

47
2oj.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

ESTUDIO "IN VIVO" DEL POTENCIAL MUTAGENICO DE LOS CONGENERES DEL TEQUILA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A N :
ARACELI ROJAS CRUZ
ARMANDO RAMOS CAMACHO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. EDUARDO MADRIGAL BUIJAIAR



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C O N T E N I D O

- I. I N T R O D U C C I O N
- II. O B J E T I V O S
- III. M A T E R I A L Y M E T O D O S
- IV. R E S U L T A D O S
- V. D I S C U S I O N
- VI. C O N C L U S I O N E S
- VII. R E S U M E N
- VIII. B I B L I O G R A F I A

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

El rasgo más importante de los genes es su capacidad de -- reproducción idéntica de generación a generación. No obstante, la evolución de los seres vivos no hubiera sido posible sin la aparición de cambios en el material genético. Puesto que hay evidencias de que todos los seres vivos sobre nuestro planeta tienen un origen común, los genes, que son acarreadores de la información genética tienen la capacidad de alterarse ocasionalmente, tales cambios son llamados mutaciones [1] . Así, las formas alternativas de un gen producidas por una mutación son heredadas en las generaciones subsecuentes. [2].

El término mutación fué introducido por De Vries en 1901 - al observar cambios esporádicos en la planta *Oenothera lamarckiana* [3].

El estudio de las mutaciones y los procesos mutacionales son importantes para la comprensión de los genes y su conducta en el organismo, ya que es de gran importancia el conocer la relación entre mutación y enfermedad y otros aspectos de la salud [2].

La mutación puede producirse en cualquier gen, en cualquier momento y en cualquier célula, siendo por lo tanto, cambios genéticos al azar. Las causas de las mutaciones son desconocidas, pero se supone que es el resultado de un error ocasional en el apareamiento de bases durante la replicación del DNA [1]. Siendo las mutaciones espontáneas cambios heredables en el material genético, éstas llegan a ser evidentes cuando aparece un nuevo fenotipo y éste es transmitido a una nueva generación.

Al analizar por métodos experimentales las mutaciones espontáneas tanto autosómicas como ligadas al gene X, los in-

investigadores pudieron: a] detectar nuevas mutaciones, b] calcular su frecuencia en progenies y calcular el porcentaje de mutación; c] determinar la naturaleza del efecto de la mutación sobre el organismo [2].

Las radiaciones y agentes químicos en el medio ambiente contribuyen a que haya una mayor probabilidad para que ocurra daño al DNA, aunque la cantidad de estos agentes en el medio ambiente es insuficiente para que se observe el fenómeno, con frecuencia los organismos se ven expuestos a este tipo de agentes, por lo que las investigaciones sobre la mutación inducida han tenido una gran importancia en las últimas décadas [2].

Se sospecho de inducción de mutaciones por compuestos químicos desde los primeros días de la Genética, sin embargo, las primeras publicaciones fueron hechas por Muller quien estudió la inducción de mutaciones por radiaciones ionizantes en *Drosophila* en 1927 (4,5,6). Las siguientes publicaciones de Muller fueron un énfasis secundario sobre el desarrollo de las radiaciones en la genética, y por un largo tiempo hubo poco interés en algún otro agente mutagénico.

En 1942, Auerbach y Robson en Gran Bretaña lograron obtener mutaciones en *Drosophila* con mostaza nitrogenada [7].

Independientemente en 1943, Oehlkers y colaboradores en Alemania obtuvieron mutaciones en *Oenothera*, particularmente con uretano [8], un farmaco muy usado por su actividad hipnótica en niños y que tiempo después se supo era carcinogénica. En 1946 Rapaport en Rusia describe la acción mutagénica de compuestos carbónicos [9].

Después de estos primeros descubrimientos el campo de la Genética Humana y la Salud se expandió rápidamente. Los primeros movimientos en esa dirección pudieron fundarse en una lectura por Lüers en 1956 y en un estudio reportado -- por Barthelmess en el mismo año. Fué hasta 1961 que Connen y Lansky hicieron la primera correlación al detectar aberraciones cromosómicas en linfocitos de individuos que fueron tratados con mostaza nitrogenada [10].

Después de 1960 la comunidad científica reconoció gradualmente la importancia que para el hombre tenía la exposición a mutágenos químicos y la Genética Toxicológica surgió como una disciplina alrededor de 1969, al fundarse en los Estados Unidos la Sociedad para el Estudio de Mutágenos del Medio Ambiente [11].

La revisión de la vasta literatura sobre daño genético causado por agentes químicos y físicos requiere un estudio -- convincente de éstos, un agente puede ser efectivo causando una de las diversas clases de daño genético pero no necesariamente produce todos.

Numerosos estudios se han realizado en los cuales las células se exponen a agentes químicos o físicos y se examina la frecuencia del incremento de aberraciones cromosómicas. Hay diferentes sistemas que pueden ser usados:

1. Estudios "in vivo": los animales (generalmente ratones) son tratados con un agente y las aberraciones son -- cuantificadas en las células de la médula ósea, linfocitos periféricos y espermatogonias [12].
2. Estudios "in vivo" F_1 : los animales son tratados con algún agente y las anomalías son examinadas en sus

descendientes. Como un ejemplo Sotomayor y Cumming (1975) observaron un incremento en las translocaciones en los descendientes machos de ratones tratados con ciclofosfamida.

3. Estudios en humanos: En los linfocitos de sangre periférica de humanos puede examinarse fácilmente el daño cromosómico.
4. Estudios in vitro; diferentes tipos de células pueden ser usadas para trabajos de clastogénesis "in vitro." El uso de células humanas "in vitro" permite la investigación para estudiar algún agente deseado [13].

Los cuatro grupos de mutágenos químicos cuyos modos de acción sobre el DNA son estudiados intensamente son:

- [1] Análogos de bases. [2]
- [2] Químicos que actúan directamente sobre las bases del DNA. [2]
- [3] Agentes alquilantes que remueven purinas del DNA. [2]
- [4] Tinturas de acridina que causan delección y adición de bases en el DNA [2].

Con base en los avances técnicos logrados en la década pasada, se ha incrementado el empleo de la citogenética como parte de la metodología empleada para el estudio de mutágenos. Las pruebas principales para detectar daño genético se encuentran divididas en dos grupos: a) Pruebas loci específicas y; b) Pruebas en el genoma total. Incluido en estas últimas se encuentran las aberraciones cromosómicas totales las cuales son debidas a la diferencia de tama

no entre un gen y un genoma, son aproximadamente 10^5 veces más frecuente después de radiación aguda que son efectos - en loci individual. Por esta razón, más que por ninguna - otra, la inducción de aberraciones cromosómicas favoreció la vía para detectar si una sustancia es o no mutagénica - en una gran cantidad de organismos [14].

Las alteraciones cromosómicas pueden ser estructurales o - numéricas, entre las primeras se encuentran las acromáti-- cas, cromatídicas y cromosómicas; en las segundas, euploidias y aneuploidias.

Entre las aberraciones acromáticas se encuentra la despi-- rilización de una porción del DNA que suele ocurrir du-- rante la interfase, antes o después de la replicación; si ocurre antes la lesión se observa en las dos cromátides y recibe el nombre de isobrecha, si es después se observa - solo en una y se denomina brecha [15].

Cuando se producen verdaderas rupturas se habla de aberra-- ciones cromatídicas si es en una cromátide y cromosómicas si es en las dos; éstas ocurren durante la fase G_2 y G_1 - respectivamente. Estos últimos tipos de alteraciones -- conducen a la pérdida del material genético o a rearrreglos intra o intercromosómicos [2, 15, 16].

Disturbios en el movimiento y distribución de los cromoso-- mas provocan aberraciones numéricas; las euploidias que -- son múltiplos exactos del número básico y las aneuploidias que son desviaciones del número cromosómico diploide.

Para valorar la frecuencia de aberraciones cromosómicas, - se debe tomar en cuenta que la mayoría de los clastógenos quí-- micos son dependientes de la fase de síntesis del ciclo

celular esto es, que para que se exprese el daño se requiere que el DNA se replique ya sea durante o después de la exposición de la célula al agente en estudio. Es también de trascendencia valorar solo las células de primera división, con objeto de obtener datos más exactos acerca del posible mutágeno, ya que esta clase de compuestos generalmente induce aberraciones de tipo cromatídico, muchas de las cuales se pierden en las siguientes divisiones celulares a causa de sus efectos letales.

El otro parámetro para determinar las propiedades mutagénicas o clastogénicas de algunos compuestos es midiendo la frecuencia del intercambio de cromátides hermanas [18].

El fenómeno de intercambio de cromátides hermanas fué primeramente observado por Taylor en 1958, y debido a su gran sensibilidad y fácil interpretación ha sido de gran importancia en los estudios genotoxicológicos.

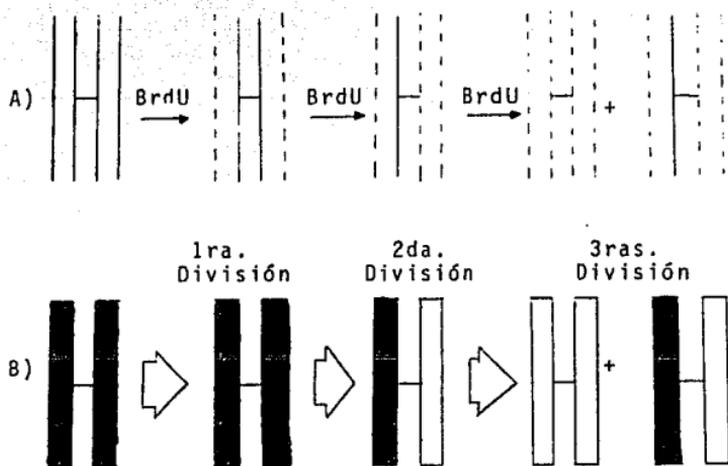
Este fenómeno de intercambio de cromatides hermanas se define como el recambio de segmentos de DNA entre las dos -- cromátides de un cromosoma y durante el cual cada una de las cadenas del segmento de DNA intercambiado se une a la cadena similar de la cromátide hermana. Para lograr visualizar este fenómeno las células se exponen a 5' -Bromo 2'-desoxi-Uridina (BrdU), agente que sustituye a la timina durante la síntesis de DNA. Esta sustitución en la cadena de DNA pone de manifiesto su propiedad de replicarse semiconservativamente, de tal manera que después de dos ciclos replicativos, durante la metafase, se observan cromosomas con una cromátide bisustituida y otra monosustituida con BrdU [19, 20] que al teñirse con fluorocromo (Hoechst -- 33258) [21] produce una cromátide fluorescente y la otra no. Con la introducción del método "Fluorocromo más Giem--

sa", se perfeccionó la técnica obteniéndose preparaciones permanentes y con muy buena resolución [22, 23, 24].

En la fig. 1.1 se esquematiza la forma por medio de la - - cual la BrdU se integra al cromosoma de acuerdo a tres pre - misas: 1) La replicación del DNA es de naturaleza semicon - servativa; 2) La estructura cromatídica es uninémica (cada cromátide está formada por una sola cadena doble de DNA); 3) Los cromosomas se segregan al azar en células en divi - sión. Así, después de dos ciclos replicativos en presen - cia de la BrdU, las hebras de DNA hijas incorporan el com - puesto, y las hebras de DNA madre conservan sus caracterís - ticas originales. Esto determina que los cromosomas de - segunda división celular posean una cromátide que incorpo - ra el análogo y otra que no lo hace. Esto quiere decir - que una cromátide tiene su DNA unisustituido y la otra bi - sustituido, esta última fluoresce menos al teñirse con el - fluorocromo o bien presenta menor tinción con el colorante de Giemsa, este fenómeno origina la presencia de la tin - ción diferencial [20].

Precisamente después de ocurrir el mecanismo del intercam - bio de cromátides hermanas se van a encontrar en la cromá - tide que incorporó el análogo (bisustituida), fragmentos - de DNA que pertenecían a la otra cromátide (unisustituida) esto ocurre en la misma posición cromosómica y entre crom - osomas homólogos.

Fig. 1.1 Incorporación de BrdU y aspecto de los cromosomas después de la tinción diferencial.



A) Incorporación de BrdU a la cadena de DNA

Línea continua; cadena sencilla de DNA sin incorporación de BrdU

Línea punteada; cadena sencilla de DNA con incorporación de BrdU

B) Apreciación al microscopio de incorporación de BrdU a la cadena de DNA

Cromátide oscura (no se aprecia la incorporación - aún en la 1ra. división)

Cromátide clara (se aprecia la incorporación, hasta la 2da. división)

El mecanismo que explique este fenómeno aún no es claro, - pero se han postulado varias hipótesis:

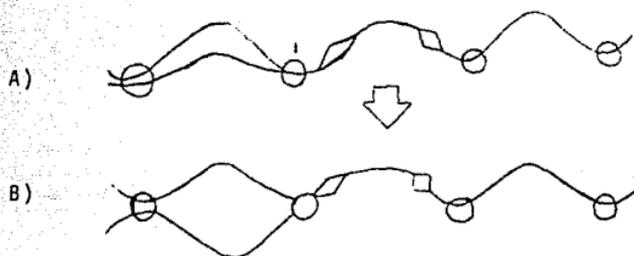
1. Su inducción por agentes que dañan al DNA condujo a - que algunos investigadores desarrollaran la idea de - que un intercambio es la manifestación citológica de un proceso de reparación [25].
2. Más adelante (1974) Bender y colaboradores sugieren - que el intercambio de cromátides hermanas puede estar relacionado a un modelo de reparación recombinante du - rante el cual ocurra un entrecruzamiento de una hebra sencilla de polaridad paralela de cromátides opuestas por arriba y abajo del intercambio, por lo cual se -- consideró al intercambio de cromátides hermanas como la transferencia física de una hebra sencilla de una cadena doble a otra [26].
3. Cuando un mutágeno actúa en una de las hebras del - DNA, esta hebra dañada por la asociación de la doble hebra hermana no dañada (catalizada por endonuclea - sas), se desenrolla la hebra no dañada y se asocia - con ambas regiones simples de la hebra de la doble -- hélice dañada, una segunda hendidura inducida por una endonucleasa en la molécula no dañada conduce a la -- combinación recíproca de la molécula del DNA [26]. Sin embargo, los intentos por correlacionar la inducción de intercambios de cromátides hermanas con al - gún mecanismo de reparación ha sido infructuoso, ya - que se encontró en los pacientes con Xeroderma pig - mentosum, con deficiencias en los mecanismos de re - paración por escisión y postreplicación, tenían fre - cuencias similares a los de personas normales [27], además, el grado de intercambios obtenidos con luz --

ultravioleta no mostró ninguna correlación entre la habilidad de la célula para llevar a cabo la reparación por escisión y la producción de intercambios de cromátides hermanas [28]. La cafeína, que es un inhibidor del mecanismo de reparación postreplicativo, tampoco inhibió la inducción de intercambios de cromátides hermanas producido por Mitomicina-C [29].

4. En los últimos años se han propuesto varios modelos para explicar el intercambio de cromátides hermanas, uno de los más aceptados ha sido el desarrollado por Painter [30] se basa en los descubrimientos que -- identificaron a la subunidad superenrollada cromosómica como la responsable del control de replicación del DNA [31]. La proposición nos dice que el DNA contiene unidades de replicación (agrupamientos de 20 a 80 orígenes de replicación), los cuales se van replicando alternativamente siguiendo la horquilla de replicación, este evento se puede ver afectado -- por agentes que dañan al DNA, ocasionando que la replicación se detenga o que disminuya su velocidad, -- esto origina que un "agrupamiento" se replique completamente y en el subsecuente se de la replicación. En este mecanismo participan todas las enzimas responsables de la replicación como son; helicasas, topoisomerasas y protefnas desestabilizadoras de la doble hélice entre otras. La detección de la topoisomerasa II, en células eucarióticas [32], hace más probable la doble ruptura ya que esta enzima rompe -- transitoriamente a ambas cadenas de DNA. Después de que la doble cadena se rompe existe una unión entre ambas cadenas, la hija y la madre, las cuales deben tener una polaridad adecuada para la unión del DNA; es aquí donde se lleva a cabo el intercambio de cro-

mátides hermanas, interviniendo DNA homólogo. La posterior unión de las hebras de DNA por procesos - conocidos, completa la formación del intercambio de cromátidas hermanas. Las cadenas que se unen son la hija de un agrupamiento replicado, con la del agrupamiento no replicado (Fig. No. 1.2).

Fig. 1.2
MODELO DE PAINTER [32]



- A) Replicamiento de cadena sencilla de DNA
1 Replicones; orígenes de replicación susceptibles
a un rompimiento por agentes que dañan al DNA.
- B) Unión del agrupamiento replicado con el agrupa-
miento no replicado.

En los sistemas "in vivo" una gran variedad de tejidos pueden ser examinados, incluyendo aquellos que son normalmente esenciales (células de hígado) y precursores de células germinales. Así, también una gran variedad de alternativas pueden ser usadas para ensayos de exposición a agentes químicos. Por otra parte por llevarse a cabo los procesos de activación o inactivación de mutágenos y carcinógenos "in vivo" es importante que sus efectos sean examinados en este sistema además de hacerlo "in vitro".

Las investigaciones iniciales para sistemas "in vivo" fueron realizadas por Bloom y Hsu en 1975 en embriones de pollo [21] inyectando BrdU en los embriones de pollo que fueron incubados y a los cuales se les inyectó colcemid antes del sacrificio. Este procedimiento produjo tinción diferencial constante a concentraciones de BrdU alrededor de 12.5 mg/embrión.

Los sistemas "in vivo" también han sido estudiados en plantas, sistemas acuáticos, células de médula ósea, células germinales, células de bazo, macrófago de pulmón, mucosas de pollo y células fetales. La administración de BrdU en células de mamíferos ha sido obstaculizada por la deshalogenación de la base análoga en el hígado [21]. Para mantener concentraciones adecuadas de BrdU durante dos periodos de síntesis de DNA se recurrió inicialmente a inyecciones múltiples [22] o a un proceso de infusión venosa continua [23]. Con el desarrollo de técnicas de implantación subcutánea de pequeñas tabletas de BrdU se simplificó la metodología, sin embargo, la rápida absorción del producto (55 mg en 7 horas) hacía indispensable la colocación de una segunda tableta [24]. Incrementando la dureza de la tableta se logró llevar el tiempo de absorción hasta 16 horas, aún insuficientes para in-

cluir los dos ciclos celulares. El problema al final se resolvió recubriendo las tabletas con agar [25], parafina [26], o mezclando la BrdU con colesterol [27], logrando así aumentar la disponibilidad de la BrdU por más de 24 horas. Otra forma de lograr la absorción adecuada de la BrdU, es a través de la mezcla de esta última con carbón activado [28].

Los congéneres es una fracción no volátil de las bebidas alcohólicas que está formada por alcoholes de elevado peso molecular, aldehídos y ésteres [40, 41] plomo, hierro, cobalto, histaminas, aditivos, colorantes, fenoles y trazas de otros compuestos orgánicos e inorgánicos.

Se han realizado estudios de mutagenicidad de bebidas alcohólicas, en algunos casos solo en la fracción alcohólica y en otros en la bebida como tal, en vista de la gran variedad de componentes de la fracción de congéneres consideramos importante determinar la actividad mutagénica en esta fracción, además los pocos estudios que se han --realizado de esta fracción en otras bebidas se ha hecho --"in vitro"; en nuestro estudio es el primero que se realiza "in vivo" lo cual nos dará una certeza mayor en la determinación del efecto mutagénico en caso de que este se presente.

II. OBJETIVOS

O B J E T I V O S

El objetivo fundamental del presente trabajo es determinar si los residuos sólidos del tequila (congéneres) son capaces de producir daño al DNA, es decir, establecer su capacidad mutagénica a nivel cromosómico en células de mamíferos.

Para cumplir con nuestro objetivo general, se establecen, los siguientes objetivos particulares:

- 1.- Evaluación de la frecuencia de aberraciones cromosómicas con distintas concentraciones de congéneres.
- 2.- Evaluación de la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas a distintas concentraciones de congéneres.
- 3.- Valoración del efecto de estos congéneres sobre la proliferación celular.

III. MATERIAL Y METODOS

MATERIAL EMPLEADO

Se emplearon 30 ratones machos de la línea NIH (S.W.) con un peso de 20 a 26 gramos. Los animales se mantuvieron con alimento y agua "Ad Libitum" organizados en lotes de 5 ratones (Tabla No. 2.1).

OBTENCION DE CONGENERES

En el presente trabajo se estudio una fracción de tequila denominada congéneres con objeto de determinar su probable mutagenicidad, para ello se obtuvieron dichos congéneres por medio de una destilación simple; 3.5 litros de tequila "Sauza" blanco, se sometieron a destilación controlando la temperatura entre 72 y 73°C con el objeto de separar la fase volátil y no volátil con ayuda de vacío, obteniéndose un concentrado no volátil de 250 ml.. Esta fracción se sometió a liofilización (liofilizador marca Feliwelch de 2 etapas con desplazamiento de 160 lt/minuto obteniéndose 220 mg. de un residuo seco color café claro (congéneres)(Foto No. 2.1).

IDENTIFICACION DE CONGENERES POR ANALISIS INFRA-ROJO

Se elaboró una tableta compuesta de 1 mg. de congéneres llevada a 200 mg. con Bromuro de Potasio y se corrió su espectro en un espectrofotómetro de infrarrojo (marca Beckman modelo Acculab-2).

IDENTIFICACION DE CONGENERES POR CROMATOGRAFIA DE GASES

Se disolvieron 5 mg. de congéneres en 5 ml. de agua destilada en un sonicador (marca Braun Sonic modelo 1510) en seis intervalos de 20 segundos cada uno. Se realizó una corrida de 10 microlitros de la solución anterior en un cromatógrafo de gases modelo 5830A marca Hewler Packard - equipado con detector de ionización de flama, en columna de porapak P, con nitrógeno como gas acarreador con corriente de 30 centímetros cúbicos por minuto.

DOSIS APLICADAS EN LOS RATONES

Se disolvieron 160 mg. de congéneres en 60 ml. de agua -- destilada estéril (10 mg./ml.) por medio de sonicación, - de la misma forma que para la solución empleada en cromatografía de gases. En ensayos preliminares se intentó -- conocer el efecto de los congéneres en la mortalidad de - los ratones, por lo que se probaron por vía intraperitoneal las siguientes dosis: 40, 80, 400 y 5000 mg./Kg.. En ningún caso se observó efecto letal solo adormecimiento. En vista de que la clasificación de los componentes en -- listas oficiales sugiere que después de 5000 mg./Kg. es - inoperante ubicar la DL_{50} (43) se decidió usar las si -- guientes dosis: 50, 215, 430, 645 y 860 mg./Kg., diluidas cada una en 0.5 ml. de agua destilada estéril, la disolución se realizó por el método de sonicación al igual que los casos anteriores. Los testigos negativos recibieron agua destilada y los testigos positivos 2 mg./Kg. de mitomicina C (MMC SIGMA) (Tabla No. 2.1). Para la adminis tración de la mitomicina C se hizo una solución en agua

destilada estéril, con una concentración final de 400 mg./ml., se administró 0.125 ml. por ratón de 25 g.

OBTENCION DE CROMOSOMAS DE MEDULA OSEA

La técnica corresponde a la descrita por Mc Fee [33]. con algunas modificaciones:

- 1.- A cada uno de los animales se le implantó subcutáneamente en la parte inferior del dorso una tableta de 53 ± 1 mg. de 5-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU SIGMA), de un diámetro de 5 mm., los cuales se comprimieron con 40 Kg., cubiertas aproximadamente en un 65% de su superficie con parafina de punto de fusión entre 58-60° C.
- 2.- Una hora después se administraron los congéneres por vía intraperitoneal.
- 3.- A las 21 horas de tratamiento se inyectó a los animales colchicina (5 mg./Kg.) por vía intraperitoneal; y 3 horas después se les sacrificó por -- dislocación cervical.
- 4.- Se efectuó una disección para liberar ambos fémures cortándolos por la epífisis, se eliminó tanto el tejido muscular como el tejido conjuntivo que los cubría, se cortó la parte media de la epífisis, y se extrajo la médula ósea con una jeringa (aguja de 23 x 16 mm.), pasando a través de cada extremo del hueso un mililitro de una solución de Cloruro de Potasio 0.075 M.

- 5.- La médula ósea se dispersó en 7 ml. de dicha solución y se colocó en baño maría a 37°C durante 20 - min. para el tratamiento hipotónico.
- 6.- Una vez removido el KCl por centrifugación (1200 - rpm por 10 min.), las células se fijaron con una - mezcla de metanol-ácido acético (3:1) durante 30 - min. en 2 ocasiones.
- 7.- Las preparaciones se hicieron en portaobjetos pre - viamente sumergidos en metanol al 50 %, flameándo se levemente las laminillas.

TINCION DIFERENCIAL

La técnica corresponde a la descrita por Goto, con algu-
nas modificaciones [33].

- 1.- Después de dos días de elaboradas las laminillas, la tinción se efectuó durante 30 min. con el fluo - rocromo bisbenzimidá Hoechst 33258 Riedel-De Haen AG) en dilución de 100 mg./ml. de agua destilada.
- 2.- Las preparaciones se lavaron con agua destilada, - se secaron al aire y se montaron en una solución reguladora de fosfatos-citratos a un pH de 7.0 -- (0.1 M Na_2HPO_4 y 0.05 M $\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) con un cubreob-
jetos de 50 x 24 mm.
- 3.- En éstas condiciones las laminillas se expusieron a una lámpara de luz negra, a una distancia de -- 1.5 cm. durante 30 minutos.

- 4.- Se lavaron en agua destilada, se secaron a 55°C - durante 30 minutos con una solución de colorante de Giemsa al 4%, en solución reguladora de fosfatos 0.01 M a un pH de 6.8 . Las etapas y características del experimento se presentan en la Fig. No. 2.1
- 5.- Por cada animal se analizaron 60 metafases de primera división para determinar la frecuencia de -- aberraciones cromosómicas.
- 6.- De cada ratón se analizaron 30 metafases de segunda división, para determinar la frecuencia de intercambios de cromátides hermanas.
- 7.- Se obtuvo la proporción de células de primera, segunda y tercera división en las primeras 100 metafases encontradas para cada animal con el fin de estudiar la proliferación celular.

TRATAMIENTO ESTADISTICO

Se utilizó la prueba de "t" de student para determinar - si habia diferencias significativas entre las distintas dosis y los controles positivos y negativos.

(Fig. No. 2.1)
 DIAGRAMA DE TRABAJO

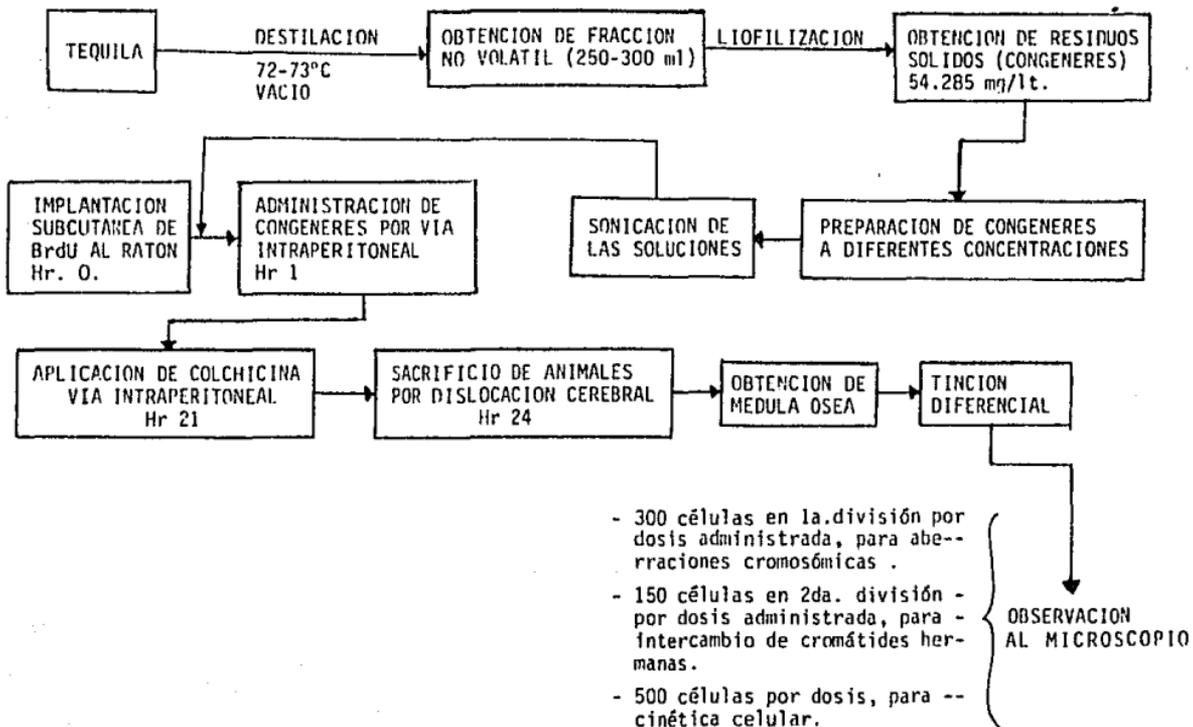


TABLA No. 2.1 DATOS GENERALES SOBRE EL
TRATAMIENTO EXPERIMENTAL

| DOSIS mg/kg | CEPA DEL RATON | P E S O PROM. (g) | SEXO | No. ANIMALES | ABSORCION DE Bz d U PROMEDIO % |
|-------------------------------|-------------------|----------------------|------|-----------------|--------------------------------------|
| D ₀ | N7H (SW) | 23.0 | M | 5 | 75.0 % |
| D ₁ | N7H (SW) | 23.0 | M | 5 | 75.0 % |
| D ₂ | N7H (SW) | 24.1 | M | 5 | 76.4 % |
| D ₃ | N7H (SW) | 22.0 | M | 5 | 72.1 % |
| D ₄ D ₅ | N7H (SW) | 23.0 | M | 5 | 73.5 % |
| * TESTIGO POSITIVO | N7H (SW) | 23.7 | M | 5 | 71.4 % |

* Mitomicina-C 2 mg/kg

Foto No. 2.1 Congéneres del Tequila
su aspecto después de la destilación
y Liofilización.



IV. RESULTADOS

En relación a la técnica de incorporación de BrdU, se observó que la cubierta parcial de parafina permitió una incorporación adecuada del análogo de la timina, ya que en el 100 % de los cromosomas de los animales se observó tinción diferencial. Se absorbió alrededor del 75% de la -- BrdU de la tableta (Fig.No. 3.1, Tabla No. 2.1)

De las observaciones realizadas en células de primera división para detectar aberraciones cromosómicas, se encontraron lesiones de tipo acromático e isoacromático y deleciones cromatídicas, las alteraciones en una cromátide -- fueron las más frecuentes, considerando el total de abe--rraciones, al hacer la comparación estadística con respecto al testigo negativo se presentó un resultado signifi--cativo desde la primera dosis. El testigo positivo tuvo aumentos significativos en los diferentes tipos de aberraciones analizadas, lo que demostró que la técnica utilizada funcionó correctamente. No se observaron alteraciones de tipo cromosómico (Tabla No. 3.1, Foto No. 3.1). La - frecuencia de aberraciones cromosómicas mostró una tendencia para definir una curva positiva para cada tipo de aberración a excepción de las deleciones isocromatídicas, como se puede observar en la Fig. No. 3.2, lo que demuestra la dependencia de la aparición de aberraciones con la concentración de congéneres de tequila presente.

En lo que concierne a los intercambios de cromátides hermanas, podemos observar que existe un aumento significativo a partir de la dosis de 215 mg/Kg., que se observa significancia, al realizarle una curva dosis-respuesta - del efecto de los congéneres de tequila con respecto a - la frecuencia de intercambios de cromátices hermanas; obtuvimos un coeficiente de correlación lineal de 0.9917 y una pendiente positiva, lo que indicó que la frecuencia

de Intercambios de Cromátides Hermanas es directamente --
proporcional a la dosis (Fig. No. 3.3 , Tabla No. 3.2, --
Foto No. 3.2).

En relación al efecto de los congéneres de tequila sobre
la proliferación celular de la médula ósea de ratón, se -
observa que aunque existe una leve tendencia a disminuir
el número de primeras divisiones e incrementar las segun-
das, al calcular el tiempo de generación promedio estas -
modificaciones fueron aparentemente insignificantes, ob-
teniéndose una línea recta con pendiente de cero (Fig. -
No. 3.4, Tabla No. 3.3, Foto Nò. 3.2 y 3.3).

TABLA No. 3.1 FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS INDUCIDA POR
LOS CONGENERES DEL TEQUILA. MEDULA OSEA DE RATON.

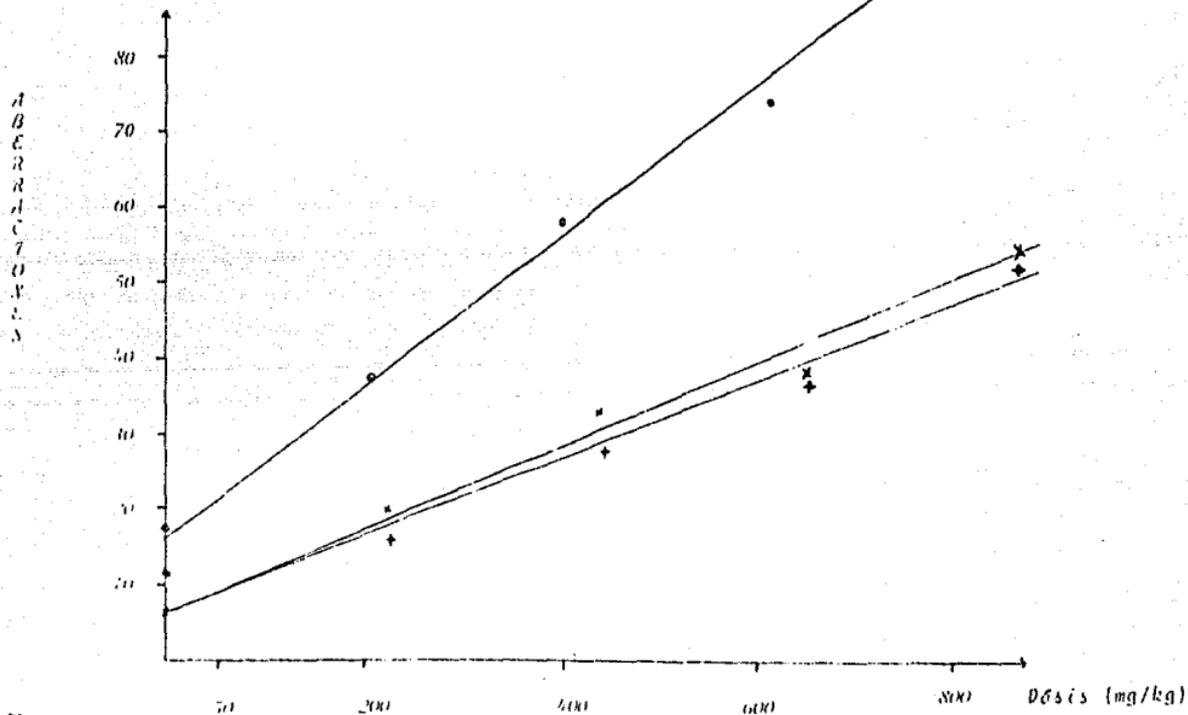
| DOSIS mg/kg | No. CELULAS | No. ANIMALES | LESIONES | | DELECCIONES | | TOTAL (1) x ± e e ■ |
|--------------------|----------------|-----------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | | | ACROMATICAS x ± e e ■ | ISOACROMATICAS x ± e e ■ | CROMATIDICAS x ± e e ■ | ISOCROMATIDICAS x ± e e ■ | |
| 0 | 300 | 5 | .036 $\frac{11}{\pm}$.0008 | .003 $\frac{1}{\pm}$.0004 | .02 $\frac{6}{\pm}$.0004 | 0 | .06 $\frac{18}{\pm}$.0005 |
| 215 | 300 | 5 | .05 $\frac{15}{\pm}$.001 | .006 $\frac{2}{\pm}$.0008 | .053 $\frac{16}{\pm}$.001 | 0 | .11 $\frac{33}{\pm}$.0014* |
| 430 | 300 | 5 | .085 $\frac{26}{\pm}$.0012* | .003 $\frac{1}{\pm}$.0004 | .073 $\frac{22}{\pm}$.0012* | 0 | .163 $\frac{49}{\pm}$.0004* |
| 645 | 300 | 5 | .083 $\frac{25}{\pm}$.0022* | 0.13 $\frac{4}{\pm}$.001 | .103 $\frac{31}{\pm}$.00038* | 0 | .20 $\frac{60}{\pm}$.0017* |
| 860 | 300 | 5 | .123 $\frac{37}{\pm}$.0017* | .013 $\frac{4}{\pm}$.0008 | .143 $\frac{43}{\pm}$.0016* | 1 | .28 $\frac{84}{\pm}$.0031* |
| MHC (3) 2 mg/kg | 300 | 5 | .246 $\frac{74}{\pm}$.0024* | .02 $\frac{6}{\pm}$.0008* | .423 $\frac{127}{\pm}$.0032* | .016 $\frac{5}{\pm}$.00067* | .706 $\frac{212}{\pm}$.0186* |

(1) Media \pm error estandar de la media
Mitomicina C

(2) Incremento significativo con una $p \leq 0.05$ (t-student)

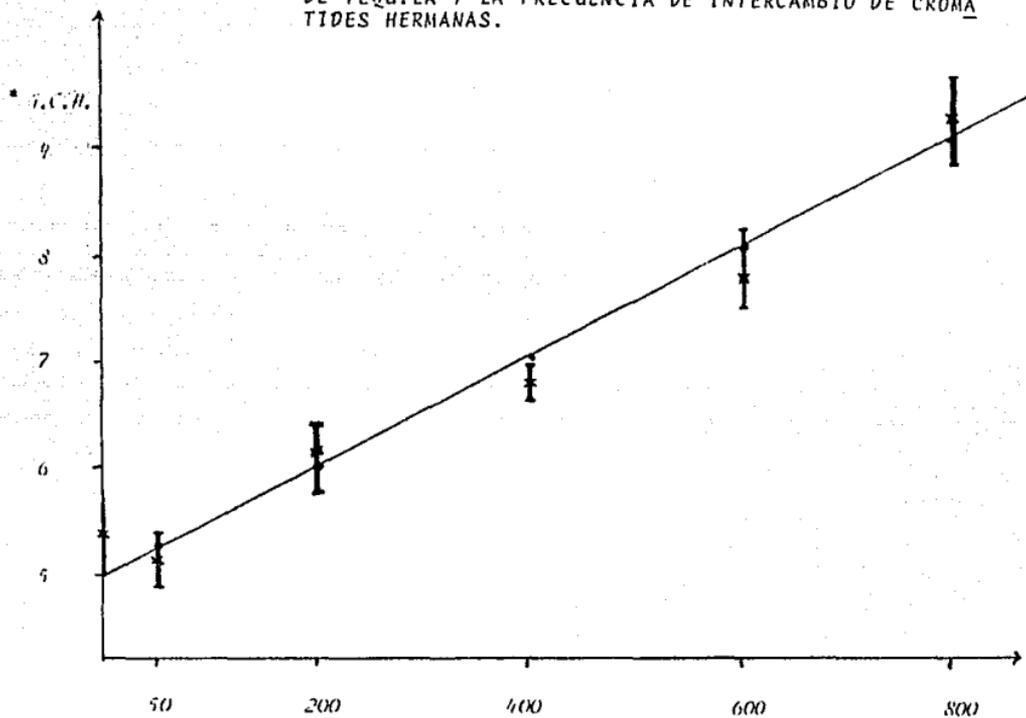
(3) Mitomicina C

FIG. NUM.3.2 RELACION ENTRE EL EFECTO DE LOS CONGENERES DE
TEQUILA Y LA DOSIS (mg/kg)
FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS



- LESIONES ACROMATICAS
- x ABERRACIONES CROMATIDICAS
- ABERRACIONES TOTALES

FIG. NUM. 3.3 RELACION ENTRE EL EFECTO DE LOS CONGENERES DE TEQUILA Y LA FRECUENCIA DE INTERCAMBIO DE CROMATIDES HERMANAS.



IXSIS mg/kg

* INTERCAMBIOS DE CROMATIDES HERMANAS

TABLA NUM. 3.2. EFECTO DE LOS CONGENERES DEL TEQUILA
 SOBRE LA FRECUENCIA DE INTERCAMBIO DE CROMATIDES
 HERMANAS EN MEDULA OSEA DE RATON.

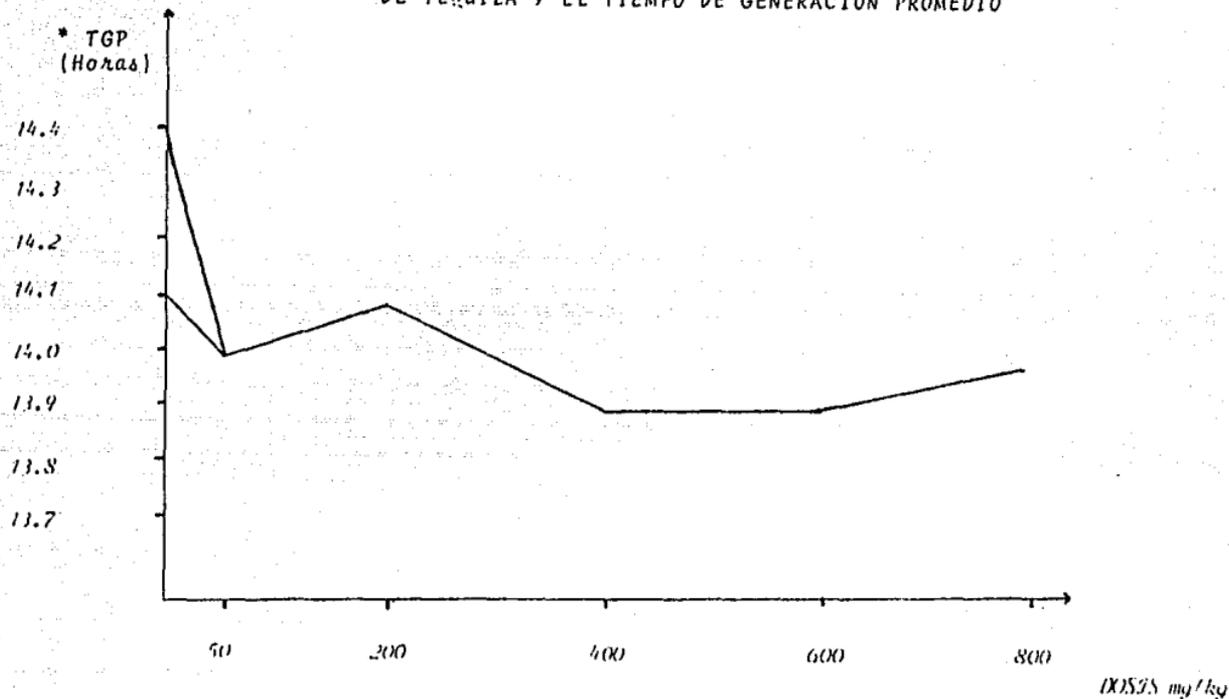
| DOSIS mg / kg | CELULAS ANALIZADAS | NUMERO DE ANIMALES | INTERVALO ⁽¹⁾ | I C H (MEDIA \pm D.E) | (2) E.E.H. |
|------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------|
| 0 | 150 | 5 | 0-12 | 5.4 \pm 0.44 | 0.199 |
| 50 | 150 | 5 | 0-11 | 5.2 \pm 0.400 | 0.200 |
| 215 | 150 | 5 | 0-15 | 6.2 \pm 0.42 ⁽³⁾ * | 0.188 |
| 430 | 150 | 5 | 3-15 | 6.8 \pm 0.16 [*] | 0.071 |
| 645 | 150 | 5 | 4-15 | 8.0 \pm 0.36 [*] | 0.164 |
| 860 | 150 | 5 | 5-22 | 9.2 \pm 0.30 [*] | 0.307 |
| MMG 2 mg / kg | 150 | 5 | 11-34 | 20.4 \pm 2.26 [*] | 1.013 |

1 Media \pm Desviación Estandar

2 Error Estandar de la Media

3 Estadísticamente significativo con $p - 0.05$ (t-student)

FIG.NUM.3.4 RELACION ENTRE EL EFECTO DE LOS CONGENERES DE TEQUILA Y EL TIEMPO DE GENERACION PROMEDIO



* TGP = Tiempo de generación Promedio

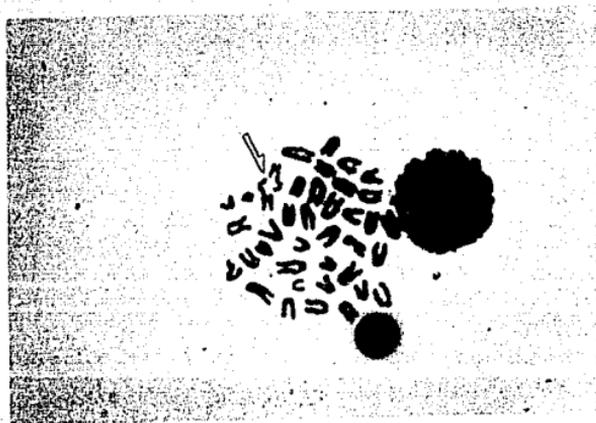
TABLA NUMERO 3.3

EFEECTO DE LOS CONGENERES DE TEQUILA SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR. MEDULA OSEA DE RATON. (Diferencias no significativas $p \leq 0.05$)

| DOSIS mg/kg | CELULAS ANALIZADAS | PRIMERA DIVISION % | SEGUNDA DIVISION % | TERCERA DIVISION % | TIEMPO PROMEDIO GENERACION (*HORAS \pm D. E) |
|----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---|
| 0 | 500 | 37.8 % | 57.0 | 4.4 | 14.09 \pm 0.01 |
| 50 | 500 | 34.9 % | 61.0 | 4.1 | 13.99 \pm 0.03 |
| 215 | 500 | 36.4 % | 59.2 | 4.4 | 14.08 \pm 0.14 |
| 430 | 500 | 32.4 % | 62.8 | 4.8 | 13.91 \pm 0.14 |
| 645 | 500 | 30.2 % | 66.0 | 3.8 | 13.88 \pm 0.03 |
| 860 | 500 | 30.6 % | 66.6 | 2.8 | 13.93 \pm 0.19 |
| MNC 2 mg/kg | 500 | 32.2 % | 67.2 | 0.6 | 14.24 \pm 0.15 |

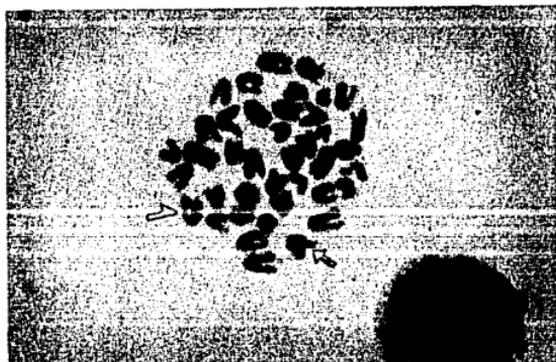
* Horas \pm Desviación Estandar

FOTO No. 3.1 CELULA DE PRIMERA DIVISION



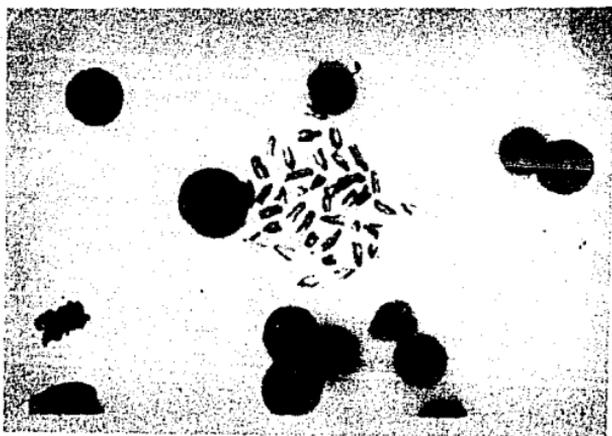
↓ = Rompimiento cromosómico

FOTO No. 3.2 CELULA DE SEGUNDA DIVISION



↓ = Intercambio simple de cromátides hermanas
↑ = Doble intercambio de cromátides hermanas

FOTO No. 3.3 CELULA DE TERCERA DIVISION



V. DISCUSSION

Desde hace algunos años el consumo de bebidas alcohólicas se ha incrementado en gran medida y la mayoría de las investigaciones referentes a estudios de toxicidad, mutagénesis, carcinogenicidad y teratogénesis solo han considerado al etanol como agente causal (35, 36, 37, 38), siendo que las bebidas alcohólicas no tienen etanol puro, y si una combinación de éste con una gran variedad de componentes a los cuales se les ha denominado congéneres, los cuales, según estudios realizados, se encuentran en diferente concentración para cada tipo de bebida e incluso ocurren variaciones entre bebidas de la misma marca. Esto - debido a las materias primas utilizadas, a los procesos - de fermentación, destilación y procesos de almacenamiento [39].

Entre los componentes que conforman a los congéneres se han encontrado alcoholes de elevado peso molecular, aldehidos y ésteres [40, 41], plomo, hierro, cobalto, histaminas, aditivos, colorantes, fenoles y trazas de un gran número de otros compuestos orgánicos e inorgánicos. Por cromatografía de gases y análisis infra-rojo se pudieron detectar algunos de éstos componentes en los congéneres - de tequila, como son; metanol, alcohol isobutílico y n-butílico, grupos funcionales hidroxilo con interacción, metilo, cetónico-alcohol secundario y alcohol primario.

Es bien sabido que la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica de alcohólicos - son significativamente elevadas cuando son comparadas con las de no alcohólicos [38, 42] y debido a que el etanol es el mayor componente de las bebidas alcohólicas, establecieron que el acetaldehido (principal metabolito del - etanol en hígado) era el principal mutágeno y carcinógeno

de tales bebidas [43]. Pero la contribución de los congéneres presentes en estas bebidas alcohólicas no puede - ser descartada. Para dilucidar lo anterior, el presente estudio se realizó con el objetivo de investigar bajo - - drásticas condiciones si los congéneres del tequila po-- seen efectos genotóxicos. Ya ha sido determinado el efecto genotóxico de los congéneres de bebidas como el Whisky y el Brandy, pero dado que el tequila es una bebida típicamente mexicana y de gran consumo en el país nuestro interés se centró en él.

Nagao y colaboradores en 1981 [36] estudiaron el efecto de los residuos no volátiles de varias marcas de whisky, brandy y un brandy especial de manzana en Salmonella - - typhimurium TA 100, encontrándolos como mutágenos directamente activos.

Loquet y colaboradores [35].utilizando Salmonella typhimurium encontraron acción directa de los mutágenos de diferentes fracciones de brandys de manzana caseros de Normandía y algunas fracciones de whiskies, coñacs, armaniacs y rones.

De bebidas alcohólicas con diferente contenido de congéneres se han estudiado sus efectos sobre una variedad de - - factores fisiológicos, de conducta, toxicidad y efectos - crónicos, concluyendo que la contribución de los congéneres en los efectos medidos, tiene relevancia [44, 45, 46, 47]. Las formas de daño que causan las diferentes bebidas solo difieren con relación a la potencia y curvas de tiempo-acción [48]. Pero también se ha encontrado que la ingestión repetida de estos componentes puede causar - su acumulación en sangre o cerebro, potencializando sus - efectos.

La mayoría de los agentes químicos solo causan aberraciones de tipo cromatídico, que en general son la consecuencia de errores en el mecanismo de replicación que se producen durante la fase de síntesis del DNA posterior a la exposición, o bien constituyen el reflejo de una reparación defectuosa o inconclusa del DNA [49]. De acuerdo al conocimiento anterior, resulta evidente por que es conveniente el análisis cromosómico para determinar si un compuesto daña o no al DNA.

Algunos investigadores como Perry y Evans evaluaron mutágenos conocidos con la técnica de intercambio de Cromátides Hermanas, encontrando que la mayoría inducían incrementos altamente significativos, ya que duplicaban la frecuencia basal de Intercambios de Cromátides Hermanas respecto al control, pero con esas mismas dosis solo se producían Aberraciones Cromosómicas mínimas [50]. Esto demostró (además de comprobar que la inducción de Intercambios de Cromátides Hermanas es un método simple y sencillo para valorar mutágenos químicos), que los mecanismos para la inducción de aberraciones cromosómicas e Intercambio de Cromátides Hermanas son diferentes. Por lo que se incluyeron ambas pruebas, además de la cinética celular, para cumplir con el objetivo general [51].

La evaluación de la cinética celular es de gran importancia cuando se trabaja con un posible mutágeno, ya que algunos compuestos tienen la facultad de acelerar o retardar el ciclo celular [52] y es por ello que se requieren conocer los valores de cinética celular y así calcular el tiempo de generación promedio. Este estudio se --realizó "in vivo", ya que aunque las técnicas que emplean ratones u otros mamíferos aparentemente son más complejas,

proporcionan una visión más real del riesgo potencial de un agente químico.

Con relación a los resultados obtenidos en la determinación de la frecuencia de Intercambios de Cromátides Hermanas, el método empleado para llevar a cabo la incorporación de la BrdU "in vivo", mostró buena reproducibilidad en uno de los puntos más importantes de la técnica que se refiere a la absorción del análogo de la timina por los tejidos. En nuestro caso, después de la incorporación y tratamiento que duró 21.5 horas, obtuvimos de la zona subcutánea un promedio del 25 % de la tableta original de -- BrdU, que es similar a lo observado por Mc Fee [33] al determinar que la absorción a las 22 horas de la administración del análogo es de 78.15 %. Con respecto a la frecuencia de Intercambios de Cromátides Hermanas, el basal nuestro fué de 5.40 ± 10.44 y el obtenido por Mc Fee fué de 3.48 ± 2.05 , consideramos que la causa de ésta discrepancia fué el peso de los ratones, que en nuestro caso -- tuvo un promedio de 23 gramos y el obtenido por Mc Fee -- fué de 30 gramos por lo que la dosis de BrdU, a pesar de ser la misma cantidad administrada en ambos casos, se vió aumentada en -- nuestro experimento al usar ratones de menor peso.

La determinación de Intercambios de Cromátides Hermanas, utilizada como parámetro para medir el daño cromosómico -- causado por los congéneres de tequila, muestra en sus resultados un incremento significativo de intercambios desde la dosis de 215 mg/kg y muestra respuesta progresiva -- con las siguientes dosis. Estos resultados implican una trascendencia biológica ya que para que un agente sea -- francamente mutagénico es necesario que muestre significancia con respuesta progresiva con las diferentes dosis [53] como es nuestro caso. Estos resultados podemos

compararlos con un estudio realizado por Hoeff y Obe en el cual ellos utilizan whisky escoces, whisky de bourdon, brandy y ron, en un estudio "in vitro" utilizando linfocitos humanos, encontraron que los congéneres de tales bebidas son capaces de inducir incremento significativo y progresivo en los Intercambios de Cromátides Hermanas - - [54].

Los resultados de la evaluación de las Aberraciones Cromosómicas "in vivo" muestran un incremento significativo, -- con respecto al testigo negativo, en lesiones acromáticas y deleciones cromatídicas a partir de una dosis de 430 mg./Kg. (62.85 mg. de congéneres/litro de tequila) y no producen incrementos significativos en lo que respecta a lesiones isocromatídicas y deleciones isocromatídicas, lo que indica que el daño producido bajo este criterio se realiza en la fase de síntesis [55].

Este último parámetro conjuntamente con el de Intercambios de Cromátides Hermanas nos refuerza aún más el conocimiento del daño a nivel genético al cual inducen los congéneres de tequila.

Con respecto a la interpretación del efecto de los congéneres de tequila sobre la cinética celular, no se produjo -- ningún efecto inhibitorio o acelerador de los ciclos celulares, en las diferentes dosis con respecto a los controles negativos.

Por lo que concierne al control (mitomicina-C), con la dosis empleada el compuesto indujo incrementos significativos tanto de Aberraciones Cromosómicas en sus distintos tipos, como de Intercambio de Cromátides Hermanas, lo que -- confirma la efectividad de la técnica y da apoyo a la in-

interpretación del daño cromosómico causado por los congéneres de tequila.

Este estudio lo consideramos de suma importancia ya que -- aunque algunos investigadores trataron de dilucidar el --- efecto genotóxico de congéneres de algunas bebidas alcohólicas, como ya se mencionaron anteriormente, ninguno lo ha realizado "in vivo" como en el presente trabajo y hasta -- ahora no se había visualizado en el tequila, bebida de -- gran consumo en nuestro país. Y en vista de los resultados obtenidos nos refuerza el conocimiento de que esta --- fracción del tequila si posee efectos genotóxicos.

Aunque la evaluación de las propiedades genotóxicas sea -- un aspecto fundamental para normar el criterio que decida el uso, restricción o prohibición de una sustancia o compuesto en la sociedad occidental el alcohol tiene la peculiaridad de ser el único agente farmacológico potente -- del cual se "tolera" la autointoxicación. Si se descarta el tabaquismo, el alcoholismo es, con mucho, el problema -- más grave con fármacos tóxicos en México. Si se estima en términos de accidentes, pérdidas de la productividad, crímenes, muerte o daño a la salud, los costos sociales combinados del problema de los bebedores en México se calcula en miles de millones de pesos al año.

VI. CONCLUSIONES

La metodología utilizada en el presente estudio nos permitió cumplir con los objetivos establecidos en la evaluación de mutagenicidad de los congéneres de tequila blanco en células de médula ósea de ratón "in vivo" por lo cual concluimos lo siguiente:

1. Los congéneres de tequila inducen un incremento significativo de intercambios de cromátides hermanas de células de médula ósea de ratón "in vivo."
2. Los congéneres de tequila inducen así mismo un incremento significativo de aberraciones cromosómicas en células de médula ósea de ratón "in vivo. "
3. Los congéneres de tequila no inducen ningún -- efecto sobre la cinética celular en células - de médula ósea de ratón "in vivo."

VII. RESUMEN

En el presente estudio se analizó la mutagenicidad que -- pueden causar los congéneres de tequila en células de médula ósea de ratón in vivo, esto se hizo por medio de ensayos citogenéticos que se utilizan como parte de las pruebas para evaluar el potencial mutagénico como son la detección del tipo y frecuencia de aberraciones cromosómicas y la frecuencia de intercambios de cromátides hermanas.

Se valoraron tales parámetros in vivo estudiando la médula ósea de ratón; las dosis utilizadas fueron : 50, 215, 430, 645 y 860 mg./Kg. diluidas cada una en 0.5 ml. de agua destilada estéril.

En las observaciones realizadas para detectar aberraciones cromosómicas se encontraron lesiones de tipo acromático -- e isoacromático y deleciones cromatídicas, las alteraciones en una cromátide fueron las más frecuentes, al hacer la comparación estadística con respecto al testigo negativo se presentó un resultado significativo desde la primera dosis.

Con respecto a las observaciones realizadas en cuanto a intercambios de cromátides hermanas, se observó un aumento significativo a partir de la dosis de 215 mg./kg.

En cuanto al efecto de los congéneres de tequila sobre la proliferación celular vemos que no hay un efecto determinante.

En vista de los resultados obtenidos en este sistema utilizado si se encontró un efecto mutagénico por lo cual consideramos continuar un estudio más profundo de los congéneres de tequila ya que su consumo es muy amplio en nuestro país.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. F. VOGEL A.G. MOTULSKY
Human Genetics Problems and Approaches
By Springer-Verla and Berlin Heidelberg
Pág. 46-47, 153, 282, 359-360
New York 1979

2. CHARLOTTE J. AVERS
Genetics
Rutgers University
Willard Grand Press Boston
Pág. 371-396, 404-424, 538
1984 2da. Ed.

3. VRIES, H.
Recherches Experimentales Sur L'origenedes Especes
Rev. Gev.
Pág. 23-24
Boston 13, 5, (1981)

4. BARTHELMESS, A.
Mutagenic Substances in the Human Environment In:
Chemical Mutagenesis in Mammals and Man.
Vogel F., Röhrborn, G. (cols), 1973
Pág.69-147

5. BARTHELMESS, A.
Erbgefahren im Zivilisationsmilieu
München: Goldmann 1973
Pág. 58-60

6. MULLER, H.J.
Artificial Transmutacion of the Gene
Science 66, 84-87 (1927)

7. AUERBACH, C., ROBSON J.M.
Chemical Production of Mutations
Nature 157, 302 (1946)

8. OEYLKERS, F.
Die Auslösung von Chromosomemutationen in Der Meiosis Durch Einwirkung Von Chemikalien.
Induktives Abstammungs-Vererbungslhre 81, 313-341 (1943)
9. RAPOPORT, I.A.
Carbonyl Compounds and the Chemical Mechanism of Mutation
C.R. Acad. Sci. USSR 54,65 (1976)
10. CONEN, P.E., LANSKY, G.S.
Chromosome Damage During Nitrogen Mustard Therapy
BR Med. J. 1961/I, 1055-1057
11. BARTHELMESS, A.
Mutagenic Substances in the Human Environment
In Vogel, F., and Röhrborn, G. (EDS)
Chemical Mutagenesis in Mammals and Man
Springer-Verlag, New York, 1970, p.p. 69-197
12. TATES, A.D. and NATARAJAN, A.T., VAN BULL, F.P., MEYERS, M, and DE VOGEL, N.
A Correlative Study on the Genetic Damage Induced by Chemicals Mutagens in Bone Marrow and Spermatogenesis of Mice. I. CNG-ETHANOL
Mutat Res. 37: 83-90, 267-278, 1976
13. CASARETT AND DOULL'S
Toxicology the Basic Science of Poisons
2da. Ed. Ed. Mac. Millan Publishing Co., Inc.
New York 1980 pag. 147, 153
14. Genetic Damage in Man Caused By Environmental Agents
pag. 229, 1980

15. KOHILA T. ERIKSSON K. AND HALKKA O.
Goniomitosis in rats Subjected to Ethanol
Med. Biol., 54, 150-161, (1976)

16. OBE G., RISTOW H. AND HERA J.
Chromosomae Damage by Alcohol In Vitro and In Vivo
In M.M. Gross (Ed)
Alcohol intoxication and withdrawal
Vol. III Biological Aspects of Ethanol, Plenum,
47-70 (1977).

17. PRESTON, R., ET.AL.
The U.S. EPA'S Gene-Tox Program. Mammalian In Vivo
and In Vitro Cytogenetic Assays:
Mutation Reg. 87: 143-188, 1981

18. SHELOON WOLFF
Sister Chromatides Exchange
Ann Rev. Genet II, 83-201 (1977)

19. SCHNEIDER E. TICE R. AND KRAN D.
Bromodeoxyuridine Defferential Chromatid Staining
Technique: A new approach to examining SCE and Cell
replications kinetics.
Methods Cell Biology, Vol. XX, Cap. 25, 379-409 (1977)

20. NATARAJAN, AT., KIHLMAN, B.A. AND OBE G.
Use of the 5-Bromodeoxyuridine-Labeling Technique
For Exploring Mechanism Involved in the Formation
of Chromosomac Aberrations.
Mut. Res., 75, 307-317 (1980)

21. BLOOM, S.E. AND TSU, T.C.
Differential Fluorescence of Sister Chromatids in -
Chicken Embryos Exposed to 5-Bromodeoxyuridine
Chromosoma 51: 261-267 (1975)

22. PERRY, P. AND WOLFF, S.
New Giemsa Method for the Differential Staining of Sister Chromatid
Nature 251: 156-158, 1974
23. I KUSHIMA T. AND WOLFF S.
SCE Induced by Light Flasher to 5-Bromodeoxyuridine Substituted Chinese Hamster Chromosomes
Exp. Cell. Res., 87, 15-19 (1974)
24. BROGGER A.
Chromosomes Damage in Human Mitotic Cells After In Vivo and In Vitro Exposure to Mutagens. Genetic Damage in Man Caused by Environnemetal Agents
Acad. Press 1980
New York
25. KATO, H.
Mecanism for SCE and their Relation to the Production of Chromosomal Aberrations
Chromosoma 59: 179-191, 1977
26. BLENDER, M., GRIGGS, H. AND BEDFORD, J.
Recombinational DNA-Repair and SCE if
Mutation, Res. 24: 117-123 (1974)
27. KATO, H. AND STICH, H
SCE in Ageing and Repair-Deficient Human Fibroblast
Nature 260: 447-448, 1976
28. DE WEERD, K., KEISZER, W. AND RAINALDI, G.
Induction of SCE in Xeroderma Pigmentosum Cell After Exposure to Ultraviolet Light
Mutation Reg 45: 253-261, 1977

29. PALITTI, F. AND BECCHETTI, A.
Effect of Caffeine on SCE and Chromosomal Aberrations/Induced by mutagens in Chinese Hamster Cells.
Mutation Res 45: 157-159, 1977
30. PAINTER, R.
A Replication Model for SCE
Mutation Res 70: 337-341, 1980
31. COOK, P.C. AND BRAZELL, I.A.
Super Coils in Human DNA
J. Cell SCI 19: 261-279 (1975)
32. LIU, L. AND ALBERTS, B.
Type II DNA Topoisomerases Enzymes which unknot a Topologically Knotted DNA Molecule via a Reversible Double Strand Break
J. Cell SCI. 19: 261-279 (1975)
33. MC FEE, A., LOWE, L., SAN SEBASTIAN, J.
Im Proved Sister Chromatid differentiation using parafin-coated Bromodeoxyuridine tablets in mice.
Mutation Res 119: 83-88, 1983
34. GOTO K; AKEMATSC, T; SHIMATZU. H.
Simple Differential Giemsa Staining of sister chromatid after Treatment with Photosensitive Dyes and -- Exposure to Light and the Mechanism of Staining Chromosoma 53: 223-230, 1975
35. LOQUET, C.G. TOUSSAINT AND J.Y. LE TALAER (1981)
Studies on Mutagenic Constituents of Apple Brandy and various Alcoholic Beverages Collectec in Western France, a High incidence Area for Desophageai Cancer
Mutation Res., 88, 155-164

36. HINARO NAGAO, M., Y. TAKAHASHI, K. WAKABAYASHI AND T. SUGIMURA (1981)
Mutagenicity of Alcoholic Beverages,
Mutation Research 88, 147-154 (1981)
37. LEE, J.S.K., AND L.Y.Y. FONG (1979)
Mutagenicity of Chinese Alcoholic Spirits, Food
Cosmetic Toxicology 17, 575-578
38. OBEG., AND H. RISTOW (1979)
Mutagenic, Cancerogenic and Teratogenic Effects
of Alcohol
Mutation Res., 65, 229-259
39. HOBE B. GREIZERTEIN
Conger Contents of Alcoholic Beverages
J Of Stud. ou Alcohol (1981) 42 (11), 1030-1037
40. SNELL, C.A.
The Conger Content of Alcoholic Beverages Q.J. Stud
Alcohol 19: 69-71, 1958
41. CARROLL. R.B.
Analysis of Alcoholic Beverages by Gas-Liquid
Chromatography Q.J. Stud Alcohol
Suppl No. 5, p.p. 6-19, 1970
42. OBE G. (1980)
Mutagenic Activity of Ethanol, in: K.ERIKSSON, J.D.
SINCLAIR AND K. KIIANMAA (EDS)
Animal Models in Alcohol Research
Academic Press
New York, p.p. 377-391
43. OBE G. (1981) Acetaldehyde not Ethanol is Mutagenic
in: A. KAPPAS (ED), Progress in Mutation Research,
Vol. 2, Elsevier/North-Holland, Amsterdam p.p.19-23

44. Hagg, H.B., Finnegan, J.K., Larson, P.S. AND Smith R.B. Jr.
Studies on the Acute Toxicity and Irritating Properties of the congeners in Whisky Toxic
 Appl. Pharmac 1: 618-627, 1959
45. Haggard, H.W., Greenberg, L.A. AND Cohen, L.H.
The Influence of the congeners of distilled spirits upon the physiological action of alcohol Q.J.
 Stud Alcohol 4: 3-56, 1943
46. Greenberg, L.A.
The appearance of Some Congeners of Alcoholic Beverages and their Metabolites in blood Q.J.
 Stud. Alcohol, Suppl. No.5, p.p. 20-25, 1970
47. Kalant, H., Le Blac, A.E., Wilson, A. AND Homatiors, S.
Sensorimotor and Physiological Effects of Various Alcoholic Beverages
 p.p. 371-379 In: Israel Stam, S. AND Lambert, S. EDS. ALCOHOL, DRUGS, AND TRAFFIC SAFETY, TORONTO, 8-13 SEPT. 1974. TORONTO; ADDICTION RESEARCH - - FOUNDATION; 1975
48. Allen, J. Shuler, C. AND Latt, S.
Bromo Deoxyuridine Tablet Methodology for In Vivo Studies of DNA Synthesis
 Somatic Cell Genet 4: 393-405, 1978
49. Evans, J. AND O'Riordan, N.
Human Peripheral Blood Lymphocytes for the Analysis of Chromosome Aberrations in Mutagen Test
 Mutation Res 31: 135-148: 1975

50. PERRY P. AND EVANS, H.
Cytological Detection of Mutagen-Carcinogen - -
Exposure by Sister Chromatid Exchange
Nature 258: 121-125 (1975)
51. INTERNATIONAL COMMISSION FOR PRODUCTIONS AGAINST
ENVIRONMENTAL MUTAGENS AND CARCINOGENS ICPEMC -
WORKING PAPER 5/2.
Epidemiologic and Design Aspects of Studies of -
Somatic Chromosome Bee age and Sister-Chromatid
Exchange
Mutation Res. 99: 373-382, 1982
52. PALITTI Y COL. 1983
O' SCHNEIDER, E., STERNBERG, H. AND TICE, R.:
In Vivo analysis of Cellular Replication,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 2041-2044 (1977)
53. LATT, S.
Sister-Chromatid Exchanger A. Report of The
Gene-Tox Program,
Mutation Res. 87: 17-62, 1981
54. H.HOEFT AND G. OBE (1983)
SCE Inducing Congeners in Alcoholic Beverages
Mutation Research, 121, p.p. 247-251
55. OBE G. D. GOBEI, H. ENGELN, H. HERHA AND A.T.
NATARAJAN (1980)
Chromosomal Aberrations in Peripheral Lymphocytes
Of Alcoholics,
Mutation Res., 73, 377-386