

U N I V E R S I D A D N A C I O N A L A U T O N O M A D E M E X I C O

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

ESTIMACION DEL EFECTO MUTAGENICO DE UN PESTICIDA
DE AMPLIO USO EN MEXICO MEDIANTE VARIOS SISTEMAS
DE PRUEBA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
RICARDO ORTIZ FREYRE

Dir. de Tesis: I.B.Q. PASCASIO VARGAS CASTILLO

1 9 8 1



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE

Pag.

INTRODUCCION

GENERALIDADES

5

I.- Sistemas de detección de mutágenos
ambientales.

II.- Características de los compuestos
estudiados

MATERIAL Y METODOS

16

1.- Equipo

2.- Reactivos

3.- Material de laboratorio y biológico.

4.- Prueba de Inducción de Mutaciones D₀
minantes Letales en ratones.

5.- Estudio Citogenético en Leucocitos -
humanos.

R E S U L T A D O S	29
1.- Prueba de Inducción de mutaciones <u>Do</u> minantes Letales en ratones.	
2.- Estudio Citogenético.	
a) Exposición a diferentes dosis de Azodrín.	
b) Estudio a diferentes tiempos de - exposición.	
D I S C U S I O N	58
C O N C L U S I O N E S	64
B I B L I O G R A F I A	66

1

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

ra: Por contacto, por ingestión, sistémicos, asfixiantes y polivalentes. (30)

Según el tipo de compuesto activo se subdividen así:

Clorados, como DDT y Eldrín.

Organofosforados, como Parathion, Malathion y Azodrín.

Carbamatos, como Servin y Baygon.

De éstos grupos, el de los clorados ha disminuido su producción en la actualidad, y es el de los organofosforados el que ha tenido gran auge últimamente; a este grupo pertenece el Azodrín, cuyo empleo está muy difundido en México, utilizándose en cultivos como: algodón, tomate, maíz, soya, sorgo, el chile, caña de azúcar, papa, tabaco, las cucurbitáceas, el trigo y los cítricos; todos ellos cultivos de primera necesidad en nuestro país. Este compuesto será el utilizado en el desarrollo de la presente tesis.

Los plaguicidas son utilizados generalmente a dosis bajas y las pruebas realizadas para determinar su grado de toxicidad son casi siempre suficientes en este sentido; empero, recientemente ha surgido la pregunta de si éstos compuestos son capaces de producir daño a nivel genético (esterilidad, abor-

tos espontáneos, malformaciones congénitas, etc) en los animales, el hombre mismo y sus descendientes.

Se hace patente la necesidad de establecer métodos o sistemas de prueba sensibles, confiables y sencillos que sean capaces de proporcionar la información sobre los efectos de los plaguicidas a nivel del material genético. Este es el objetivo principal del presente trabajo.

De las pruebas de mutagenicidad mayormente difundidas podemos mencionar a las siguientes: "La prueba de Ames", El ensayo mediado por el huésped, Prueba del Locus específico, Pruebas utilizando a Drosophila melanogaster, Estudios citogenéticos en mamíferos, tanto "in vivo" como "in vitro" y la Prueba de Inducción de mutaciones Dominantes Letales en ratones.

Los sistemas utilizados serán: Estudio citogenético "in vitro"; y la prueba de Inducción de Mutaciones Dominantes Letales en ratones.

GENERALIDADES

GENERALIDADES

I.- Sistemas de Detección de Mutágenos Ambientales.

Brevemente explicados, los sistemas de detección de mutágenos que más se han difundido son los siguientes:

1) SISTEMAS BACTERIANOS. Posiblemente la prueba más ampliamente utilizada es aquella que emplea cepas de la bacteria Salmonella typhimurium especialmente construidas, esta prueba es frecuentemente señalada como "La Prueba de Ames".

La prueba de Ames utiliza diferentes cepas mutantes de S. typhimurium auxotróficas a histidina, y que dependen de un aporte externo de este aminoácido para crecer.

En presencia de un compuesto mutagénico, estas cepas son capaces de "revertir" su mutación y regresar al tipo silvestre (wild), el cual es capaz de sintetizar histidina.

Dichas cepas tienen mutaciones adicionales en la pared celular, que las hacen permeables a moléculas grandes, lo que incrementa su sensibilidad a esta clase de agentes químicos.

Se han utilizado otras bacterias como Escherichia: coli y algunos sistemas eucarióticos como el hongo Neurospora cra-

ssa y la levadura Sacharomyces cerevisiae.

La popularidad de estas pruebas para los científicos, radica en el hecho de que son las pruebas menos costosas y que requieren mínimas cantidades de espacio y equipo. Por supuesto se necesitan personas altamente especializadas en procedimientos microbiológicos.

Muchos investigadores (5) estiman que estas pruebas a pesar de proporcionar valiosa información sobre el efecto de los compuestos químicos sobre el ADN, no puede ser directamente extrapolada al hombre, ya que difícilmente podemos encontrar muchas semejanzas entre una célula bacteriana y organismos superiores, como un mamífero o el hombre mismo.

2) ENSAYO MEDIADO POR EL HUESPED. En este ensayo, el mamífero huésped durante el tratamiento con un mutágeno químico potencial, es inoculado con un microorganismo indicador en el cual puede medirse fácilmente su frecuencia de mutación.

Es importante notar que el mutágeno y el microorganismo son administrados por diferentes vías. Después de un período de tiempo conveniente, el microorganismo es retirado del ani-

mal y se determina la inducción de mutantes en él. La comparación entre la acción mutagénica en el microorganismo directamente y en el ensayo donde media el huésped, indica si éste puede modificarlo y formar productos mutagénicos como resultado del mamífero.

En esta prueba se han empleado las cepas de Ames, auxotróficas a histidina preferentemente, aunque también se han utilizado cepas del hongo Neurospora crassa en forma limitada.

El ensayo mediado por el huésped es un simple y rápido procedimiento que proporciona información única en la caracterización de agentes mutagénicos, pero presenta el mismo problema que la prueba de Ames, y es su difícil extrapolación de resultados al hombre.

3) DROSOPHILA MELANOGASTER. (mosca de la fruta). El uso de este sistema para estudios de mutagénesis presenta ciertas ventajas:

Son raros los organismos superiores que pueden ser conservados en tan gran número, tan fácil y económicamente como

puede serlo Drosophila. De esta forma, uno puede estudiar muchos tipos de alteraciones genéticas: Dominantes Letales, - Mutaciones Puntuales, Rearreglos Cromosómicos, y Pérdida de los cromosomas X ó Y.

4) PRUEBA DEL LOCUS ESPECIFICO. La prueba de Locus específico en ratones, es un método para detectar y medir velocidades - de mutación en algunos Loci recesivos.

El método básicamente consiste en cruzar ratones tratados y no tratados de tipo silvestre, machos o hembras, con una cepa de ratones homocigota para un número conocido de genes recesivos. Los genes recesivos son tales que rápidamente se expresan como fenotipos visibles en el estado homocigoto.

Si una mutación ha ocurrido en cualquiera de los loci - probados en las células germinales de los animales tratados, será detectada en la descendencia. Si no han ocurrido mutaciones con el tratamiento, la progenie será del tipo silvestre.

La principal desventaja de ésta prueba es que requiere - la producción de gran número de animales y consecuentemente espacio considerable de almacenaje.

glos de sus cromosomas. La incidencia de tales aberraciones cromosómicas puede ser correlacionada con la administración o exposición a mutágenos químicos potenciales.

Los procedimientos citogenéticos han sido también aplicados al estudio de los cromosomas meióticos. Tales procedimientos nos llevan a estudiar cambios cromosómicos dentro - del espermatocito mismo.

Esta es una de las pruebas más eficientes y que proporciona información de mejor calidad, y sobre todo, que puede ser aplicada al hombre sin mayor riesgo que una extracción - de sangre.

6) PRUEBA DE INDUCCION DE MUTACIONES DOMINANTES LETALES EN RATONES. La mutación Dominante Letal es un evento genético - que mata al individuo que la contiene. Esta prueba es un indicador conveniente de daño genético grueso y ha sido empleada ampliamente en mamíferos para medir los efectos de rayos - X y mutágenos químicos. Los datos de este sistema pueden ser apropiadamente extrapolados al hombre, ya que se ha reconocido que muchas enfermedades humanas autosómicas son debidas a

glos de sus cromosomas. La incidencia de tales aberraciones cromosómicas puede ser correlacionada con la administración o exposición a mutágenos químicos potenciales.

Los procedimientos citogenéticos han sido también aplicados al estudio de los cromosomas meióticos. Tales procedimientos nos llevan a estudiar cambios cromosómicos dentro del espermatozoido mismo.

Esta es una de las pruebas más eficientes y que proporciona información de mejor calidad, y sobre todo, que puede ser aplicada al hombre sin mayor riesgo que una extracción de sangre.

6) PRUEBA DE INDUCCION DE MUTACIONES DOMINANTES LETALES EN RATONES. La mutación Dominante Letal es un evento genético que mata al individuo que la contiene. Esta prueba es un indicador conveniente de daño genético grueso y ha sido empleada ampliamente en mamíferos para medir los efectos de rayos X y mutágenos químicos. Los datos de este sistema pueden ser apropiadamente extrapolados al hombre, ya que se ha reconocido que muchas enfermedades humanas autosómicas son debidas a

mutaciones Dominantes Letales.

Las bases genéticas de la Letalidad Dominante son principalmente: la inducción de aberraciones numéricas y estructurales de los cromosomas, tales como traslocaciones, aneuploidias; secuencialmente, ésto puede inducir: pérdida de preimplantación de cigotos no-viables, muerte fetal temprana y esterilidad de la progenie F_1 .

The Advisory Panel on Mutagenicity of Pesticides, y la FDA Advisory Committee on Protocols for Safety Evaluation - (24), han recientemente recomendado que los pesticidas y aditivos de los alimentos, sean rutinariamente estudiados para mutagenicidad en mamíferos, antes de su registro.

Recomiendan asimismo, el empleo de la prueba de Inducción de Mutaciones Dominantes Letales, e indican como puede ser integrada en la práctica toxicológica de rutina.

El ensayo, como clásicamente se describe, consiste en - inocular una sola vez, con una dosis sub-tóxica de la sustancia que se desea probar, a ratones o ratas machos, y cruzarlos con hembras no tratadas por un periodo de tiempo conveniente para asegurar la fertilización, entre 12 y 20 días - después las hembras son disecadas y examinados los úteros en

busca de fetos muertos tempranamente y embriones vivos.

Los efectos mutagénicos son convencionalmente expresados por medio del Índice Mutagénico:

(Embriones muertos/ implantaciones totales)X100.

Considerando que la prueba de Inducción de Mutaciones Dominantes Letales y el Estudio Citogenético "in vitro" - reúnen las mejores características, y nos proporcionan datos directamente aplicables al hombre; serán las utilizadas y estandarizadas en el desarrollo de la presente tesis.

II.- Características de los compuestos.

1) AZODRIN (18, 19, 32, 34, 45)

Insecticida de acción rápida sistémica, estomacal y de contacto, utilizado contra una amplia gama de plagas en una variedad también grande de cultivos. Persistencia de 1 a 2 semanas.

Ha causado fitotoxicidad bajo condiciones de frío intenso en manzanas y algunas variedades de sorgo.

Se trata de un sólido cristalino, miscible en agua, soluble en acetona y etanol, ligeramente soluble en xileno, pero casi insoluble en keroseno y aceites.

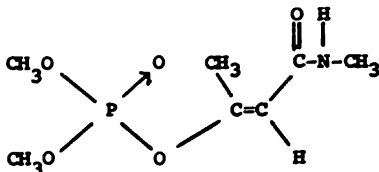
DL aguda para ratones es de 13.23 mg/ Kg.

50

Usos: Efectivo contra una amplia gama de plagas, incluyendo: ácaros, escarabajo comedor de hojas, chinche y orugas.

El nombre químico del azodrin es: Dimetil fosfato de 3-hidroxi-N-metil-cis-crotonamida; por lo tanto pertenece al grupo de los organofosforados, cuyo principal mecanismo de acción es inhibir a la colinesterasa.

Estructura Química:



En México este insecticida es fabricado y distribuido por Química Lucava S.A.; Edo. de Méx. México.

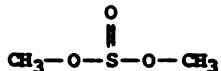
2) METIL METANO SULFONATO (12, 15, 16, 17, 27, 31, 46, 52, 26)

Conocido y potente mutágeno, utilizado para estandarizar muchas de las pruebas de mutagenicidad por muchos de los grupos de investigación.

Pertenece al grupo de los mutágenos alquilantes, que actúan directamente sobre el material genético.

Se reconoce su capacidad de producir aberraciones cromosómicas en células germinales.

Estructura Química:



Punto de ebullición de 202-203°C, soluble en agua y solventes polares.

Fabricado por Eastman Organic Chemicals, Rochester, N.Y.

3) METIL MERCURIO (56, 25, 30)

Sustancia ampliamente difundida en la industria de los colorantes y pinturas, se utiliza para inhibir actividad bacterial y crecimiento de hongos en superficies recién pintadas.

Se ha reportado (25) que el Metil Mercurio produce daño cromosómico en células humanas "in vitro", ésto ha sido confirmado por varios investigadores.

Parece ser que el Metil Mercurio interfiere con el material genético directamente causando rupturas, también se ha reportado que afecta la división celular normal, por interacción con los grupos sulfhidrilo de las proteínas que rodean al ADN.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

MATERIAL Y METODOS

1.- EQUIPO

Microscopio óptico. (Zeiss Jena).

Microscopio estereoscópico.

Centrífuga clínica.

Campana de flujo laminar para cultivos celulares "VECCO".

Equipo de disección.

2.- REACTIVOS

Cloruro de sodio. (Merck).

Metil Metano Sulfonato. (Eastman Organic Chemicals, Rochester, N.Y.)

Azodrín. (química Lucava, Edo. de Méx., Méx.)

Eter etílico. (Merck).

Medio para cultivo celular HAM-F-10. (Gibco, USA).

Suero fetal de ternera. (Biocel, Méx.).

Cloruro de potasio. (Merck).

Alcohol metílico. (Merck).

Acido acético glacial. (Merck).

Metil Mercurio. (Calbiochem, USA).

Heparina sódica grado reactivo. (Sigma Co., USA)

Bicarbonato de sodio. (Merck).

Colorante Giemsa. (Sigma, Méx.).

Colchicina. (Ciba-Geygi).

3.- MATERIAL

Jaulas de plástico para ratones.

Pipetas estériles y no estériles de 1ml, 5 ml y 10 ml.

Pipetas Pasteur.

Cajas de Petri.

Portaobjetos de vidrio.

Jarras de Coplin para tinción.

Filtro Millipore con membrana de 0.22 micras de diámetro, estéril.

Matraces de vidrio estériles.

Frascos de tapón de rosca estériles de 30 ml aproximadamente.

Jeringas de plástico desechables estériles de 1 ml y 5 ml.

Tubos de centrifuga de plástico estériles y no estériles de capacidad de 15 ml.

--

Guantes de látex para cirujano.

Algodón.

Tanque de CO₂.

4.- MATERIAL BIOLÓGICO

Ratones de laboratorio cepa Balb-C.

Sangre venosa completa de donadores adultos clínicamente sanos.

**PRUEBA DE INDUCCION DE MUTACIONES DOMINANTES LETALES
EN RATONES.**

En esta prueba se utilizaron ratones machos (cepa Balb-C) mayores de 10 semanas de edad y hembras vírgenes de la misma edad.

1.- Se inocularon intraperitonealmente los machos (30), en un volumen de 0.20 ml. con: Azodrín (2.5 mg/Kg. de peso); Metil - Metano Sulfonato (100 mg/Kg de peso) y solución de cloruro de sodio 0.85% para: problemas, control de referencia y controles respectivamente.

2.- Despues de 24 hrs. para adaptación, se colocó cada macho - con 2 hembras vírgenes no tratadas.

3.- Dieciocho días después todas las hembras fueron sacrifica - das por eterización.

4.- Se extrajeron los dos cuernos del útero y una sección de la vagina, se colocaron en una caja de Petri que contenia solución salina fisiológica. Se lavaron varias veces por cambio de esta - solución.

5.- Se buscaron embriones vivos y deciduomas (molas), indicativas de embriones muertos temprana o tardiamente despues - de la implantación.

ESTUDIO CITOGENETICO EN LEUCOCITOS HUMANOS

"IN VITRO"

Medio de cultivo

Medio Ham F-10*	4.0 ml.
Suero Fetal Bovino	0.5 ml.
Sangre completa heparinizada	0.3 ml.
Fitoheamaglutinina "m"	0.2 ml.
	<hr/>
	5.0 ml.

* Medio preparado conforme a las especificaciones del fabricante. (Gibco. USA).

INICIO DEL CULTIVO

- 1.- Se obtuvieron por punción venosa cinco ml. de sangre de donadores clínicamente sanos utilizando una jeringa estéril previamente heparinizada (0.2 mg/ml.de sangre).
- 2.- Se inició el cultivo añadiendo los reactivos en el orden y cantidad indicados anteriormente, todo dentro de una campana de flujo laminar para preservar la esterilidad.
- 3.- Se incubaron los frascos a 37°C en una estufa microbioló-

gica, agitándolos dos veces al día durante 72 horas, hasta su cosecha.

EXPOSICION

a) Estudio del efecto del tiempo de exposición.

1.- A las 24, 36 y 48 horas (15,16,20) de iniciado el cultivo se añadieron soluciones previamente esterilizadas de: Metil Mercurio (concentración final de 50 mcg/ml), (25), para el control de referencia; Azodrín (concentración final de -- 15 mcg/ml) a los frascos problema, y 0.5 ml. de solución de cloruro de sodio 0.85% para los cultivos controles.

2.- Se incubó en la forma descrita anteriormente.

b) "Pulso" de 4 horas.

1.- Dos horas después de iniciado el cultivo (Pag.23-2), se añaden solución de Azodrín, Metil Mercurio y Solución salina fisiológica de la misma manera que en el número 1 del inciso a.

2.- Cuatro horas después de iniciada la exposición se transfirió el cultivo a tubos de centrifuga estériles, y se centrifugó a 1,000 rpm durante 5 minutos.

3.- Se retiró el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur -- estéril, se lavó el botón celular cinco veces, cada una de e--

llas con 5 ml. de solución salina fisiológica estéril.

4.- Se resuspendieron las células en 1 ml. de solución salina fisiológica y se transfirieron a frascos nuevos, donde previamente se habían colocado medio HAM F-10 y suero fetal bovino como en un cultivo normal.

5.- Se añadieron 0.2 ml. de Fitohemaglutinina, y se reinició la incubación hasta completar 72 horas antes de la cosecha.

c) Estudio del efecto de la dosis sobre leucocitos humanos.

1.- Veinticuatro horas después de iniciado el cultivo (Pag. 23), se añadieron soluciones de Azodrín en las siguientes-- concentraciones finales: 1,5,10,15 y 20 mcg/ml. para los problemas; Metil Mercurio concentraciones finales de 10,20,30, 40 y 50 mcg/ml. para los controles de referencia y solución salina fisiológica 0.85% para los controles.

2.- Se reinició la incubación en la forma descrita anteriormente hasta completar 72 horas antes de la cosecha.

COSECHA DE LAS CELULAS

Método modificado de Moorhead, (2,40).

- 1.- Dos horas antes de la cosecha (a las 70 horas de cultivo), se añaden a los frascos 0.1 mcg/ml. de Colchicina.
- 2.- Se centrifuga a 1,000 rpm/10' y se descarta el sobrenadante.
- 3.- Se resuspenden las células, se añaden 5 ml. de solución hipotónica de KCl 0.075 M., incubada previamente a 37°C. Se mezcla bien y se incuba en baño maría a 37°C. durante 15'.
- 4.- Se centrifugó a 1,000 rpm/5', se descartó el sobrenadante (las manipulaciones en este paso deben de ser mucho más-- cuidadosas, pues las células se encuentran muy frágiles; el tiempo total de exposición a la solución hipotónica no debe ser mayor de 25').
- 5.- Se resuspendieron las células utilizando una pipeta Pasteur.
- 6.- Manteniendo dentro de la pipeta Pasteur la suspensión de células se colocaron en el tubo 5 ml. de fijador de Carnoy -- (Metanol-Acido acético 3:1 preparado en el momento), (20).
- 7.- Con un solo movimiento se mezclaron las células rápidamente con el fijador, evitando así la formación de grumos difíciles de manejar más tarde, se dejaron a temperatura ambiente --

durante 30'.

8.- Se centrifugó a 1,000 rpm/5', se descartó el sobrenadante, se efectuaron cambios de fijador hasta que el líquido estuvo transparente.

9.- Por último, se resuspendieron las células en un volumen de 0.5-1 ml. de fijador fresco y se prepararon las laminillas.

PREPARACION DE LAS LAMINILLAS

1.- Utilizando una pipeta Pasteur se dejaron caer desde una altura de 30 cms. aproximadamente 2 ó 3 gotas de suspensión celular sobre una laminilla seca, perfectamente libre de grasa y otras impurezas. (Si los cromosomas no se dispersan bien o lo hacen demasiado, se preparan nuevas laminillas corrigiendo la altura).

2.- Se dejaron secar las laminillas a temperatura ambiente.

3.- Se tificaron con colorante Giemsa al 10% durante 10'.

4.- Se lavó el exceso de colorante con agua corriente y se dejaron secar a temperatura ambiente.

OBSERVACION DE LAS LAMINILLAS

- 1.- Utilizando el objetivo 10 X, se rastrearon las laminillas en busca de metafases convenientes para su análisis.
- 2.- Con objetivo 40 X, se determinó el número modal de cromosomas y el índice mitótico, (24):

Número de células en mitosis / 1000 células en cultivo.

Es necesario contar un mínimo de 4,000 células.

- 3.- Con el objetivo de inmersión se identificaron las aberraciones cromosómicas (rupturas, cromosomas en anillo, dicéntricos, etc.).
- 4.- Se fotografiaron las metafases escogidas, y se realizaron ampliaciones según las necesidades y conveniencias.

R E S U L T A D O S .

RESULTADOS

1.- Prueba de Inducción de Mutaciones Dominantes Letales en ratones.

Esta prueba se desarrolló inoculando 30 ratones machos mayores de 10 semanas de edad y de 30 gr. de peso para cada uno de los compuestos utilizados (ver material y métodos); y cruzando cada uno de ellos con 2 hembras vírgenes no tratadas.

Se escogió el Metil Metano Sulfonato como control de -- referencia debido a su reconocido poder mutagénico, en especial a su probada capacidad de inducir mutaciones Dominantes Letales (1,4,8,12,21,23,24,40), y a que es ampliamente recomendada por diferentes grupos de investigadores como mutágeno de elección para estandarizar métodos de detección de mutágenos químicos o físicos.

Los resultados de la examinación uterina se encuentran en el cuadro No.I; donde puede observarse el alto grado de mutaciones Dominantes Letales (76.45%), producidas por el Metil Metano Sulfonato comparándolo con el control (1.97%) de solución salina fisiológica, ésto indica que el método es con-

fiable y altamente reproducible.

En el caso del Azodrín, existe sólo un reporte previo de daño genético investigado en este insecticida (45); se procedió en la misma forma que con el control de referencia y los resultados fueron similares. Se observó inducción de mutaciones Dominantes Letales por el Azodrín, aunque en menor grado que con el MMS, sólo del 28.75%. Los resultados se encuentran en el cuadro No.I.

En la gráfica No.1 se representan en forma esquemática los resultados de esta prueba y se comparan entre sí -- los diferentes compuestos utilizados.

En las figuras 1,2 y 3, se observan ejemplos de úteros grávidos mostrando los resultados de esta prueba.

CALCULO DEL INDICE DE MUTACION

Se determinó el índice de mutación para cada uno de los compuestos de acuerdo a la fórmula (52):

$$\text{INDICE DE MUTACION} = \frac{\text{DECIDUOMATAS}}{\text{IMPLANTACIONES TOTALES}} \times 100$$

Para controles (solución salina fisiológica)

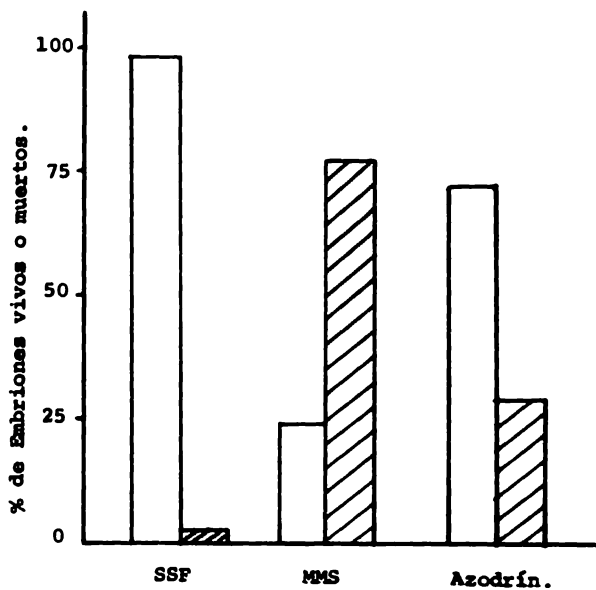
$$\text{I.M.} = \frac{0.17}{8.59} \times 100 = 1.97$$

Para controles de referencia (Metil Metano Sulfonato)

$$\text{I.M.} = \frac{6.98}{9.13} \times 100 = 76.45$$

Para Azodrin

$$\text{I.M.} = \frac{2.30}{8.01} \times 100 = 28.71$$



Embriones vivos.



Embriones muertos.

MMS = Metil Metano Sulfonato
(100mg/Kg.)

SSF = Solución salina fisiológica.

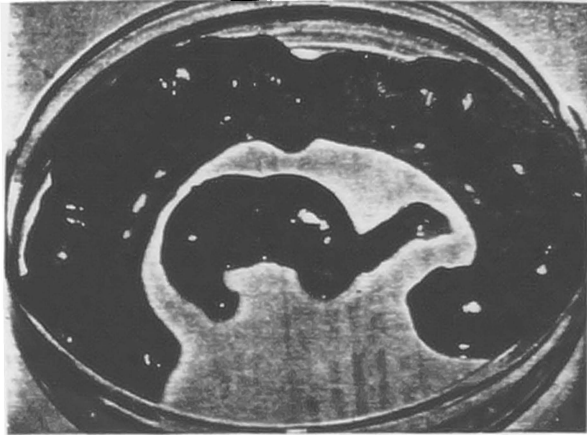
Azodrin: (2.5 mg/Kg.)

Grafica No. 1. Inducción de Mutaciones Dominantes

Letales en ratones.



Figúra No. 1. Utero grávido normal (SSF).



Figúra No. 2. Utero grávido normal (arriba);SSF
Utero de una hembra con mutaciones
Dominantes Letales (MMS). (abajo)



Figura No. 3. Utero grávido mostrando un embrión muerto
(grupo tratado con Azodrin)

PRUEBA DE SIGNIFICANCIA ESTADISTICA.

Los resultados obtenidos para los diferentes compuestos se compararon estadísticamente aplicando pruebas no paramétricas, (51). Se determinó aplicar este tipo de pruebas, principalmente porque son las más adecuadas cuando se tiene un tamaño de muestra pequeño. Además, las probabilidades obtenidas de la mayoría de las pruebas no paramétricas son exactas, independientemente de la forma de distribución de la población de donde procede la muestra.

La prueba escogida para este caso fué la "Prueba de la Mediana", que utiliza la determinación del valor de X^2 .

La prueba de la Mediana es un procedimiento para probar si dos grupos independientes difieren en sus tendencias centrales.

La hipótesis nula (H_0), es que los dos grupos tienen la misma mediana; la hipótesis alternativa (H_1) es que la mediana de una población es diferente a la de la otra.

a) Prueba de significancia para Metil Metano Sulfonato:

$$H_0 : P_{SSF} = P_{MMS}$$

Nivel de Significancia $\alpha = 0.02$

$$H_1 : P_{SSF} \neq P_{MMS}$$

Utilizando una tabla de contingencia de 2 x 2:

	Embriones vivos	Embriones Muertos	
Control (SSF)	9 A	0 B	A+B= 9
Metil Metano Sulfonato.	2 C	7 D	C+D= 9
	A+C= 11	B+D= 7	N = 18

$$X^2 = \frac{N (|AD - BC| - N/2)^2}{(A+B) (C+D) (A+C) (B+D)}$$

$$X^2 = \frac{18 (|63 - 0| - 9)^2}{9 \times 9 \times 11 \times 7} = \frac{52488}{6237} = 8.41$$

El valor reportado en tablas para 1 grado de libertad y $\alpha = 0.02$ es de 5.41; como el valor calculado para el grupo de Metil Metano Sulfonato es de 8.41, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que existen diferencias significativas entre las dos muestras.

b) Prueba de significancia para Azodrín:

$$H_0 = P_{SSF} = P_{Azodrín}$$

Nivel de significancia $\alpha = 0.02$

$$H_1 = P_{SSF} \neq P_{Azodrín}$$

	Embriones vivos	Embriones Muertos	
Control SSF	9 A	0 B	A+B = 9
Azodrín	2.5 C	5.5 D	C+D = 8
	A+C=11.5	B+D= 5.5	N = 17

$$\chi^2 = \frac{17 (|49.5 - 0| - 8.5)^2}{9 \times 8 \times 11.5 \times 5.5} = \frac{28577}{4554} = 6.2$$

El valor reportado en tablas para 1 grado de libertad y

$\alpha = 0.02$ es de 5.41, como el calculado para Azodrín es de 6.2, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que existen diferencias significativas entre las dos muestras.

c) Así mismo se compararon entre sí los grupos de Azodrín y de Metil Metano Sulfonato.

$$H_0 = P_{MMS} = P_{Azodrín}$$

Nivel de significancia $\alpha = 0.02$

$$H_1 = P_{MMS} \neq P_{Azodrín}$$

Tabla de contingencia 2 x 2.

	Embriones vivos	Embriones Muertos	
Metil Metano Sulfonato	2 A	7 B	A+B = 9
Azodrín	5.5 C	2.5 D	C+D = 8
	A+C = 7.5	B+D = 9.5	N = 17

$$\chi^2 = \frac{17 (|15 - 38.5| - 8.5)^2}{9 \times 8 \times 7.5 \times 9.5} = \frac{3825}{5130} = 0.745$$

El valor reportado en tablas para 1 grado de libertad y $\alpha = 0.02$ es de 5.41, como el calculado es de 0.745, no es posible rechazar la hipótesis nula y se concluye que estadísticamente no existen diferencias entre estos dos grupos.

2.- Estudio citogenético en leucocitos humanos "in vitro"

a) Exposición a diferentes dosis de Azodrín.

Para este estudio, se utilizó sangre de 10 donadores adultos clínicamente sanos; se hizo el ensayo a 1,5,10,15 y 20 mcg/ml. para Azodrín; y 10,20,30,40 y 50 mcg/ml. para el control de referencia.

Se utilizó como control de referencia y con objeto de estandarizar el método: Metil Mercurio, conocido agente inductor de aberraciones cromosómicas (5,7,25).

Los resultados obtenidos se encuentran en el cuadro No. II (Azodrín), y en el cuadro No.III (Metil Mercurio); así como el comportamiento a las diferentes dosis en las gráficas No. 2 y 3 (Azodrín), y las gráficas NO. 4 y 5 (Metil Mercurio)

Los tipos de aberraciones preferentemente encontrados--- fueron: rupturas cromosómicas (fig.4 y 5); cromosomas en anillo (fig. 6), y cromosomas dicéntricos (fig.7); se encontraron también: tétradas,coalescencia y pulverización cromosómica, pero en una frecuencia tan baja que no pueden ser tomados en cuenta en este estudio.

--

Siguiendo la forma de reportar de diversos investigadores (6,9,10,13,14,15,16,17), los datos se expresan en: por-- ciento de células con aberraciones cromosómicas (por ciento de células con rupturas y por ciento de células con cromosomas en anillo y dicéntricos).

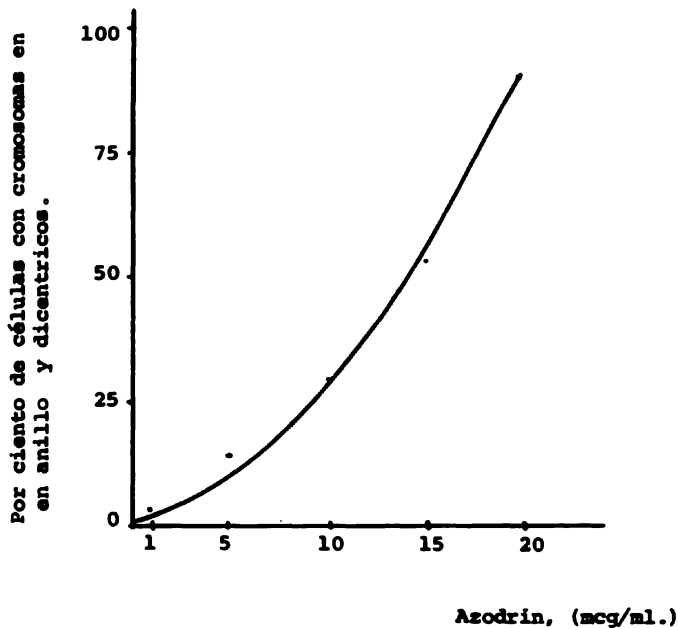
El tiempo de exposición fué de 48 horas en todos los ca-
sos.

Dosis mcg/ml.	No.de células analizadas.	No.de células con ruptura.	No.de cel.con anillos y di- céntricos.	Porcentaje de células con rupturas.	Porcentaje de cé- lulas con anillos y dicéntricos.
0	397	5	0	1.25	0
1	284	30	7	10.56	2.46
5	234	56	31	23.90	13.20
10	238	85	67	35.70	28.15
15	309	133	164	43.00	53.07
20	255	125	226	49.00	88.60

Cultivos de 48 horas de exposición.

CUADRO No. II

Aberraciones cromosómicas producidas por Azodrín a diferentes dosis de exposición.



Gráfica No. 2. Por ciento de células con cromosomas en anillo y dicéntricos, a diferentes dosis de Azodrin.

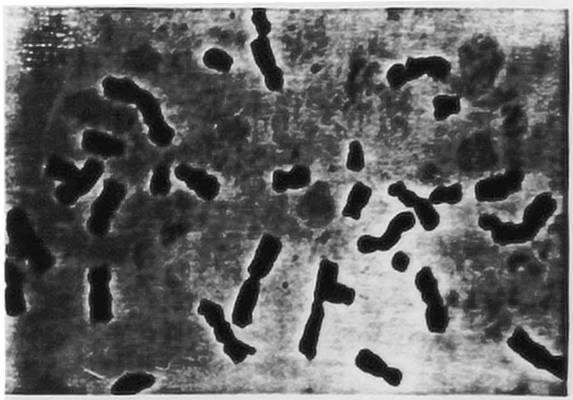


Figura No. 4. Metafase mostrando múltiples rupturas cromosómicas (Azodrín).

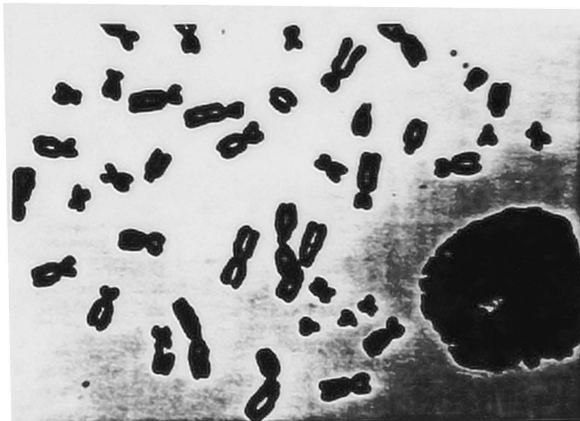


Figura No. 5. Metafase con una ruptura cromosómica (Cultivo tratado con Azodrín).



Figura No. 6. Metafase mostrando un cromosoma en anillo. Tratado con Azodrín.



Figura No. 7. Cromosomas Dicéntricos (Azodrín)

Dosis	No.de cels. analizadas.	No.de cels. con rupturas.	No.de cels. con anillos.	No.de cels. con dicén-- tricos.	Porcentaje de cels. con rupturas.	Porcentaje de cels.con ani- llos y dicén- tricos.
0	300	3	0	1	1	0.35
10	290	8	0	6	2.75	2.00
20	250	13	2	30	5.20	12.80
30	320	32	4	55	10.00	18.4
40	285	57	7	102	20.00	38.2
50	245	94	12	178	38.30	77.5

Resultado promedio de 3 experimentos realizados bajo condiciones similares.

CUADRO No. III

Aberraciones cromosómicas producidas por Metil Mercurio (control de referencia) a diferentes dosis de exposición.

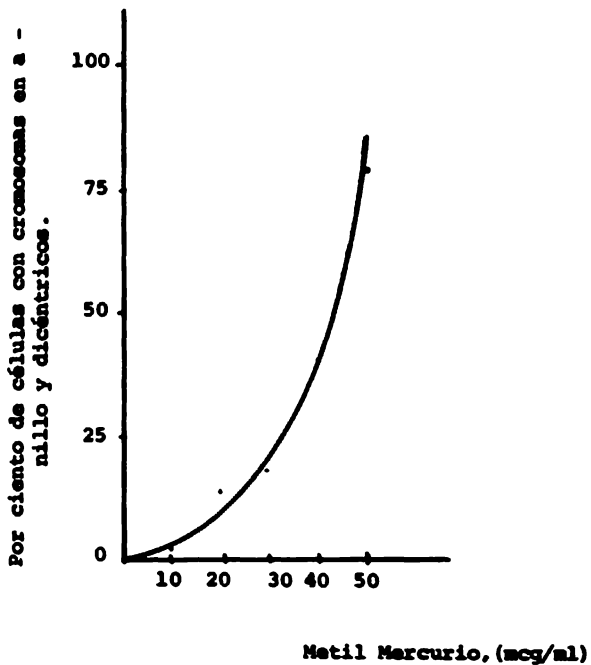
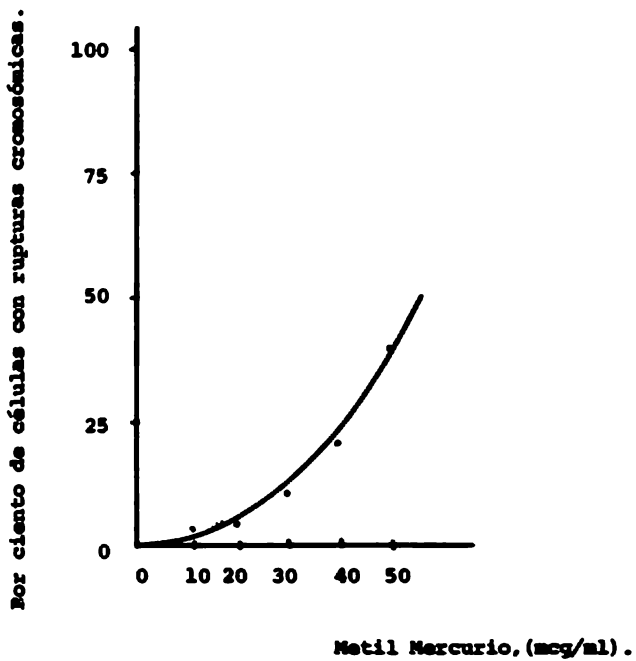


Gráfico No. 4. Por ciento de células con cromosomas en anillo y dicéntricos a diferentes dosis de -
Metil Mercurio.



Gráfica No. 5. Por ciento de células con rupturas cromosómicas a diferentes dosis de Metil Mercurio.

lares a los de control de referencia, con la diferencia de que en el "pulso" de 4 Hrs. no se observó inducción de aberraciones. También se determinó el Índice Mitótico.

Los tipos de aberraciones encontrados fueron: rupturas cromosómicas, cromosomas en anillo y dicéntricos.

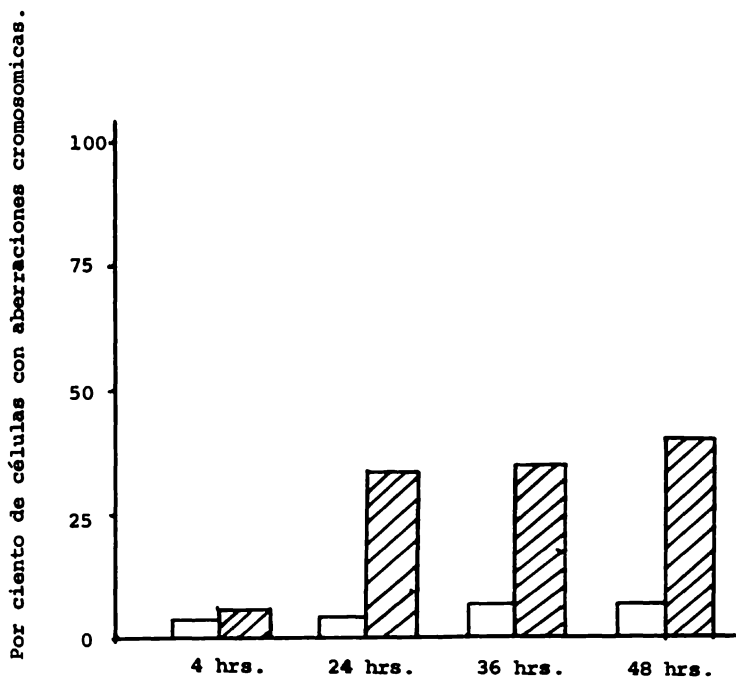
Los resultados se muestran en el cuadro No.IV y la gráfica No. 6, donde se observan claramente las diferencias entre controles y problemas.

Exp.	Azodrín mcg/ml.	No.de células analizadas.	Tiempo de exposición horas.	Porcentaje de metafases con 1 o más ruptu- ras.	Indice Mitó- tico.
I	Control	200	-	6	1.9
	15	200	48	40	0.035
	15	200	48	38	0.040
II	Control	200	-	5	1.5
	15	200	36	32	0.65
	15	200	36	36	0.55
III	Control	200	-	4	1.8
	15	200 ^m	24	31	0.30
	15	200	24	34	0.28
IV	Control	200	-	4	2.1
	15	200	4*	4	1.65
	15	200	4*	6	1.45

* Pulso iniciado 2 Hrs. después del cultivo.

CUADRO No. IV

Efecto del Azodrín sobre Leucocitos humanos "in vitro" a diferentes tiempos de exposición.



Tiempo de exposición a Azodrin, (15mcg/ml).

□ Control (SSF)

▨ Azodrin.

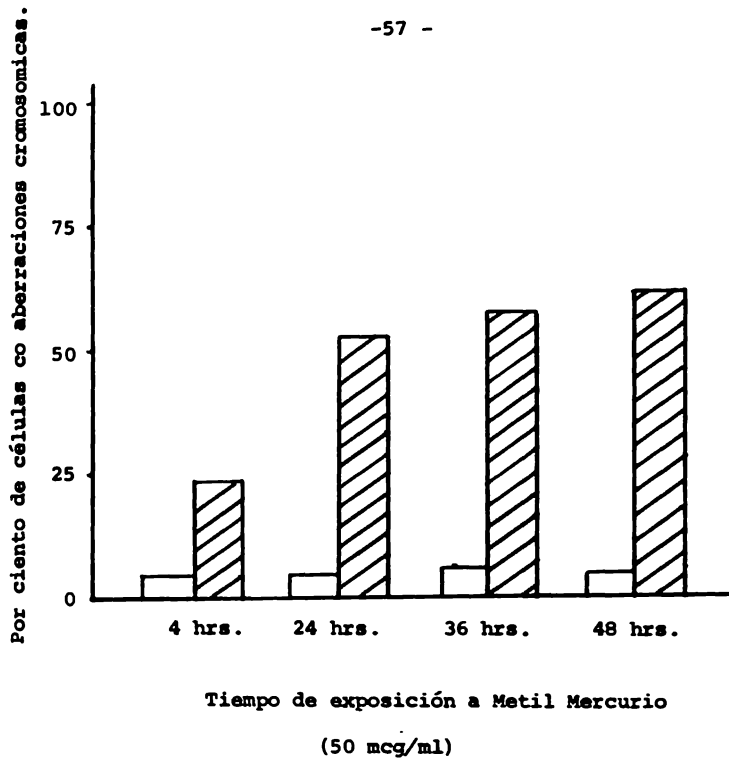
Gráfica No. 6. Efecto del Azodrin sobre Leucocitos humanos a diferentes tiempos de exposición.

Exp.	Metil Mercurio mcg/ml.	No.de células analizadas.	Tiempo de exposición.	Porcentaje de metafases con 1 o más rupturas.	Indice Mitótico.
I	Control	200	-	4	2.1
	50	200	48	62	0.8
	50	200	48	60	0.69
II	Control	200	-	5	1.8
	50	200	36	58	1.0
	50	200	36	55	0.79
III	Control	200	-	4	2.0
	50	200	24	53	1.5
	50	200	24	51	1.3
IV	Control	200	-	4	2.2
	50	200	4*	20	1.5
	50	200	4*	26	1.3

* Pulso iniciado 2 Hrs. después del cultivo.

CUADRO No. V

Efecto del Metil Mercurio sobre Leucocitos Humanos "in vitro" a diferentes tiempos de exposición.



□ Control (SSF)
▨ Metil Mercurio.

Gráfica No. 7. Efecto del Metil Mercurio sobre Leucocitos humanos a diferentes tiempos de exposición.



D I S C U S I O N .

DISCUSION

En la actualidad, existe una gran preocupación acerca de la repercusión genética que pueda tener el incremento continuo de factores químicos a los que se encuentra expuesta la población, tanto por el uso desmedido de medicamentos como por el empleo cada vez mayor de plaguicidas para mejorar la producción de alimentos. Se sabe, en efecto, que existe un equilibrio delicado entre la producción y la eliminación de mutaciones en una población dada. Así la velocidad de producción de mutaciones espontáneas en cualquier especie, ha llegado a un óptimo mediante la selección natural introduciendo nuevos genes a una velocidad suficiente para permitir la evolución, pero no tan rápido que se exceda la capacidad de los factores selectivos para eliminar mutaciones perjudiciales.

Si se incrementa la velocidad de producción de mutaciones, se corre el peligro de aumentar la frecuencia de alteraciones hereditarias en la población respectiva.

Dado que se ha demostrado que diferentes compuestos químicos, en particular contaminantes ambientales son mutagénicos,

cos para ciertos organismos, se hace evidente la necesidad de contar con métodos que permitan la evaluación del potencial mutagénico de todo agente al que se encuentren expuestos los humanos, en forma rápida y confiable.

Es importante señalar que ningún método permite extrapolar en forma cien por ciento confiable los resultados obtenidos en otros organismos, al hombre. Sin embargo, no es posible llevar a cabo estudios en el humano directamente por razones éticas obvias.

Así mismo, existen limitaciones en aquellos métodos desarrollados en sistemas "in vitro" con respecto a aquellos realizados "in vivo".

A pesar de no ser extrapolable en forma absoluta al humano, se considera que el estudio comparativo de los efectos de agentes químicos tanto "in vivo" (7,15), utilizando organismos de distintas especies; como "in vitro" recurriendo a diferentes métodos (16,17), podría permitir decidir con mejores bases si un compuesto es o no potencialmente mutagénico para el hombre.

Conscientes de la importancia de contar en nuestro país con métodos para la evaluación del efecto genético de contaminantes químicos del ambiente, nos propusimos estandarizar dos de ellos: La prueba de Inducción de Mutaciones Dominantes Letales, que presenta ciertas ventajas ya que se trabaja con organismos superiores (ratones), cuyos resultados pueden ser extrapolados más fácilmente al hombre que si se trabaja con microorganismos procariotes; además no se requiere mucha manipulación de los animales, sólo es necesario inocular una vez y la examinación uterina es fácilmente realizable ya que se necesita solamente un microscopio estereoscópico. El manejo de los datos y su interpretación son muy sencillos también (1,21,23).

El estudio Citogenético "in vitro" ha mostrado (15,21) ser una prueba valiosa en la determinación del potencial mutagénico de los productos químicos, además, presenta la gran ventaja de trabajar con células humanas (leucocitos) directamente, lo que ningún otro método permite. Es un ensayo fácil de realizar y que no presenta complicaciones metodológicas.

La inducción de aberraciones cromosómicas por el Metil Mercurio se mantuvo dentro de lo reportado previamente (25), el comportamiento a diferentes dosis siguió el tipo de comportamiento de una función: $y = ax^2$ característico, tanto para las aberraciones del tipo de rupturas como para la formación de cromosomas en anillo y dicéntricos.

El hecho de no encontrarse diferencias a los distintos tiempos de exposición, puede deberse a que éste compuesto actúa directamente sobre el ADN, y es en el periodo de síntesis de este ácido cuando se causa el daño; en un cultivo de leucocitos cuya mitosis es inducida por fitohemaglutinina, el fenómeno de síntesis de ADN se efectúa durante las primeras 24 horas exclusivamente, de tal manera que un tiempo de exposición mayor puede no incrementar el daño en forma considerable.

Con respecto al Azodrín, los hallazgos en el experimento a diferentes dosis, sugieren una cinética del tipo del control de referencia cuando se considera el porcentaje de células con cromosomas en anillo y dicéntricos; pero en el caso de rupturas cromosómicas mas bien semeja una cinética de saturación, con

Conscientes de la importancia de contar en nuestro país con métodos para la evaluación del efecto genético de contaminantes químicos del ambiente, nos propusimos estandarizar dos de ellos: La prueba de Inducción de Mutaciones Dominantes Letales, que presenta ciertas ventajas ya que se trabaja con organismos superiores (ratones), cuyos resultados pueden ser extrapolados más fácilmente al hombre que si se trabaja con microorganismos procariotes; además no se requiere mucha manipulación de los animales, sólo es necesario inocular una vez y la examinación uterina es fácilmente realizable ya que se necesita solamente un microscopio estereoscópico. El manejo de los datos y su interpretación son muy sencillos también (1,21,23).

El estudio Citogenético "in vitro" ha mostrado (15,21) ser una prueba valiosa en la determinación del potencial mutagénico de los productos químicos, además, presenta la gran ventaja de trabajar con células humanas (leucocitos) directamente, lo que ningún otro método permite. Es un ensayo fácil de realizar y que no presenta complicaciones metodológicas.

El empleo del Metil Metano Sulfonato y del Metil Mercurio, como controles de referencia paralelos, tuvo un doble propósito: primeramente confirmar que con nuestros métodos era posible detectar y cuantificar mutaciones (utilizando agentes bien conocidos), y en segundo término poder estimar y comparar la mutagenicidad del Azodrín con dichos compuestos.

La inducción de mutaciones dominantes letales por Metil-Metano Sulfonato confirma lo ya descrito por otros autores: el MMS es altamente mutagénico, y su empleo para estandarizar la técnica es completamente satisfactorio.

En cuanto al Azodrín, el experimento demuestra que es capaz de inducir este tipo de mutaciones en un grado considerable, aunque no tan grande como el MMS.

Con el fin de comparar más adecuadamente los dos compuegtos, los datos se representan esquemáticamente (gráfica 1), como por ciento de embriones vivos o muertos. Esto da una idea clara de los resultados.

Así mismo, la prueba de significancia estadística indica que las diferencias entre controles y problemas son altamente significativas y que entre MMS y Azodrín, estadísticamente no existió diferencia.

La inducción de aberraciones cromosómicas por el Metil Mercurio se mantuvo dentro de lo reportado previamente (25), el comportamiento a diferentes dosis siguió el tipo de comportamiento de una función: $y = ax^2$ característico, tanto para las aberraciones del tipo de rupturas como para la formación de cromosomas en anillo y dicéntricos.

El hecho de no encontrarse diferencias a los distintos tiempos de exposición, puede deberse a que éste compuesto actúa directamente sobre el ADN, y es en el periodo de síntesis de este ácido cuando se causa el daño; en un cultivo de leucocitos cuya mitosis es inducida por fitohemaglutinina, el fenómeno de síntesis de ADN se efectúa durante las primeras 24 horas exclusivamente, de tal manera que un tiempo de exposición mayor puede no incrementar el daño en forma considerable.

Con respecto al Azodrín, los hallazgos en el experimento a diferentes dosis, sugieren una cinética del tipo del control de referencia cuando se considera el por ciento de células con cromosomas en anillo y dicéntricos; pero en el caso de rupturas cromosómicas mas bien semeja una cinética de saturación, con

un principio de gran daño; esto es difícil de interpretar pero puede deberse a que el material genético presenta una afinidad limitada por el Azodrín, y que a dosis altas no le es posible combinarse con él en una forma proporcionada.

En el experimento a diferentes tiempos de exposición, el Azodrín se comportó en una forma muy similar al Metilmercurio; así que lo comentado anteriormente puede aplicarse también en este caso.

Es importante recalcar, que los resultados aquí presentados de ninguna manera son definitivos, aunque sí fueren sugestivos de que el Azodrín es un mutágeno potencial para la población; consideramos necesario llevar a cabo más pruebas en sistemas como: El ensayo mediado por el Huésped, lo que nos daría información sobre el metabolismo de este insecticida; también deben realizarse pruebas en sistemas de microorganismos, tanto procariotes ("Prueba de Ames"), como eucariotes (Reversión en Neurospora crassa); conjuntando los diferentes resultados, se podría concluir definitivamente sobre la capacidad mutagénica del Azodrín.

CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES

Podemos concluir, que la evaluación del potencial mutagénico de agentes químicos utilizados en la agricultura, y a los que se encuentra expuesta la población es una necesidad urgente, por ello es importante el contar con métodos---confiables que permitan obtener en poco tiempo una respuesta.

Los sistemas por los que optamos para llevar a cabo tal valoración, demostraron ser muy confiables, y dado su fácil - manejo y reproducibilidad pueden ser recomendados como pruebas de rutina a todos aquellos agentes químicos de quienes-- se sospecha puedan ser mutagénicos, antes de permitirse su-- empleo y difusión.

Los resultados obtenidos con el insecticida Azodrin, indican que cuando menos utilizando dos sistemas de detección, este compuesto es mutagénico; consideramos necesario llevar a cabo pruebas adicionales antes de tomar una decisión al respecto.

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

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- ADAMCZEWSKA. Estimation of number of young born on the basis of placental scar counts in the laboratory mouse. *Acta theriol* 14 : 263-267 (1969).
- 2.- ARAKARI D.T. & SPARKES R.S. Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood. *Cytogenetics* 2 : 57 (1963).
- 3.- ARMENDARES S. & LISKER R. Human genetics. *Excerpta medica. Amsterdam Oxford* (1976).
- 4.- BADR F.M. Induction of dominant lethal mutation in male mice by ethyl alcohol. *Nature* 253 : 134-136 (1975).
- 5.- BARTHELMESS A. Mutagenic substances in the human environment. *Chemical mutagenesis in mammals and man.* Ed. Vogel and Rohrborn (1970).

- 11.- CARRANO A.V. Chromosome aberrations and radiation-induced cells death. II.- Predicted and observed cell survival.
Mutation Research 17 : 355-356 (1973).
- 12.- CAJANACH B.M. Ethyl methane sulfonate induced chromosome breakage in the mouse.
Mutation Research 6 : 297-307 (1968).
- 13.- COHEN M.M. & HIRSCHORN K. In vivo and in vitro damage--induced by LSD-25.
The New England Med. 277:1043 (1967).
- 14.- COHEN M.M. & BACK N. Chromosomal damage in human leukocytes induced by lysergic acid diethylamide.
Science 155 : 1417-1419 (1967).
- 15.- COREY M.J. & ANDREWS J.C. Chromosome studies on patients (in vivo) and cells (in vitro) treated with Lysergic acid diethylamide.
The New England Journal of Medicine 282 : 939-943 (1970).

- 16.- DATA P.K. The effect of chemical mutagenesis on the mitotic chromosomes of the mouse in vitro. In chemical mutagenesis in mammals and man.
Ed. Vogel and G. Rohrborn. 194-213 Berlin Springer.
- 17.- DEKHECT C.H. Chromosome aberrations observed in the male workers occupationally exposed to lead.
Environ. Physiol.Biochem 3 : 132 (1973).
- 18.- DENNIS HILL. Agricultural insect pests of the tropics and their control.
Cambridge University press.
Cambridge. London. New York. Melbourne. (1979).
- 19.- DINAVER R.C. Pesticides in soil and water.
Soil science Society of America Inc. publisher.
Madison, Wisconsin USA (1979).
- 20.- EGOZCUE J. Tecnicas en citogenética.
Edit. Espaxs. Barcelona (1971).

- 21.- EHLING U.H. Induction of dominant lethal mutations by alkylating agents in male mice.
Mutation Research 5 : 417-428 (1967).
- 22.- EPSTEIN S.S. Chemical mutagens in the human environment.
Nature 219 : 385-387 (1968).
- 23.- EPSTEIN S.S. & ROHEBORN G. Recommended procedures for testing genetic hazards from chemicals, based on the induction of dominant lethal mutations in mammals.
Nature 230 : 459-460 (1971).
- 24.- First Annual course in the principles and practices of genetics toxicology.
University of Texas Medical branch, Galveston Texas (1976).
- 25.- FISKESJOE G. The effect of two organic mercury compounds on human leucocytes in vitro.
Hereditas 64 : 142-146 (1970).
- 26.- GENEROSO W.N. Chemical induction of dominant lethal in male mice.
Genetics 61 : 461-470 (1969).

- 27.- GOOD E.E.& WARE G.W.Effects of insecticides on reproduction in the laboratory mouse.
Toxicol appl.Pharmacol. 14 : 201-203 (1969).
- 28.- GOODENOUGH V. Genetics.
Edition Harvard University. Second Edition.
- 29.- HARRIS M. Anomalous patterns of mutation in cultured mammalian cells.
Genetics Supplement 73 : 181 (1973).
- 30.- HAYES W.J. Toxicology of pesticides.
The Williams and Wilkins Company.Baltimore (1975).
- 31.- HSU. J.C. Mammalian chromosomes in vitro.Idiogram of the chinase hamster.
J.Nat. Cancer Inst. 32 : 272-280 (1970).
- 32.- HUGUES J.P. & RYSER M.D. Chemical carcinogenesis.
New England J.Med. 285 : 721 (1971).
- 33.- JENKINS J.B. Genetics.
Second edition.Houghton miffin Company. Boston (1979).

- 34.- KIHLMAN B.A. The effect of deoxyadenosine and cytosine arabinoside on the chromosomes of human leucocytes in vitro.
Hereditas 50 : 139-143 (1963).
- 35.- KIHLMAN B.A. Action of chemicals on dividing cells.
Prentice hall inc.
Englewood cliffs, New Jersey (1967).
- 36.- MALLING H.V. & WASSON J.S. Action of mutagenic agents.
Handbook of Teratology Vol.I (1977).
- 37.- MARQUEZ M.H. Manual de citogenética humana.
Segunda edición, La Prensa Médica Mexicana. (1979).
- 38.- MATTER B.E. & JAEGER I. Premature chromosome condensation, structural chromosome aberrations and micronucleid in early mouse embryos after treatment of paternal post-meiotic germ cells with Triethyleneemelamine. Possible mechanisms for chemically induced dominant-lethal mutations.
Mutation Research 33 : 251-260 (1975).

- 39.- MAJZER B.E. Effects of dose on the induction of dominant lethal mutations with triethylenemelamine in male mice. *Genetics* 77 : 753-763 (1974).
- 40.- MOORHEAD P.S. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exptl. Cell. Res.* 20 : 613 (1960).
- 41.- NARRO REYES J.G. El uso de plaguicidas en la agricultura mexicana. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (1979).
- 42.- NICHOLS W.W. In vitro chromosome breakage induced by arabinosilamine in human leucocytes. *Cancer Research* 22 : 1502-1505 (1964).
- 43.- NICHOLS W.W. Comparison of chemically induced and virus induced chromosome aberrations. *Federation Proceedings* 38: 17-94 (1969).
- 44.- OMS. Evaluación de la actividad carcinogénica de los productos químicos. OMS: 564 (1974).

- 45.- QUANTITATIVE genetic response of chicken embryos to organosphosphorus insecticide Azodrin.
Can. J. Genet. Cytol. 17 : 466 (1975).
- 46.- ROHRBORN G. The dominant lethals; method and cytogenetic examination of early cleavage stage in:
Vogel and G, Rohrborn Eds. chemical mutagenesis in mammals and man.
Springel. Verlag. Berlin pp 148-155 (1970).
- 47.- ROSIVAL L. Mutagenic effects of pesticides.
Agrochemic 10 : 12 (1970).
- 48.- SCIENTIFIC AMERICAN. Facetas de la genética.
Hermann Blume Ediciones, Madrid (1978).
- 49.- DE SERRES F.J. Genetics test systems to evaluate the mutagenic effects of environmental chemicals.
Pharmacol. 2 : 171-181 (1972).
- 50.- SHAW M.W. Human chromosome damage by chemical agents.
Ann. Rev. Medicine 21 : 409-432 (1970).

- 51.- SIEGEL S. Nonparametric statistics for the behavioral sciences.
Mc.Graw-Hill Book Company (1956).
- 52.- SOARES E.R. & CRENSHAW J.W. Dominant lethal mutations induced in mice, by orally administered Ethylmethansulfonate.
Mutation Research 26 : 385-389 (1974).
- 53.- SOARES E.R. Estimating the frequency of induced dominant lethals in mice, by uterine dissection after meaning progeny.
Mutation Research 16 : 425-427 (1972).
- 54.- SOARES E.R. Estimating the frequency of induced dominant lethal mutations in mice.
The Journal of Heredity 28 : 421 (1976).
- 55.- STERN C. Principles of human genetics.
Third edition W.H. Freeman and Company
San Francisco (1973).
- 56.- STONE D. & LAMSON E. Cytogenetic effects of cyclamates on human cells, in vitro.
Science 164 : 568-569 (1969).

- 57.- WAN CHOI KYOO. In vitro cloning of human lymphocytes and establishment of lymphocyte cell lines.
1970.
- 58.- WANSON C.P. Cytology and Cytogenetics.
Prentice Hall, Inc.
Englewood Cliffs N.J. (1973).
- 59.- WILLIAMS J. Advances in modern toxicology.
V. Mutagenesis.
Hemisphere Publishing Corporation (1978).