		Aberraciones Cromatídicas					Aberraciones Cromosómicas					
	Tipo-U	Tipo-X	Hueco	Rompimiento	Rompimiento isocromatídico Tipo-SU	Intercambio		Rompimiento	Inter. (asimétrico completo)	Intra (asimétrico completo)			
						Inter. (asimétrico completo)	Intra (asimétrico completo)						
Configuración En Metafase													
Configuración de Anafase													

Figura 4. Principales aberraciones cromosómicas en *Vicia faba* producidas por productos químicos. (Tomado de Kihlman, 1966)

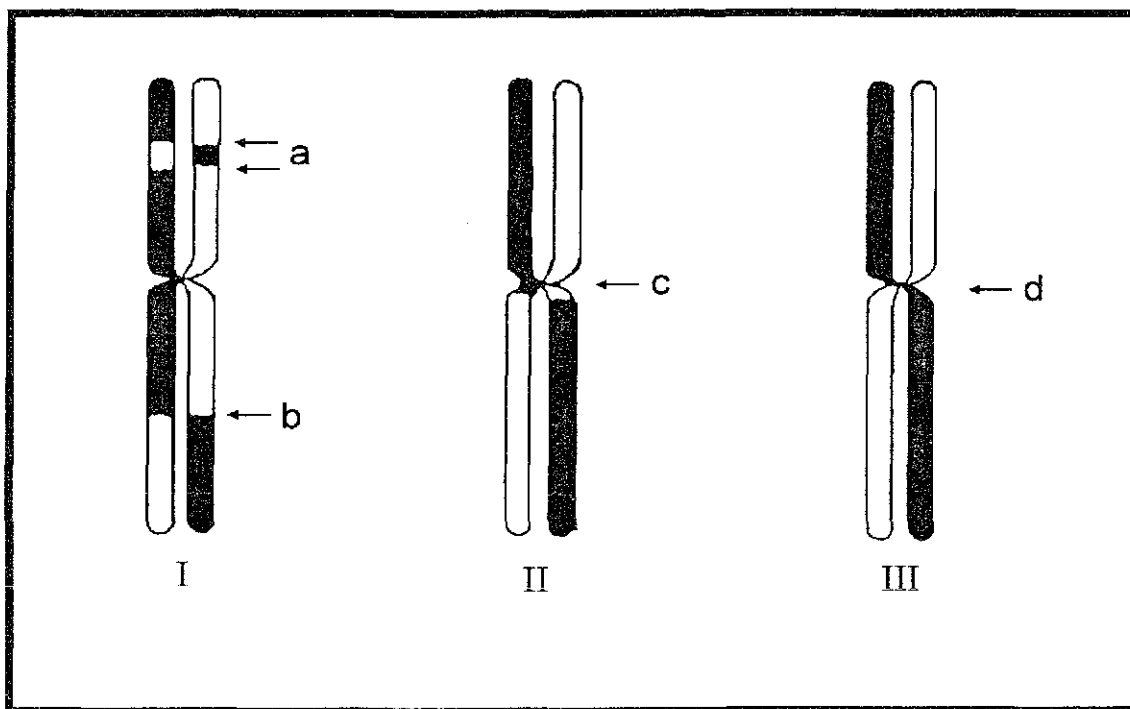


Figura 5. Tipos de intercambios de cromátidas hermanas.

- I. Tres intercambios: (a) intercambio doble o intersticial, (b) intercambio sencillo o terminal.
- II. Un intercambio: (c) intercambio que no incluye centrómero.
- III. Un intercambio: (d) intercambio que incluye las dos cromátidas y el centrómero.

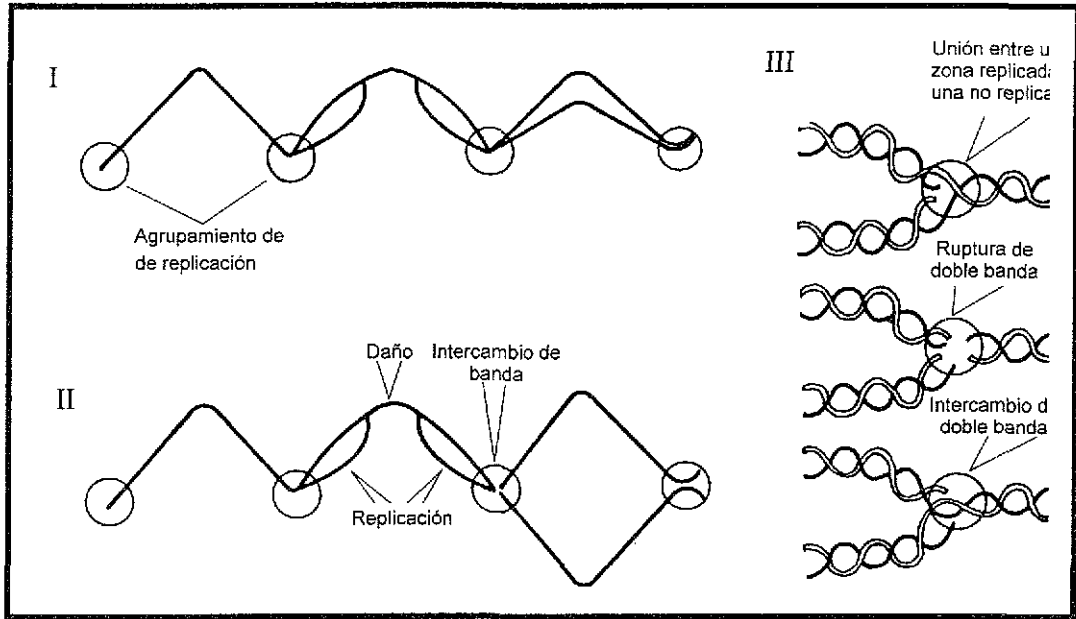


Figura 6. Modelo de Painter (tomado de Painter, 1980).

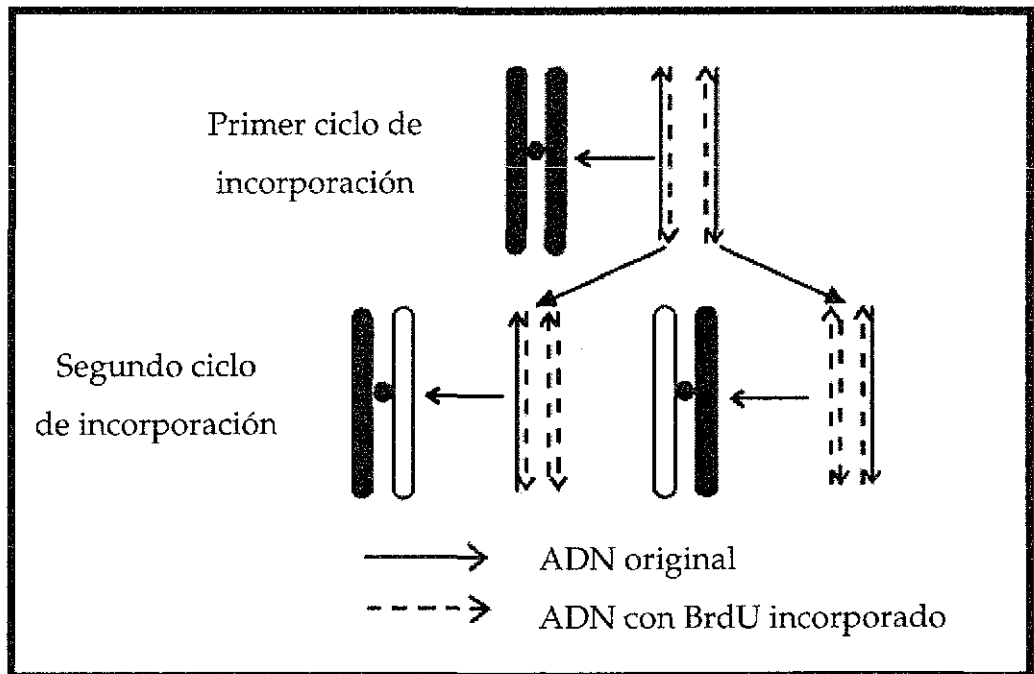


Figura 7. Tinción diferencial de ICH basada en la incorporación de la BdrU tinción con Giemsa (Tomado de Schdvartzman, 1987)

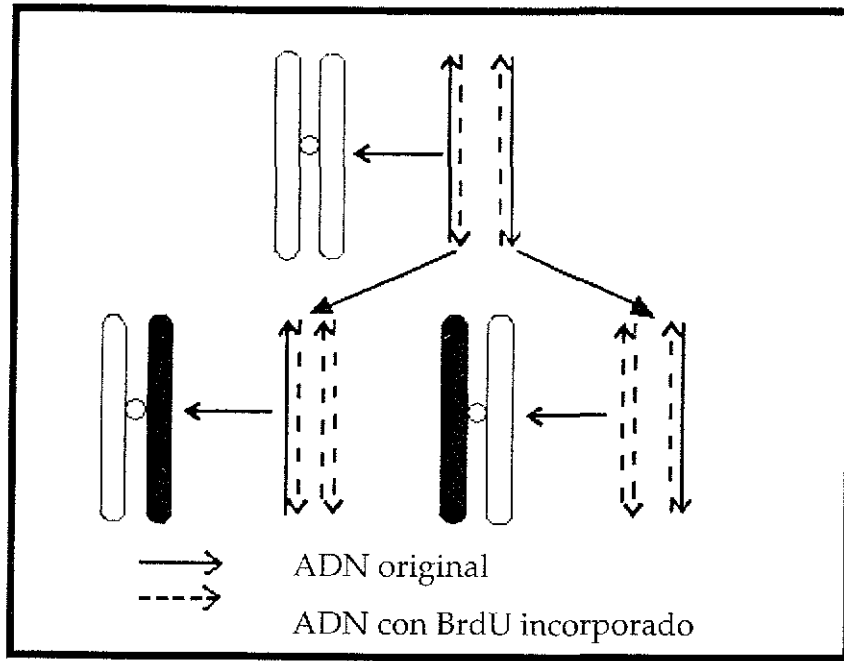


Figura 8. Tinción Diferencial de ICH. Tinción de Feulgen.



Figura 9. Río Lerma.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 10. Río Lerma.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

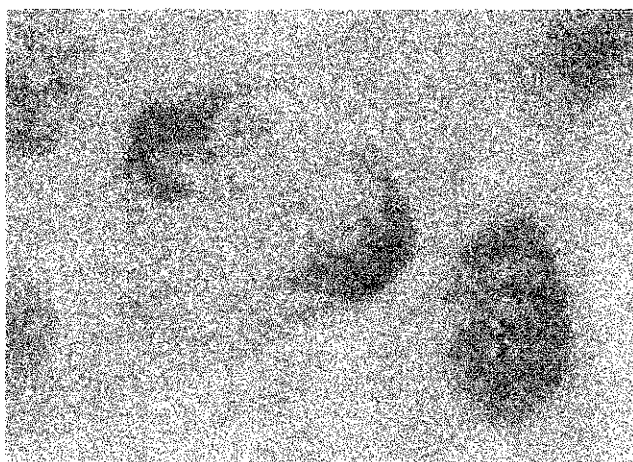


Figura 11. Anafase normal.

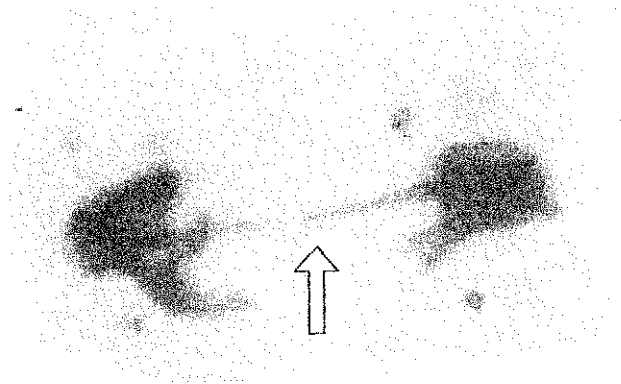


Figura 12. Puente cromatídico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

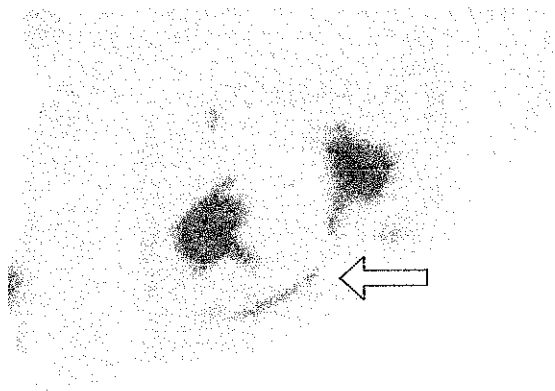


Figura 13. Cromosoma con centr6mero inactivado.

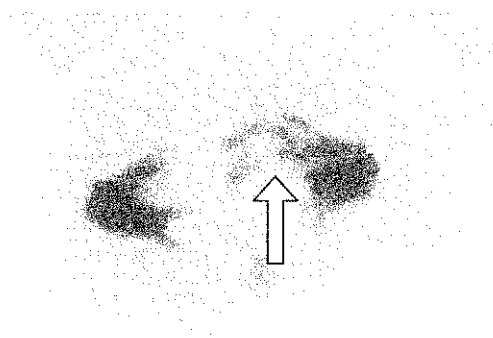


Figura 14. Fragmento e isocromosoma.

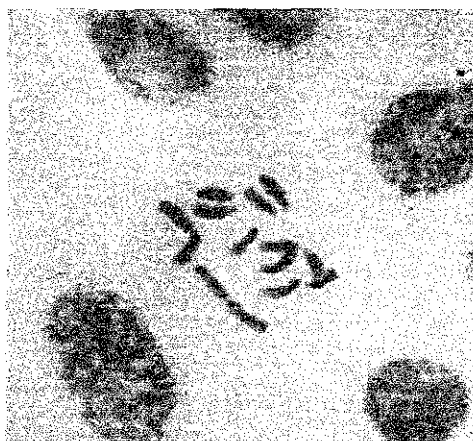


Figura 15. Metafase normal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

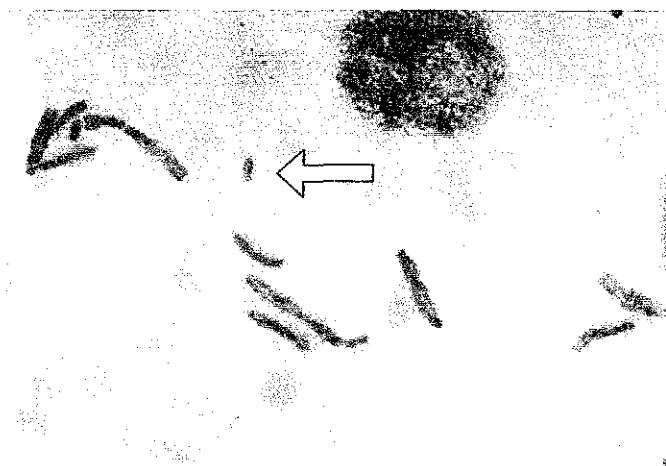


Figura 16. Rompimiento cromosómico.

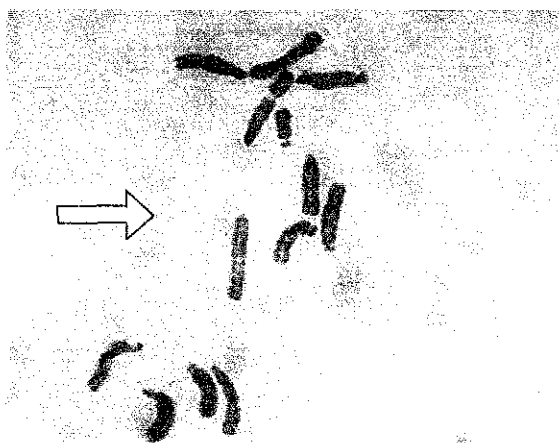


Figura 17. Rompimiento isocromátidico.

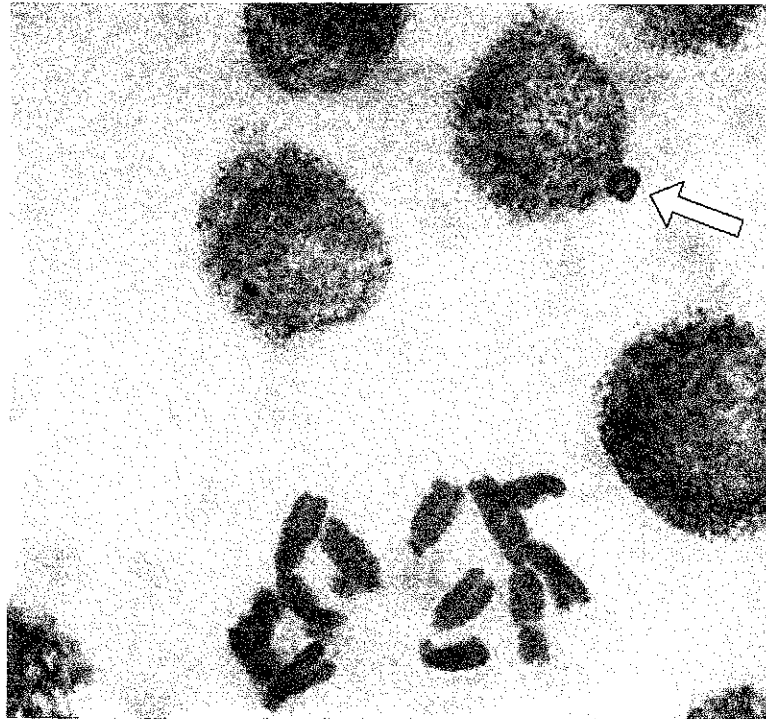


Figura 18. Anillo y rompimiento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

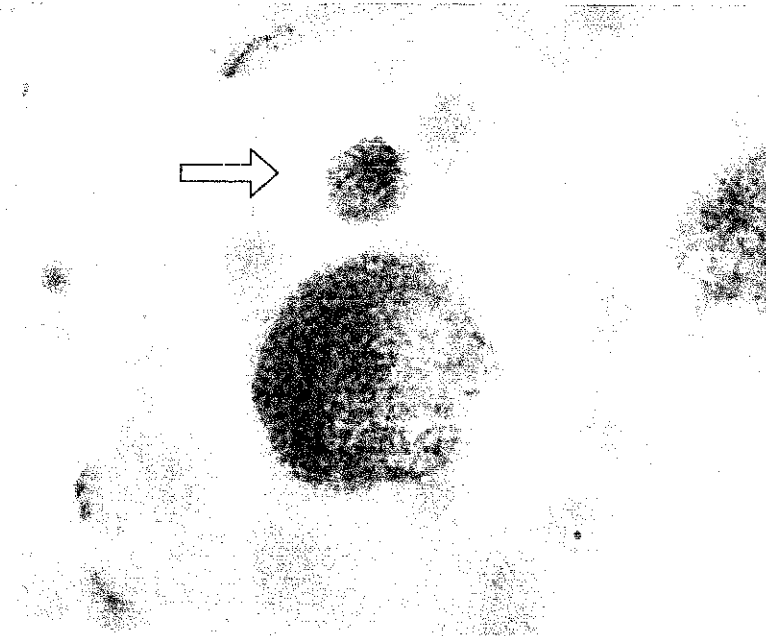
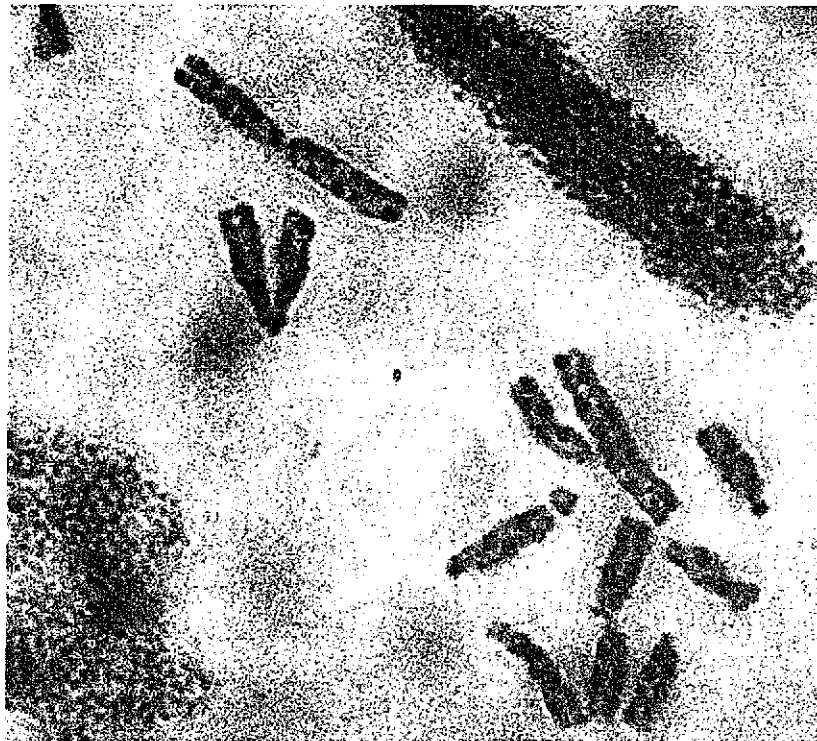


Figura 19. Micronúcleo.

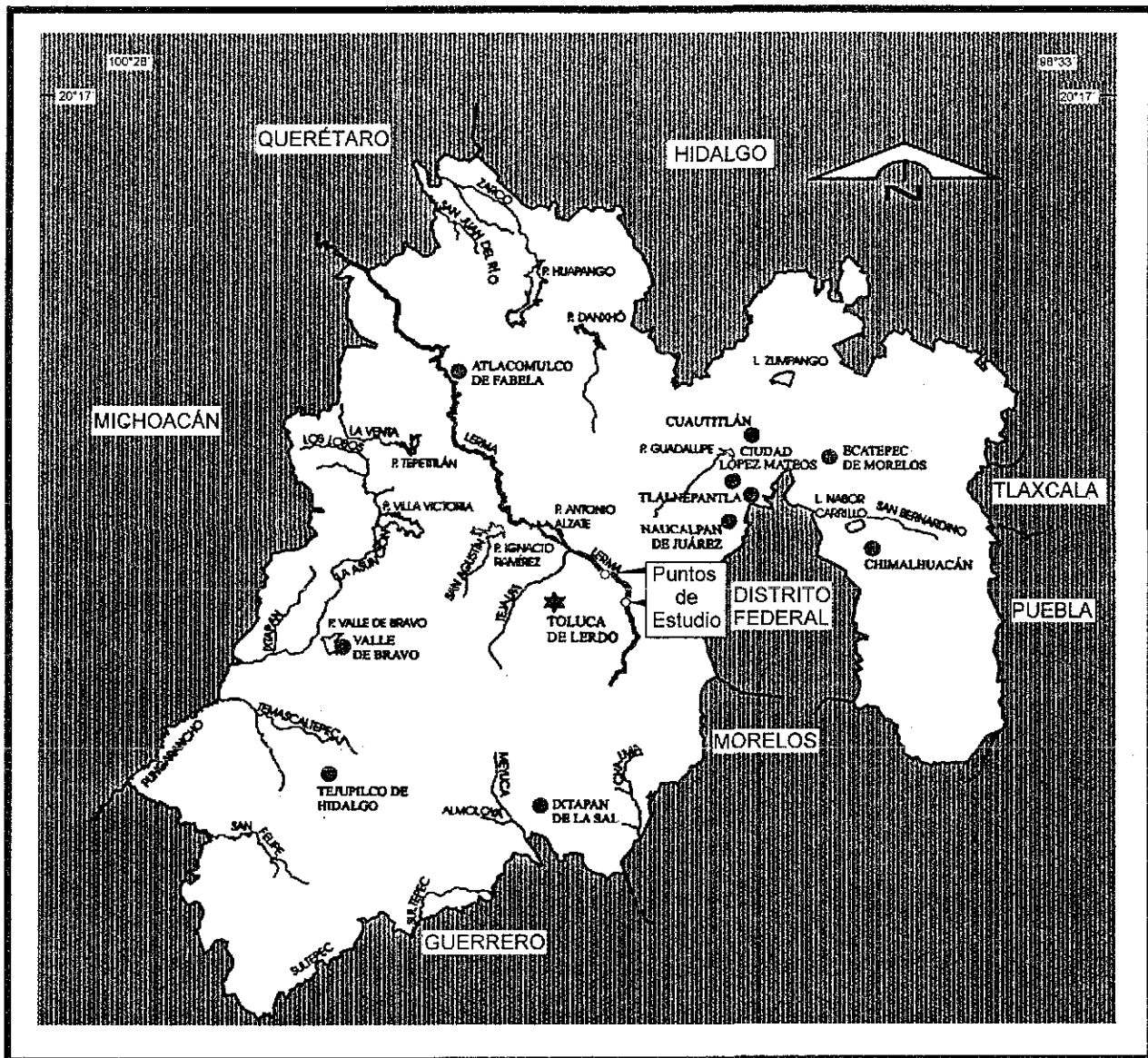


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 20. Intercambio de cromátidas hermanas.

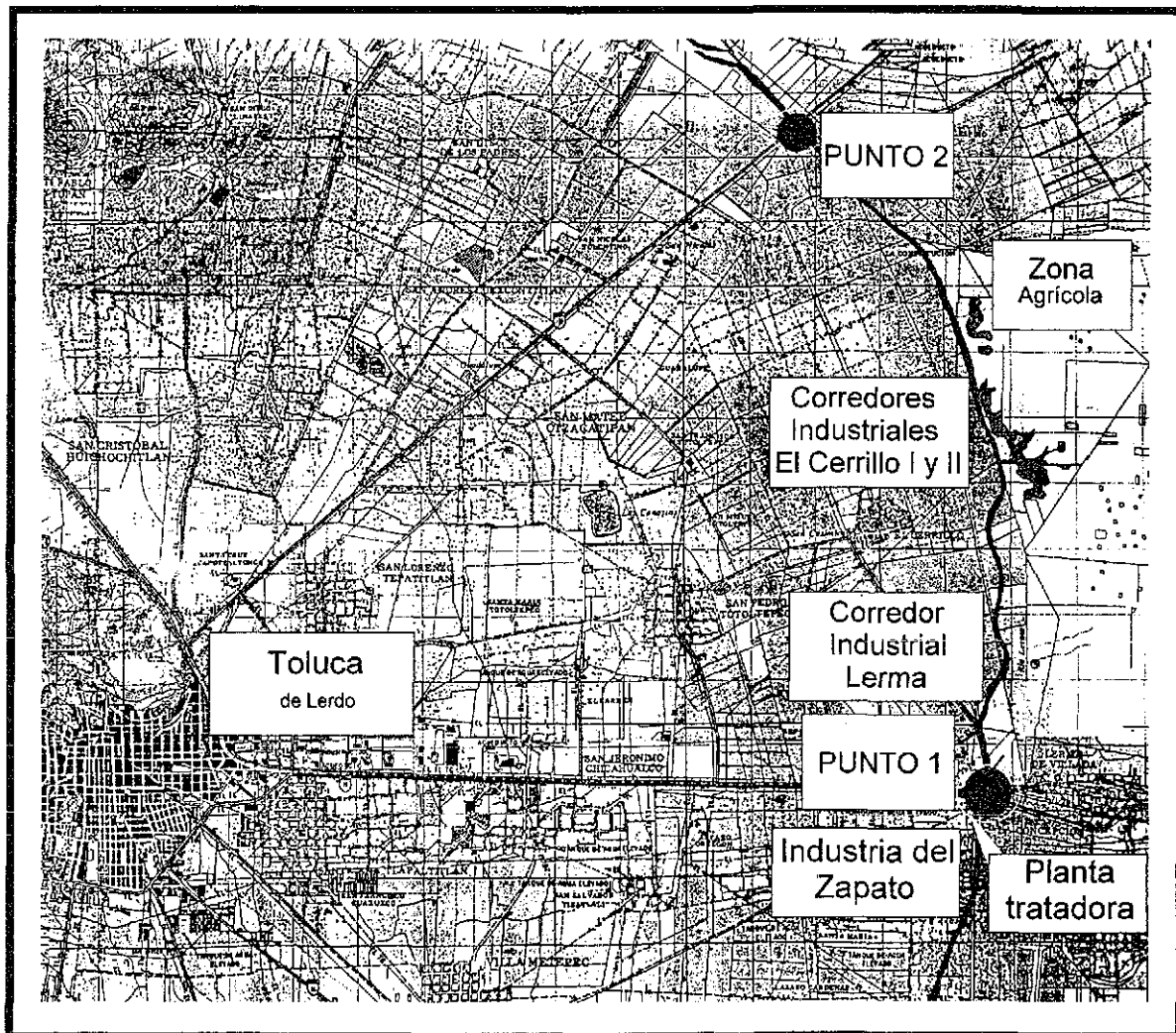
10.2. Mapas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Mapa 1. Localización del Río Lerma en el Estado de México
(Tomado INEGI).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Mapa 2. Localización de los sitios de estudio
(Tomado de la Comisión de Estudios Territoriales del Estado de México)