

93
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACION DE CROMO EN DIFERENTES ESTRUCTURAS DE
Viola faba y *Tradescantia* CLON 4430 EXPUESTAS A
CONCENTRACIONES QUE LES PRODUCEN EFECTOS GENETICOS

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

presenta

CARMEN ARIEL LOPEZ MONTER

MEXICO, D.F.

1994

REALIZADA BAJO LA DIRECCION DEL

DR. RAFAEL VILLALOBOS PIETRINI

EN EL LABORATORIO DE CITOGENETICA Y

MUTAGENESIS AMBIENTALES

DEL CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMOSFERA

UNAM



FACULTAD DE CIENCIAS
SUBSISTEMAS ESCOLARES

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.

A LA MEMORIA DE MI MADRE

A MI PADRE

A MIS HERMANOS

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rafael Villalobos Pietrini por su dirección y apoyo para la elaboración de esta tesis.

A mis sinodales Dra. Sandra Gómez Arroyo, M. en C. Ana Rosa Flores Márquez, Biól. Miguel Angel Meneses Pérez y Biól. Claudio Mario Amescua García, por la revisión y sugerencias para este trabajo.

Al M. en C. Mario Villalobos Peñalosa por su ayuda en el montaje de las técnicas analíticas empleadas de espectrofotometría de absorción atómica.

A Salvador Blanco Jiménez por su colaboración en el análisis estadístico de los datos y por sus puntos de vista.

Y a todas aquellas personas que me brindaron su apoyo para la culminación de mis estudios.

CONTENIDO

	PAG.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
I. FUENTES DEL CROMO	2
II. CARACTERISTICAS QUIMICAS DEL CROMO	3
III. ACUMULACION DEL CROMO	6
IV. EFECTOS FISIOLOGICOS	7
V. EFECTOS MUTAGENICOS	11
MATERIAL Y METODOS	14
RESULTADOS	20
DISCUSION	23
CONCLUSIONES	30
REFERENCIAS	32
TABLAS	49
FIGURAS	55

RESUMEN

Con el objeto de conocer las correlaciones que existen entre el cromo aplicado, el acumulado, el tiempo de exposición y el daño genético producido por este metal, se hicieron determinaciones por medio de espectrofotometría de absorción atómica de las concentraciones acumuladas de Cr en diversas estructuras de *Vicia faba* y *Tradescantia* clon 4430. Así en la raíz de *Vicia faba* se encontró que existe una relación directa de dosis-respuesta entre las concentraciones aplicadas, las acumuladas, el tiempo de exposición y el daño genético evaluado por anafases anormales y aberraciones totales y de manera inversa con la cantidad de anafases totales de las células del meristemo.

En el caso de *Tradescantia* es posible observar que existe una clara correlación entre las concentraciones de Cr aplicadas y las acumuladas en las diferentes estructuras en el siguiente orden: tallo > hojas > inflorescencias. Sin embargo, no se encontró relación de proporcionalidad de la dosis con el daño genético evaluado por medio de los micronúcleos en las tétradas, aunque el análisis estadístico mostró que las frecuencias de micronúcleos encontradas fueron significativamente diferentes a las de los testigos ya que aquellas excedieron el doble de estos valores.

INTRODUCCION

Como resultado de la gran cantidad de residuos originados por las actividades industriales y agrícolas, los vehículos de combustión interna y los desechos domésticos, el ambiente está sometido a una excesiva carga de sustancias tóxicas, que agudizan el problema de la contaminación ambiental, ya que a pasos acelerados se está perturbando la salud del hombre y el equilibrio de los ecosistemas.

I. FUENTES DEL CROMO

Entre los agentes perjudiciales que se incorporan al ambiente se encuentran los metales pesados; uno de los más importantes es el cromo, que es usado ampliamente en la actualidad, sin embargo, el control inadecuado de sus residuos es causante de serios problemas de contaminación del aire, agua y suelo (Villalobos-Pietrini 1977) y cuando se incrementa su concentración traza puede alterar las funciones normales de los organismos.

Entre las principales fuentes de emisión de cromo se hallan las industrias metalúrgica, química, de producción de cromatos, el procesamiento de cromado, la quema de carbón y su uso en los aditivos de la gasolina, los inhibidores de la corrosión, los pigmentos de pinturas, tintas y gomas, los agentes curtidores, fungicidas, fuegos artificiales, baterías de celdas secas,

preservadores de la madera, el cemento para la construcción, el material fotográfico, fertilizantes, cerámica, la industria del papel, la producción de cerillos, entre otros (Denton et al. 1954, Sullivan 1969, Natusch et al. 1974, Parr et al. 1976, Galvao y Corey 1987, Satyakala y Jamil 1992).

En la naturaleza, el cromo sólo se encuentra en estado combinado y no como elemento (Sullivan 1969). Su única mena es la cromita (FeCr_2O_4) que se halla en grandes cantidades en Nueva Caledonia, Filipinas, Rodesia, Rusia y Sudáfrica (Villalobos-Pietrini 1977), siendo la materia prima para la producción de compuestos de importancia en la industria química (Sullivan 1969, Villalobos-Peñalosa et al. 1987).

II. CARACTERISTICAS QUIMICAS DEL CROMO

El cromo ocupa el décimo séptimo lugar entre los elementos más abundantes de la corteza terrestre, pertenece al primer grupo de metales de transición, con peso atómico de 51.99, número atómico de 24, radio atómico metálico de 1.27 Å, una densidad de 7.19 g/ml, su punto de fusión es de 1,875 °C y el punto de ebullición de 2,665 °C (Choppin 1979). Teóricamente puede presentar todos los estados de oxidación del 0 al VI. Los más comunes son el 0, III y VI, siendo el I, IV y V sólo intermediarios transitorios en solución acuosa (Villalobos-Peñalosa et al. 1987, De Flora et al. 1990).

El cromo es muy resistente a la corrosión; se usa para el revestimiento de otros metales, proporcionándoles una capa protectora, así como para darles un acabado brillante. La adición del cromo al acero lo hace más duro y más resistente a la corrosión. A pesar de que el cromo es un metal relativamente activo ($E_{Cr^{3+}/Cr}^{\circ} + 0.74$ voltios), se hace pasivo en los ácidos oxidantes y libera gas hidrógeno con ácido sulfúrico o ácido clorhídrico diluidos y en caliente. En el estado de oxidación 2+, el cromo se oxida fácil y rápidamente al 3+. En el cual forma muchos iones complejos y compuestos de coordinación (Choppin 1979). Las sales de cromo divalentes (Cr II), son inestables y no tienen importancia comercial, son oxidadas en el aire o en soluciones acuosas y por ello se les encuentra rara vez (Sullivan 1969, Villalobos-Peñalosa et al. 1987). Los compuestos trivalentes de Cr tienen la propiedad de ser anfotéricos, son los más estables y ampliamente utilizados en la industria como el óxido crómico (Cr_2O_3) y el sulfato crómico [$Cr_2(SO_4)_3$]. De los compuestos hexavalentes, los cromatos (CrO_4^{2-}) y dicromatos ($Cr_2O_7^{2-}$), son los más significativos en la industria, pero también los más tóxicos (Sullivan 1969) y generalmente son solubles en agua (Sullivan 1969, De Flora et al. 1990).

Los compuestos trivalentes y hexavalentes son los que más frecuentemente se encuentran en el ambiente y tienen importancia biológica, siendo el Cr III el más común (Mertz 1969) y menos agresivo que el VI (Norseth 1981, De Flora et al. 1990). Estos

pueden ser interconvertidos fácilmente, el Cr VI es reducido por el Fe^{2+} , por los sulfuros disueltos y por algunos compuestos orgánicos con grupos sulfhidrilo a Cr III y éste a su vez es oxidado por un exceso de manganeso y por el oxígeno en condiciones naturales a la forma hexavalente (Mertz 1969, Schroeder y Lee 1975).

Para conocer los límites ambientales permisibles de Cr se han estudiado concentraciones que se han verificado en varias partes del mundo y con las cuales no se han detectado efectos en la salud de la población expuesta. Los límites establecidos para cromo ambiental son los siguientes (Galvao y Corey 1987):

- Aire urbano	50 ng/m^3
- Agua de ríos	10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
- Agua de océanos	5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
- Agua potable	0.05 mg/l (OMS)
- Suelo	125.0 mg/K en promedio aunque puede aumentar hasta 250 mg/K (no existe un límite preciso)
- Alimentos	no debe exceder de 0.03-0.1 $\text{mg}/\text{día}$

En muchos animales y en el hombre, la intoxicación con cromo puede acontecer por diferentes vías: inhalación (aire, polvo), ingestión (agua y alimentos contaminados) (Galvao y Corey 1987), por contacto directo (Gebhart 1984), como en el caso de los trabajadores de la industria del cromo (Galvao y Corey 1987), por el uso de pinturas que manipulan cotidianamente los niños o de maquillaje (Rastogi 1992).

III. ACUMULACION DEL CROMO

Se ha demostrado que en los vegetales el cromo es asimilado por absorción y puede estimular su crecimiento o ser tóxico dependiendo del tipo de planta, de la concentración (Lyon et al. 1968) y disponibilidad, la cual depende del pH, ya que se ha observado que en suelos ácidos el cromo es poco asequible para las plantas (Verfaillie 1974). En el medio acuático los factores que afectan su absorción en vegetales incluyen tanto la presencia de agentes quelantes como la solubilidad del metal (Cooley y Martin 1977), siendo menor esta última en el cromo III (Gendusa y Beitingger 1992). En lo que respecta a los agentes quelantes, Tripathi y Chandra (1991), observan por un lado que el EDTA suprime la acumulación de Cr en *Spirodela polyrrhiza* y por otro que el ácido salicílico la favorece.

Debido a la capacidad de absorción que tienen los vegetales, Parr et al. (1976) utilizan el follaje de plantas de tabaco para

monitorear la cantidad de cromo en el ambiente, en donde se determinó su acumulación colocándolas a diferentes distancias de los respiraderos de torres de enfriamiento.

En humanos, cuando se ingiere cromo por vía digestiva sólo se absorbe alrededor del 0.50 % (Donaldson y Barreras 1966), siendo los cromatos (VI) y el Cr (III) combinado con oxalatos, los que penetran mejor (Chen et al. 1973); por otro lado, se ha observado que la entrada de cromo depende de la estructura química en la que se presenta (Mertz et al. 1965). El mecanismo más importante de excreción del cromo ingerido es por vía urinaria, por la que se eliminan de 3 a 50 $\mu\text{g}/\text{día}$ (Wolf et al. 1974).

El cromo que entra pasa a la corriente sanguínea, en donde adquiere la forma trivalente y se distribuye a varios órganos, principalmente al sistema retículo endotelial, hígado, bazo y huesos. Las concentraciones detectadas en los tejidos y el tiempo de permanencia en ellos depende del tipo de compuesto (Galvao y Corey 1987).

IV. EFECTOS FISIOLÓGICOS

Se ha descrito al cromo como elemento esencial para los organismos, incluyendo a los mamíferos (Schroeder 1968, Toepfer et al. 1977, Galvao y Corey 1987) ya que en ratas se ha notado que cuando la cantidad disponible es menor de 0.1 ppm se produce

dilatación de los vasos, neovascularización y opacidad en la córnea (Roginski y Mertz 1967a, b). Por otro lado, la deficiencia de este elemento en su dieta les provoca un síndrome parecido a la diabetes debido a la inhibición del metabolismo de la glucosa (Mertz et al. 1965, Mertz 1969, Sullivan 1969) y cuando ocurren deficiencias mayores se presenta retraso en el crecimiento (Roginski y Mertz 1967b), disminución de las reservas de glucógeno, aumento en la frecuencia de lesiones aórticas y alteración del uso de los aminoácidos en la síntesis de proteínas (Mertz 1969) y a concentraciones elevadas puede ser tóxico para el hígado y el riñón de animales experimentales (Tsapakos et al. 1983).

Los efectos causados por el cromo y sus compuestos en los organismos dependen como se menciona anteriormente, del estado químico en el que se encuentra (Sullivan 1969). Se ha observado que dentro de la célula la forma hexavalente es reducida a trivalente estando los sitios de conversión en la membrana plasmática, el retículo endoplásmico, la mitocondria y el núcleo celular (Gruber y Jennette 1978, Löfroth 1978, Connett y Wetterhahn 1983). La acción del Cr VI sobre los organismos, puede estar relacionada con estos procesos de reducción y con la subsecuente unión del Cr III, considerado como el agente activo, con un número de ligandos dentro de la célula (Wacker y Vallee 1959), así como a su alta solubilidad y difusión en condiciones fisiológicas eucarióticas y a sus propiedades oxidantes (Grogan y

Oppenheimer 1955).

Grogan (1958) observa la penetración del cromo en el núcleo celular de los eritrocitos de gallinas y aunque normalmente se encuentran ciertas concentraciones de este elemento en los ácidos nucleicos, su función es desconocida. Se ha demostrado *in vitro* que este metal presenta un efecto estabilizador en el RNA (Fuwa et al. 1960). Sin embargo, los cromatos y los dicromatos provocan la disminución de las cantidades de DNA, RNA y ácido ascórbico que se extraen regularmente de tejidos no tratados, pues al reducirse intracelularmente el Cr VI a Cr III, éste interacciona con la estructura terciaria del DNA incrementando su estabilidad y modificando sus propiedades fisico-químicas (Huff et al. 1964). Por otro lado, se forman complejos de cromo trivalente con dichos ácidos nucleicos o con nucleoproteínas (Heerman y Speck 1954, Tsapakos y Wetterhahn 1983, Wedrychowski et al. 1985).

Se ha descrito tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* que en la sangre de los mamíferos, el Cr III se une a las proteínas del plasma mientras que el cromo VI es absorbido por los glóbulos rojos (Hopkins y Schwarz 1964). En ratas tratadas con Cr VI se reduce el porcentaje de hemoglobina y de corpúsculos rojos de la sangre, mientras que los niveles de triglicéridos, fosfolípidos, colesterol y glucosa en el suero se elevan significativamente (Kumar y Barthwal 1991).

Uno de los efectos fisiológicos que aparece en las plantas por el aumento en el contenido de Cr es la clorosis o amarillamiento de las hojas, así como severa acción en el metabolismo de carbohidratos y de nitrógeno y en la actividad de ciertas metaloenzimas de las células (Satyakala y Jamil 1992).

Además del cáncer pulmonar, el Cr VI puede provocar en el aparato respiratorio úlceras nasales, perforación del tabique nasal, asma bronquial, bronquitis y catarro crónicos (Royle 1975a, b). Sin embargo, el Cr III no produce cáncer, aunque a elevadas concentraciones en sistemas *in vitro* se presentan mutaciones y transformaciones celulares (Norseth 1981).

El cromo por vía digestiva es poco asimilado ya que el pH de los jugos gástricos inhibe su absorción (Donaldson y Barreras 1966).

En ratas, el cromo se acumula en riñón, corazón, pulmón, hígado, bazo, intestino, cerebro, músculo, piel, pelo y huesos (Visek et al. 1953, Smith 1970).

El cromo, en sus formas trivalente y hexavalente, puede causar trastornos en el sistema nervioso periférico (Melgaard et al. 1976).

Se ha observado que el Cr en la piel causa dermatitis (Denton et al. 1954, Royle 1975b) y úlceras (Royle 1975b, Samitz et al. 1962), éstas pueden llegar a ser crónicas con bordes gruesos que tienden a corroer hacia los tendones pudiendo llegar hasta el hueso (Sullivan 1969). También puede causar eritematosis positiva, edematosis y manchas papulovesiculares (Denton et al. 1954).

V. EFECTOS MUTAGENICOS

Los seres vivos, al estar expuestos a compuestos que les son tóxicos sufren alteraciones de diversos tipos entre las cuales las genéticas tienen una dimensión considerable, ya que pueden repercutir en su descendencia.

Las pruebas de mutagenicidad directas en el hombre han sido enfocadas en casos específicos cuando de manera individual o un cierto grupo de la población han sido expuestos a la influencia de mutágenos ya sea en forma ocupacional o por razones accidentales (Gebhart 1984).

Se ha descrito que sales de dicromato de potasio, cromato de calcio y trióxido de cromo, producen aberraciones cromosómicas de los tipos subcromatídico, cromatídico y cromosómico, así como efectos sobre la región centromérica que provocan cromosomas con el centrómero inactivado e isocromosomas, anafases multipolares y micronúcleos en las células meristemáticas de la raíz de *Vicia*

faba (Rendón 1982, Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini 1983, Gómez-Arroyo et al. 1987). Asimismo, cromato de calcio, trióxido de cromo y dicromato de potasio inducen intercambios de cromátidas hermanas en linfocitos humanos en cultivo (Gómez-Arroyo et al. 1981).

En estudios de aberraciones cromosómicas en la meiosis, se ha observado que uno de los periodos más sensibles a los mutágenos es la profase I que se expresan en etapas posteriores como micronúcleos (Sparrow 1951, Ma et al. 1978, Ma 1979, 1981) que se forman cuando se provocan rompimientos en los cromosomas (fragmentos acéntricos) o por cromosomas con el centrómero inactivado, que al ser excluidos del núcleo al final de la división se pueden observar como pequeños núcleos en las etapas de diada y tétrada del mismo ciclo meiótico (Ma 1979). Este tipo de daño genético se ha inducido con el dicromato de potasio en *Tradescantia* (Cisneros 1986, Villalobos-Pietrini et al. 1986).

Los compuestos de cromo VI (principalmente las sales) causan cáncer en humanos y en animales de laboratorio (Hueper y Payne 1962, Roe y Carter 1969, Nettesheim et al. 1971) y ejercen daño genético en bacterias y en células de mamíferos *in vitro* (Tamino et al. 1981, De Flora et al. 1985a). Pueden jugar además un papel importante en la producción de cáncer pulmonar, ya que se ha establecido una relación de este padecimiento con el de cromo hexavalente como son los cromatos, los dicromatos y el ácido

crómico (Hueper y Payne 1962, Tsuchiya 1965, Royle 1975a, b). Se ha observado que el riesgo de cáncer de pulmón es mayor en fumadores que en no fumadores, (Tsuchiya 1965, Royle 1975a, b) y aumenta si en los componentes del aire existen factores contaminantes ambientales como el cromo y otros metales pesados (Natusch et al. 1974) y compuestos orgánicos (De Flora et al. 1987). Por otra parte, entre los fumadores se ha descrito el desarrollo de cáncer en el sistema gastrointestinal y en los genitales (Royle 1975a).

Debido al efecto tóxico que causa el cromo tanto en vegetales como en animales, incluido el hombre, y a las evidencias sobre la mutagenicidad que induce en los organismos, el presente trabajo tiene por objeto conocer las relaciones existentes entre el cromo aplicado y el acumulado en distintas estructuras de *Tradescantia* clon 4430 y en *Vicia faba* variedad mayor, sometidas a diferentes concentraciones y tiempos de exposición de dicromato de potasio, así como establecer la correlación entre las concentraciones y el daño genético que producen.

MATERIAL Y METODOS

Para la realización de este estudio se utilizó dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) cuyos datos son los siguientes:

a. Reactivo estándar primario	
b. pH de la solución al 5 ‰ a 25 °C	3.5
c. Pérdida por secado a 105 °C	0.0049 ‰
d. Impurezas	
- Materia Insoluble en NH_4OH	0.0040 ‰
- Cloruros (Cl)	0.0010 ‰
- Sulfatos (SO_4)	0.0025 ‰
- Calcio (Ca)	0.0010 ‰
- Sodio (Na)	0.0100 ‰

Los materiales biológicos elegidos para este trabajo fueron las raíces principales de plántulas de *Vicia faba* variedad mayor y los cortes de *Tradescantia* clon 4430, ya que estas plantas presentan características óptimas para este tipo de trabajo, las cuales se describen a continuación.

Vicia faba es una dicotiledónea que pertenece a la familia de las leguminosas. Es una planta anual, erecta, robusta, de un metro de altura o más, densamente foliada. Su tallo es angular, las hojas, ovales o elípticas dispuestas en pares de uno a tres con una hoja terminal que puede estar representada por un rudimentario

zarcillo obtuso, micronado, usualmente ennegrecido cuando se seca. Las flores son axiales, sésiles, blanquecinas con una larga mancha azul-negra. La vaina es larga y gruesa de 5 a 8 cm o más. Las semillas son largas comprimidas, muy duras y con un hilum muy largo (Standley y Steyermark 1946).

Esta planta es utilizada para estudios citogenéticos, ya que presenta entre otras características, cromosomas de gran tamaño y en cantidad reducida ($2n = 12$), lo que permite que sean fácilmente observables. El cariotipo normal de *Vicia faba* está formado por un par de cromosomas metacéntricos, los cuales tienen en uno de los brazos una constricción secundaria en la región del organizador nucleolar y cinco pares de cromosomas subacrocentricos de menor tamaño que el primero y que muestran muy pocas diferencias entre ellos. El promedio del ciclo celular es de 19.3 h a 19°C, siendo de 4.9, 7.5 y 4.9 h para los períodos G₁, S y G₂, respectivamente, y la mitosis de 2 h (Evans y Scoott 1964).

Con el objeto de realizar los experimentos con las raíces de *Vicia faba*, las semillas se lavaron en agua corriente durante 2 h, posteriormente se dejaron remojando en agua durante 24 h con el fin de acelerar su germinación. Transcurrido este tiempo se lavaron nuevamente en agua corriente y se colocaron entre dos capas de algodón humedecido, todo esto en la obscuridad y a temperatura ambiente.

Una vez que aparecieron las radículas, la testa fue removida con el fin de evitar la contaminación por hongos. Las raíces se dejaron crecer hasta que alcanzaron una longitud de 3 a 4 cm, antes de aplicar los tratamientos.

Tradescantia es una monocotiledónea que pertenece a la familia Commelinaceae. Es una planta herbácea de tallo delgado y hojas angostas que alcanza de 60 a 70 cm de altura. Las inflorescencias son terminales, poseen de 10 a 20 yemas florales, tienen flores completas formadas por 3 sépalos y 3 pétalos azules dispuestos alternadamente, 6 estambres (3 antisépalos y 3 antipétalos) con anteras elipsoidales y un pistilo (Underbrink et al. 1973).

Por su fácil manejo y gran sensibilidad a *Tradescantia* se le emplea para investigaciones sobre los efectos de contaminantes atmosféricos y de mutágenos físicos y químicos (Ma et al. 1971, 1978, Ma 1979, 1981, Underbrink et al. 1973, Villalobos-Pietrini et al. 1986, 1990).

Se han producido varios clones de *Tradescantia* de los cuales, los más utilizados son el 02, 03, 4430 y 4458. Por su elevada sensibilidad, el 4430 se ha empleado extensamente en trabajos realizados con mutágenos químicos (Van't Hof y Schairer 1982).

Las ventajas de esta planta para este tipo de estudios, en que posee un bajo número cromosómico diploide ($2n = 12$), se puede propagar fácilmente por reproducción asexual y mantener en condiciones de invernadero floreciendo por períodos de tiempo prolongados, las células madres del polen de cada una de las yemas de la inflorescencia están sincronizadas en diferentes estados meióticos, facilitando así su tratamiento (Ma 1979). La duración de la microsporogénesis de *T. paludosa* es de 15 días (Sax y Edmonds 1933) y para *T. reflexa* de 17 días (Taylor 1950).

En este estudio se utilizó el clon 4430 de *Tradescantia*, cuyas plantas crecieron en un invernadero en macetas de plástico con tierra negra y de hoja.

Se seleccionaron aquellas que tenían inflorescencias jóvenes, asegurando de esa manera que las células gaméticas masculinas de las yemas más pequeñas estuvieran en la etapa de profase I de la meiosis del ciclo microsporogénico (Sax y Edmonds 1933, Taylor 1950), en donde se ha notado el incremento de la sensibilidad de los cromosomas a los mutágenos (Sparrow 1951, Ma et al. 1978, Ma 1979, 1981).

Para el análisis en *Vicia faba* se formaron lotes de 10 ejemplares y se emplearon concentraciones de 500, 1000, 2500, 5000 y 7500 ppm de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), durante 1, 2, 3 y 4 horas de tratamiento (Fig. 1).

En el caso de *Tradescantia*, se hicieron cortes de 6 cm de longitud de la punta de la inflorescencia hacia abajo y con ellos se formaron lotes de 30; que se expusieron a concentraciones de 1000, 2000, 4000, 6000 y 10000 ppm de $K_2Cr_2O_7$ durante 6 horas y 30 de recuperación (Fig. 2).

En ambos casos los lotes testigos se mantuvieron en las mismas condiciones que los tratados, pero se evitó la exposición al compuesto; se introdujeron en agua destilada durante los mismos tiempos de exposición elegidos para cada ensayo, los cuales se seleccionaron a partir de los trabajos realizados con anterioridad por Rendón (1982) y Cisneros (1986).

Las soluciones de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) fueron colocadas en vasos de precipitados para *Tradescantia* y en cristalizadores cubiertos en la parte superior con papel aluminio con perforaciones por donde se introdujeron las raíces de *Vicia faba* y los cortes de la primera, para mantenerlas en contacto con las soluciones.

Una vez terminados los períodos de inmersión, las muestras de *Tradescantia* se lavaron con agua corriente para eliminar el cromo adherido a la superficie de la planta; los ejemplares ya lavados se pusieron en agua de la llave y con aireación constante para permitir las recuperaciones establecidas.

Al finalizar los tratamientos, las muestras fueron lavadas con agua y ácido nítrico al 5 % para eliminar el cromo adherido en la superficie y se dividieron en raíces para *Vicia faba* y en tallos, hojas e inflorescencias para los cortes de *Tradescantia* y se pusieron a secar en la estufa a 80 °C para obtener su peso seco.

Las muestras fueron maceradas hasta su completa pulverización, dejándolas digerir a 500°C durante toda la noche y las cenizas se resuspendieron en 25 ml de ácido clorhídrico al 4 % para ser analizadas por espectrofotometría de absorción atómica.

Todo el material de laboratorio empleado fue lavado cuidadosamente, sometiéndolo a una solución de ácido nítrico al 10 %.

RESULTADOS

Los resultados del análisis de la acumulación de cromo en las raíces de *Vicia faba* mostrados en la tabla I se sometieron a un análisis de varianza multifactorial en donde al no haber diferencias significativas entre las réplicas, se considera que hubo reproducibilidad de los datos obtenidos, mientras que entre los tratamientos aplicados a diversas concentraciones y entre los llevados a cabo a distintos tiempos de exposición, el estadístico de prueba da evidencias de comportamiento diferencial ($p < 0.001$) (Tabla II), indicando que existe una relación de interdependencia de las variables involucradas.

En las figuras 3 y 4 se observa que en general existe una tendencia de aumento en los niveles de cromo acumulado en las raíces de *Vicia faba* conforme se incrementan tanto las concentraciones aplicadas de 500 a 7500 ppm de dicromato de potasio como los tiempos de exposición de 1 a 4 horas.

Por otro lado, en las figuras 5, 6, 7 y 8 se nota que el daño genético causado por el cromo en las raíces de *Vicia faba* evaluado como aberraciones totales y anafases anormales está correlacionado de forma positiva con la concentración a la cual se expusieron (Tabla III), excepto en el caso de 4 horas (Fig. 8) en la que únicamente las anafases anormales en lugar de aumentar se mantienen asintóticas con el cromo acumulado.

Las figuras 9, 10, 11 y 12 muestran una correlación indirecta entre el cromo acumulado y la cantidad de anafases totales (Tabla III), notándose que a mayor exposición y acumulación de cromo se baja la cantidad de anafases. En todos los tiempos de exposición, cuando se absorben cantidades elevadas de cromo se presenta daño citotóxico de tal magnitud que ya no ocurren divisiones mitóticas.

Con respecto a la absorción de cromo registrada en diferentes estructuras de *Tradescantia* los resultados obtenidos aparecen en la tabla IV. El análisis de varianza multifactorial con el que fueron evaluados los datos de las repeticiones no muestran diferencias significativas, lo que permitió concluir que hubo reproducibilidad del ensayo, mientras que entre las distintas concentraciones utilizadas y tiempos de exposición y de cromo absorbido por los diversos tejidos de este vegetal sí se manifiesta comportamiento diferencial a nivel de $p < 0.001$ (Tabla V).

La figura 13 muestra clara relación del aumento en los niveles de cromo acumulado conforme se incrementan las concentraciones de exposición en las estructuras analizadas que sigue este orden decreciente: el tallo es el que absorbe mayor cantidad de cromo, después las hojas y en las inflorescencias se encuentra la menor proporción. Sin embargo, al relacionar el cromo acumulado en las inflorescencias con el daño citogenético evaluado

mediante el análisis de micronúcleos en tétradas no se observa dicha relación (Fig. 14), debido a que todos los niveles de cromo aplicados y acumulados causan el mismo daño a la planta y como se evidencia en la tabla IV y en la figura 13, los valores de absorción se elevan conforme se incrementa la concentración; el análisis estadístico, empleando la prueba de diferencia de proporciones, indica que en todos los casos las frecuencias de micronúcleos son significativamente diferentes a las del testigo ($p < 0.001$), ya que en todos los casos se duplica su frecuencia (Cisneros 1986).

Durante el experimento se observa que el cromo causa daño fisiológico a los cortes de *Tradescantia*, el cual se manifiesta como marchitamiento a concentraciones mayores de 6000 ppm, el cual se expresa con mayor intensidad conforme pasa el tiempo (30 horas de recuperación).

DISCUSION

La acumulación de cromo, tanto en *Vicia faba* como en *Tradescantia*, se incrementó de forma lineal conforme se elevaron las concentraciones y los tiempos de exposición, notándose que el transporte de cromo en las estructuras vegetales analizadas sigue la cinética de Michaelis-Menten, como lo describen Skeffington et al. (1976) en las raíces de cebada, que lo incorporan sin alcanzar la saturación.

En este trabajo se pone de manifiesto que fue bajo el ingreso de cromo en las raíces de *V. faba*, con respecto a los niveles de exposición, lo que contrasta con el estudio de incorporación y acumulación durante la floración de frijol y trigo de Huffman y Allaway (1973), en el cual más del 90 % se absorbió por las raíces.

La incorporación de cromo en los tejidos de las plantas estudiadas es congruente con la alta solubilidad y las propiedades oxidantes que los compuestos de cromo VI presentan bajo condiciones fisiológicas eucarióticas (Grogan 1955). La mayoría de los compuestos de cromo VI probados en diferentes sistemas experimentales han dado respuestas positivas con relación al daño genético. Sin embargo, en ensayos libres de células (ácidos nucleicos) o en blancos subcelulares, tienen efecto menor y presentan distintos mecanismos de acción comparados con los

compuestos de cromo III, los cuales son capaces de producir efectos genéticos cuando son aplicados directamente a los ácidos nucleicos o a blancos subcelulares (núcleo celular) y generalmente pierden su capacidad genotóxica al ser usados en sistemas celulares (De Flora et al. 1990). El cromo VI puede atravesar la membrana plasmática y dentro de la célula se reduce a cromo III que se une a macromoléculas (Norseth 1981). Este último no tiene esta propiedad ya que es incapaz de pasar la membrana celular.

Sin embargo el Cr VI, que fue el utilizado en este estudio, aparentemente no reacciona con el ADN *in vitro* bajo condiciones fisiológicas (Aiyar et al. 1989). Componentes intracelulares como la DT-diaforasa (De Flora et al. 1985b, 1988), glutatión y H_2O_2 pueden reducirlo a Cr (III) y en el proceso se detectan niveles significativos de Cr (V) (Kawanishi et al. 1986, Arslan et al. 1987, Aiyar et al. 1989, Sugiyama et al. 1989a, b). Este fenómeno requiere de la presencia de enzimas reductasas y de sustratos donadores de electrones de la mitocondria (Rossi y Wetterhahn 1989). Una vez reducido el Cr VI puede expresar su potencialidad mutagénica, ya que se ha descrito que al ser incorporado por fagocitosis en forma de Cr III, se presenta actividad genotóxica en la línea celular de macrófagos P388D₁ (Andersen 1983).

Hay muchos sitios posibles para que se lleve a cabo la reducción del cromato en la célula. Estudios con moléculas pequeñas sugieren que sólo las que contienen al ascorbato (Chiou

1984, Korallus et al. 1984) o al radical tiol son eficientes en la reducción del cromato bajo condiciones fisiológicas (Connet y Wetterhahn 1985). En los eritrocitos, la hemoglobina y la reductasa del glutati6n reaccionan con el cromato reduciéndolo. En los microsomas, dos enzimas del sistema de transporte de electrones, la reductasa del citocromo NADPH P450 y la del citocromo P450 metabolizan al cromato; aunque enzimas no identificadas en las mitocondrias también son capaces de hacerlo, así como aquellas conocidas como reductasas del cromato de las cuales 2 son hemoproteínas involucradas en el metabolismo del oxígeno y 2 flavoproteínas NADPH dependientes. El metabolismo selectivo de este carcin6geno por constituyentes celulares puede permitir daño específico por metabolitos del cromo y alteraci6n de las funciones celulares normales (Connet y Wetterhahn 1983).

En *Vicia faba* las muestras celulares utilizadas para analizar el daño genético, fueron tomadas de las raíces, las cuales al estar en contacto directo con la soluci6n y debido a la gran disponibilidad y a las características del cromo hexavalente antes mencionadas, pueden explicar la elevada correlaci6n entre las concentraciones aplicadas y el daño genético registrado. No obstante con *Tradescantia* la baja asociaci6n hallada entre las concentraciones y el efecto citogenético puede ser debida a transformaciones sufridas por el compuesto durante su recorrido desde el tallo hasta las inflorescencias.

Se han estudiado los cambios presentados en el interior de los tejidos y a nivel celular en cuanto a la reducción del cromo en animales *in vivo* e *in vitro*, describiéndose que la activación microsómica juega un papel importante en la mutagénesis y en la carcinogénesis provocadas por este metal, ya que en condiciones anaeróbicas se reduce de manera muy lenta a cromo trivalente (Alexander et al. 1986) y da como resultado la pérdida en la mutagenicidad (De Flora et al. 1980) debido a que parece estar involucrada una conversión enzimática en el proceso de desactivación (Petrilli y De Flora 1978), sin pasar por alto que dicha fracción inactiva pero no totalmente, dando lugar a cierto efecto genotóxico del Cr (VI) (Tsapakos y Watterhahn 1983). Los procesos anteriores podrían estar incluidos en el metabolismo de los vegetales, ya que su fracción microsómica es capaz de activar o desactivar agentes mutagénicos (Calderón 1993) y que de alguna forma participan diferencialmente en los sistemas de prueba de daño genotóxico empleados en este trabajo.

En las concentraciones de exposición que se utilizaron en esta investigación, se ha observado que dependiendo del pH puede o no haber interacción del cromo con proteínas (Grogan y Oppenheimer 1955) y en exposiciones bajas de cromo en la Tilapia (pez de agua dulce) se ha observado que la actividad enzimática puede ser alterada (Sivalingam 1989), no obstante en enzimas eritrocitarias como la acetilcolinesterasa no tiene efecto (Koutras et al. 1964). Sin embargo, el Cr es esencial en el establecimiento del factor de

tolerancia a la glucosa (Toepfer et al. 1977), por lo que el papel del glutatión es muy importante en la reducción del cromo hexavalente, que una vez reducido resulta ser tóxico (Aaseth et al. 1982, Cupo y Wetterhahn 1985b, Kitagawa et al. 1982, Koutras et al. 1964). Algunos quelantes como EDTA, salicilato y tirón disminuyen o eliminan la mutagenicidad del anión cromato (Gentile et al. 1981), así como también la vitamina E (Sugiyama et al. 1987, 1989b) y la N-acetilcisteína (De Flora et al. 1985a) que ejercen efectos protectores contra la mutagenicidad, no así la vitamina B₂ y el Na₂SeO₃ que la incrementan por la formación de radicales libres e intervienen en el metabolismo reductor celular (Sugiyama et al. 1987, 1989a).

Se ha probado que el cromato compite en la difusión a través de la membrana con los aniones sulfato y fosfato cuyo transporte facilitado se lleva a cabo por canales iónicos o acarreadores iónicos de éstos últimos (Campbell et al. 1981, Alexander et al. 1982); sin embargo, en eritrocitos, el traslado aniónico del ión cromato es difásico, es decir, hay estímulo en la incorporación de 0.001 a 0.01 mM y luego inhibición de 0.5 a 1.0 mM (Buttner y Beyersmann 1985), posiblemente en *Tradescantia* ocurra un fenómeno similar, ya que con las concentraciones aplicadas, no se observaron diferencias en el daño citogenético y probablemente a valores menores de Cr que los aquí empleados, se podría obtener una relación acumulación-exposición-respuesta, ya que en experimentos con ratas Wistar se ha descrito mayor efecto tóxico

en macrófagos alveolares a exposiciones bajas (Glaser et al. 1985).

En cuanto a los efectos en células del sistema radicular de vegetales se ha encontrado toxicidad por cromatos a 10.8 ppm en *Myriophyllum spicatum* L. (Stanley 1974), niveles mucho más bajos que los empleados en este trabajo; sin embargo, no se conoce el potencial de retención en la membrana que en el caso de los fibroblastos sucede en un 50 % a las 48 horas (Levis y Majone 1981).

Por otra parte, en un estudio con ratas tratadas con dicromato de sodio (140 μM Cr/Kg) y cloruro de cromo (290 μM Cr/Kg), se determinaron cantidades significativas del metal unidas al ADN, a proteínas del tipo no histonas de la cromatina y al ARN citoplásmico, siendo el nivel de cromo unido a la cromatina, mayor en el hígado que en el riñón, resultando más eficiente en la entrada de Cr (VI) en el primero; sin embargo, después de la inyección a las 40 horas no hubo diferencia entre estos órganos y la especie de cromo, pero en este tiempo se encontró daño en el ADN del riñón (Cupo y Wetterhahn 1985a).

En células de hígado de mamífero expuestas a K_2CrO_4 se mostró la formación de complejos de cromo a concentraciones de 200 μM ó mayores y el máximo de entrecruzamiento en el ADN se dió a 5 mM, comprobándose la unión del cromo III con proteínas nucleares

(Wedrychowski et al. 1985), el metal forma enlaces con el nitrógeno, el oxígeno o el azufre de las proteínas (Miller y Costa 1989).

Se ha descrito que en la línea celular de fibroblastos de criceto (BHK), el Cr (III) interactúa con las bases de los ácidos nucleicos, principalmente con guanina y citosina y también con los grupos fosfato, permitiendo la desprotonación de bases, efectos intramoleculares, formación de complejos y quelación entre bases y fosfatos, desestabilizando con esto la estructura del ADN. Por el contrario el ARN se estabiliza debido a los enlaces metálicos en las regiones ricas en G-C. Por otro lado, el Cr (VI) en ADN purificado produce rompimientos en la cadena polinucleotídica debido a su fuerte poder oxidante. En células intactas, los cambios en las propiedades del ADN pueden deberse más bien al Cr (III) resultado de la reducción intracelular y a la actividad oxidante residual del Cr (VI) (Levis et al. 1978, Tamino et al. 1981), afectando la función de la polimerasa durante la replicación y la reparación del ADN con consecuencias mutagénicas y carcinogénicas (Fornace et al. 1981).

En células L de ratón, 10 μM de Cr (VI) inhibe irreversiblemente la síntesis de ADN, en tanto que el Cr (III) 3.3 mM no tiene ese efecto; sin embargo, a 0.3 mM ambas formas del Cr reducen la síntesis de ADN, aunque más intensamente con el (III) que el (VI) en el sistema de la ADN polimerasa I de *Escherichia*

coli (Nishio y Uyeki 1985).

CONCLUSIONES

Se presentó una elevada correlación entre la cantidad de cromo de exposición y la de acumulación en los diversos tejidos vegetales. La concentración de cromo acumulado en *Vicia faba* se incrementa conforme aumenta el tiempo y la concentración de exposición.

Se encontró relación de daño citogenético con la cantidad de cromo acumulado en las raíces de *Vicia faba* con respecto al total de aberraciones cromosómicas totales.

Probablemente se produjo toxicidad ya que disminuyó la cantidad de anafases con la mayor incorporación de cromo en las raíces de *Vicia faba*.

En *Tradescantia* clon 4430, sus órganos incorporaron cromo de mayor a menor medida en el siguiente orden: tallo > hojas > inflorescencias.

El tallo, las hojas y las inflorescencias fueron acumulando el cromo conforme aumentaban los niveles de exposición, pero no sucedió lo mismo con los daños genéticos analizados en las

inflorescencias de *Tradescantia*, en donde desde la primera concentración aplicada hasta la última se presentó daño similar, por lo que se sugiere realizar más adelante tratamientos con valores de cromo menores a los empleados en este estudio.

Los resultados de exposición directa de cromo concuerdan con los descritos por otros autores en los que evaluaron, a nivel de micro y nanomoles, los efectos de mutagenicidad y las alteraciones fisiológicas.

REFERENCIAS

Aaseth J., Alexander J. y Norseth T. (1982). Uptake of ^{51}Cr -chromate by human erythrocytes—a role of glutathione. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 50, 310-315.

Aiyar J., Borges K.M., Floyd R.A. y Wetterhahn K.E. (1989). Role of chromium (V), glutathione thiol radical and hydroxyl radical intermediates in chromium (VI)-induced DNA damage. *Toxicol. Environ. Chem.* 22, 135-148.

Alexander J., Aaseth J. y Norseth T. (1982). Uptake of chromium by rat liver mitochondria. *Toxicology* 24, 115-122.

Alexander J., Mikalsen A. y Ryberg D. (1986). Microsomal reduction of Cr VI. *Acta Pharmacol. Toxicol. Sup. VII* 59, 267-269.

Andersen O. (1983). Effects of coal combustion products and metal compounds on sister chromatid exchange (SCE) in a macrophagelike cell line. *Environ. Health Perspect.* 47, 239-253.

Arslan P., Beltrame M. y Tomasi A. (1987). Intracellular chromium reduction. *Biochim. Biophys. Acta* 931, 10-15.

Buttner B. y Beyersmann D. (1985). Modification of the erythrocyte anion carrier by chromate. *Xenobiotica* 15, 735-741.

Calderón S.M.E. (1993). Intercambio de cromátidas hermanas inducido por propoxur en cultivo de linfocitos humanos previa activación metabólica por *Vicia faba*. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, 88 p.

Campbell C.E., Gravel R.A. y Worton R.G. (1981). Isolation and characterization of chinese hamster cell mutants resistant to the cytotoxic effects of chromate. *Somat. Cell Genet.* 7, 535-546.

Chen N.S.C., Tsai A. y Dyer I.A. (1973). Effect of chelating agents on Chromium absorption in rats. *J. Nutr.* 103, 1182-1186.

Chiou S.H. (1984). DNA-scission activities of ascorbate in the presence of metal chelates. *J. Biochem.* 96, 1307-1310.

Choppin G.R. (1979). Química. Publicaciones Cultural. México, 595 pp.

Cisneros A.G. (1986). Inducción de micronúcleos (MCNs) en tétradas de *Tradescantia* por el dicromato de potasio. Tesis de licenciatura, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza, UNAM, México, 49 p.

Connett P.H. y Wetterhahn K.E. (1983). Metabolism of the carcinogen chromate by cellular constituents. Structure and Bonding 54, 93-124.

Connett P.H. y Wetterhahn K.E. (1985). *In vitro* reaction of the carcinogen chromate with cellular thiols and carboxylic acids. J. Am. Chem. Soc. 107, 4282-4288.

Cooley T.N. y Martin D.F. (1977). Factors affecting the distribution of trace elements in aquatic plants. J. Inorg. Nucl. Chem. 39, 1893-1896.

Cupo D.Y. y Wetterhahn K.E. (1985a). Binding of chromium to chromatin and DNA from liver and kidney of rats treated with sodium dichromate and chromium (III) chloride *in vivo*. Cancer Res. 45, 1146-1151.

Cupo D.Y. y Wetterhahn K.E. (1985b). Modification of chromium (VI)-induced DNA damage by glutathione and cytochromes P-450 in chicken embryo hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82, 6755-6759.

De Flora S., Coppola R., Camoirano A., Battaglia M.A. y Bennicelli C. (1980). Mutagenicity and toxicity of chromyl chloride and its vapours. Carcinogenesis 1, 583-587.

De Flora S., Bennicelli C., Camoirano A., Serra D., Romano M., Rossi G.A., Morelli A. y De Flora A. (1985a). *In vivo* effects of N-acetylcysteine on glutathione metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and/or mutagenic compounds. *Carcinogenesis* 6, 1735-1745.

De Flora S., Morelli A., Basso C., Romano M., Serra D. y De Flora A. (1985b). Prominent role of DT-diaphorase as a cellular mechanism reducing chromium (VI) and reverting its mutagenicity. *Cancer Res.* 45, 3188-3196.

De Flora S., Petruzzelli S., Camoirano A., Bennicelli C., Romano M., Rindi M., Ghelarducci L. y Giuntini C. (1987). Pulmonary metabolism of mutagens and its relationship with lung cancer and smoking habits. *Cancer Res.* 47, 4740.

De Flora S., Bennicelli C., Camoirano A., Serra D. y Hochstein P. (1988). Influence of DT diaphorase on the mutagenicity of organic and inorganic compounds. *Carcinogenesis* 9, 611-617.

De Flora S., Bagnasco M., Serra D. y Znacchi P. (1990). Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutat. Res.* 238, 99-172.

Denton C.R., Keenan R.G. y Birmingham D.J. (1954). The chromium content of cement and its significance in cement dermatitis. *J.*

Invest. Dermatol. 23, 189-192.

Donaldson R.M. y Barreras R.F. (1966). Intestinal absorption of trace quantities of chromium. J. Lab. Clin. Med. 68, 484-493.

Evans H.J. y Scott D. (1964). Influence of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by X rays and maleic hydrazide in *Vicia faba*. Genetics 49, 17-38.

Fornace A.J.J., Seres D.S., Lechner J.F. y Harris C.C. (1981). DNA-protein cross-linking by chromium salts. Chem.-Biol. Inter. 36, 345-354.

Fuwa K., Wacker W.E.C., Druyan R., Bartholomay A.F. y Vallee B.L. (1960). Nucleic acids and metals, II: Transition metals as determinants of the conformation of ribonucleic acids. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 46, 1298-1307.

Galvao L.A.C. y Corey G. (1987). Cromo. Serie Vigilancia 5. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. OPS, OMS, México, 66 p.

Gebhart E. (1984). Chromosome damage in individuals exposed to heavy metals. Toxicol. Environ. Chem. 8, 253-266.

Gendusa T.C. y Beitinger T.L. (1992). External biomarkers to assess chromium toxicity in adult *Lepomis macrochirus*. Bull.

Environ. Contam. Toxicol. 48, 237-242.

Gentile J.M., Hyde K. y Schubert J. (1981). Chromium genotoxicity as influenced by complexation and rate effects. Toxicol. Lett. 7, 439-448.

Glaser U., Hochrainer D., Klöppel H. y Kuhnen H. (1985). Low level chromium (VI) inhalation effects on alveolar macrophages and immune functions in Wistar rats. Arch. Toxicol. 57, 250-256.

Gómez-Arroyo S., Altamirano M. y Villalobos-Pietrini R. (1981). Sister-chromatid exchanges induced by some chromium compounds in human lymphocytes *in vitro*. Mutat. Res. 90, 425-431.

Gómez-Arroyo S. y Villalobos-Pietrini R. (1983). Chromosomal alterations induced by some chromium salts. Cytologia 48, 185-193.

Gómez-Arroyo S., Villagómez M.L. y Villalobos-Pietrini R. (1987). Effects induced by chromium trioxide on root tip chromosomes of *Vicia faba*. Contam. Ambient. 3, 55-61.

Grogan C.H. y Oppenheimer H. (1955). Experimental studies in metal cancerigenesis. V. Interaction of Cr^{III} and Cr^{VI} compounds with proteins. Arch. Biochem. Biophys. 56, 204-221.

Grogan C.H. (1958). Experimental studies in metal cancerigenesis. XI. On the penetration of chromium into the cell nucleus. *Cancer* 11, 1195-1203.

Gruber J.E. y Jennette K.W. (1978). Metabolism of the carcinogen chromate by rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82, 700-706.

Heerman H. y Speck L.B. (1954). Interaction of chromate with nucleic acids in tissues. *Science* 119, 221.

Hopkins L.L. y Schwarz K. (1964). Chromium (III) binding to serum proteins, specifically siderophilin. *Biochim. Biophys. Acta* 90, 484-491.

Hueper W.C. y Payne W.W. (1962). Experimental studies in metal carcinogenesis. Chromium, nickel, iron, arsenic. *Arch. Environ. Health* 5, 445-462.

Huff J.W., Sastry K.S., Gordon M.P. y Wacker W.E.C. (1964). The action of metal ions on tobacco mosaic virus ribonucleic acid. *Biochemistry* 3, 501-506.

Huffman E.W.D. y Allaway W.H. (1973). Chromium in plants: distribution in tissues, organelles, and extracts and availability of bean leaf Cr to animals. *J. Agr. Food Chem.* 21, 982-986.

Kawanishi S., Inoue S. y Sano S. (1986). Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate (VI) in the presence of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 261, 5952-5958.

Kitagawa S., Seki H., Kametani F. y Sakurai H. (1982). Uptake of hexavalent chromium by bovine erythrocytes and its interaction with cytoplasmic components; the role of glutathione. *Chem.-Biol. Inter.* 40, 265-274.

Korallus U., Harzdorf C. y Lewalter J. (1984). Experimental bases for ascorbic acid therapy of poisoning by hexavalent chromium compounds. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 53, 247-256.

Koutras G.A., Hattori M., Schneider A.S., Ebaugh Jr. F.G. y Valentine W.N. (1964). Studies on chromated erythrocytes. Effect of sodium chromate on erythrocyte glutathione reductase. *J. Clin. Invest.* 43, 323-331.

Kumar A. y Barthwal R. (1991). Hexavalent chromium effects on hematological indices in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 761-768.

Levis A.G., Buttignol M., Bianchi V. y Sponza G. (1978). Effects of potassium dichromate on nucleic acid and protein syntheses and on precursor uptake in BHK fibroblasts. *Cancer Res.* 38, 110-116.

Levis A.G. y Majone F. (1981). Cytotoxic and clastogenic effects of soluble and insoluble compounds containing hexavalent and trivalent chromium. Br. J. Cancer 44, 219-235.

Löfroth G. (1978). The mutagenicity of hexavalent chromium is decreased by microsomal metabolism. Naturwiss. 65, 207-208.

Lyon G.L., Brooks R.R., Peterson P.J. y Butler G.W. (1968). Trace elements in a New Zealand serpentine flora. Plant and Soil XXIX, 225-240.

Ma T.H., Snope A.J. y Chang T.Y. (1971). Far-red light effect on ultraviolet light induced chromatid aberrations in pollen tubes of *Tradescantia*. Rad. Bot. 11, 39-43.

Ma T.H., Sparrow A.H., Schairer L.A. y Nauman A.F. (1978). Effect of 1,2-dibromoethane (DBE) on meiotic chromosomes of *Tradescantia*. Mutat. Res. 58, 251-258.

Ma T.H. (1979). Micronuclei induced by X-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of *Tradescantia*. Mutat. Res. 64, 307-313.

Ma T.H. (1981). *Tradescantia* MCN-in-tetrad mutagen test for on-site monitoring and further validation. EPA-600/S1-81-019, 1-3.

Melgaard B., Clausen J. y Rastogi S.C. (1976). Electromyographic changes in automechanics with increased heavy metal levels. *Acta Neurol. Scandinav.* 54, 227-240.

Mertz W., Roginski E.E. y Reba R.C. (1965). Biological activity and fate of trace quantities in intravenous chromium (III) in the rat. *Amer. J. Physiol.* 209, 489-494.

Mertz W. (1969). Chromium occurrence and function in biological systems. *Physiol. Rev.* 49, 163-239.

Miller C.A. III y Costa M. (1989). Immunological detection of DNA-protein complexes induced by chromate. *Carcinogenesis* 10, 667-672.

Natusch D.F., Wallace J.R. y Evans C.A. Jr. (1974). Toxic trace elements: preferential concentration in respirable particles. *Science* 183, 202-204.

Nettesheim P., Hanna M.G. Jr., Doherty D.G., Newell R.F. y Hellman A. (1971). Effect of calcium chromate dust, influenza virus, and 100 R whole-body X radiation on lung tumor incidence in mice. *J. Nat. Cancer Inst.* 47, 1129-1144.

Nishio A. y Uyeke E.M. (1985). Inhibition of DNA synthesis by chromium compounds. *J. Toxicol. Environ. Health* 15, 237-244.

- Norseth T. (1981). The carcinogenicity of chromium. *Environ. Health Perspect.* 40, 121-130.
- Parr P.D., Taylor F.G.J. y Beauchamp J.J. (1976). Sensitivity of tobacco to chromium from mechanical draft cooling tower drift. *Atmos. Environ.* 10, 421-423.
- Petrilli F.L. y De Flora S. (1978). Metabolic deactivation of hexavalent chromium mutagenicity. *Mutat. Res.* 54, 139-147.
- Rastogi S.C. (1992). Cadmium, chromium, lead, and mercury residues in finger-paints and make-up paints. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 289-294.
- Rendón M.I. (1982). Alteraciones cromosómicas producidas por algunas sales de cromo. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. 57 p.
- Roe F.J.C. y Carter R.L. (1969). Chromium carcinogenesis: calcium chromate as a potent carcinogen for the subcutaneous tissues of the rat. *Brit. J. Cancer* 23, 172-176.
- Roginski E.E. y Mertz W. (1967a). An eye lesion in rats fed low chromium diets. *J. Nutr.* 93, 249-251.

Roginski E.E. y Mertz W. (1967b). Dietary chromium and amino acid incorporation in rats on a low-protein ration. Fed. Proc. 26, 301.

Rossi S.C. y Wetterhahn K.E. (1989). Chromium (V) is produced upon reduction of chromate by mitochondrial electron transport chain complexes. Carcinogenesis 10, 913-920.

Royle H. (1975a). Toxicity of chromic acid in the chromium plating industry (1). Environ. Res. 10, 39-53.

Royle H. (1975b). Toxicity of chromic acid in the chromium plating industry (2). Environ. Res. 10, 141-163.

Samitz M.H., Epstein E. y Philadelphia M.D. (1962). Experimental cutaneous chrome ulcers in Guinea pigs. Arch. Environ. Health. 5, 463-468.

Satyakala G. y Jamil K. (1992). Chromium-induced biochemical changes in *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms and *Pistia stratiotes* L. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 48, 921-928.

Sax K. y Edmonds H.W. (1933). Development of the male gametophyte in *Tradescantia*. Bot. Gaz. 95, 156-163.

Schroeder H.A. (1968). The role of chromium in mammalian nutrition. Amer. J. Clin. Nutr. 21, 230-244.

Schroeder D.C. y Lee G.F. (1975). Potential transformations of chromium in natural waters. *Water, Air Soil Pollut.* 4, 355-365.

Sivalingam P.M. (1989). Enzymatic and cellular level effects of chromium. *Toxicol. Environ. Chem.* 19, 119-123.

Skeffington R.A., Shewry P.R. y Peterson P.J. (1976). Chromium uptake and transport in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 132, 209-214.

Smith B.S.W. (1970). A comparison of ^{125}I and ^{51}Cr for measurement of total blood volume and residual blood content of tissues in the rat; evidence for accumulation of ^{51}Cr by tissues. *Clin. Chim. Acta* 27, 105-108.

Sparrow A.H. (1951). Radiation sensitivity of cells during mitotic and meiotic cycles with emphasis on possible cytochemical changes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 1508-1540.

Standley P.C. y Steyermark J.A. (1946). *Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany* Vol. 24, Part V 362 p.

Stanley R.A. (1974). Toxicity of heavy metals and salts to eurasian watermilfoil (*Myriophyllum spicatum* L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2, 331-341.

Sugiyama M., Ando A., Furuno A., Furlong N.B., Hidaka T. y Ogura R. (1987). Effects of vitamin E, vitamin B2 and selenite on DNA single strand breaks induced by sodium chromate (VI). *Cancer Lett.* 38, 1-7.

Sugiyama M., Ando A. y Ogura R. (1989a). Vitamin B2-enhancement of sodium chromate (VI)-induced DNA single strand breaks: ESR study of the action of vitamin B2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159, 1080-1085.

Sugiyama M., Ando A. y Ogura R. (1989b). Effect of vitamin E on survival, glutathione reductase and formation of chromium (V) in chinese hamster V-79 cells treated with sodium chromate (VI). *Carcinogenesis* 10, 737-741.

Sullivan R.J. (1969). Preliminary air pollution survey of chromium and its compounds. A literature review. US. Dept. of Health, Education, and Welfare.

Tamino G., Peretta L. y Levis A.G. (1981). Effects of trivalent and hexavalent chromium on the physicochemical properties of mammalian cell nucleic acids and synthetic polynucleotides. *Chem. Biol. Inter.* 37, 309-319.

Taylor J.H. (1950). The duration of differentiation in excised anthers. *Am. J. Bot.* 37, 137-143.

Toepfer E.W., Mertz W., Polansky M.M., Roginski E.E. y Wolf W.R. (1977). Preparation of chromium-containing material of glucose tolerance factor activity from Brewer's yeast extracts and by synthesis. *J. Agric. Food Chem.* 25, 162-166.

Tripathi R.D. y Chandra P. (1991). Chromium uptake by *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden in relation to metal chelators and pH. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 47, 764-769.

Tsapakos M.J. y Wetterhahn K.E. (1983). The interaction of chromium with nucleic acids. *Chem.-Biol. Inter.* 46, 265-277.

Tsapakos M.J., Hampton T.H. y Wetterhahn K.E. (1983). Chromium (VI)-induced DNA lesions and chromium distribution in rat kidney, liver, and lung. *Cancer Res.* 43, 5662-5667.

Tsuchiya K. (1965). The relation of occupation to cancer, especially cancer of the lung. *Cancer* 18, 136-144.

Underbrink A.G., Schairer L.A. y Sparrow A.H. (1973). *Tradescantia* stamen hairs: a radiobiological test system applicable to chemical mutagenesis. In: Chemical mutagens: principles and methods for their detection (A. Hollaender, Ed.) Plenum Press, Nueva York, Vol. 3, pp. 171-207.

Van't Hof J. y Schairer L.A. (1982). *Tradescantia* assay system for gaseous mutagens. *Mutat. Res.* 99, 303-315.

Verfaillie G.R.M. (1974). Kinetics of chromium absorption by intact rice plants. IAEA, Viena, pp. 315-331.

Villalobos-Peñalosa M., Gutiérrez-Ruiz M.E. y Castillo-Blum S. (1987). A study of the factors that influence the interference of Fe (III) in the colourimetric analysis of Cr (VI), in polluted waters. *Contam. Ambient.* 3, 7-23.

Villalobos-Pietrini R. (1977). Efectos biológicos del cromo. *An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. Méx.* 48, Ser. Biol. Exp. (1), 115-162.

Villalobos-Pietrini R., Gómez-Arroyo S. Flores-Márquez A.R. y Cisneros A. (1986). *Tradescantia*-micronucleous test on potassium dichromate. *Contam. Ambient.* 2, 63-70.

Villalobos-Pietrini R., Flores-Márquez A.R., Sánchez M. y Gómez-Arroyo S. (1990). Micronuclei induced in *Tradescantia* by arsenic. *Contam. Ambient.* 6, 75-78.

Villalobos-Pietrini R., Flores-Márquez A.R. y Gómez-Arroyo S. (1993). Cytogenetic evaluation of the effects of chromium and detergents in *Vicia faba*. *Cytologia* 58, 41-45.

Visek W.J., Whitney I.B., Kuhn U.S.G. III y Comar C.L. (1953).
Metabolism of Cr⁵¹ by animals as influenced by chemical state.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 84, 610-615.

Wacker W.E.C. y Vallee B.L. (1959). Chromium, manganese, nickel
and other metals in RNA. Fed. Proc. 18, 345.

Wedrychowski A., Ward W.S., Schmidt W.N. y Hnilica L.S. (1985).
Chromium-induced cross-linking of nuclear proteins and DNA. J.
Biol. Chem. 260, 7150-7155.

Wolf W., Mertz W. y Masironi R. (1974). Determination of chromium
in refined and unrefined sugars by oxygen plasma ashing flameless
atomic absorption. J. Agr. Food Chem. 22, 1037-1042.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLAS

TABLA I. CONCENTRACION ABSORBIDA DE CROMO* (PPM) A PARTIR DE DIVERSAS CONCENTRACIONES DE $K_2Cr_2O_7$ APLICADAS A LAS RAICES DE *Vicia faba* A DIFERENTES HORAS DE EXPOSICION

Concentración aplicada (ppm)	Tiempos de tratamiento			
	1 h	2 h	3 h	4 h
0	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
500	87.69 (11.12)	132.60 (9.85)	149.53 (44.27)	254.31 (3.47)
1000	154.07 (11.77)	271.12 (11.37)	210.17 (20.78)	362.83 (90.22)
2500	298.00 (54.82)	432.06 (6.53)	528.17 (26.36)	497.84 (135.51)
5000	453.94 (15.34)	551.66 (56.61)	559.03 (115.57)	801.97 (46.33)
7500	545.38 (84.13)	609.74 (5.65)	523.69 (168.73)	843.32 (131.18)

* Promedio de dos análisis
(D.E.)

TABLA II. ANALISIS DE VARIANZA DE LAS CONCENTRACIONES ABSORBIDAS POR LA RAIZ DE *Vicia faba* ENTRE LAS DIVERSAS REPETICIONES DE EXPERIMENTOS, TIEMPOS Y CONCENTRACIONES

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	F*	Nivel Sign.
Principales Efectos					
Repetibilidad	1911	1	1911	0.34	0.571
Entre tiempos	97260	3	32420	5.75	0.003
Entre concentraciones	1540454	5	308091	54.67	< 0.001
Residuo	169068	30	5636		

* el cálculo de F está basado en el error cuadrado medio del residuo con el 95% de confianza

gl Grados de libertad

Nivel Sign. Significatividad de F

TABLA III. CORRELACION DE LA CONCENTRACION DE CROMO ABSORBIDO EN LA RAIZ DE *Vicia faba* CON DIFERENTES CRITERIOS DE EVALUACION DEL DAÑO CITOGENETICO DESCRITO PARA ESTA PLANTA^a Y CON LA CONCENTRACION DE EXPOSICION

	Correlación
Concentración de exposición	0.8159 **
Anafases totales	-0.7789 **
Anafases anormales	0.6294 *
Aberraciones totales	0.7692 **

^a Rendón 1982

* Valor significativo ($p < 0.050$)

** Valor significativo ($p < 0.001$)

TABLA IV. CONCENTRACION ABSORBIDA DE CROMO* (PPM) EN ALGUNAS ESTRUCTURAS DE *Tradescantia* CLON 4430 A 6 HORAS DE EXPOSICION Y 30 DE RECUPERACION

Conc. Aplicada (ppm)	Tejido		
	Tallo	Hoja	Inflorescencia
0	1.88 (0.06)	5.63 (0.61)	2.90 (2.16)
1000	948.68 (81.98)	376.34 (45.27)	168.80 (70.32)
2000	1581.72 (108.28)	796.89 (50.80)	315.48 (98.70)
4000	1804.55 (44.09)	1119.10 (289.06)	423.09 (4.91)
6000	2350.05 (362.84)	1140.57 (87.05)	544.69 (11.67)
8000	3566.43 (5.00)	1672.19 (235.44)	1099.95 (265.04)
10000	3678.94 (185.04)	1841.37 (124.92)	719.63 (199.80)

* Promedio de dos análisis
 (D. E.)

TABLA V. ANALISIS DE VARIANZA DE LAS CONCENTRACIONES ABSORBIDAS EN DISTINTAS ESTRUCTURAS DE *Tradescantia* CLON 4430 ENTRE LAS DIVERSAS REPETICIONES DE LOS EXPERIMENTOS Y CONCENTRACIONES

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	F*	Nivel Sign.
Principales Efectos					
Repetibilidad	8251	1	8251	0.04	0.853
Entre Concentraciones	21806490	6	3634415	15.77	< 0.001
Entre Estructuras	16746082	2	8373041	36.32	< 0.001
Residuo	7376248	32	230508		

* el cálculo de F está basado en el error cuadrado medio del residuo con el 95% de confianza

gl Grados de libertad

Nivel Sign. Significatividad de F

FIGURAS

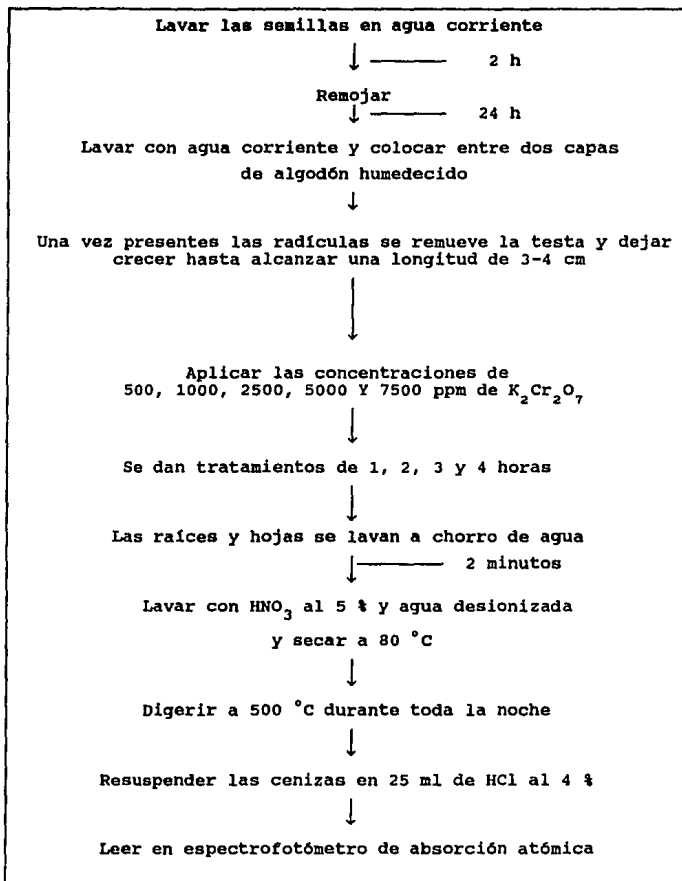


Fig. 1. TECNICA PARA EL ANALISIS DE LA ACUMULACION DE CROMO EN RAICES DE *Vicia faba*

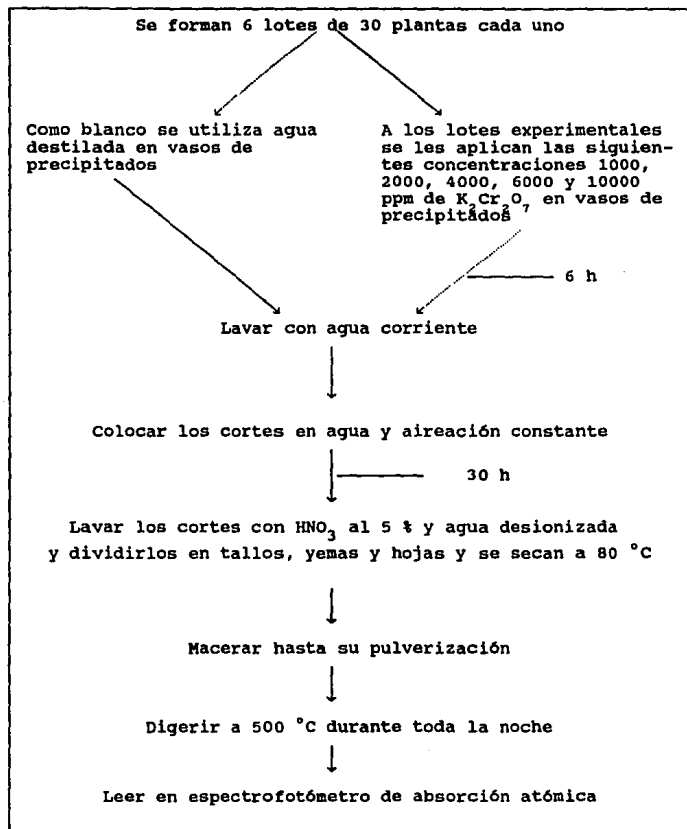


Fig. 2. TECNICA PARA EL ANALISIS DE LA ACUMULACION DE CROMO EN DIVERSOS TEJIDOS DE *Tradescantia*

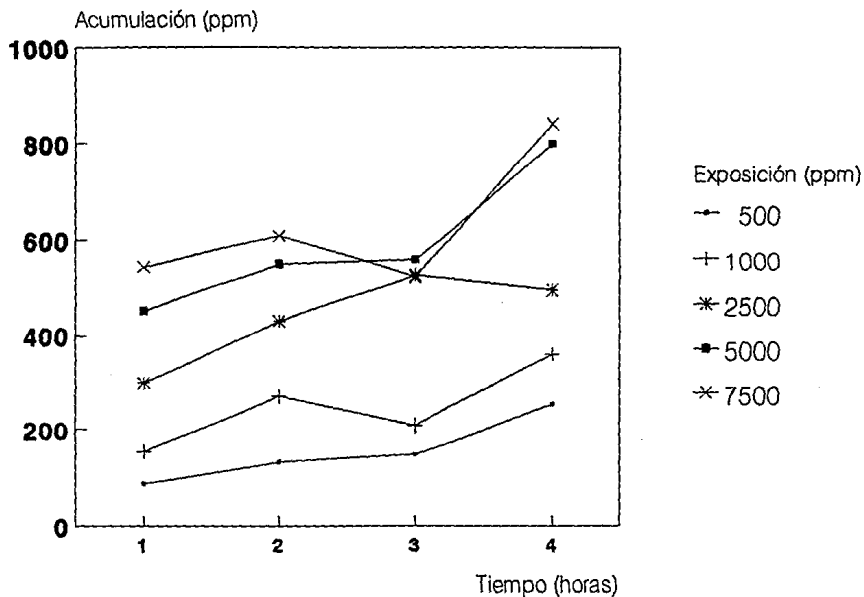


Fig 3. Acumulación de cromo en las raíces de *Vicia faba* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición con dicromato de potasio.

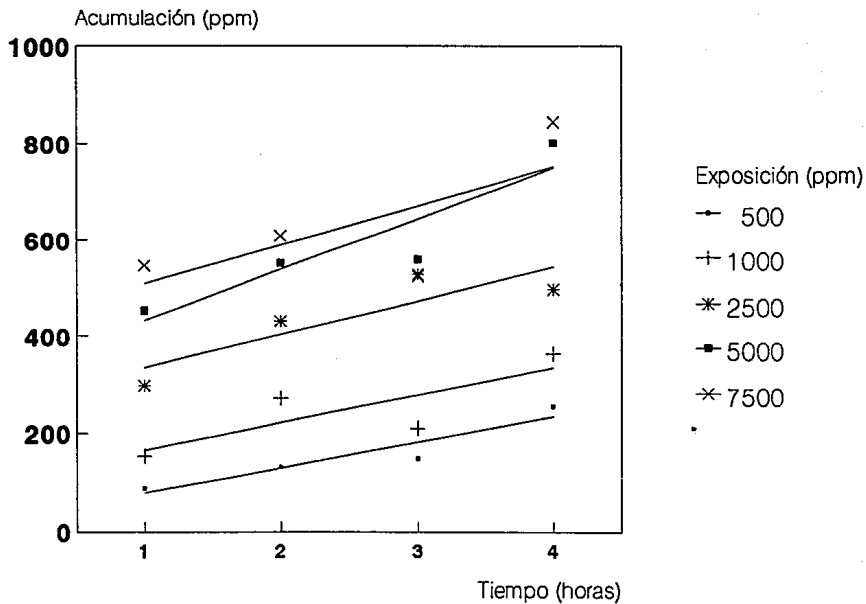


Fig 4. Tendencia de la acumulación de cromo en las raíces de *Vicia faba* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición con dicromato de potasio.

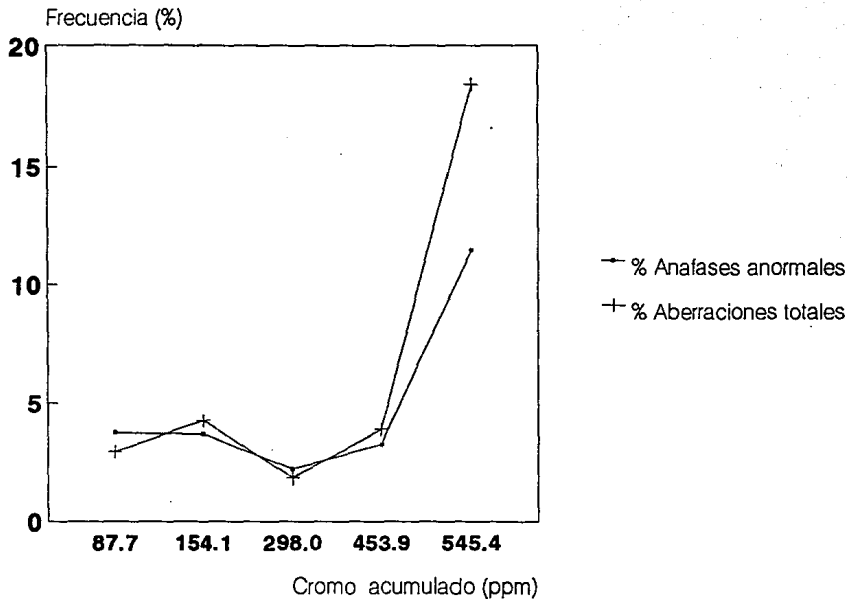


Fig. 5. Relación de la concentración de cromo absorbido y el efecto genético a una hora de exposición con dicromato de potasio en *Vicia faba*.

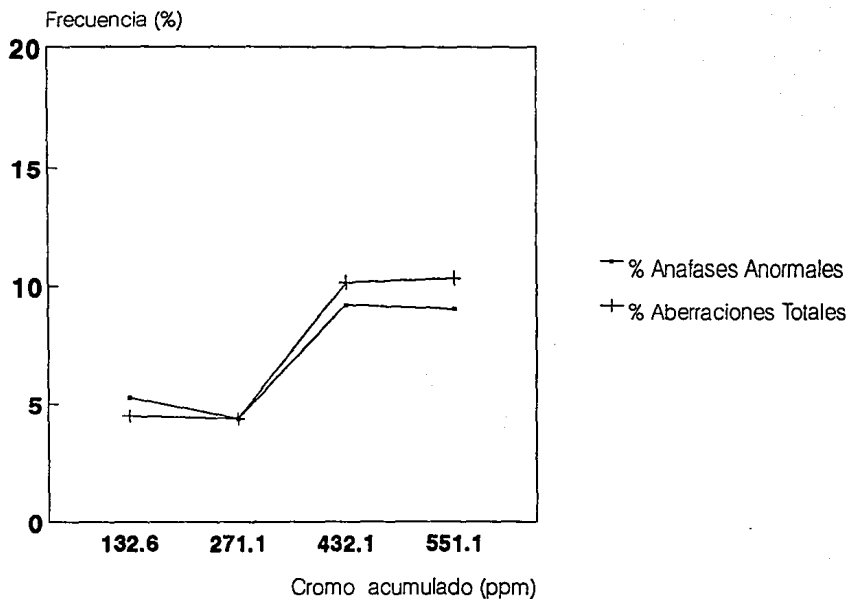


Fig. 6. Relación de la concentración de cromo absorbido y el efecto genético a dos horas de exposición con dicromato de potasio en *Vicia faba*.

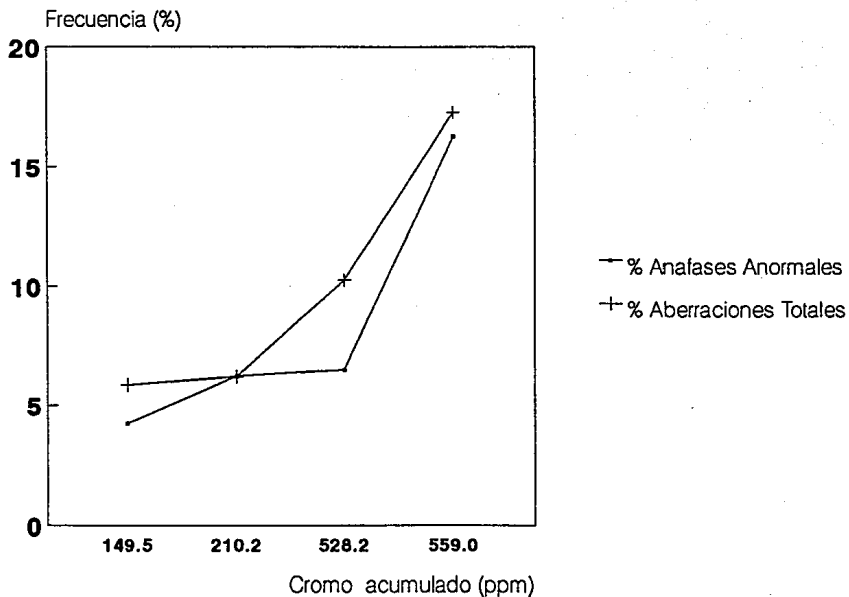


Fig. 7. Relación de la concentración de cromo absorbido y el efecto genético a tres horas de exposición con dicromato de potasio en *Vicia faba*.

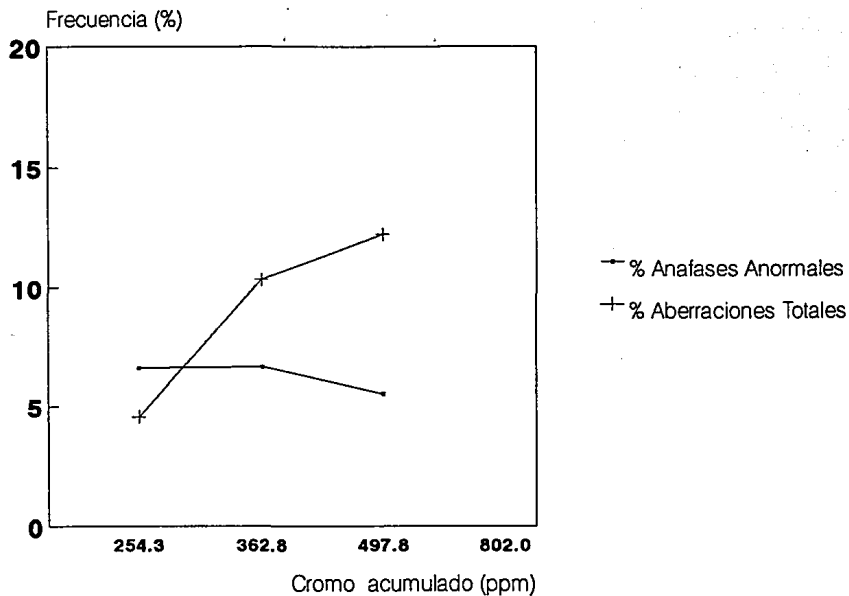


Fig. 8. Relación de la concentración de cromo absorbido y el efecto genético a las cuatro horas de exposición con dicromato de potasio en *Vicia faba*.

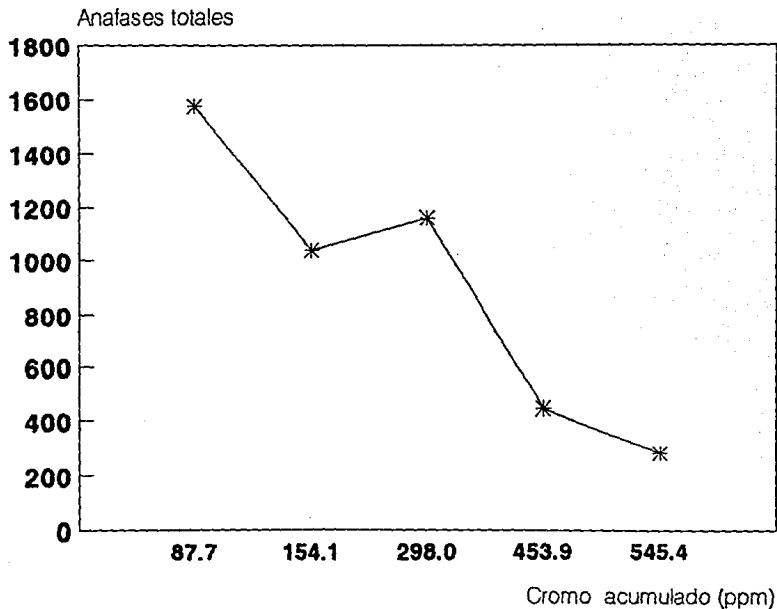


Fig. 9. Relación de la concentración de cromo absorbido y anafases registradas a una hora de exposición con dicromato de potasio en *Vicia faba*.

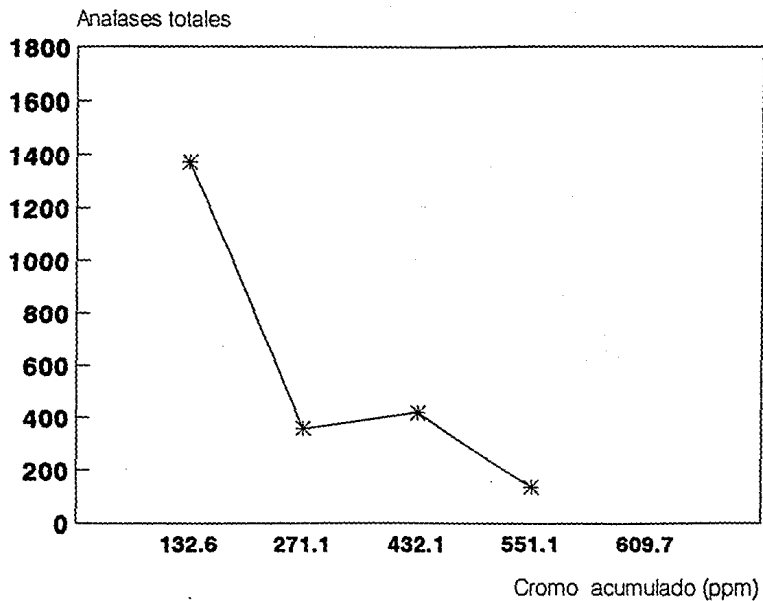


Fig. 10. Relación de la concentración de cromo absorbido y anafases registradas a dos horas de exposición con dicromato de potasio en *Vicia faba*.

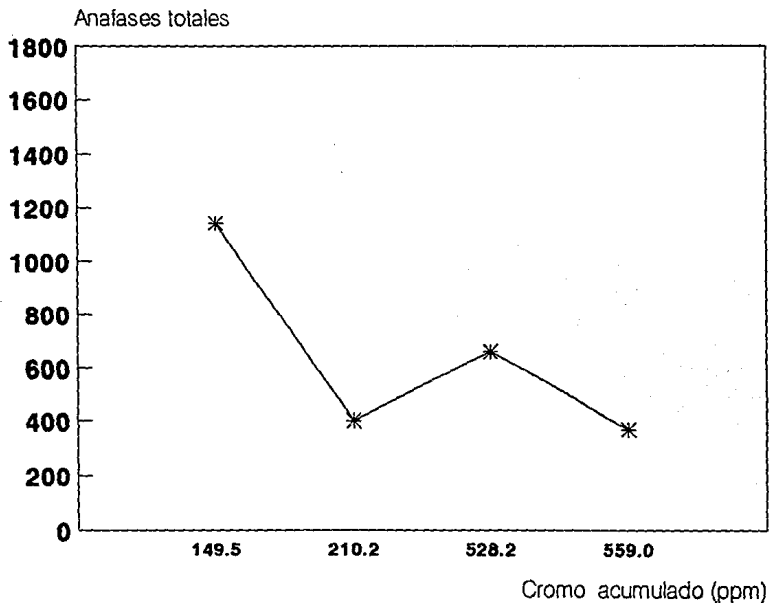


Fig. 11. Relación de la concentración de cromo absorbido y anafases registradas a tres horas de exposición con dicromato de potasio en *Vicia faba*.

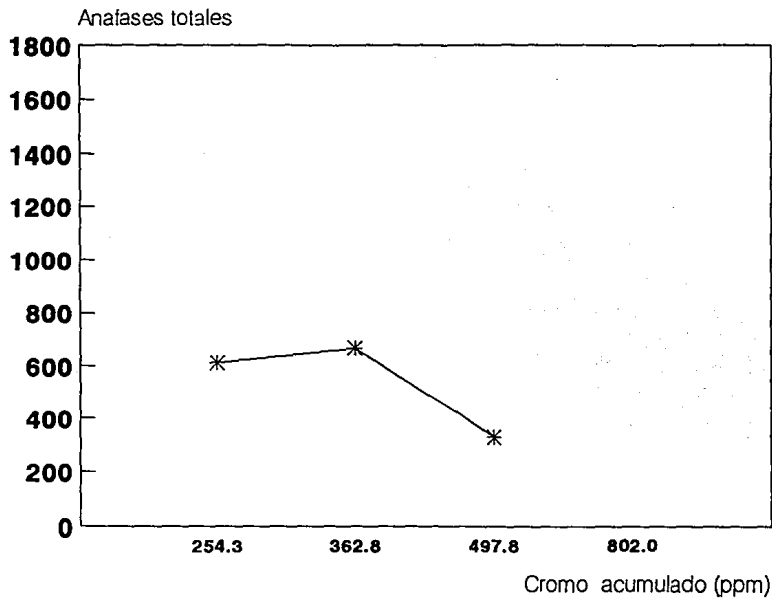


Fig. 12. Relación de la concentración de cromo absorbido y el efecto genético a las cuatro horas de exposición con dicromato de potasio en *Vicia faba*.

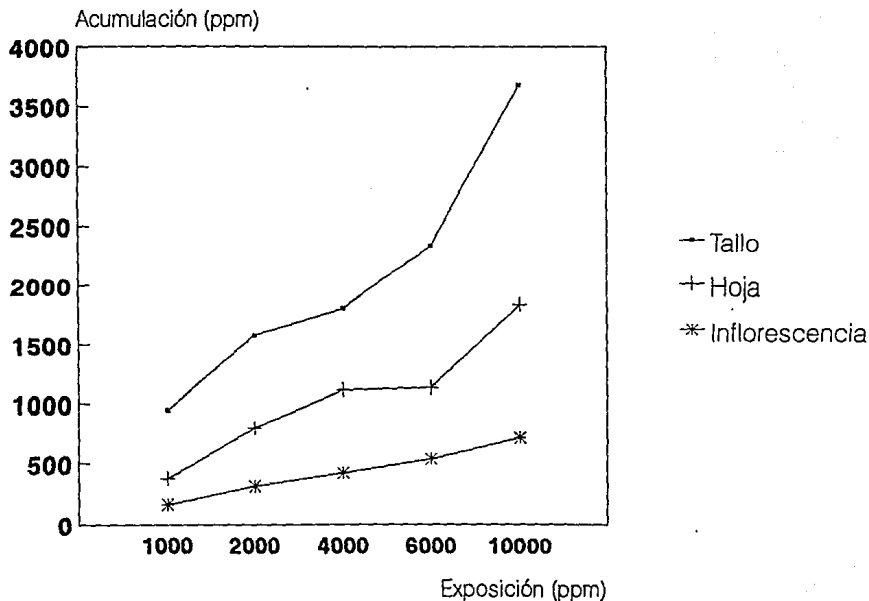


Fig. 13. Acumulación de cromo en diversas estructuras de *Tradescantia* clon 4430 a 6 horas de exposición y 30 horas de recuperación con dicromato de potasio.

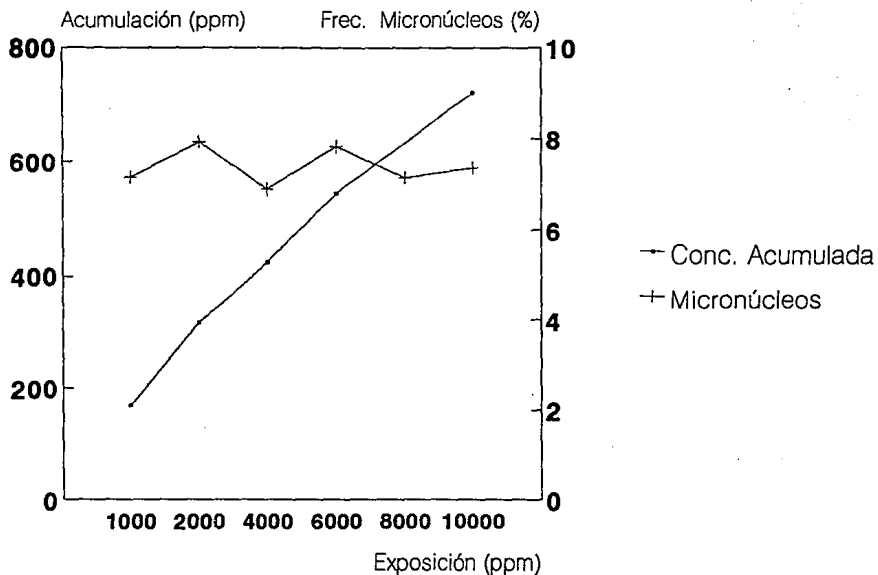


Fig. 14. Relación de la concentración de cromo absorbido y la frecuencia de micronúcleos a 6 horas de exposición y 30 horas de recuperación con dicromato de potasio en inflorescencias de *Tradescantia* clon 4430. + Tomado de Cisneros (1986).