

53
2c1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



"EVALUACION IN VIVO DEL INTERCAMBIO DE
CROMATIDAS HERMANAS (I.C.H.) INDUCIDAS
POR LA FRACCION ALCOHOLICA DEL TEQUILA"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
PETRA YESCAS GOMEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Cuautitlán Izcalli

Abril de 1990



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.

INDICE

	Págs.
RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	
I.1. Aspectos Históricos sobre el consumo del alcohol.	2
I.2. Concepto de Alcoholismo.	4
I.3. Etiopatogenia del Alcoholismo.	5
I.4. Cinética del Alcohol.	8
I.5. Metabolismo del Alcohol.	9
I.6. El etanol como principal componente de bebidas alcohólicas.	12
I.7. Repercusiones del Alcoholismo.	15
I.8. Intercambio de Cromátidas Hermanas (I.C.H.) y Alcoholismo.	20
II. OBJETIVOS	28
III. MATERIAL Y METODOS	
III.1. Material Biológico.	29
III.2. Obtención de la fracción alcohólica del tequila.	29
III.3. Determinación de la Dosis Letal Media (DL ₅₀).	30
III.4. Evaluación de la frecuencia de Intercambio de Cromátidas Hermanas (I.C.H.).	31
a) Elaboración de tabletas de 5- BrdU.	31
b) Implantación subcutánea de las tabletas de 5- BrdU.	31

c) Administración de la fracción alcohólica del tequila.	32
d) Obtención de cromosomas de médula ósea - femoral.	32
e) Proceso de tinción diferencial para I.C.H.	33
f) Observaciones.	34
g) Tratamiento estadístico.	35

IV. RESULTADOS

IV.1. Obtención de la Fracción alcohólica del tequila.	36
IV.2. Determinación de la DL_{50} de la fracción alcohólica del tequila.	36
IV.3. Evaluación de la frecuencia de I.C.H.	40

V. DISCUSION

53

VI. CONCLUSIONES

57

VII. REFERENCIAS

58

R E S U M E N

La ingesta desmedida y la producción de bebidas alcohólicas figura actualmente entre las principales preocupaciones de salud pública del mundo , ya que representa un obstáculo para el desarrollo socioeconómico de los países, una carga importante para los servicios de salud, debido a la gran variedad de manifestaciones clínicas, genéticas, fisiológicas y socioeconómicas.

Actualmente, las investigaciones realizadas tratan de dilucidar el mecanismo que ha conducido al individuo al consumo desmedido de bebidas alcohólicas. Se tienen al respecto estudios donde se ha demostrado, que el consumo de bebidas alcohólicas daña al ADN, y su consumo crónico exhibe una frecuencia significativa de aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas (I.C.H.).

La mayoría de las investigaciones sobre alcoholismo se han relacionado exclusivamente al etanol comunmente llamado alcohol, sin embargo en las bebidas existen mezclas complejas de compuestos orgánicos e inorgánicos, que manifiestan su efecto mutágeno en los diferentes organismos expuestos a ellas.

Con el propósito de investigar el efecto mutágeno que presenta la fracción alcohólica del tequila en mamíferos , se decidió realizar la evaluación del intercambio de cromátidas hermanas, en médula ósea de ratón como parámetro indicativo.

Los resultados muestran un incremento significativo de intercambios de cromátidas hermanas, observandose una relación dosis-respuesta.

I. INTRODUCCION

I.1. ASPECTOS HISTORICOS SOBRE EL CONSUMO DE ALCOHOL

Es probable que desde tiempos pre-históricos el hombre se haya ingeniado para producir bebidas alcohólicas mezclando frutas, granos y cereales con agua, dejándolas al sol.

Las frutas fermentadas produjeron los primeros vinos, los cereales las primeras cervezas, su elaboración figura entre los primeros descubrimientos del ser humano (1).

En el año 1700 A.C., se presentó el primer intento de que se tiene conocimiento, por llevar a cabo una campaña de prevención hacia el uso desmedido de las bebidas alcohólicas (1,2).

El proceso de destilación fué descubierto en el siglo VIII por los alquimistas musulmanes, pero no fué sino muchos años más tarde que su nombre, en su acepción como aguardiente empezó a usarse como sinónimo de bebida embriagante.

Los propios árabes al conquistar nuevos pueblos, extendieron el cultivo de la vid, así como la producción de aguardiente por toda Europa y después por Asia (2).

De ahí que la palabra alcohol deriva del vocablo árabe Alkohl, con el cual se designaba a un cosmético usado para ensombrecer los párpados, después se empleó esta palabra para designar a las sustancias susceptibles de dividirse en partículas muy pequeñas y por este motivo la utilizaron al referirse al proceso de destilación, por medio del cual el " espíritu " de la bebida se removía en forma invisible de vinos y cervezas, originándose así una bebida con un contenido mayor de alcohol que el de los fermentos (3).

La invención de bebidas más fuertes incrementó los problemas de salud, que ya originaba el consumo de alcohol, especialmente cuando se comercializó su uso con la urbanización y la industrialización.

Mientras tanto en América, en el territorio correspondiente al México Prehispánico, para producir alcohol, nuestros antecesores supieron ingeniar para obtener a partir del maguey - una bebida fermentada que fué llamada "octli" en náhuatl y que constituye el pulque de nuestros días.

La importancia del octli era testificada por el papel capital que desempeñaban en la religión los dioses de la bebida y de la embriaguez. En general todas las clases sociales repudiaban a los alcohólicos, trataban de curarlos y controlarlos sobre bases de austeridad y deportes.

Sin embargo, como ninguna de las medidas logró prevenir y controlar el problema, fue necesario crear una serie de leyes que tenían por objeto castigar severamente a los que insistían en ingerir en forma desmedida la bebida embriagante.

Las restricciones variaban según la edad y la posición social, los castigos iban desde raparles completamente la cabeza hasta la muerte, mientras que los ancianos podían beber sin restricciones, debido a que su vida activa había terminado y no representaban una carga para la sociedad.

Con la llegada de los españoles estos castigos fueron suprimidos originándose poco tiempo después un aumento considerable del alcoholismo entre los indígenas que prevalece hasta nuestros días (3,4).

I.2. CONCEPTO DE ALCOHOLISMO.

Existen una serie de definiciones del alcoholismo que difieren unas de otras, por esto es necesario contar con una definición de alcoholismo en donde se establezca la esencia del problema y que permita la comparación entre las diferentes comunicaciones científicas relativas al tema (5).

Analizando en forma breve las definiciones del alcoholismo postuladas por la Organización Mundial de la Salud y algunos países como Chile y Francia que caracterizan al alcoholismo : como una pérdida definitiva en acto o potencia de la libertad - del ser humano para controlar su conducta con respecto al alcohol, una vez que éste ha penetrado en su organismo en cantidad suficiente, pérdida que parece estar condicionada por factores somáticos.

Por lo que serán alcohólicos aquellos bebedores excesivos cuya dependencia al alcohol ha alcanzado tal grado que da lugar a trastornos psíquicos o complicaciones somáticas , así como conflictos en sus relaciones interpersonales, sus funciones sociales y laborales (6,7).

Autores como E. M. Jellinek, consideran al alcoholismo como una enfermedad y a cualquier uso de bebidas alcohólicas que causen daño al individuo, a la sociedad u ambos (6,8).

Pero cualquiera que sea su definición, el alcoholismo es una enfermedad muy antigua cuyas manifestaciones son muy diversas.

En América Latina existen serios problemas relacionados con el abuso de alcohol en Argentina, Brasil, Chile, Perú y México, mostrarón que el índice de alcoholismo en los países antes mencionados es muy cercano al prevalescente en los Estados

Unidos Americanos, que es muy elevado.

Se destaca también la dificultad para obtener estadísticas confiables del consumo de alcohol y sus problemas en la mayor parte de América Latina, particularmente en las zonas rurales, debido a la abundante producción no registrada de bebidas no industrializadas como el pulque, chicha y otras, así como la insuficiencia de datos en los informes nacionales e internacionales (9).

I.5. ETIOPATOGENIA DEL ALCOHOLISMO

Se han propuesto varios modelos para explicar la etiopatogenia del alcoholismo siendo los más válidos los referentes a la farmacodependencia en general (8).

Para entender el problema se consideran tres factores :

1. La acción específica de las drogas que provocan dependencia.
2. Las características específicas del individuo consumidor.
3. El campo social del que depende la disponibilidad de las drogas adictivas.

Estas tres condiciones actúan en distinta medida según la droga, el individuo y las circunstancias del ambiente social - esquematizadas en la figura 1.

Debido a que los modelos psicológicos y sociológicos descuidan los resultados de las investigaciones biológicas y estos a su vez a los factores sociales cuyo significado es muy evidente

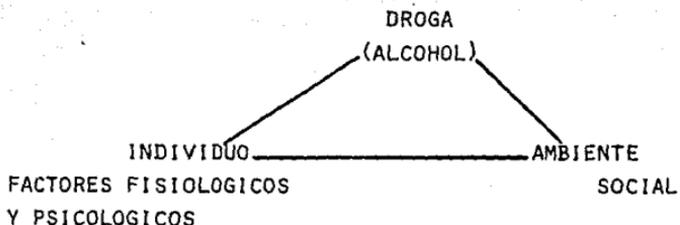


Fig. 1 Interacción entre factores que influyen en el alcoholismo (8).

te, White y Warburg parten de estos tres factores y exponen un comienzo multicondicionado, que incluye procesos fisiológicos, bioquímicos y conductuales, como se observa en la figura 2.

El modelo de la figura 2, se basa en la conducta del hombre, al pretender alcanzar un equilibrio biológico y social, adaptándose al medio en que se desarrolla, siendo el ambiente social, la familia y el trabajo muy importantes para entender el alcoholismo.

El alcohol como se muestra en el esquema, puede conducir al individuo a un círculo vicioso con nuevas alternativas psíquicas y físicas, donde el problema real puede enmascarse en forma transitoria y hasta cierto grado por un nuevo aporte de alcohol, pero finalmente estas ingestas refuerzan el círculo vicioso e incrementan la dependencia.

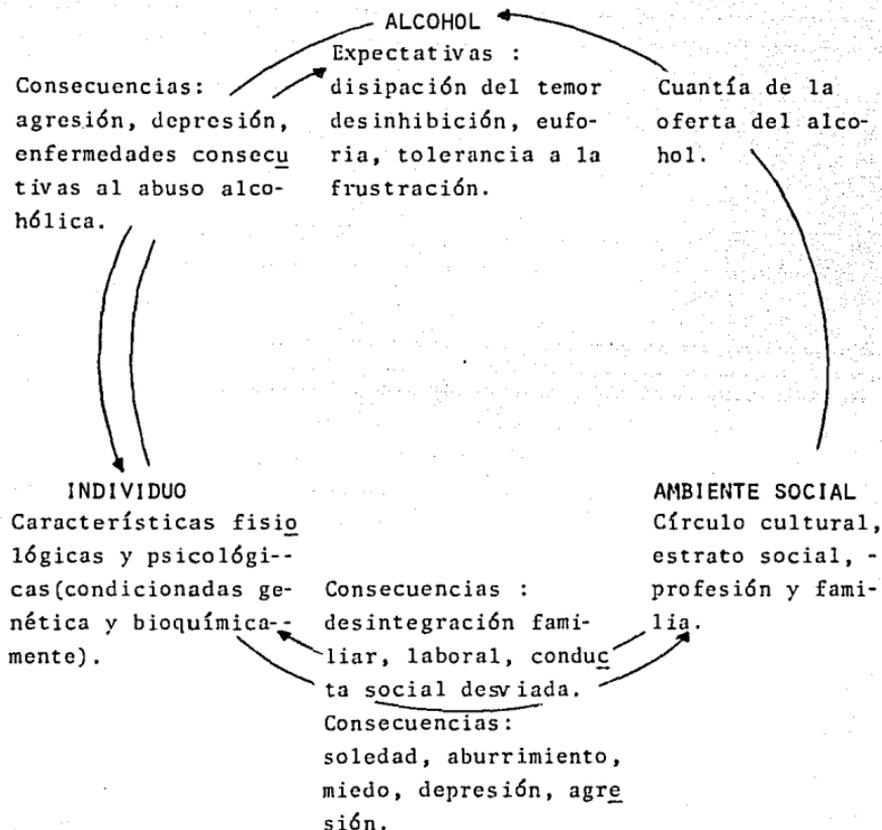


Fig. 2. Modelo modificado sobre la Etiopatogenia del alcoholismo (8).

I.4. CINETICA DEL ALCOHOL

El etanol es un componente habitual de la dieta humana, es producido endógenamente por la flora intestinal, en cantidades muy pequeñas. Cuando es ingerido se absorbe por las mucosas: en la gástrica en forma lenta y más rápido a nivel de la intestinal.

El alcohol se absorbe en un 20% a través del estómago y el resto por el intestino delgado, este proceso depende de su concentración, los alcoholes más concentrados se absorben más, rápido, debido al pH ácido del estómago, que facilita su desdoblamiento y favorece la formación de agua.

Una vez absorbido el alcohol se distribuye a los tejidos, dentro del agua total del organismo, lo que determina la caída acelerada de la alcoholemia.

La distribución del alcohol en cada uno de los tejidos va ría mucho individualmente, y depende de su contenido acuoso, así como del grado de irrigación de cada órgano que constituyen.

La concentración hemática de alcohol alcanza su punto máximo a los 30-60 minutos de su administración oral, realizándose la distribución rápida y regular por todo el organismo (10).

El alcohol atraviesa también la placenta, lo que permite su paso al torrente circulatorio del feto y entre los 60-90 minutos de la última ingesta de alcohol termina su distribución por todo el cuerpo (8,10).

La eliminación del alcohol comienza inmediatamente des p ués de su administración, por ejemplo el alcohol procedente de la cerveza se metaboliza más rápidamente que el contenido en bebidas destiladas.

Solo cantidades relativamente pequeñas se eliminan sin modificar a través de los riñones (0.5-2.0%), los pulmones (5%), o a través de la piel. El resto del alcohol es metabolizado en hígado, existiendo muchas diferencias de un individuo a otro (10,11,12).

Por término medio el varón elimina 0.1 g/kg de peso /hr, la mujer 0.085 g/kg de peso /hr, ante un aporte elevado de alcohol su catabolismo máximo representa 400-500 ml/24 hrs., sin embargo existen diferencias raciales con respecto a su eliminación. Tras un consumo prolongado, ciertos alcohólicos pueden incrementar su velocidad de metabolización etílica, a diferencia de los individuos no alcohólicos (8,13,14).

I.5. METABOLISMO DEL ALCOHOL

El metabolismo del etanol es responsable de hasta un 10% de las calorías de la dieta humana normal (7.5 Kcal/g), y puede representar 30-35% del aporte energético del alcohólico, este aporte es de calorías vacías, es decir sin elementos esenciales, lo cual unido a trastornos gastrointestinales frecuentemente lleva al individuo a la desnutrición (8,10,11,15).

No existe en el organismo un mecanismo de almacenamiento, ni retroalimentación para su oxidación, esto hace que sea la actividad de las enzimas que lo transforman y la disponibilidad de sus cofactores los que regulen su oxidación.

En general del 90-98% del alcohol administrado desaparece del organismo siendo completamente oxidado en hígado. Dicha biotransformación se realiza en dos compartimentos celulares: el citoplasma y la mitocondria.

En el citoplasma puede ocurrir en tres sistemas principa-

les, el sistema de la alcohol deshidrogenasa, el sistema de oxidación microsomal y por medio de las catalasas.

Pero estas vías de oxidación del etanol, su producto es el acetaldehído. La principal de estas vías es catalizada por la alcohol deshidrogenasa (ADH), que es una enzima citosólica, cuya máxima actividad aparece en hígado.

Como se observa en la figura 3, por acción de la ADH, el etanol se transforma en acetaldehído, requiriendo la actividad de la coenzima dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado (NAD^+), el cual es reducido a NADH.

Se sabe que estos dos productos son responsables de la mayor parte de los efectos tóxicos y las alteraciones metabólicas producidas por el etanol (10).

El acetaldehído formado por este proceso es preferentemente oxidado a acetato por acción de la acetaldehído deshidrogenasa (ALDH), la cual es también dependiente de NAD^+ , como se desconoce su especificidad absoluta, algunos autores la refieren como aldehído deshidrogenasa.

El acetato formado sale al citosol, el NADH formado por esta reacción de la ALDH junto con el derivado de la ADH, es utilizado en la mitocondria para la generación de energía (ATP), o la reducción de metabolitos.

El acetato puede ser activado a acetyl-CoA y utilizado ya sea en el hígado o en otros tejidos, también se puede incorporar al ciclo de los ácidos tricarbónicos (C.A.T.), para convertirse finalmente en dióxido de carbono y agua (10,12,13,14).

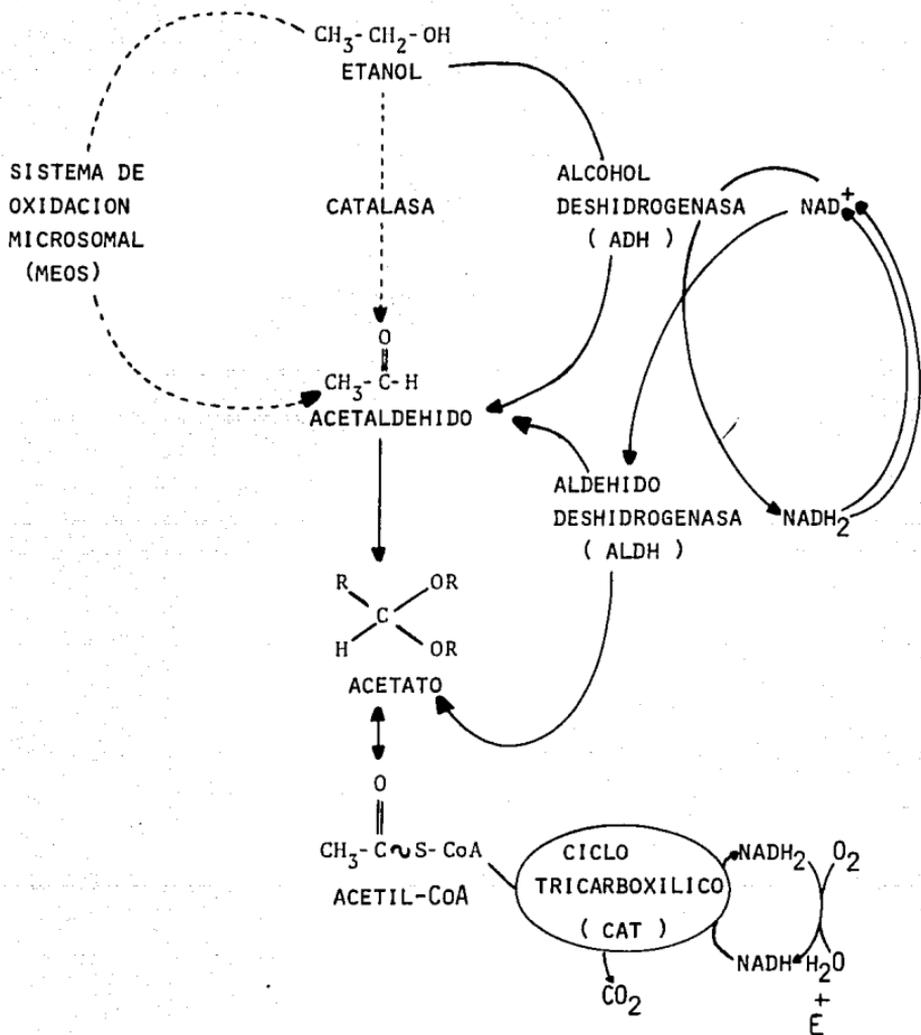


Fig. 3. Fases de biotransformación del Etanol (8,10).

1.6. EL ETANOL COMO PRINCIPAL COMPONENTE DE BEBIDAS ALCOHOLICAS

El alcohol comunmente conocido, su nombre químico es alcohol etílico o etanol, es un líquido incoloro quemante al paladar. Se obtiene por fermentación de azúcares, disociados en alcohol y CO_2 por acción de levaduras.

Es el principal componente de bebidas alcohólicas, llámese cerveza, ron, tequila, brandy, whisky, ginebra, sake, pulque etc., cuyo contenido varía en cada una de ellas (19).

El tequila es una bebida destilada, la cual se define de acuerdo con la norma oficial mexicana de calidad para bebidas alcohólicas destiladas como " La bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos fermentados -- con levaduras y preparados con los azúcares provenientes de las cabezas del Agave tequilana weber, variedad azul permitiéndose adicionar hasta un 49% de otros azúcares, con un contenido en volumen del 50% de alcohol (40 g%) ".

El agave es una planta xerófila, que pertenece a la familia de las agavaceas, existen 5 especies, pero el Agave azul es el más empleado.

Esta planta madura entre los 7 y 8 años, desarrollando piñas esféricas de hasta 120 kg, que corresponden al 70% del peso total de la planta, actualmente es la única fuente de azúcares para la elaboración del tequila, en la figura 4 se muestra cada una de las partes del Agave (16,17).

En la actualidad se considera al tequila y al mezcal como las bebidas representativas y típicas de México.

La mayor producción de tequila es procedente de los estados de Jalisco y Nayarit, la industria tequilera consta de 40 a

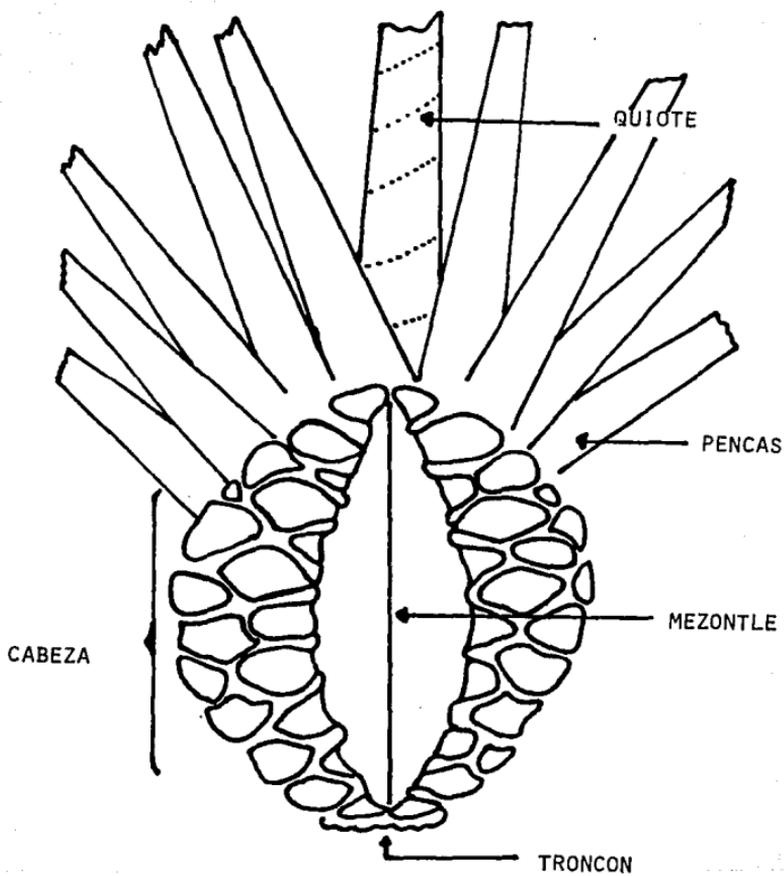


Figura N° 4 . Partes del Agave tequilana (16).

50 compañías en operación, que producen más de 60 millones de litros anuales, de esta cantidad se exporta más del 50%, siendo el principal consumidor los Estados Unidos Americanos (18).

Su elevado consumo en el país despierta el interés por comprender los cambios fisicoquímicos que se efectúan en las bebidas alcohólicas, durante su envejecimiento.

El tequila contiene sustancias acompañantes en menor cantidad que el etanol, las cuales se forman durante el proceso de fermentación, los más importantes son : metanol, furfural (sustancia muy tóxica), aceites de fusel (alcoholes de fuerte graduación como el alcohol isobutílico, isoamílico, etc.), acetaldehído y formiato de etilo.

El contenido de sustancias acompañantes difiere grandemente en cada bebida alcohólica y algunas son fuertemente tóxicas.

La ley de Richardson es válida para todos los aceites de fusel: cuanto mayor sea el número de átomos de carbono, mayor será su toxicidad, a excepción del metanol que depende de su metabolito formaldehído (8,13,15).

La mayor parte de las investigaciones sobre alcoholismo se han relacionado con el etanol, sin embargo en las bebidas existen mezclas complejas de numerosas sustancias incluyendo alcoholes de alta graduación, aldehídos, ésteres, metales como plomo, cobalto, fenoles, taninos y otros compuestos orgánicos e inorgánicos en pequeñas cantidades o incluso en trazas.

La contribución de estas sustancias químicas en los diferentes efectos producidos por la ingesta de estos compuestos, puede causar su acumulación en sangre o cerebro y así potencializar su efecto (19).

I.7. REPERCUSSIONES DEL ALCOHOLISMO

La ingesta de alcohol tiene una gran variedad de consecuencias fisiológicas, clínicas, genéticas y socioeconómicas.

Las consecuencias del consumo inmoderado del alcohol figuran actualmente entre las principales preocupaciones de salud pública del mundo, además de ser un obstáculo para el desarrollo socioeconómico de los países, también representa una carga importante para los servicios de salud.

En muchas naciones como México, la carencia de estadísticas confiables dificultan la observación real de los problemas asociados al consumo de alcohol.

En un estudio realizado por el Instituto Mexicano de Psiquiatría, se determinaron las variables médicas y sociales relacionadas con el consumo de alcohol en México, las cuales muestran que durante el período de 1975-1983, las bebidas de mayor consumo se muestran en la tabla 1.

TIPO DE BEBIDA	PRODUCCION MILLONES DE LTS.	CONSUMO POR PERSONA
CERVEZA	2,780,522	71,000
PULQUE	240,000	6,250
BRANDY	125,459	3,250
TEQUILA	41,925	1,090
RON	17,014	0,443

Tabla 1. La producción y probable consumo por persona de bebidas alcohólicas en la República Mexicana (20)

Esta tabla muestra que durante los años estudiados, la be bi da de mayor producción y consumo es la cerveza, para la pobla ci ón mayor de 15 años.

En relación al consumo, en otros países las cifras pre sen tadas son superiores a las observadas en Finlandia, Suecia, No rue ga, muy similares a las de los Estados Unidos Americanos e inferiores a las de Francia, Portugal, Italia y España, que son países tradicionalmente consumidores de bebidas alcohólicas (20,21).

Diversas investigaciones epidemiológicas, han demostrado que existe una correlación positiva entre el consumo por persona y las muertes por cirrosis hepática alcohólica man ten ien do se constante en las últimas décadas.

El consumo de alcohol se incrementó en nuestro país, pero no así las muertes por cirrosis hepática, esta aparente falta de relación puede atribuirse a que la certificación médica de las defunciones por este padecimiento adolece de grandes limitaciones, lo que se acostumbra es unir las cirrosis con y sin men ci ón del alcohol como primera causa de la enfermedad, in cre men tan do se el error en las elaboración de las tasas que se emplean como estimadores del problema (15,20,21).

La mortalidad es un indicador limitado en México, la mor bi li dad lo es más, puesto que la sintomatología que presentan por el consumo de alcohol, no se detecta en sus fases iniciales los motivos de consulta en muchas ocasiones se atribuyen a otras causas (gastritis crónicas, úlceras, desnutrición, etc.) y este se registre cuando el problema se presenta en un estado avanzado o crítico (21).

La tasa de problemas sociales asociados con el consumo de alcohol es elevada y se debe principalmente a bebedores ocasionales que consumen bebidas en forma excesiva, más que los crónicos, ya que estos últimos requieren de cantidades mayores de bebida alcohólica para perder el control de su persona.

Dentro de los problemas sociales, se encuentran los divorcios, los intentos de suicidio, existiendo en una relación de 80 suicidios donde el 55% tenía algún vínculo con la ingesta de alcohol y el 24% restante resultarán ser alcohólicos los individuos, aún así la tasa es baja comparada con otros países y varía entre 3.5 y 2.5 por 100,000 habitantes (21,22).

La morbilidad psiquiátrica, después de los trastornos psicoafectivos, el alcoholismo es un factor causante de suicidio con una relación del 15-23% de los casos (22).

Los accidentes y la conducta delictiva y violenta, constituyen otro problema de salud en México y en parte se presentan en sujetos con altos niveles de alcohol en sangre, frecuentemente bebedores ocasionales.

De una muestra de 1042 individuos estudiados en 1984, que acudieron a los servicios de urgencias de un hospital y que tuvo conocimiento el Ministerio Público, 708 presentaban lesiones por riñas, asaltos y atropellamientos, de este grupo el 18.5% estaban bajo los influjos del alcohol, de 334 individuos detenidos el 40% estaban alcoholizados, el 97% correspondía al sexo masculino, predominando los jóvenes (22,23).

Dadas las condiciones de administración de justicia en el país, la población de otros niveles socioeconómicos puede oír con más facilidad el ser captados por las autoridades, ya sea haciendo uso de su poder económico y social, acudiendo en -

caso de lesiones a centros de atención médica privados (23).

Entre las consecuencias fisiopatológicas y clínicas, se ha observado que existe una relación muy estrecha entre madres alcohólicas y la presencia de malformaciones en sus hijos, con lo que se ha demostrado que el alcohol es un agente teratogénico en el humano e induce el síndrome fetal alcohólico o embriopatología alcohólica, que se caracteriza por una variedad de defectos mentales y del desarrollo, habiéndose descrito 25 anomalías esqueléticas en niños con este síndrome.

El síndrome fetal alcohólico tiene una frecuencia de 1 a 3 casos por 1000 recién nacidos y es una de las tres principales causas de retardo mental después del síndrome de Down y la espina bífida (24,25).

No está claramente definida la dosis mínima de alcohol en la gestación que desencadena este síndrome, pero resulta evidente que existe una relación dosis-respuesta y que ésta además depende de la duración de la ingesta. La cantidad más baja asociada al desarrollo completo de este síndrome fetal alcohólico ha sido de 75 ml de alcohol diarios (equivalentes a 6 cervezas) y el período más corto de ingestión, las primeras 6 semanas de embarazo. (26,27,28).

Es poco lo que se conoce acerca del sistema reproductivo de mujeres alcohólicas, pero se ha observado que produce efectos sobre el nivel hormonal, inhibición de la ovulación, decremento de la masa gonadal, infertilidad y una gran variedad de alteraciones obstétricas y ginecológicas, así como disfunción sexual (29).

El prolongado consumo de bebidas alcohólicas puede ser un factor etiológico en muchas enfermedades gastrointestinales, neuromusculares, cardiovasculares y de otros sistemas del cuer-

po, y la mujer puede ser vulnerable a esos efectos.

Por medio del análisis epidemiológico se ha visto una correlación entre el consumo de alcohol y cáncer de lengua, laringe y esófago, aunque no está claro si el etanol actúa directa o indirectamente a través de sus metabolitos, además hay que considerar que muchas sustancias carcinogénicas como las nitrosaminas de los colorantes pueden estar disueltas en las bebidas, constituyendo mezclas complejas con las bebidas (19,24).

Desde hace tiempo se ha estudiado al alcoholismo desde el punto de vista genético y aunque se ha visto influencia familiar aún no se conoce el componente hereditario específico.

En 1967, Cruz Coke y cols. propusieron un patrón de herencia ligado al cromosoma X, al encontrar en pacientes alcohólicos y cirróticos una elevada frecuencia de ceguera parcial al color, pero ésta hipótesis se rechazó, dado que el mecanismo era debido a una severa disfunción hepática que alteraba el metabolismo retiniano, por lo cual se sigue considerando el alcoholismo como una enfermedad multifactorial (31).

Al tratar las diferencias raciales se han visto variaciones étnicas en el metabolismo alcohólico, de tal modo que los caucásicos toleran más el alcohol, que los individuos de raza mongólica, así como existen cepas de ratones y ratas con una aumentada preferencia por el alcohol (30,32,33).

En conclusión, el mecanismo hereditario del alcoholismo se desconoce y si bien existen factores genéticos predisponentes los aspectos ambientales juegan un papel determinante, por lo anterior, en la actualidad se cataloga la presencia de un número indeterminado de genes y la participación desencadenante del medio ambiente (31,32).

El alcohol se considera un agente mutagénico, carcinogénico y teratogénico. Para entender los mecanismos y el poder mutagénico de las sustancias químicas se emplean métodos citogénicos "in vivo e in vitro", que permiten la examinación específica de un tejido, de la actividad química, daño cromosómico, y formación de intercambio de cromátidas hermanas (34).

I.8. INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (I.C.H.) Y ALCOHOLISMO

El análisis para caracterizar el daño producido por sustancias químicas y físicas, es una constante preocupación por las consecuencias que puede tener en el hombre y los seres vivos. Independientemente de su vía de entrada afectan al organismo, a través de cambios químicos que sufren al interactuar con las moléculas de mayor importancia biológica, como es el ADN, portador de la información genética.

Lós resultados de las interacciones de los agentes genotóxicos con el ADN son muy variables, algunos consisten en lesiones que causan rupturas, sustituciones de bases, enlaces con otras moléculas, etc., estas lesiones pueden producir cambios en la estructura de los cromosomas, causar mutaciones o que las células se transformen en malignas.

El análisis para caracterizar el daño genético producido por tales agentes se basa en el estudio de las aberraciones cromosómicas y de los intercambios de cromátidas hermanas (I.C.H.).

El estudio de los I.C.H. permite conocer las respuestas celulares ante agentes que lesionan al ADN y como su nombre lo indica, son intercambios de segmentos simétricos y equivalentes entre las cromátidas de un mismo cromosoma (35).

El I.C.H. fué descrito por primera vez por Taylor en 1958 mediante el análisis autorradiográfico de células cultivadas en la presencia de timidina tritiada. Actualmente es más fácil de tectarlo gracias al desarrollo del método de tinción diferencial de las cromátidas hermanas, propuesta por Goto y cols., el cual permite visualizar los I.C.H.'s, aún cuando el segmento intercambiado sea muy pequeño (35,36,37).

Este método se basa en la incorporación de análogos de timidina como la 5-bromodesoxiuridina (BrduU), en por lo menos dos ciclos de replicación del DNA, precedida de tinción con Hoechst 33258, luz negra e incubación a 65°C en solución salina citratos y teñirlos con giemsa, de esta manera la tinción es permanente y analizable al microscopio de campo claro (36,37).

La formación del I.C.H. obedece al modelo de Watson y Crick en 1957, en el cual las dos cadenas complementarias de DNA se separan y cada una de ellas sirve como molde para la síntesis de una nueva, resultando dos moléculas iguales (38,39).

En los últimos años se han propuesto modelos que explican como ocurre este fenómeno, el más aceptado fué propuesto por Painter en 1980 y se basa en los descubrimientos realizados por Cook y Brazell en 1975, quienes identificaron a la subunidad enrollada o replicón como responsable del control de la replicación (39,40-42).

Painter propone que el DNA contiene agrupamientos de replicación los cuales se van replicando alternativamente siguiendo la horquilla de replicación, éste evento se ve afectado por agentes que dañan al DNA, ocasionando que la replicación se detenga o disminuya su velocidad, mientras que un agrupamiento se replica completamente otro lo hace incompletamente ocasionando-

que se rompa la doble cadena, una vez concluida la replicación.

Después que la cadena se rompe existe unión entre ambas cadenas la hija de un agrupamiento replicado, con la cadena madre de un agrupamiento no replicado, como se muestra en las figuras 5 y 6.

La evidencia de que el I.C.H. se realiza como se mencionó por medio de la incorporación de BrdU ocasiona que las hebras - madres de ADN conserven sus características originales y las hebras hijas incorporen el compuesto, ésta evidencia se observa en cromosomas en segunda división celular, los que poseen una cromátida que incorporó el análogo y otra que no lo hace o incluso fragmentos de ADN que pertenecen a la otra cromátida como se muestra en la figura 7.

Actualmente para la incorporación de BrdU, existen sistemas " in vivo e in vitro ", los cuales fueron introducidos por Bloom y Tsu, ambos tienen ciertas ventajas. Los sistemas " in vivo " son muy utilizados porque simulan claramente el efecto de los agentes genotóxicos y permiten que estos sean activados o inactivados metabólicamente, además proporcionan una gran variedad de tejidos a examinar (35,43-48).

Para evitar la rápida degradación y deshalogenación de la BrdU en hígado, se han desarrollado diversos métodos como : inyecciones múltiples intraperitoneales, infusiones intravenosas, implantación de tabletas de BrdU simples, cubiertas con agar, parafina o combinadas con colesterol, suspensiones de carbón activado o con aceites vegetales, etc., con el fin de lograr una mayor sensibilidad a la técnica e identificación de I.C.H's , para que sea un parámetro confiable en los estudios de genotoxicidad (43,44-49).

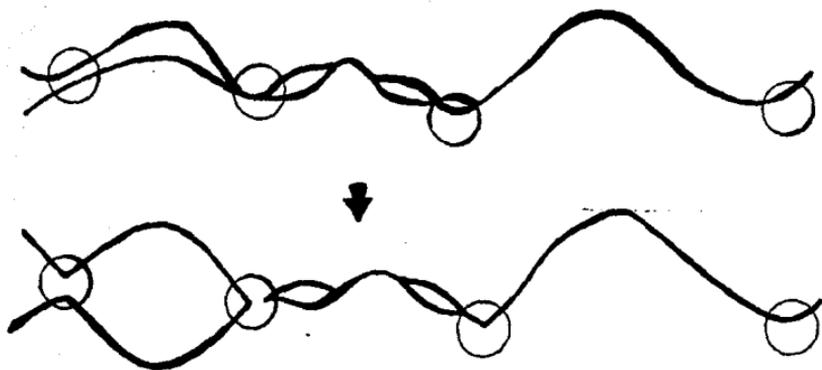


Figura N° 5. Modelo propuesto por Painter, en donde se muestra a las unidades de replicación divididas por círculos y su segregación. Este modelo explica los efectos de los agentes que causan daño al ADN, afectando a los agrupamientos de replicación o clusters, a la derecha se observa un agrupamiento no replicado, a la izquierda - uno completamente replicado, mientras que al centro se encuentra bloqueada la progresión de la horquilla, replicandose parcialmente el agrupamiento (41).



Figura N° 6. El diagrama muestra la formación del intercambio entre la nueva cadena que se forma del agrupamiento replicado y la cadena madre del agrupamiento no replicado , que se acompaña del rompimiento de la doble cadena y la unión posterior para completar el intercambio de cromátidas hermanas (42).

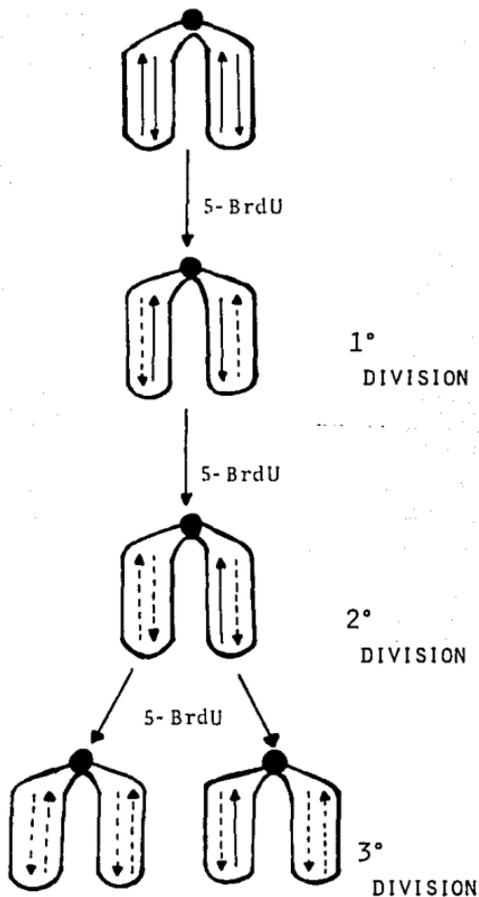


Figura N° 7. Incorporación de 5-BrdU durante la síntesis de ADN las flechas representan las cadenas de ADN y con una línea quebrada las cadenas sustituidas. A la derecha metafases de médula ósea de ratón con tinción diferencial correspondiente a las características de sustitución de BrdU por uno, dos y tres ciclos de división, donde se puede observar que las cromátidas con dos bandas sustituidas por BrdU se tiñen levemente. 25

Desde el punto de vista mutagénico se ha demostrado la -- utilidad de éstas técnicas, no solo en animales sino también en tejidos humanos. Se ha demostrado en pacientes alcohólicos incrementos significativos en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas y de aberraciones cromosómicas, pero al analizar el efecto del etanol en cultivo de linfocitos, se han encontrado resultados contradictorios (50-57).

Otros estudios en células de ovario de hamster, médula ósea de ratón y linfocitos periféricos de humano han demostrado, que no es el etanol el que ocasiona el daño, sino el acetaldehído, que es el primer metabolito de la oxidación del alcohol e induce este incremento de I.C.H.'s y aberraciones cromosómicas (58-60).

En niños con el síndrome fetal alcohólico no se ha observado una elevación en las aberraciones cromosómicas, por lo que se ha discutido la posibilidad de una supresión inespecífica -- del RNA y consecuentemente de síntesis protéica en el desarrollo embrionario, como causa del síndrome (59).

Como hemos visto muchos de los efectos se han estudiado -- principalmente con el etanol, sin embargo las bebidas alcohólicas tienen otras sustancias que pueden contribuir a los diferentes efectos encontrados en el alcoholismo, por lo que es necesario estudiar tales bebidas, así como sus diferentes fracciones que las constituyen (fracción volátil y residuos).

Estudios genotóxicos referentes a las fracciones alcohólicas de algunas bebidas, realizadas en Salmonella typhimurium -- TS100 por el método de Ames, han demostrado una variable capacidad mutagénica en muestras de whisky y brandy de diferentes -- países de Europa y América (62,63).

En 1981, Nagao y Loquet realizaron el estudio mutagénico con los residuos del brandy y whisky por el método de Ames, com probándose con este estudio que los residuos son mutagénicos , pero en presencia de un activador metabólico (mezcla S9) la mu tagenicidad se reduce o inhibe totalmente (63).

Obe y cols., al investigar los residuos de las bebidas al cohólicas y su inducción de intercambios de cromátidas hermanas en linfocitos periféricos humanos in vitro, encontraron una respuesta dosis-dependiente, a dosis altas se induce hasta el doble de la tasa espontánea de I.C.H's (64).

En lo referente a nuestro país, no se ha llevado a cabo ningún estudio genotóxico en relación con las bebidas alcohólicas producidas y consumidas en México.

En base a lo anterior y a los antecedentes ya mencionados sobre toxicidad y daño clínico provocado por la bebida completa y sus diferentes fracciones considerando el alto consumo y producción de tequila, se decidió realizar este trabajo, para evá luar los efectos genotóxicos de los componentes volátiles del -tequila "in vivo" , ya que este trabajo constituye parte del -proyecto en el que también se estudiarán los residuos y la bebi da completa.

II. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es :

Evaluar el potencial mutágeno de la fracción alcohólica del tequila, en médula ósea de ratón, empleando como parámetro a la frecuencia de intercambio de cromátidas --hermanas (I.C.H.).

Como objetivos particulares se tienen :

- a) Obtener la fracción alcohólica del tequila por destilación.
- b) Determinación de la dosis letal media (DL_{50}) de la muestra alcohólica, en ratones.
- c) Evaluar si la fracción alcohólica obtenida es capaz de incrementar la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en médula ósea de ratón, después de un tratamiento agudo y establecer curvas dosis-respuesta
- d) Caracterizar su efecto sobre la proliferación celular
- e) Con lo anterior colaborar en la determinación del potencial mutagénico del tequila.

III. MATERIAL Y METODOS

III.1. MATERIAL BIOLOGICO

El estudio genotóxico se realizó in vivo, para lo cual se emplearon ratones machos de la cepa NIH(SW), con un peso de 20-25 g. Para la determinación de la dosis letal media, así como para la técnica de intercambio de cromátidas hermanas, se emplearon ratones de la misma cepa y peso promedio.

III.2. OBTENCION DE LA FRACCION ALCOHOLICA DEL TEQUILA

En el presente trabajo se analizó el tequila blanco, que se compró directamente en el mercado.

Los envases se abrieron antes de iniciar su destilación para evitar alguna modificación en su composición y estudiarla en las condiciones que se ofrece al público, esto es con el fin de disminuir las diferencias ya existentes aún dentro de un mismo lote.

Para lograr la separación de los componentes volátiles de los no volátiles, se realizó el proceso de destilación simple a una temperatura de 70-78°C, la fracción obtenida se le denominó fracción alcohólica del tequila.

Las características físicas de la fracción alcohólica alcohólica del tequila así obtenido fueron : sustancia incolora, sabor ardiente, olor característico, densidad 0.815 g/ml.

Por litro de tequila destilado (tequila blanco), se obtu-

vó, la fracción alcohólica volátil que constituye el 36.4% de la bebida total.

Posteriormente se efectuó un análisis preeliminar para tratar de identificar los componentes de la fracción alcohólica del tequila por cromatografía de gases.

III.3. DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL MEDIA (DL₅₀)

La dosis letal media (DL₅₀) de la fracción alcohólica obtenida se determinó experimentalmente en ratones; los animales se mantuvieron sin alimento, ni agua, 12 hrs. antes de administrarles la mezcla alcohólica.

Se mantienen sin alimento los animales debido a que con el estómago lleno desciende considerablemente la velocidad de absorción y por acción de líquidos la pared muscular del estómago ve limitada su función, con lo cual demora el vaciado gástrico perdiéndose parte del alcohol.

Se pesaron y marcaron los ratones para distribuirlos en 6 lotes, de 6 ratones cada uno, con el objeto de valorar las siguientes dosis : 6.52, 7.82, 9.12, 10.42, 11.72 y 13.04 g/kg de peso tomando como referencia la DL₅₀ del etanol.

La vía de administración fué oral, empleándose una sonda metálica, que se introdujo aproximadamente 2 cm en la cavidad oral. La DL₅₀ se calculó en base a los resultados obtenidos a las 48 hrs después de la administración oral de la fracción alcohólica del tequila, manteniéndose los animales en observación durante una semana.

III.4. EVALUACION DE LA FRECUENCIA DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (I.C.H.)

Se empleó la metodología modificada de Mc. Fee y cols., que consiste en la elaboración de tabletas de 5-BrdU cubiertas parcialmente con parafina (64).

- a) Elaboración de tabletas de 5-Bromo-2'-deoxiuridina (5-BrdU).

Se pesaron 50 ± 2 mg de 5-BrdU, se colocó dicha sustancia en el conducto central de un dado metálico, e introduciéndose un punzón con una presión de 40 kg se obtuvieron tabletas compactas de 0.46 cm de diámetro y 0.18 cm de altura.

Cada tableta se sumergió en parafina (P.F. 56-58°C) previamente fundida a 60°C, cubriéndose aproximadamente 70-75% de la superficie de la tableta. Dicha cubierta se dejó solidificar y las tabletas se protegieron de la luz y la humedad en un desecador hasta su empleo.

- b) Implantación subcutánea de las tabletas de 5-BrdU.

Los ratones empleados se mantuvieron con agua y alimento Ad libitum antes y después del experimento. Fueron distribuidos en 8 lotes de 5 ratones cada uno, previamente pesados y marcados.

A cada ratón se le anestesió con éter etílico y se le practicó un corte de aproximadamente 1 cm, en la región postero dorsal cercana al muslo. Se introdujo la tableta dentro del área subcutánea, suturando la incisión con una grapa quirúrgica

c) Administración de la fracción alcohólica del tequila.

La fracción alcohólica del tequila se mantuvo en refrigeración hasta su uso, en ese momento se diluyó con agua destilada para obtener las siguientes dosis a valorar : 0.32, 0.98, - 1.64, 2.30, 4.60 y 6.90 g/kg de peso, tomando como referencia la DL_{50} calculada para la fracción alcohólica del tequila, la vía de administración fué oral, una hora después de la implantación de la tableta de 5-BrdU.

d) Obtención de cromosomas de médula ósea femoral.

Los animales se mantuvieron vivos 24 hrs, a las 22 hrs se les administró una solución de colchicina (5 mg/kg de peso) por vía intraperitoneal, para detener la división celular.

Dos horas después se sacrificarón por dislocación cervical y los restos de las tabletas se recuperaron para determinar el porcentaje de 5-BrdU liberado.

Se obtuvieron ambos fémures, eliminándose el tejido muscular y tejido conectivo que rodea al hueso. Se cortó la parte media de la epífisis y se extrajo la médula ósea con una jeringa que permite el paso de la solución hipotónica (KCl 0.075 M a 37°C). La médula ósea se dispersó en 8 ml de la misma solución hipotónica y se incubó a 37°C por 25 min.

Después de este tiempo se centrifugarón las células a 1500 rpm, durante 10 min., eliminándose la solución hipotónica una vez concluida la centrifugación.

El botón celular se fijó en 7 ml de solución de carnoy, mezcla de ácido acético-metanol (1:3), durante 20 min.

Se centrifugaron durante 10 min a 1500 rpm y se eliminó el sobrenadante, éste paso se repitió en dos ocasiones más, fijándose las células durante 10 y 15 min. respectivamente.

Se hicieron las preparaciones en portaobjetos limpios y -desengrasados con etanol al 96%. Estos se humedecieron en una solución de etanol 50% frío, y se flamearon ligeramente después de dejar caer tres gotas del material celular.

e) Proceso de tinción diferencial para I.C.H.

La técnica corresponde a la descrita por Goto y cols., -- con algunas modificaciones (37).

Después de elaborar las laminillas, se efectuó la tinción diferencial con el colorante fluorocromo bisbenzimidá Hoescht - 33258 (50 mg/50 ml de agua destilada), durante 40 min.

Transcurrido el tiempo las laminillas se lavan con agua -destilada, secándose 30 min a 60°C.

Las laminillas se colocan sobre un soporte de acrílico, -poniendo sobre cada una de ellas buffer de fosfato-citrato, pH-7.0 colocando un cubreobjetos, y en éstas condiciones se expone la lámpara de luz negra, a una distancia de 1,5 cm., durante 40 min.

Concluido el tiempo se quita el cubreobjetos y se elimina el resto del buffer al lavarse las laminillas en agua destilada

Se secan a 60°C por 20 min, posteriormente se colocan en una solución de 2XSSC (sol. salina-citratos), en un vaso coplin a 60°C, por 20 min.

Se lavan y se sacan a 60°C por 10 min.

Finalmente se tiñen con el colorante giemsa al 4% durante 10 min., se lavan y se secan a temperatura ambiente.

f) Observaciones.

Se analizaron 25 metafases de 2a. división por ratón, para evaluar la frecuencia de I.C.H., de cada una de las dosis probadas.

Se obtuvo la proporción de células de 1a., 2a., 3a. o más divisiones celulares, en las primeras 100 metafases encontradas al azar, por dosis.

Para la evaluación de la DL_{50} se utilizó el método gráfico nomográfico de Litchfield y Wilcoxon y el método Logit de Berkson, modificado por Lehman el cual consiste en :

i) Organización de los datos.

Se dispone de once columnas de la A a la K y tantos renglones como dosis probadas, sin incluir dosis que produjeron efectos del 0 ó del 100% de muerte.

ii) Ponga las dosis empleadas en A, el número de animales probados (n) en C y el número que reaccionó (r) en D.

Conviene que las dosis se expresen en unidades mayores de 1 ó menores de 10.

iii) Calcule el valor de E, F, G, H, I, J y K.

iv) Gráficar los datos. Se realiza sobre papel milimétrico, disponiendo del eje de las abscisas con un rango adecuado para cubrir los valores de B y el eje de las ordenadas, marque el cero a media escala e indicar los valores de H.

En general basta de ir de -2 a +2, graficando los valores de x contra λ para cada dosis (65,66).

g) Tratamiento Estadístico.

Para la DL_{50} se emplean los logaritmos de las dosis, para obtener una curva dosis-respuesta sigmoidea simétrica, por el método de Litchfield y Wilcoxon, pero con el método logit de Berkson se obtiene una recta, por lo que se efectúa un análisis de regresión lineal de la recta λ vs. x para poder estimar los coeficientes de regresión.

Se utilizó la prueba de U de Mann Whitney y el análisis de varianza para determinar si existía diferencia significativa en la frecuencia de I.C.H., entre las dosis empleadas y el control negativo.

Para la cinética celular se aplicó la prueba de Chi-cuadrada (χ^2).

IV. RESULTADOS

IV.1. OBTENCION DE LA FRACCION ALCOHOLICA DEL TEQUILA.

La fracción alcohólica obtenida, se le efectuó un análisis preliminar por cromatografía de gases, identificándose los siguientes componentes : etanol, metanol, acetaldehído, propanol, alcohol isoamílico y acetato de etilo.

Se decidió analizar los componentes volátiles que constituyen la fracción alcohólica del tequila, esto tiene como finalidad determinar si está sufre alguna modificación en sus componentes durante la destilación y saber cual de ellos es el de mayor toxicidad.

Se ha reportado que las bebidas alcohólicas sufren modificaciones durante el proceso de destilación o durante su añejamiento, por está resulta importante conocer los cambios fisicoquímicos que se producen en las bebidas alcohólicas.

IV.2. DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL MEDIA (DL₅₀).

Se evaluó el porciento de mortalidad producido por cada una de las dosis evaluadas de la fracción alcohólica del tequila los resultados se muestran en la tabla 2.

El cálculo de la dosis letal media DL₅₀, se logró utilizando el método gráfico-nomografico, que emplea la relación dosis-respuesta expresada como el logaritmo de la dosis, en relación al porcentaje de la población muerta con la fracción alcohólica del tequila administrada (71).

TABLA No.2

Dosis Letal Media (DL50) inducida por la fracción alcohólica del tequila, en ratones cepa NIH (SW), vía oral.

DOSIS		ANIMALES POR LOTE	ANIMALES MUERTOS	ANIMALES VIVOS	% ANIMALES MUERTOS
ml/g	g/kg				
0.20	6.52	6	0	6	0.00
0.24	7.82	6	2	4	33.33
0.28	9.12	6	3	3	50.00
0.32	10.42	6	4	2	66.66
0.36	11.72	6	5	1	83.33
0.40	13.02	6	6	0	100.00

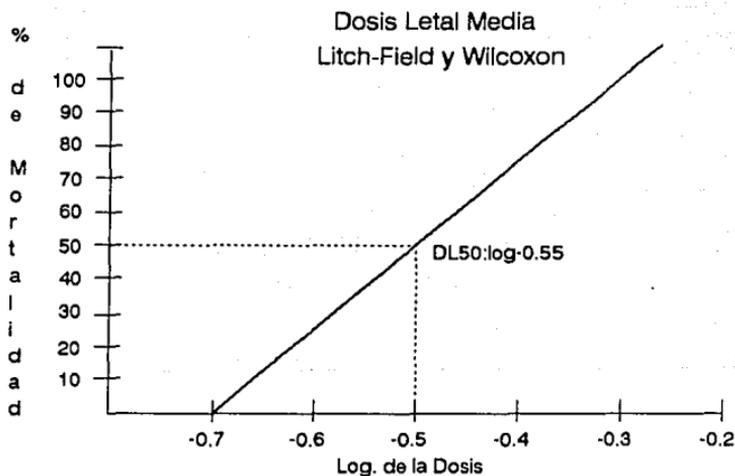
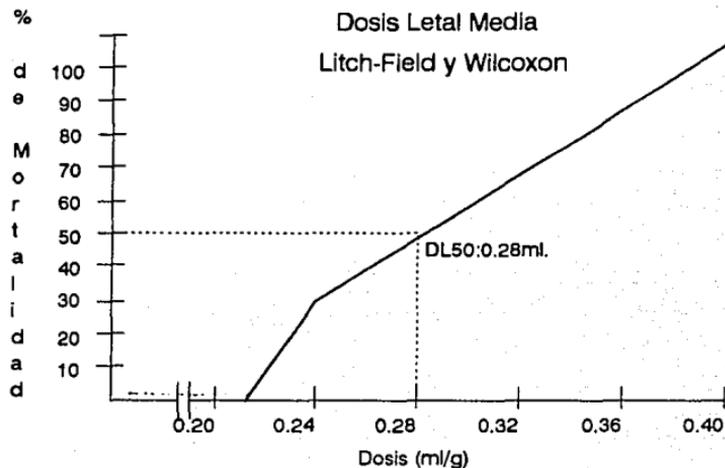


Fig. 8 Método Gráfico-Monográfico de Litch-field y Wilcoxon, para la determinación de la DL50 de la fracción alcohólica del tequila. Vía oral en ratones macho NIH(SW), DL50:9.12 g/kg de peso.

Tabla No.3

Determinación de la dosis letal media (DL50) , por el método Logit de Berkenson,
 modificado por Lehman de la fracción alcohólica del tequila en ratones, via oral.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Dosis	x in Dosis	n	r	$p = r / n$	$q = 1 - p$	p / q	$l = \ln p / q$	x	l	$x \cdot l$
2.4	0.8754	6	2	0.3333	0.6667	0.4999	-0.6932	0.7643	0.4805	-0.6068
2.8	1.0296	6	3	0.5000	0.5000	1.0000	0.0000	1.0600	70.0000	0.0000
3.2	1.1831	6	4	0.6666	0.3334	1.9999	0.6928	1.3528	0.4000	0.8057
3.6	1.2809	6	5	0.8333	0.1667	4.9998	1.6091	1.6407	2.5892	2.0610
$N = 4$	$Sx = 4.369$	$Sn = 24$					$Sl = 1.608$	$Sx = 4.81$	$Sl = 3.46$	$Sx \cdot l = 2.25$
	$x = 1.087$	$1/Sm = 0.0416$					$l = 0.402$			
	$(Sx) = 18.91$						$(Sl) = 2.58$			
				$r = 0.089$	$m = 0.879$					

p = fracción que no responde
 q = fracción que responde
 n = número de animales probados
 r = número de animales que reaccionan

Se determinó el valor de DL_{50} trazando una línea vertical desde el punto del 50% de mortalidad, hasta su correspondiente dosis, como se muestra en la figura 8, obteniéndose un valor de 9.12 g/kg de peso.

Se aplicó también el método Logit de Berkenson, el cual consiste en la transformación de la curva dosis-respuesta obtenida por el método anterior, en una línea recta a partir de los datos calculados en la tabla 3.

Se gráfica respuesta contra el logaritmo de la dosis, donde el logit para p , se define como $\lambda = \ln p/q$, corresponde p a la fracción que responde y q a la fracción que no responde ante la dosis administrada de fracción alcohólica de tequila, el valor de DL_{50} se da cuando se intercepta en la gráfica de $\lambda = 0$, es decir $p=q$ (50% muere y 50% no muere), el valor de $\lambda = \ln 1 = 0$, por lo tanto la DL_{50} será aquel valor de x , para el cual $\lambda = 0$, como se muestra en la gráfica de la fig. 9.

En ambos métodos se obtiene el valor de DL_{50} de 9.12 g/kg de peso, vía oral.

IV.3. EVALUACION DE LA FRECUENCIA DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (I.C.H.).

Para evaluar la frecuencia de I.C.H., se analizó la incorporación de la 5-BrdU, que en promedio se liberó el 80% de cada tableta, lo que permitió la observación de metafases con tinción diferencial valorable, en cada una de las dosis evaluadas.

La frecuencia de I.C.H., se analizó en 125 metafases de 2a. división celular, con tinción diferencial valorable, para cada una de las dosis empleadas.

Dosis Letal Media Berkson-Lemman

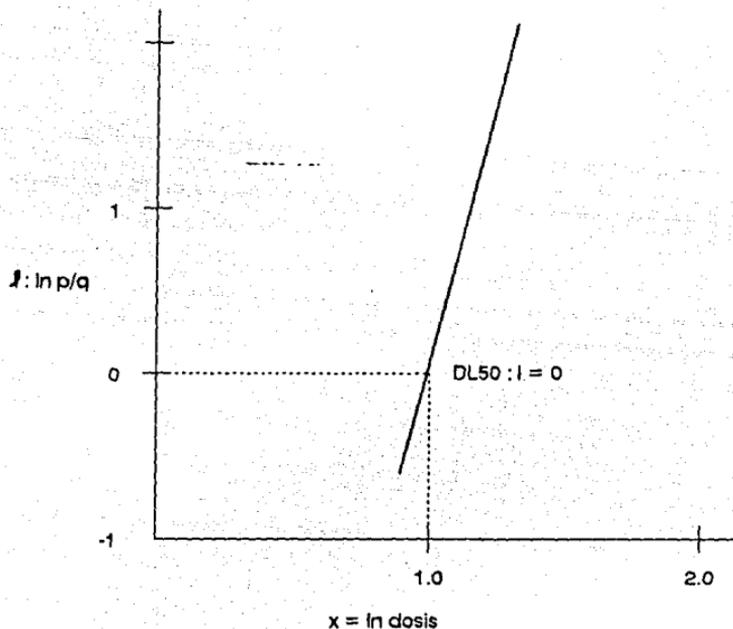


Fig. 9 Gráfica para la determinación de la DL50 de la fracción alcohólica del tequila.
Método Logit de Berkson-Lemman, vía oral en ratones macho, NIH(SW), donde p = fracción que responde y q = fracción que no responde.

Los resultados se muestran en la tabla 4b, donde se observa un leve incremento en la frecuencia de I.C.H., en comparación con el testigo negativo, que muestra un valor basal de 5.20 I.C.H.'s.

Estos incrementos fueron estadísticamente significativos con la prueba U de Mann Whitney y el análisis de varianza con una $p < 0.05$ y una $p < 0.01$, para el análisis de varianza los datos se muestran en la tabla 5b.

Las tablas 4a, y 5a muestran el manejo estadístico de cada una de las pruebas aplicadas en forma resumida, así como los cálculos y fórmulas más importantes.

Se realizó la gráfica de I.C.H. vs. dosis, se muestra la gráfica en la figura 10. Al efectuar el análisis de regresión lineal de la gráfica, se obtiene un coeficiente de correlación $r=0.85$, cuya ecuación es $y=0.549x + 6.57$, lo que indica que la mayor parte de puntos cae sobre la recta.

Para determinar el efecto de la fracción alcohólica del tequila sobre el ciclo celular, en médula ósea de ratón, se analizaron 100 metafases al azar, evaluándose el porcentaje de las 1as., 2as., 3as. ó subsecuentes divisiones celulares en cada una de las dosis, comparando los resultados obtenidos con los valores del grupo testigo, en el cual se empleó un mutágeno conocido que incrementa la frecuencia de I.C.H. e inhibe el ciclo celular, los resultados se muestran en la tabla 6.

Se observó poca diferencia entre las dosis estudiadas y el testigo positivo (Mitomicina C, MMC), ya que disminuye el número de primeras divisiones en las dosis más altas y se incrementan las terceras divisiones, sin embargo al evaluarse estas diferencias a través de la prueba de Chi-cuadrada (χ^2) éstas no son estadísticamente significativas.

TABLA 4a.

PRUEBA U DE MANN - WHITNEY

TESTIGO NEGATIVO	RANGOS DEL TESTIGO NEGATIVO	DOSIS D1 (0.32 g/kg)	RANGOS DE LA DOSIS D1
5.04	3	5.68	5
3.48	1	5.00	2
5.76	6	6.00	7
5.56	4	8.44	10
6.16	9	6.12	8
	R1 = 23		R2 = 5
n1 = 5		n2 = 5	

DESARROLLO.

a) Ordenar los valores de las muestras en orden creciente conservando cada valor dentro de su propia muestra (los valores dados en el testigo como en la dosis 1 son los correspondientes al número de intercambios de cromátidas hermanas observados en cada ratón, por lo que n representa el número de ratones empleados).

b) Efectuar la sumatoria de los rangos R1 y R2 .

c) Aplicar las siguientes fórmulas :

$$U_1 = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_1 (n_1 + 1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_2 (n_2 + 1)}{2} - R_2$$

Resolviendo para U_1 , tenemos :

$$U_1 = (5) \cdot (5) + \frac{5 (5 + 1)}{2} - 23 = 17 , \text{ si sustituimos}$$

los valores para U_2 , está tendrá un valor de $U_2 = 8$.

d) Una vez calculada cualquiera de las dos U's , se verifican los resultados al calcular el valor de U' , donde :

$U' = n_1 \cdot n_2 - U$ (el valor de U es sustituido por cualquiera de los valores calculados anteriormente), sustituyendo para U_1

$$U' = 8$$

e) Comparar el menor de los valores calculados de U ó U' , con el menor de los valores críticos de las tablas de U , para los tamaños de muestra dados por n_1 y n_2 , en su correspondiente nivel de significancia $\alpha < 0.05$.

Sí, el valor calculado es menor que el valor crítico de tablas para la prueba de U , se rechaza la hipótesis nula, es decir $H_0 : \mu_1 = \mu_2$, aceptándose la hipótesis alterna H_a , $H_a : \mu_1 \neq \mu_2$, por lo que existiera diferencia significativa entre la dosis evaluada y el testigo negativo.

En este caso se comparó la frecuencia de I.C.H. del testigo negativo y la D_1 , observandose que el menor de los valores de

de U es 8, comparado con los valores críticos de las tablas, para $n_1 = 5$ y $n_2 = 5$, el nivel de significancia entre las U 's es $\alpha > 0.05$.



Se acepta la H_0 y no existe diferencia significativa entre las dosis probadas.

Estos mismos cálculos se efectuarán para cada una de las dosis evaluadas, comparándolas con el testigo negativo, encontrándose significancia a partir de la tercera dosis, como se muestra en la tabla 4b, con un nivel de significancia $\alpha < 0.05$.

TABLA 4b.

Efecto de la fracción alcohólica del tequila sobre la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas, en médula ósea de ratón.

Análisis Estadístico Prueba U de Mann - Whitney con una $p < 0.05$.

DOSIS		METAFASES	ANIMALES	INTERVALO	MEDIA \pm D. E.	E. E. M.	SIGNIFICANCIA
ml/g	g/kg	ANALIZADAS	POR LOTE				5%
0.000	0.00	125	5	0 - 13	5.20 \pm 1.04	\pm 0.46	*
0.010	0.32	125	5	2 - 13	6.36 \pm 1.17	\pm 0.52	-
0.030	0.98	125	5	2 - 15	7.18 \pm 0.89	\pm 0.40	-
0.050	1.64	125	5	5 - 16	8.33 \pm 0.28	\pm 0.12	*
0.070	2.30	125	5	4 - 20	9.22 \pm 1.87	\pm 0.83	*
0.140	4.60	125	5	4 - 16	9.41 \pm 1.67	\pm 0.75	*
0.210	6.90	125	5	5 - 16	9.50 \pm 1.43	\pm 0.64	*
M. M. C.							
0.38	2x10 ⁻⁵	125	5	10 - 50	15.67 \pm 0.17	\pm 0.17	*

TABLA 5a.

Análisis de Varianza para el diseño completamente al azar

FUENTE DE VARIACION F. V.	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F. C.
TRATAMIENTO	t - 1	$SCTR = \sum_{i=1}^t X_i / r - c$	$CMT = \frac{SCTR}{(t-1)}$	$\frac{CMT}{CMER}$
ERROR	t. (r - 1)	SCER = SCTL - SCTR	$CMER = \frac{SCER}{t.(r-1)}$	
TOTAL	r. t. - 1	$SCTL = \sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^r X_{ij} - c$		

$$G = (\text{GRAN TOTAL}), \quad G = \sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^r X_{ij}$$

t = número de dosis

r = número de l.c.h. por ratón.

$$C = \text{FACTOR DE CORRECCION}, \quad C = G / (r \cdot t)$$

X_i = TOTAL DEL i-ésimo TRATAMIENTO.

$$SCTL = \text{SUMA DE CUADRADOS TOTAL}, \quad SCTL = \sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^r X_{ij} - c$$

$$SCTR = \text{SUMA DE CUADRADOS DE TRATAMIENTOS}, \quad SCTR = \sum_{i=1}^t X_i / r - c$$

$$SCER = \text{SUMA DE CUADRADOS DEBIDO AL ERROR}, \quad SCER = SCTL - SCTR$$

$$CMT = \text{CUADRADO MEDIO DE LOS TRATAMIENTOS}, \quad CMT = SCTR / g.l.$$

$$CMER = \text{CUADRADOS MEDIOS DEL ERROR}, \quad CMER = SCER / g.l.$$

$$F.C. = F \text{ CALCULADA}, \quad F = CMT / CMER.$$

la F de tablas, se busca en tablas de distribución F.

la hipótesis nula H_0 se rechaza, si F calculada > F de tablas, por lo que existe evidencia estadística al nivel de significancia que sea establecido (5% o 1%).

TABLA 5B.

Análisis de Varianza Prueba F, para la frecuencia de Intercambio de Cromátidas Hermanas inducidas por la fracción Alcohólica del tequila, en médula ósea de ratón.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F CALCULADA	f TABLAS
TRATAMIENTO	6	84.2426	14.040	8.3722	2.45*
ERROR	28	46.9567	1.677		3.53**
TOTAL	34	131.1993			

* Significancia con $p < 0.05$

** Significancia con $p < 0.01$

Intercambio de Cromátidas Hermanas

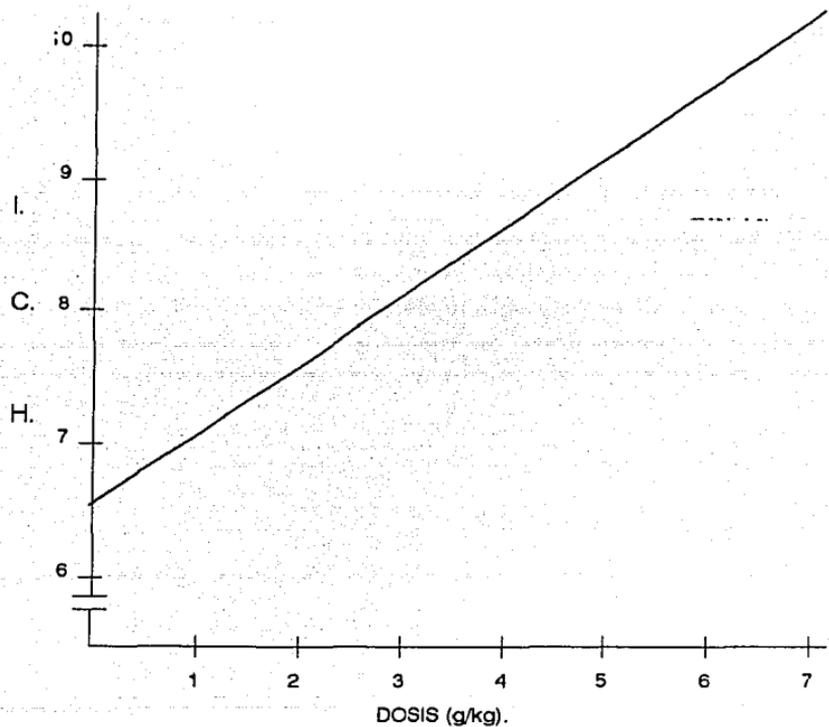


Fig. 10 Frecuencia de intercambio de cromátidas Hermanas (I. C. H.) inducidas por la fracción alcohólica del tequila, cuya ecuación es $y=0.549x + 6.57$, con un coeficiente de correlación $r=0.85$.

Se calculó también el Índice de Replicación (I.R.), en el cuál se observó una tendencia a incrementarse moderadamente a medida que aumenta la dosis, mientras que el Tiempo Promedio de Generación (T.P.G.) calculado no muestra diferencias significativas en ninguna de las dosis y en comparación con los testigos.

En la figura 11, se muestran metafases en 1a. y 2a. división celular, diferenciándose por su tinción diferencial que presentan y se muestra también la presencia de intercambios de cromátidas hermanas en una metafase de 2a. división.

TABLA 6.

Efecto de la Fracción Alcohólica del tequila sobre la
Cinética Celular, en médula ósea de ratón.

DOSIS		PROLIFERACION CELULAR %			I. R.	T. P. G. * *
ml/g	g/kg	1	2	3		(hrs.)
0.00	0.00	29	67	4	1.75	12.57
0.010	0.32	23	65	12	1.53	14.37
0.030	0.98	22	69	9	1.87	11.76
0.050	1.64	16	72	12	1.96	12.24
0.070	2.30	18	67	15	1.97	12.18
0.140	4.60	21	68	11	1.90	12.63
0.210	6.90	28	67	5	1.77	12.43
M.M.C.						
0.38	2×10^{-3}	79	21	0	1.21	18.18

* I. R. : Indice de Replicación.

* * T.P.G. : Tiempo Promedio de Generación.



Figura N° 11. Metafases de médula ósea de ratón tratados con la fracción alcohólica del tequila, en 1a. y 2a. división celular.

V. D I S C U S I O N

1. Se realizó un análisis cualitativo por cromatografía de gases para identificar los componentes volátiles que constituyen a la fracción alcohólica obtenida durante la destilación.

Identificandose con este estudio únicamente siete componentes (etanol, metanol, acetaldehído, propanol, alcohol isoamílico y acetato de etilo), de los 11 reportados por Manjarrez y cols., en ambos casos el etanol, es el componente que se encuentra en mayor proporción (66).

Son pocos los estudios que cuantifican el contenido de congéneres en las bebidas alcohólicas, siendo necesario se efectúen, ya que las investigaciones más recientes de los efectos del alcohol han sido concernientes a los constituyentes volátiles y no volátiles de las bebidas alcohólicas, debido a que la gente no bebe etanol puro, sino una gran variedad de sustancias orgánicas e inorgánicas.

Otros estudios muestran que el contenido de congéneres en las bebidas alcohólicas comerciales varía aún dentro de un mismo lote de producción y esto se atribuye a los diferentes efectos que causa al individuo (19,62,65).

2. Determinación de la Dosis Letal Media (DL_{50}).

Se efectuó la determinación de la DL_{50} , basandose en la experiencia científica de las últimas décadas y los requisitos para los ensayos toxicológicos que se han incrementado para la de-

terminación de los efectos mutagénicos y carcinogénicos.

El significado de la determinación de la DL_{50} , no es un valor fijo, sino indica la precisión del proceso el cual depende del número de animales utilizados y está influenciado por muchos factores tales como especie animal, género, edad, sexo, dieta, privación de alimento previo a la administración de la dosis, temperatura, enjaulado, procedimientos experimentales.

Existen varios ensayos con los cuales puede ser determinado un valor aproximado de la DL_{50} , en este estudio se efectuaron dos métodos obteniéndose con ambos el mismo valor de DL_{50} : 9.12 g/kg de peso. Estos métodos utilizan un menor número de animales que la determinación clásica de DL_{50} , además son más sencillos de calcular y en caso del método Logit de Berkenson permite hacer un análisis estadístico en forma conveniente.

Su precisión y reproducibilidad son suficientes para los propósitos de este estudio, lo que permitió la selección de las dosis a utilizar en el experimento de I.C.H. (65,66).

5. Evaluación de la frecuencia de I.C.H.

La selección de dosis de fracción alcohólica del tequila incluye dosis mayores para incrementar la confiabilidad de los resultados de I.C.H.

Los resultados al evaluar las diferentes dosis de fracción alcohólica del tequila mostrarón un incremento total de 4.3 -- I.C.H's., por arriba del valor basal observado en el testigo negativo, siendo este incremento estadísticamente significativo, con una $p < 0.05$ empleando el análisis de varianza.

Observándose con la prueba U de Mann-Whitney, que esta significancia se da a partir de la tercera dosis de 1.64 g/kg de peso, con una $p < 0.05$.

Nuestros resultados indican que la fracción obtenida es mutagénica y en comparación con otras investigaciones efectuadas a diversas marcas de brandys y whiskys japoneses, escoceses, franceses, americanos y canadienses, en los cuales se analizó la fracción volátil y los residuos, empleando el método de Ames en Salmonella typhimurium TA100 y TA98, considerando éstas como mutagénicas, al incrementarse el número de revertantes espontáneas (61,62,70).

Todas las muestras mostrarán mutagenicidad, pero al adicionar la mezcla S9, que es un activador metabólico, esta mutagenicidad se inhibe, obteniéndose resultados similares con diferentes muestras de la misma botella (62).

Son pocos los estudios realizados en mamíferos que evalúen la mutagenicidad de las bebidas alcohólicas, generalmente se emplean cultivos de linfocitos humanos, de pacientes alcohólicos o se trabaja con bacterias. Se ha reportado que algunas bebidas requieren de activación metabólica para mostrar su efecto mutagénico, por lo cual nosotros empleamos un sistema in vivo, donde se manifestará el efecto que tiene la fracción alcohólica del tequila al ser metabolizada.

Se ha dado mucha atención a la relación causativa entre el consumo de bebidas alcohólicas y sus diversas manifestaciones citogenéticas en el humano, ya que involucra la presencia de aberraciones cromosómicas e incremento en la frecuencia de I.C.H's, en estudios comparativos entre alcohólicos y no alcohólicos, así como la incidencia de cáncer humano, existiendo debate entre sí el etanol actúa como iniciador o promotor de la malignidad.

Se tienen muchos estudios al respecto, donde claramente se ha demostrado que el consumo de bebidas alcohólicas daña al ADN, y el uso crónico exhibe una frecuencia altamente significativa de varios tipos de aberraciones estructurales en linfocitos humanos. Se ha reportado también que las células con alteraciones cromosómicas, reducen su supervivencia y son inducidas a muerte celular; la acumulación de células muertas puede facilitar los procesos de envejecimiento (58,60).

Otro parámetro adicional que se emplea en las pruebas de mutagénicidad esta dado por la interpretación de el efecto de la fracción alcohólica en la cinética celular, debido a que está se ve afectada en función de la dosis administrada, manifestando se por incrementos o disminuciones en el número de divisiones, en nuestro caso a pesar de las dosis administradas de fracción alcohólica, los incrementos observados no son estadísticamente significativos.

En comparación con el testigo positivo donde se empleó la mitomicina C, que es : 1) un mutágeno ampliamente conocido, 2) es un agente alquilante que causa entrecruzamiento en el ADN y 3) produce alargamiento del ciclo celular, el cual se refleja en un incremento en el número de las. divisiones, nosotros no encontramos ninguna diferencia significativa (44).

En una población como la nuestra donde el alcoholismo es un problema de salud grave, que afecta a un gran número de individuos es necesario efectuar estudios de mutagénicidad, ya que hasta el momento no se cuenta con ellos.

El reconocimiento de que las bebidas alcohólicas contienen muchas sustancias químicas adicionales al etanol y son potencialmente peligrosas para la salud humana, se debe analizar su potencial mutagénico y carcinogénico, lo que representa un enorme y costoso compromiso en favor de salud pública.

VI. CONCLUSIONES

1. De los resultados obtenidos del análisis cualitativo la fracción alcohólica del tequila, por cromatografía de gases, concluimos que esta en su mayor parte constituida por etanol.
2. La fracción alcohólica del tequila tiene una DL_{50} de 9.12 g/kg de peso, vía oral en ratones cepa NIH(SW).
3. Su efecto genotóxico se manifestó por el incremento de intercambios de cromátidas hermanas observado, sin causar ningún efecto inhibitorio en la cinética celular.
4. Por los resultados obtenidos en este trabajo, concluimos que la fracción alcohólica del tequila analizada, actúa como mutágeno débil.

VII. REFERENCIAS

1. Calderón, N. " El alcohol y el alcoholismo consideraciones históricas ". Médico Moderno, Vol. XXIV, N° 7:71-81 , 1986.
2. Celis, C.R. Elaboración del alcohol en : El alcoholismo en México. Historia y Legislación. Editores Molina Piñero y Sánchez Medal L. Fundación de investigaciones Sociales, México, 1971.
3. Bustamante, M., Guevara, L., Pérez de Francesco, C. y Vasconcelos, R. " El alcoholismo y sus consecuencias socioeconómicas ". Gaceta Médica de México, 107:182, 1971.
4. Calderón, N.G. " Consideraciones acerca del alcoholismo entre los pueblos prehispánicos de México". Rev. Inst. - Nac. Neur. 2:5 , 1968.
5. Naveillan, F.P. " Sobre el concepto de alcoholismo ". Bol. Of. Sanit. Panam. 9(4), 1981.
6. Reginald, G. Smart, N.G. y Armendares, B.J. " Ensayo de un nuevo método para estudiar el consumo de alcohol sus problemas en tres países de las Américas " . Bol. Of. Sanit. Panam. 91(6), 1981.
7. Versión condensada del documento básico para las discusiones técnicas, 35ava. Asamblea Mundial de la Salud (OMS). " Consumo de alcohol y problemas afines ". Bol. Of. Sanit. Panam., 1983.

8. Feuerlein, W. Alcoholismo, abuso y dependencia . Editorial Salvat, México, 1982.
9. Negrete, J.C. " Alcoholismo in Latin American ". Ann. NY Acad. Sci. 273:9-23, 1976.
10. Piña, G.E. " Etanol : Catabolismo y efectos metabólicos". Gaceta Médica de México. Vol.119, N° 1:1-14, 1983.
11. Stephn, B.T. , Veech, L.R. , Andrew, A. V. , Ruistein, D. " Genetic and Biochemical factor relevant to Alcoholism". Alc. Clin. and Exp. Research Vol.-8, N° 4:375-383, 1984.
12. Omenn, S.G. " Genetic Investigation of alcohol metabolis and of alcoholism ". Am. J. Hum. Genet. 43:579-581, 1988.
13. Reed, T.E. , Haraold, K. , Gibbins, J.R. , Bushan, M.K. y Rankin, G.J. " Alcohol and Acetaldehyde metabolism in caucasians, chinese and amerinds ". CMA Journal, Vol. 115, N°6 851-855, 1976.
14. Tabakoff, B. , Hoffman, L.P. , Lee John, M. , Toshikazu, S. , Willard, B. y De Leon-Jones, F. " Diferences in platelet enzyme activity betwen alcoholics and nonalcoholics ". The New England J. Medicine, Vol.21:134-139, 1988
15. West, J.L. , Maxwell, S.D. , Noble, P.E. y Solomon, H.D, " Alcoholism. UNCLA Coference " . Annals of Internal Medicine, N° 100:405-416, 1984.
16. Sánchez, M.A. y Hope, H.P. " Agave Juice ". Agricul. and food Chemistry. N° 1:246-249, 1953

17. Norma Oficial Mexicana. Bebidas Alcohólicas Destiladas. Tequila. NOM-V-7-1984.
18. Malkin, B. " Tequila Exports Soar ". *Méx-Am. Review* 45:25 1977.
19. Hebe, B.G. " Congener contents of alcoholic beverages" . *Journal of Studies on Alcohol*. Vol. 2, N°11:1030-1037, - 1981.
20. Mas Condés, C., Manrique, R.A., Valera, C. y Rosovsky, H. " Variables médicas y sociales relacionadas con el consumo de alcohol en México ". *Salud Pública Méx.* Vol.28:473-479, 1986.
21. López, J.L., Rosovsky, H. " Estudio epidemiológico sobre accidentes y delitos relacionados con el consumo de alcohol ". *Salud Pública Méx.* Vol.28:489-494, 1986.
22. Terranova, G., Sahijeral, M., Del Corral, R. " El consumo de alcohol y su relación con la conducta suicida". *Salud Pública Méx.* Vol. 28:496-504, 1986.
23. Vilchis, L.H. y Iturrioz, R.P. " Los accidentes de tránsito: Una problemática actual ". *Salud Pública Méx.* Vol. 28: 537-542, 1986.
24. Obe, G. y Hansjürgen, R. " Mutagenic, cancerogenic and teratogenic effects of alcohol ". *Mutation Research.* 65:229-259, 1979.
25. Hollsted, C., Olsson, O. y Rødborg, U. " The effect of alcohol on the developing organism genetical, teratological

- and physiological aspects ". Medical Biology. 55:1-14, - 1977.
26. Dwight, R.P. y West, R. " Blood alcohol concentration: A critical factor for producing fetal alcohol effects". Alcohol, Vol. 3:269-278, 1986.
 27. Herrera, E. " Efectos del etanol en la gestación " . Mundo Científico., Vol. 6, N° 63:1114-1119, 1986.
 28. Chernoff, G.F. " The Fetal Alcohol Syndrome in mice: An animal model ". Teratology, 15:223-230, 1977.
 29. Blume, S.B. " Women and alcohol ". JAMA., Vol. 256, N° 11: 1467-1470, 1986.
 30. Goodwin, W.D. " Hereditary factors in Alcoholism ". Hosp. Practice. 121-130, 1978.
 31. Benavidez de Larraza, G. " Alcoholismo y Genética ". Rev. Med. Hosp. Gral. Vol XLII, N° 3:133-135, 1979.
 32. Latchman, R.W. " Familial Alcoholism: Evidence from 237 alcoholics ". British Journal of Psychiatry. 147:54-57, - 1985.
 33. Theodore, R. " Biologic marker studies in alcoholism ". The New England J. of Med, Vol. 318, N° 3:180-182, 1988.
 34. Erich, G. " Sister Chromatid Exchange (SCE) and Structural chromosomal aberrations in mutagenicity testing ". Hum. - Genet, 58:235-254, 1981.

35. Morales, P. " El daño a la información genética y los intercambios entre cromátidas hermanas ". Ciencia y Desarrollo. Nº 81:65-72, 1988.
36. Schneider, L., Tice, R. y Kram, D. Bromodeoxyuridine differential chromatid exchange and cell replication kinetics. Chapter 25. Methods in cell biology., Vol. 20, - Acad. Press. Inc., 379-409, New York, 1978.
37. Goto, K. Akenat Su, T. y 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.
38. Latt, A.S. " Sister chromatid exchange formation ". Ann. Rev. Genet. 15:11-55, 1981.
39. Tice, R., Chaillet, J. y Schneider, E. " Demonstration of spontaneous sister chromatid exchange in vivo ". Exp. -- Cells Res., 102:426-429, 1976.
40. Shefer, D.A. " Replication Bypass Model of sister chromatid exchanges and implications for Bloom's Syndrome and Fanconi's Anemia ". Human Genet., 39:177-190, 1977.
41. Painter, R. " A replication model for sister chromatid exchange ". Mutation Research, 70:337-341, 1980.
42. Painter, R. " Replication model for sister chromatid exchange ". Sister Chromatid Exchange, 115-121, 1982.
43. Bloom, S. y Hsu, T. " Differential fluorescence of sister chromatids in chicken embryos exposed to 5- BrdU ". Chromosoma., 51:261-267, 1975.

44. Kram, D., Schneider, L., Senula, C. y Nakanishi, Y.
" Spontaneous and mitomycin-C induced sister chromatid ex
changes. Comparison of in vivo and in vitro systems ".
Mutation Research., 60:339-347, 1979.
45. Nakanishi, Y. y Schneider, E. " In vivo sister chromatid
exchange: A sensitive measure of DNA damage ". Mutation
Research., 60:329-337, 1979.
46. Morales, P. " Analysis in vivo of sister chromatid exchan
ge in mouse bone-marrow and sillvary-gland cells ". Muta-
tion Research., 74:61 - 69, 1980.
47. King, M., Wild, D. Gocke y Eckhardt. " 5-Bromodeoxyuridi
ne tablets with improved depot effect for analysis in vi-
vo of sister chromatid exchanges in bone-marrow and sper-
matogonial cells ". Mutation Research., 97:117-129, 1982.
48. Morales, P., Vallarino-Kelly, T. y Rodríguez, R. " Detec-
tion of SCE in rodent cells using the activated charcoal
bromodeoxyuridine system ". Sister Chromatid Exchanges.,
599-611, 1984.
49. Alien, W., Shuler, F. y Latt, A. " Bromodeoxyuridine ta-
blet methodology for in vivo studies of DNA syntesis "
Somatic Cell Genetics., Vol.4, N° 4:393-405, 1978.
50. Obe, G., Gobel, D., Engeln, H., Herha, J. y Natarajan, A.
" Chromosomal aberrations in mutagenicity testing ". Human
genetik., 58:235-254, 1981.
51. Obe, G., Gobel, D., Engeln, H., Herha, J. y Natarajan, A.
" Chromosomal damage in chronic alcohol user ". Humangene
tik., 29:191-200, 1975.

52. Mitelman, F., Wadstein, J. " Chromosome aberrations in chronic alcoholics ". *Lancet*, 28:216, 1978.
53. Merun, G. y Warren, G. " Increased frequency of sister - chromatid exchanges in alcoholics ". *Mutation Research.*, 85:71-76, 1982.
54. Fovad, M. y Hussain, H. " Chromosomal aberrations in chronic male alcoholics ". *Alcoholism Clinical and Experimental Research.*, Vol. 6, N° 4:122-129, 1982.
55. Alvarez, M., Cimino, L. Cory, M. y Gordon, R. " Ethanol induction of sister chromatid exchanges in human cells in vitro ". *Cytogenet Cells Genet.*, 27:66-69, 1980.
56. Yoshihiko, M. " Chromosomal aberrations in the lymphocytes of alcoholics ". *Neuropsychobiology.*, 17:24-29, 1987.
57. Hansjürgen, R. y Obe, G. " Acetaldehyde induces cross-links in DNA and causes sister-chromatid exchanges in human cells ". *Mutation Research.*, 58:115-119, 1978.
58. Obe, G., Natarajan, A. Meyers, M. y Den Hertg, A. " Induction of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of human blood in vitro, and of SCEs in bone-marrow cells of mice in vivo by ethanol and its metabolite acetaldehyde ". *Mutation Research.*, 68:291-294, 1979.
59. Obe, G. y Majewsky, F. " No elevation of exchange type aberrations in lymphocytes of children with alcohol embryopathy ". *Hum. Genet.*, 43:31-36, 1978.

60. Anke, K. y Obe, G. " Influence of chronic ethanol uptake and acute acetaldehyde treatment on the chromosomes of bone-marrow cells and peripheral lymphocytes of chinese hamster ". Mutation Research., 88:389-395, 1981.
61. Nagao, M., Takahashi, Y., Wakabayashi, K. y Sugimura, T. " Mutagenicity of alcoholic beverages ", Mutation Research., 88:147-154, 1981.
62. Loquet, G. y Le Talaer, J. " Studies on mutagenic constituents of apple brandy and various alcoholic beverages -- collected in Western France, a high incidence area for -- esophageal cancer ". Mutation Research., 88:155-164, 1981.
63. Hoeft, H. y Obe, G. " SCE-inducing congeners in alcoholic beverages ". Mutation Research., 121:247-251, 1983.
64. Mc. Fee, A., Lowe, W. y San Sebastian, J. " Improved sister-chromatid differentiation using paraffin-coated bromodeoxyuridine tablets in mice ". Mutation Research., 119: 83-88, 1983.
65. Lehmann, F. " Dosis letal o efectiva media : Un cálculo manual fácil y rápido ". Rev. Mex. Cienc. Farm., 10-46., 1979.
66. Zbinden, G. y Frury, M. (traducción Jauge, P.) " Significado de la determinación de DL_{50} para la evaluación toxicológica de las sustancias químicas ". Arch. Tox., 47:77 a 99, 1981.
67. Hurley, D., Aguilar, A., Garibay, J. y Landeros, J. Técnicas de Diseño Experimental. Dpto. de Matemáticas del Cen

tro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.
Cap. XI:1-37, 1981.

68. Márquez de Cantú, M.J. Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico-Biológicas. Cap. V y XIII : 361-413 y 503-507, Edit. UNAM , 1a. Edición, 1988.
69. Manjarrez, A. y Llama, M. " Cuantificación de los componentes volátiles en tequilas y mezcales por cromatografía en fase de vapor ". Rev. Soc. Quím. Méx., 18:27-33, 1966.
70. Nathan, V. , Haybron, D. , Groves, L. y Mower, H. " The nitrosation of alcohol-induced metabolites produces mutagenic substances ". Mutation Research., 158:159-168, 1985.
71. Brusick, D. Principles of genetic toxicology . Edit. Plenum, New York , USA, 1980.