

34



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

APLICACIÓN DE LAS CÉLULAS
MERISTEMÁTICAS DE *Allium cepa* EN LA
VALORACIÓN DE CONTAMINACIÓN
AMBIENTAL.

287744

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ANGÉLICA PATRICIA CAMPOS CHÁVEZ

DIRECTORA DE TESIS: M. en C. MARÍA
GUADALUPE ORDAZ TÉLLEZ



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
**APLICACIÓN DE LAS CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE Allium cepa EN
LA VALORACIÓN DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL.**

realizado por Campos Chávez Angélica Patricia

Con número de cuenta 8931537-0 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de tesis
Propietario

M.en C. María Guadalupe Ordaz Téllez

Propietario

Dra. Patricia Ramos Morales

Propietario

M.en C. Bertha Molina Alvarez

Suplente

M.en C. Elvia Coballase Urrutia

Suplente

M.en C. Yolanda Paez Serna

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Edna M. Suarez D.

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA



Este trabajo fue realizado en su totalidad en el

Laboratorio de Genética

“Theodosius Dobzhansky” de la

Facultad de Ciencias de la

Universidad Nacional Autónoma de México

Con el apoyo otorgado por:

La Dirección General de Asuntos del Personal Académico

(DGAPA)

PAPIIT Proyecto: IN-207196-UNAM

y

La Dirección de Programas de Apoyo a la Docencia

PAPIME Proyecto: DO-200898

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis:

M. en C. María Guadalupe Ordaz Téllez

Por brindarme su asesoría, ayuda y sobre todo por su amistad.

A los Sinodales:

Dra. Patricia Ramos Morales

M. en C. Bertha Molina Álvarez

M. en C. Elvia Coballase Urrutia

M. en C. Yolanda Páez Serna

Por sus valiosos y acertados comentarios y consejos durante la revisión y corrección de esta tesis.

Agradezco especialmente a la Dra. Patricia Ramos por darme la oportunidad de incursionar en el campo de la Genética y por brindarme su apoyo.

A todos mis amigos de la carrera.

A mis amigos del Museo de las Ciencias Universum.

A los compañeros del Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias.

A mis amigos del Instituto de Biología de la UNAM.

A todos mis maestros por brindarme y compartir sus conocimientos sobre esta fascinante carrera.

A Dios y a San Judas Tadeo por ayudarme cada vez que los necesito y por todo lo que me han dado en la vida.

DEDICATORIAS

A mis papás:

José Guadalupe Campos

Porque gracias a ti me interesó esta carrera, porque con tu apoyo he llegado hasta donde me encuentro hoy, por tu ejemplo de superación y el cariño que nos has dado a mi y a mis hermanos.

Virginia Chávez

Por todo el amor, apoyo y comprensión que día a día me has brindado, por preocuparte por mí y alentarme cuando lo necesito, porque además de ser mi mamá eres mi mejor amiga y sé que siempre puedo contar contigo para todo.

Agradezco a Dios por haberme dado unos padres como los que tengo, de todo corazón este trabajo es un pequeño homenaje a las personas que me dieron la vida y que me han sacado adelante con amor y dedicación, me siento orgullosa de ustedes y no me queda más que decirles:

¡¡GRACIAS POR SER MIS PAPAS, LOS AMO!!

A mis hermanos:

Guadalupe y Héctor porque me han dado su ejemplo de superación y sus consejos de hermano.

Susana, mi hermana menor, espero que el camino que cada uno de nosotros ha tomado sea un buen ejemplo para ti, sé que lograrás todo lo que te propongas y espero que nunca pierdas esa dulzura y alegría que para mí te caracterizan.

Por todos los momentos que hemos vivido juntos, por brindarme su cariño y buenos deseos. A los tres los quiero mucho.

A mi abuelita Matilde Ramírez

Por el amor que me has brindado y a cada uno de tus nietos.

A la memoria de mi querido abuelito Tomás Chávez

Porque siempre estuviste conmigo y lo sigues estando siempre en mi corazón, espero estés orgulloso de mí.

A todos los nuevos miembros de mi familia

A mis cuñados, a mis suegros y a mi sobrinita Vanessa.

A mi querido esposo Moisés:

Gracias por tu amor, comprensión y apoyo que siempre me has brindado, por tu ejemplo de lucha diaria, porque siempre que te necesito estás conmigo aconsejándome y ayudándome. Por la nueva vida que juntos estamos iniciando, por todo esto y mucho más... Gracias. TE AMO. Eres la persona más especial de mi vida.

A todas aquellas personas que desinteresadamente me han apoyado y siempre han creído en mí.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	1
El papel de los sistemas de prueba vegetales como biomonitores de contaminantes ambientales..2	
Aberraciones cromosómicas en plantas.....	6
Cariotipo.....	8
<i>A. cepa</i> como bioensayo.....	8
Ventajas y desventajas de <i>A. cepa</i>	10
Eventos genéticos que detecta la prueba de <i>A. cepa</i>	11
El ciclo celular mitótico.....	16
Fases de la mitosis en las células vegetales.....	17
Problemática ambiental de metales pesados en el agua potable subterránea de Zimapán, Hgo...21	
JUSTIFICACIÓN	26
OBJETIVOS	26
MATERIAL Y MÉTODOS	27
Compuestos químicos.....	27
Colecta de la muestra de agua.....	29
Análisis químico de la muestra de agua.....	29
Material biológico.....	29
Crecimiento de las raíces.....	29
Tratamiento.....	30
Fijación.....	31
Hidrólisis y tinción.....	31
Obtención de los meristemas.....	31
Análisis al microscopio.....	31
Análisis estadístico.....	32
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	47
PERSPECTIVAS	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

RESUMEN

En las últimas décadas, la contaminación ambiental se ha incrementado grandemente, así como los bioensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar el daño genotóxico al ADN. Entre estos se encuentra la prueba de *Allium cepa* la cual se ha considerado dentro de las baterías para el monitoreo ambiental, por su alta sensibilidad y especificidad y se le ha utilizado también para evaluar la genotoxicidad de las aguas residuales industriales y de mezclas complejas. La mayoría de estos estudios emplea tiempos de exposición relativamente cortos los cuales son importantes porque permiten determinar la genotoxicidad y/o el mecanismo de acción, sin embargo, los organismos se encuentran expuestos en la naturaleza por tiempo prolongado. En este trabajo se comparó el efecto de dos modalidades de exposición (24 y 72 horas) a agentes genotóxicos, así como la persistencia de aberraciones cromosómicas.

Se utilizaron dos modalidades de exposición: 24 y 72 h. Raíces de *A. cepa* se expusieron a DMN, MMS y a una muestra de agua potable de un pozo de la región de Zimapán, Hidalgo (como testigo negativo se utilizó agua destilada). Se elaboraron laminillas con los meristemas radicales y se cuantificaron: índice mitótico, porcentaje de aberraciones cromosómicas y porcentaje de micronúcleos. El análisis estadístico se realizó por medio de las pruebas de "t" de Student, ji cuadrada (X^2) y las tablas de Kastenbaum-Bowman.

MMS: En ambos tratamientos (24 y 72 h) se observó una notable reducción del índice mitótico con respecto al testigo negativo lo que indica un efecto citotóxico del compuesto. Para aberraciones cromosómicas se obtuvo un incremento significativo en los dos tratamientos. Con respecto a los micronúcleos también se observó incremento significativo en ambos tratamientos como resultado de actividad clastogénica. En ambos casos, el efecto a 72 h fue mayor.

DMN: En el tratamiento de 24 h se observa un ligero incremento en el índice mitótico que es significativo con respecto al testigo negativo, este efecto no se presenta en el tratamiento de 72 h. En el tratamiento de 24 h las aberraciones cromosómicas se incrementan significativamente, gran parte de esta respuesta es debida al daño al huso mitótico y no a la integridad de los cromosomas, sin embargo, para micronúcleos, la respuesta fue significativa solamente en el tratamiento de 72 h. Es importante hacer notar que la DMN es un compuesto que necesita biotransformación metabólica para mostrar sus efectos genotóxicos.

Pozo "Tierra Colorada": Con la muestra de agua de este pozo no se encontraron diferencias significativas en el tratamiento de 24 h en el índice mitótico en comparación con el testigo negativo, mientras que en tratamiento de 72 h si se presentan diferencias significativas en este índice. Para ambos tratamientos las aberraciones cromosómicas no presentaron respuesta positiva. Mientras que para micronúcleos se presentó un incremento en el tratamiento de 24 h. perdiéndose esta respuesta a las 72 h.

Los resultados mostraron que ambos tratamientos son recomendables para estudios de genotoxicidad. Si se observaron diferencias en el tipo de daño registrado. Es importante incrementar el conocimiento de la persistencia de alteraciones en la integridad cromosómica en exposiciones prolongadas, así como en organismos *in vivo*.



INTRODUCCIÓN

Se conoce que los contaminantes ambientales pueden dañar la integridad genética de los seres vivos. Recientemente se han realizado grandes avances en el conocimiento de los procesos que conducen hacia una enfermedad maligna (Bašić-Zaninović, 1991) entre los cuales se ha tratado de comprender el mecanismo de acción de las sustancias que promueven el desarrollo del cáncer, lo que ha incrementado el interés sobre la genotoxicidad de las mezclas ambientales complejas, tales como aguas naturales y residuales utilizadas para el consumo humano y la agricultura respectivamente, más aún debido a que éstas se han visto afectadas por la contaminación natural y antropogénica convirtiéndose en un riesgo a la salud (Hoffmann, 1982; Fiskesjö, 1985b; Donnelly *et al*, 1987).

El nivel de calidad del agua se determina por varios parámetros: análisis fisico-químico, saprobiológico y radiológico; además, recientemente se han incorporado diversos bioensayos para biomonitorrear los efectos genotóxicos en los seres vivos expuestos a contaminantes ambientales presentes en el agua (Al-Sabti y Kurelec, 1985; Al-Sabti, 1989; Abdou *et al*, 1989). Se ha propuesto un gran número de pruebas de corto tiempo para identificar carcinógenos potenciales, utilizando diversos organismos de prueba, desde bacterias hasta mamíferos. Estas pruebas se han diseñado tomando como base la capacidad que tienen muchos carcinógenos de causar daños al ADN o anomalías cromosómicas (Degrassi y Rizzoni, 1982; Al-sabti y Kurelec, 1985; Dixit y Nerle, 1985). El daño al ADN se clasifica en dos amplias categorías: 1) efectos visiblemente detectables a través del análisis citogenético de los cromosomas (aberraciones cromosómicas) y 2) cambios no visibles, los cuales ocurren a nivel nucleotídico (aberraciones o mutaciones puntuales).



Ha existido un interés creciente en el uso de sistemas vegetales para la identificación de agentes físicos y químicos con potencial mutagénico (Ma y Harris, 1985).

El papel de los sistemas de prueba vegetales como biomonitores de contaminantes ambientales

La importancia de valorar la genotoxicidad y la actividad carcinogénica de las sustancias químicas presentes en el ambiente, ha conducido al desarrollo de numerosas pruebas *in vivo* e *in vitro* para detectar daño al ADN, aberraciones cromosómicas y transformación (Brusick y Auletta, 1985). En los sistemas de prueba vegetales es posible observar un amplio espectro de alteraciones genéticas que incluyen mutaciones puntuales y aberraciones cromosómicas, además, tienen gran diversidad de aplicaciones en el estudio del ambiente, como la determinación del potencial mutagénico de desechos provenientes de industrias que los descargan en arroyos y ríos (Villalobos-Pietrini *et al*, 1994) ó de contaminantes atmosféricos (Schairer, L.A., 1978). Los vegetales no sólo son capaces de detectar la mutagenicidad de algún compuesto en particular, sino también de sus metabolitos, muchos de los cuales son similares a aquellos encontrados en los animales. Otra de las ventajas de las plantas superiores como sistema de prueba es que no están restringidas al laboratorio y son usadas también en el campo (de Serres, 1992). Más de 500 especies de vegetales se han empleado en mutagénesis, pero relativamente pocas se han usado para establecer si un compuesto en particular es clastogénico (capaz de romper cromosomas) o turbagénico (provoca alteraciones del huso mitótico) (Gómez-Arroyo y Villalobos- Pietrini, 1995). El Comité Gene-Tox (IPCS/WHO, 1985) ha validado diversos ensayos en vegetales (**Cuadro I**), que han sido propuestos y utilizados para el estudio de los efectos genotóxicos de las



sustancias mutagénicas y/o carcinogénicas presentes en mezclas complejas (de Serres, 1978).

Existen alrededor de 10 sistemas de prueba en plantas que abarcan un amplio rango de detección de eventos genéticos terminales. Comprenden desde los rápidos y simples ensayos para determinar daño en la estructura de los cromosomas, hasta las relativamente complejas pruebas para mutaciones de locus específico, que han demostrado ser sensibles y confiables como otros sistemas de corto tiempo (Grant *et al*, 1981; IPCS/WHO, 1985).

Las especies vegetales ideales para el estudio de mutagénesis deben poseer diversas características como: tener bajo número de cromosomas, de estructura bien definida, de gran tamaño y de fácil identificación de sus homólogos, entre otras (Cuadro II). Estas especies ofrecen muchas ventajas para tamizar y vigilar el efecto de agentes químicos ambientales y determinar si estos causan cambios en el arreglo de los genes, contribuyendo a un riesgo mutagénico (Ma y Harris, 1985).

Desafortunadamente, la investigación en mutagénesis con sistemas vegetales ha sido poco considerada y a menudo excluida, particularmente cuando la investigación es dirigida para comprender más sobre la mutagénesis en el humano (Nilan, 1978). El ADN de las plantas y de los animales es similar en cuanto a estructura y función y los mecanismos de síntesis de proteínas aparentemente son los mismos (IPCS/WHO, 1985). En las plantas, la división de los cromosomas mitóticos sigue un curso similar al de las células de mamíferos, aunque la meiosis y la gametogénesis tienen algunas diferencias; la división celular está acompañada por la formación de una lámina que separa las células hijas, mientras que en los mamíferos, las células se dividen por constricción del citoplasma (IPCS/WHO, 1985).



Durante el Programa Gene-Tox de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos se evaluaron 350 compuestos para determinar su actividad mutagénica en plantas y animales, los resultados obtenidos en estos bioensayos mostraron una marcada similitud en las respuestas (Constantin y Owens, 1982)

Cuadro I. Bioensayos aceptados en el programa Gene-Tox de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Tomado de Grant, 1994).

Sistema de prueba	Referencia
⊛ <i>Allium cepa</i> Ensayo de aberraciones cromosómicas	Grant (1982)
⊛ <i>Arabidopsis thaliana</i> Ensayo de mutaciones	Rédei (1982)
⊛ <i>Hordeum vulgare</i> (1) Ensayo de aberraciones cromosómicas (2) Ensayo de mutantes deficientes en clorofila	Constantin y Nilan (1982 a) Constantin y Nilan (1982 b)
⊛ <i>Glycine max</i> Mutaciones de manchas de clorofila	Vig (1982)
⊛ <i>Tradescantia</i> (1) Ensayo para mutágenos gaseosos (2) Pruebas citogenéticas	Van't Hof y Schairer (1982) Ma (1982 a)
⊛ <i>Vicia faba</i> Pruebas citogenéticas	Ma (1982 b)
⊛ <i>Zea mays</i> Ensayo de mutación de locus específico	Plewa (1982)



Cuadro II. Ventajas de las plantas como bioensayos para el monitoreo ambiental (Tomado de IPCS/WHO, 1985).

⊛ Son eucariontes y por consiguiente, sus cromosomas tienen una estructura similar a la del humano.
⊛ Las plantas tienen fácil crecimiento y algunas presentan generaciones cortas.
⊛ El tamaño de los cromosomas es adecuado para el análisis citológico.
⊛ Las alteraciones pueden analizarse en células somáticas y germinales en un mismo organismo.
⊛ Poseen la capacidad de bioactivar promutágenos.
⊛ Muestran una elevada sensibilidad (pocos falsos negativos) para predecir posibles carcinógenos.
⊛ Son sistemas económicos, de fácil manejo y se obtienen resultados reproducibles en poco tiempo.
⊛ Los ensayos se pueden realizar <i>in situ</i> .
⊛ Los agentes químicos a ensayar se pueden emplear solos o en mezclas y en diferentes condiciones ambientales (pH, temperatura, concentración).
⊛ Numerosos estudios muestran que los cromosomas vegetales son indicadores sensibles de efectos citotóxicos, citogenéticos y mutagénicos de contaminantes ambientales.
⊛ Los resultados muestran estrecha correlación con otros sistemas de prueba (Fiskesjö, 1985 a).



Aberraciones cromosómicas en plantas

En plantas superiores se han propuesto diferentes ensayos que utilizan cualquier estado ontogénico del desarrollo de la planta donde un número de eventos genéticos puede ser detectado en diversos tejidos como: raíces, hojas, polen y endospermo (Grant, 1994). Kostoff en 1931 correlacionó la reducción de la fertilidad en semillas de tabaco con las anomalías cromosómicas inducidas por el sulfato de nicotina (pesticida), el análisis microscópico reveló que las células meióticas con alteraciones cromosómicas son una causa de esterilidad parcial de las plantas. Los estados celulares de metafase y/o anafase son los más frecuentemente utilizados para el análisis de las aberraciones. Las metafases pueden usarse para el análisis de las aberraciones y de los sitios donde fueron inducidas aportando datos acerca del tipo de aberración que produce el agente químico (Kihlman, 1966; Kihlman y Andersson, 1984), mientras que en anafase las aberraciones pueden registrarse con mayor facilidad que en las de metafase, proveen un medio rápido para estimar el daño cromosómico y proporcionan datos sobre la formación de cromosomas con el centrómero inactivado, anafases multipolares y alteraciones del huso mitótico que no aporta la observación de las metafases (Nicoloff y Gecheff, 1976). Por otro lado, la evaluación de micronúcleos en células en interfase, es un método rápido para la detección de daño cromosómico (Gómez-Arroyo *et al*, 1986).

Con base en lo anterior, se considera que las pruebas de aberraciones cromosómicas en plantas son un excelente sistema de monitoreo ambiental para la detección de sustancias genotóxicas que representan un riesgo a la salud (Grant, 1978).



Actualmente existen pruebas que permiten estudiar los efectos tóxicos y las alteraciones a nivel del material genético en diversos organismos entre las cuales destaca la prueba de *Allium cepa* (Grant, 1982) (Fig. 1), que es uno de los materiales clásicos por su alta sensibilidad y especificidad. En países en desarrollo, son escasos los recursos económicos para el empleo de bioensayos de alto costo (de Nava y Maffey, 1986; Gopalan, 1986) pero existen sistemas de prueba que son relativamente simples y económicos como la prueba de *Allium* (Constantin y Owens, 1982).

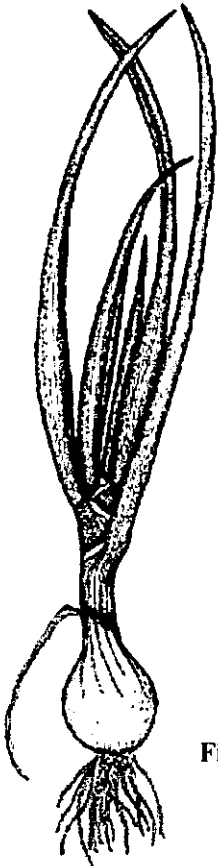


Figura 1. La cebolla común (*Allium cepa*)

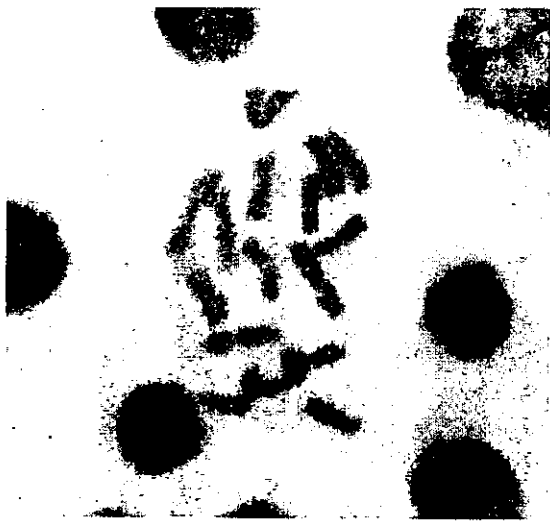


Figura 2. Complemento cromosómico de *A. cepa* ($2n = 16$)



Cariotipo

El cariotipo de *A. cepa* fue descrito por Mensinkai en 1939 (citado en Grant, 1982). El complemento cromosómico consiste de ocho pares de cromosomas ($2n=16$): cinco pares con centrómero medio o ligeramente submedio (cromosomas 1, 2, 3, 5 y 8), dos pares con centrómero submedio (cromosomas 6 y 7) y un par de cromosomas acrocéntricos con satélites, los cuales se sitúan al final del brazo corto (cromosoma 4) (Fig. 2).

A. cepa como bioensayo

La prueba de *A. cepa* forma parte del programa Gene-Tox (IPCS/WHO, 1985). Esta prueba fue desarrollada por Levan en 1938 al exponer las raíces de los bulbos a la colchicina. Emplea células del meristemo de la raíz y por su alta sensibilidad y especificidad se aplica para evaluar la genotoxicidad y citotoxicidad de agroquímicos, insecticidas, herbicidas, fertilizantes (Grover y Malhi, 1988; Rao *et al.*, 1988; El-Khodary *et al.*, 1989, Kumar y Sinha, 1989), aguas residuales industriales y de mezclas complejas (Rank y Nielsen, 1994). Los resultados obtenidos en esta prueba han demostrado que esta planta es particularmente sensible y rápida para determinar el daño genotóxico de los contaminantes ambientales. Los efectos pueden ser cuantificados midiendo la inhibición del crecimiento de la raíz en desarrollo y las alteraciones en los cromosomas de las células del meristemo radicular (Fiskesjö, 1988). El sistema funciona con un amplio rango de pH (3.5-11.0) sin efectos notorios sobre el crecimiento del sistema de la raíz (Fiskesjö, 1985 a). Otros miembros del género que han sido utilizados para los estudios de mutagenicidad son: *A. carinatum* L. ($2n=16$), *A. cepa* var. *proliferum* Targioni-Tozzetti ($2n=16$), *A. fistulosum* L. ($2n=16$) y *A. sativum* ($2n=16$) (Grant, 1982).



Meristemo

Es un tejido embrionario formado por una población de células que se mantiene en continua proliferación (Fig. 3 a y b). Las células se disponen en hileras paralelas, donde el crecimiento es longitudinal y las divisiones celulares cursan con tabicación transversal, perpendicular al eje de crecimiento.

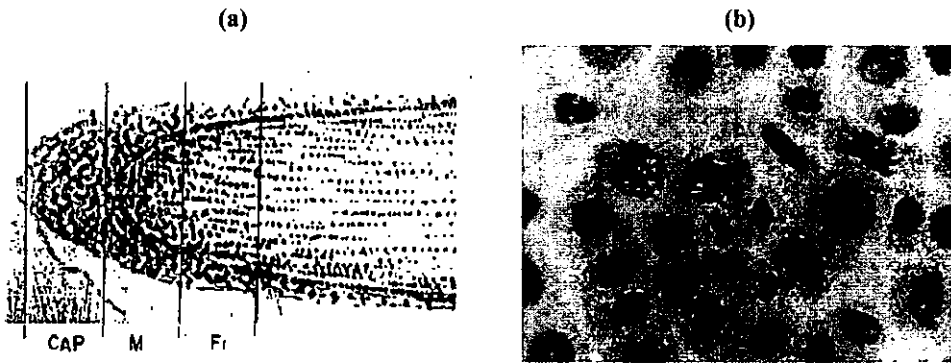


Figura 3. (a) Sección longitudinal de la raíz de *A. cepa* mostrando la cápside (CAP), el meristemo (M) y la región de células hijas (F1); (b) células del meristemo de la raíz en proliferación.

Una revisión detallada realizada por Shelby en 1980, reveló que los meristemos de la raíz son el material más empleado para ensayos de mutagénesis, mientras que los meristemos de hoja y primordios del tallo son menos utilizados (Grant *et al*, 1981). El uso de los meristemos presenta diversas ventajas como:

- ⊗ Las rutas metabólicas en este tejido son semejantes a las encontradas en otras células eucarióticas (Giménez-Martín, 1982). Las células de la raíz poseen enzimas, como las oxidasas, las cuales son utilizadas en la activación de muchos promutágenos. Este sistema de activación permite detectar aquellos químicos que ejercen su efecto tóxico vía un metabolito reactivo (Fiskesjö, 1981 a).



- ⊗ Las células del meristemo carecen de cloroplastos, por lo que su metabolismo no es fotodependiente (Giménez-Martín, 1982).
- ⊗ Son permeables a sustancias exógenas, de forma que la penetración y eliminación de solutos es sencilla (Giménez-Martín, 1982).
- ⊗ Las células del meristemo de la raíz son las primeras que se exponen a los químicos presentes en el agua y suelo.
- ⊗ La semilla o el bulbo proporcionan los nutrientes esenciales para el crecimiento de la raíz que comprende entre diez y doce ciclos de proliferación (Giménez-Martín, 1982).

Ventajas y desventajas de *A. cepa*

Ventajas

- ⊗ Los bulbos de *Allium* están disponibles todo el año, son económicos y no requieren de equipo o condiciones de crecimiento costosos o elaborados. Los bulbos producen un gran número de raíces, alrededor de 15 meristemos por bulbo en un periodo de 3 a 5 días a 21 °C (Grant, 1982).
- ⊗ El medio de cultivo es agua de la llave o filtrada y no se requieren condiciones de esterilidad (Fiskesjö, 1985 a).
- ⊗ Los cromosomas son relativamente grandes, de 8 a 16 μm de longitud (Vedt Brat, 1965). Las aberraciones cromosómicas y los intercambios son detectados fácilmente. Por lo anterior la prueba es económica y de fácil manejo (Schvartzman y Cortes, 1977; Schvartzman *et al*, 1979).



Desventajas

- ☉ En algunas ocasiones los bulbos de cebollas comerciales pueden estar tratados con inhibidores de crecimiento, tales como hidracina málica, para prevenir la germinación durante su almacenamiento (Grant, 1982)..

Eventos genéticos que detecta la prueba de *A. cepa*

Para valorar el efecto mutagénico en células del meristemo se utilizan varios parámetros como: toxicidad, micronúcleos y aberraciones cromosómicas (Fiskesjö, 1988) (Cuadro III).

Índice mitótico (IM): es el porcentaje de células que se encuentran en mitosis en una población determinada. La inhibición de la actividad mitótica es a menudo utilizada para identificar sustancias citotóxicas (Linnainmaa *et al*, 1978) (Fig. 4).

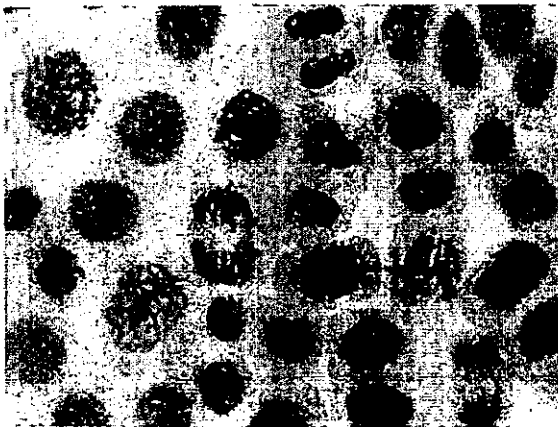


Figura 4. Células meristemáticas de *A. cepa* en proliferación



Cuadro III. Parámetros que se emplean en la determinación de la actividad genotóxica y citotóxica en *A. cepa*.

Parámetros	Etapas del análisis celular	Eventos genéticos
Micronúcleos	Interfase	⊗ Fragmentos acéntricos y/o cromosomas con centrómero inactivado
Células binucleadas		⊗ Alteraciones de la citocinesis
Aberraciones cromosómicas	Metafase	<ul style="list-style-type: none"> ⊗ Rompimiento cromatídico ⊗ Rompimiento cromosómico ⊗ Figuras cromatídicas (tri, tetra radiales) ⊗ Intercambio de cromátidas hermanas ⊗ Alteraciones en el huso mitótico (C-mitosis)
	Anafase y Telofase	<ul style="list-style-type: none"> ⊗ Puentes ⊗ Fragmentos ⊗ Cromosomas con centrómero inactivado ⊗ Alteraciones en el huso mitótico ⊗ Poliploidía
Toxicidad	Interfase y Mitosis	$\text{Índice mitótico} = \frac{\text{Número de células en mitosis}}{\text{Total de células analizadas}} \times 100$



Aberraciones cromosómicas:

Puentes y/o fragmentos: Son el resultado de rompimientos cromosómicos o cromatídicos (Fiskesjo, 1985 a) (Fig. 5 a y b).

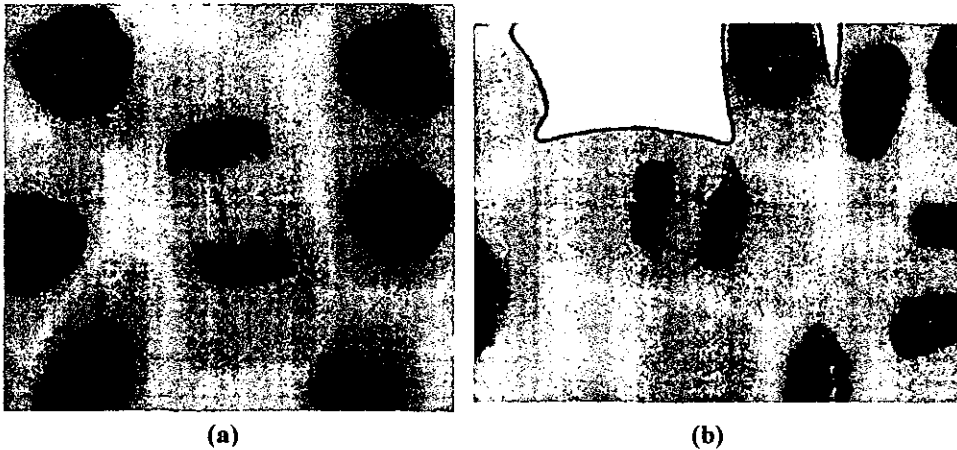


Figura 5. Puentes en células meristemáticas de *A. cepa*. (a) sencillo; (b) doble.

C-mitosis: Son producto de una inactivación del huso mitótico seguida por una dispersión al azar de los cromosomas en la célula (Levan, 1938).

Células binucleadas, multinucleadas y poliploides: Las células binucleadas surgen como consecuencia de la inhibición de la citocinesis celular. La ausencia de citocinesis en estas células puede dar origen a células multinucleadas. Las irregularidades mitóticas, tales como anafases incompletas o la distribución desigual de los cromosomas producen aneuploidías (Grant, 1978).



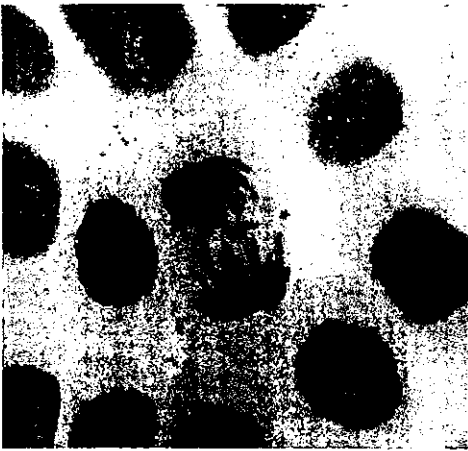
Fragmentación cromosómica: resulta de múltiples rompimientos de los cromosomas en los cuales hay una pérdida de su integridad. La fragmentación puede variar desde una desintegración parcial hasta una total (esta última se denomina pulverización cromosómica, Grant, 1978) (Fig. 6).



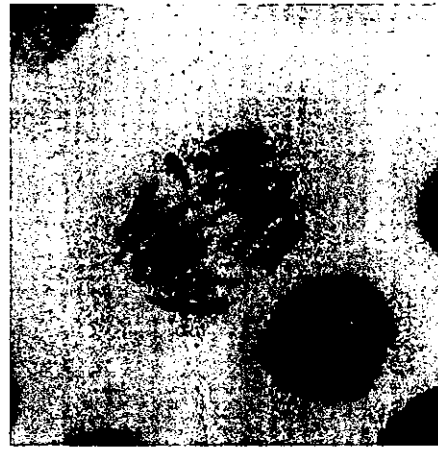
Figura 6. Fragmentación cromosómica en células meristemáticas

Rompimientos e intercambios cromosómicos: son las anomalías más comunes entre las cuales se encuentran: rompimientos cromosómicos y cromatídicos, fragmentos acéntricos, intercambios subcromatídicos, cromatídicos, huecos ("gaps") cromatídicos (lesiones acromáticas), regiones heterocromáticas e intercambios de cromátidas hermanas en metafase, puentes cromosómicos y cromatídicos y fragmentos en anafase (Grant, 1978).

Los rompimientos cromosómicos, fragmentos, intercambios cromatídicos y los cromosomas dicéntricos son generalmente considerados como aberraciones inestables, mientras que las deleciones, inversiones, duplicaciones y translocaciones se consideran como aberraciones estables (Grant, 1978) (Fig. 7 a, b y c).



(a)



(b)



(c)

Figura 7 a, b y c. Células meristemáticas con fragmentos acéntricos

Micronúcleos: son el resultado de fragmentos acéntricos o cromosomas con centrómero inactivado los cuales fueron excluidos del núcleo durante la mitosis. Los micronúcleos son evidentes en las subsecuentes generaciones en las células interfásicas o profásicas. La presencia de estos revela efectos clastogénicos en el ADN (Ma *et al.*, 1995) (Fig. 8).

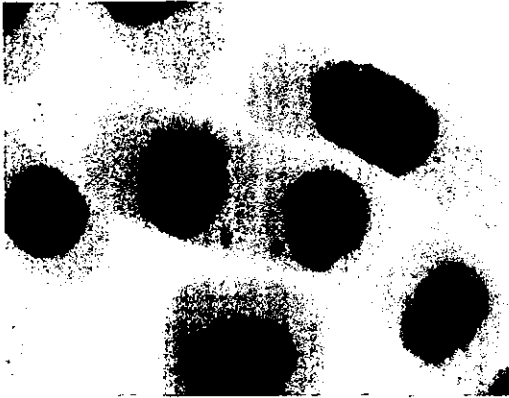


Figura 8. Células meristemáticas con micronúcleos.

El ciclo celular mitótico

El ciclo celular es esencial en la conducción y evaluación de muchos de los bioensayos en toxicología genética, principalmente en aquellos que miden la síntesis no programada del ADN (SDA), el intercambio de cromátidas hermanas (ICH's) y varias anomalías cromosómicas tanto *in vitro* como *in vivo*.

El ciclo celular mitótico es la secuencia de eventos a través de los cuales la célula duplica su genoma, crece y se divide en dos células hijas. La habilidad de una célula para duplicarse en dos células es una de las propiedades fundamentales que definen a la vida. Algunos cánceres son causados esencialmente por irregularidades del ciclo celular y muchos oncogenes y genes supresores de tumores son componentes intrínsecos del ciclo o pueden influir en su progresión.

El ciclo celular está dividido en cuatro fases (**Fig. 9**). Después de la división celular, las células hijas experimentan un periodo de crecimiento (G_1) en donde se sintetizan algunas proteínas celulares, ARN, membranas y otras macromoléculas. La fase G_1 es seguida por un periodo de síntesis de ADN (S) y posteriormente por otro periodo de crecimiento (G_2). Después de la G_2 sigue la mitosis (M) (**Fig.10**) donde



ocurre la desintegración de la membrana nuclear, se forma el huso mitótico, se unen los cromosomas al huso y se separan las cromátidas hermanas, el ciclo celular se completa con la separación de las dos células hijas (citocinesis).

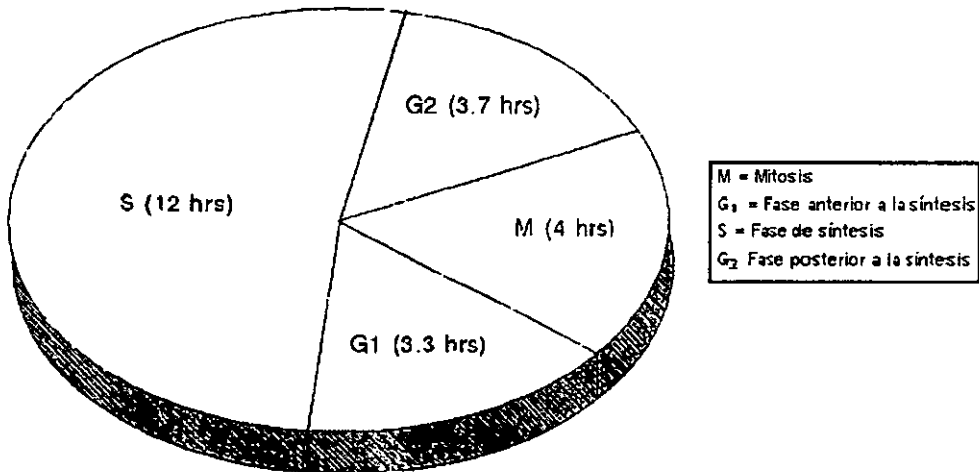


Figura 9. Ciclo celular de *A. cepa* a 21 °C (Matagne, 1968, citado en Grant, 1982)

Fases de la mitosis en las células vegetales

Aunque el proceso de la mitosis es, en general, semejante en todas las células eucarióticas, hay variaciones entre los distintos tipos celulares, principalmente entre las células animales y vegetales, por ejemplo, en las plantas superiores el huso carece de centriolos y ásteres en los polos y la separación de las células hijas es un fenómeno mucho más complejo.

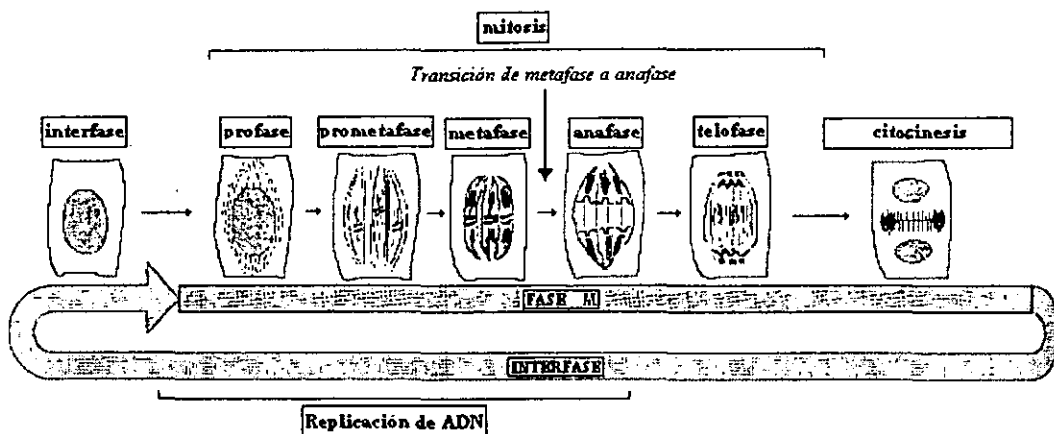


Figura 10. Ciclo celular mitótico (Modificado de Alberts *et al.*, 1994 y De Robertis y De Robertis, 1986).

Profase. La aparición de los cromosomas como filamentos delgados indica el comienzo de la profase. Durante esta fase cada cromosoma está compuesto por dos cromátidas, resultantes de la duplicación del ADN durante la fase S. Conforme avanza la profase, las cromátidas se hacen más cortas y gruesas, mientras que las constricciones primarias que forman el centrómero y que contienen el cinetocoro se hacen claramente visibles. Los nucleolos reducen su tamaño y finalmente se fragmentan desintegrándose en el nucleoplasma. Al final de la profase, cuando desaparece la envoltura nuclear, el material nucleolar es liberado en el citoplasma. El fenómeno citoplasmático más destacado es la formación del huso mitótico. Las mitosis en las que el huso posee centriolos y ásteres se denominan astrales o anfiastales y se encuentran en la mayoría de los animales, algunos hongos y en las divisiones gaméticas de la mayoría de las plantas inferiores. En las plantas superiores, células somáticas de la mayoría de las inferiores y en algunos protozoos, sus mitosis carecen de centriolos y de



ásteres, por lo que se les denominan mitosis anastrales, no obstante las células son capaces de formar un huso mitótico. El huso anastral comienza a formarse en la periferia del núcleo en una zona de muy pocos micrómetros de espesor. Cuando la envoltura nuclear desaparece, el huso se desplaza hacia la posición que previamente ocupaba el núcleo, se extiende de uno a otro de los polos de la célula, estrechándose un poco en los extremos (no tan pronunciado como en el huso astral) lo que le da una forma de tonel (Fig. 11).



Figura 11. Célula meristemática vegetal en profase.

Metafase. Empieza cuando la envoltura nuclear desaparece completamente. El huso mitótico está bien conformado. Mediante los cinetocoros los cromosomas se unen a algunas de las fibras del huso y se mueven hacia el plano ecuatorial de la célula (Fig. 12).



Figura 12. Célula meristemática vegetal en metafase.



Anafase. Comienza cuando las dos mitades (cromátidas) de cada cromosoma se separan hacia polos opuestos de la célula, cada cromátida posee un centrómero que está unido a un polo mediante los microtúbulos del huso mitótico (Fig. 13).



Figura 13. Célula meristemática vegetal en anafase.

Telofase. Durante la telofase la migración de los cromosomas hacia los dos polos es completada, los cromosomas se descondensan y se asumen las características de la interfase; el huso mitótico desaparece, la envoltura nuclear se forma alrededor de cada grupo de cromosomas y el núcleo y el nucleolo se hacen evidentes. En este punto, la división celular se completa y la célula tiene dos núcleos. Usualmente la citocinesis ocurre al final de la telofase y se originan dos células, cada una con un núcleo (Fig. 14). En las células vegetales, la citocinesis comienza con la formación de un fragmoplasto, que comprende a los microtúbulos interzonales y a ciertas vesículas derivadas del Golgi. Esta estructura se transforma posteriormente en la placa celular, que separa los territorios de las células hijas. Dentro de la placa celular, se forma la pared celular primaria, por medio de un mecanismo de secreción que consiste fundamentalmente en la producción de pectina, contenida en las vesículas de Golgi (De Robertis y De Robertis, 1986).



Figura 14. Célula meristemática vegetal en telofase.



La prueba de *Allium* en el análisis de aguas

En 1985 la prueba de *Allium* fue propuesta como un método estándar en el monitoreo ambiental y en el análisis de la citotoxicidad de aguas residuales y de los ríos (Fiskesjö, 1985 a, b), posteriormente se modificó con la finalidad de volverla más fácil y sensible para el análisis de mezclas complejas (Rank y Nielsen, 1993).

Problemática ambiental de metales pesados en el agua potable subterránea de Zimapán, Hidalgo.

Esta región se encuentra localizada en la parte central de la República Mexicana, en la Sierra Madre Oriental, específicamente al oeste del estado de Hidalgo, a 207 kilómetros de la Ciudad de México (Fig. 15 a y b). Es una zona semi-árida con una precipitación media anual de 409 mm³. La mayoría de las lluvias ocurren en fuertes tormentas durante el verano (INEGI, 1994). Desde el siglo XVII, la minería es la principal actividad económica de la población, donde se procesan minerales que contienen plata, zinc y plomo, principalmente por flotación selectiva (Armienta *et al*, 1997 b).

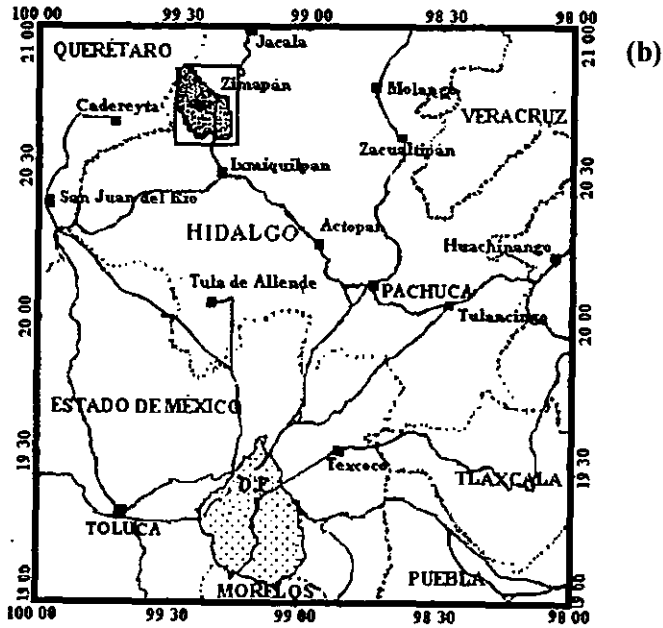
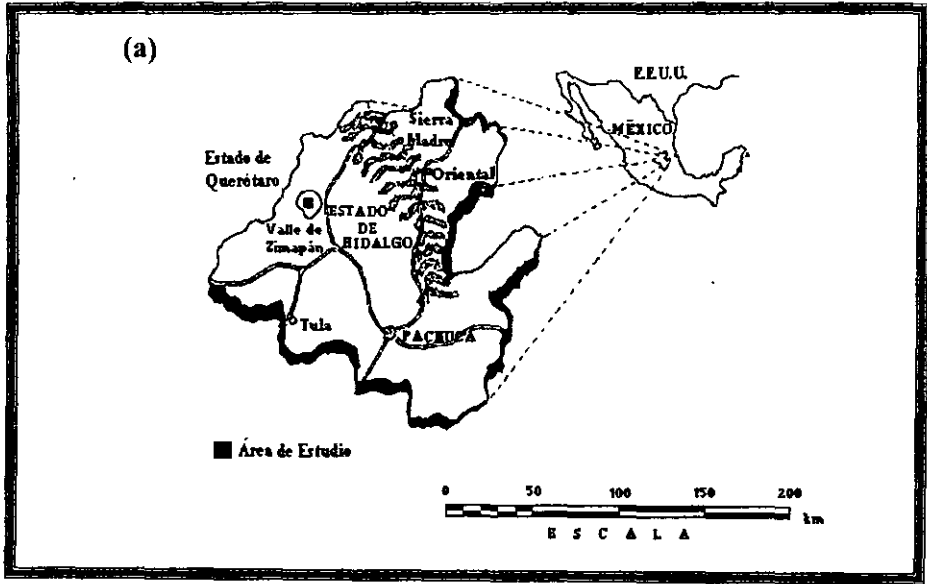
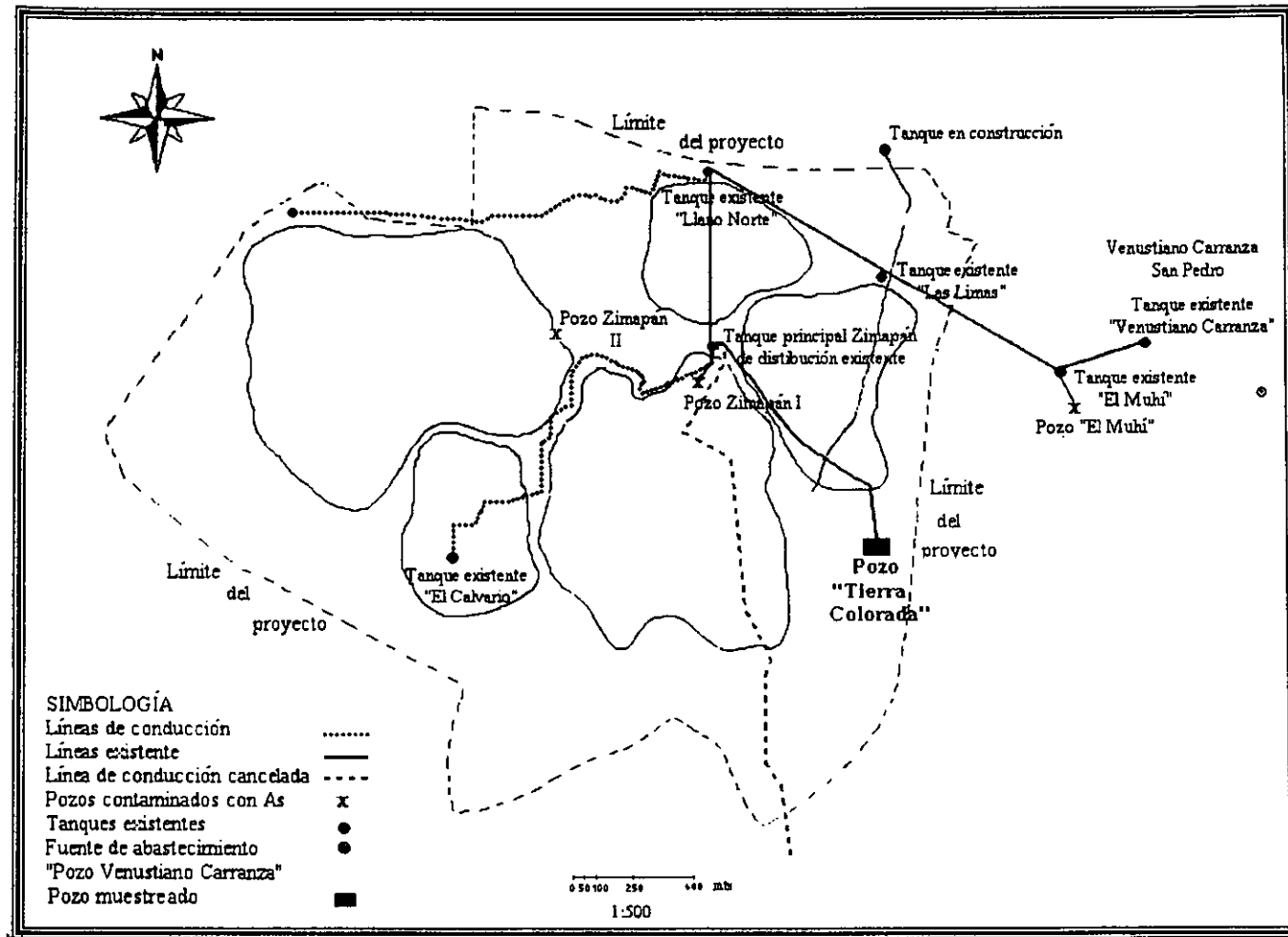


Figura 15 a y b. Localización del Valle de Zimapán, Hidalgo en la República Mexicana.



3

Figura 16. Mapa de la ubicación de los pozos de agua potable de la región de Zimapán, Hidalgo.



Uno de los problemas que presenta esta región es la ausencia de cuerpos de agua superficiales; debido a esto, las únicas fuentes de obtención de agua potable para los habitantes son los acuíferos por medio de pozos excavados superficialmente (menos de 30 m) y de la perforación de pozos profundos. La profundidad de estos últimos oscila entre 130 m como mínimo y 180 m como máximo (Ramos, 1996) (Fig. 16).

La contaminación por arsénico de las aguas subterráneas fue detectada en el Valle de Zimapán en 1992, como resultado de un estudio realizado por la Comisión Nacional del Agua (CNA, 1992) en donde se analizaron muestras de agua con la finalidad de detectar a la bacteria del cólera, resultando negativo para este estudio. Además el análisis químico determinó la presencia de metales pesados, entre los cuales destaca el arsénico como principal contaminante de algunos pozos y norias en niveles que rebasan notoriamente las normas de calidad del agua para consumo humano (0.05 mg/L) (Armienta y Rodríguez, 1993, 1995). En 1993, se reportaron altas concentraciones de arsénico de hasta 1.09 mg/L en el agua extraída de uno de los pozos más productivos (El Muhi), el cual actualmente se encuentra clausurado (Fig. 16)

Para la región de Zimapán se conocen dos fuentes de contaminación por arsénico: **La fuente natural** que se debe a la oxidación de minerales con alto contenido en arsénico que contaminan las aguas más profundas y dan lugar a mayores concentraciones.

La fuente antropogénica que contamina los pozos superficiales; esta fuente corresponde al lixiviado de los residuos mineros, jales (aproximadamente a 0.437 mg/L) y a la penetración de los gases de altos hornos, con cierto contenido de arsénico, que se depositaron en el suelo desde los años 40's (superior a 0.10 mg/L, -Armienta, *et al* 1997 b). Jason Gurdak en 1997 reportó que las aguas contaminadas antropogénicamente tienen altas concentraciones de K^+ , Na y Cu, mientras que las



aguas contaminadas de manera natural usualmente presentan altas concentraciones de Si y Fe.

Desde 1996 el agua potable es distribuida a la población por medio del bombeo de los pozos cercanos a la población, a una cisterna principal, para posteriormente ser tratada para el consumo humano (Armienta *et al*, 1997 a).

En un estudio realizado por Armienta (1996 y 1997 a), se encontró que la población de la región de Zimapán está expuesta a distintas concentraciones de arsénico en el agua potable que van desde 0.014 mg/L hasta 1.09 mg/L.

El análisis físico-químico que realizó el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL) de la UNAM, durante un proyecto en colaboración con el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias, determinó que en las muestras de agua de algunos pozos existe la presencia de metales pesados, cuyos niveles se encuentran ligeramente arriba de la norma establecida; un ejemplo de ello es el caso del Pozo "Tierra Colorada" el cual tiene solo 15 metros de profundidad (Fig. 16), en donde se detectó una significativa concentración de cadmio (Cuadro IV).

Cuadro IV. Niveles permisibles de metales pesados (mg/L) en agua potable (Gaceta Ecológica, Meybeck *et al*, 1990) y concentraciones de metales pesados en el Pozo "Tierra Colorada".

	As	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Niveles permisibles	0.050	0.005	0.050	1.00	0.100	0.5	5.00
Pozo "Tierra Colorada"	0.009	0.021*	0.007	0.013	0.079	0.14	0.017

* Nivel de metal pesado por arriba del nivel permisible.



La identificación y evaluación de fuentes múltiples de contaminación de acuíferos son necesarias para establecer programas de remediación confiables, especialmente en regiones áridas, donde el agua subterránea es la principal o incluso la única fuente de agua potable (Armienta 1997 b).

JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas, la contaminación ambiental se ha incrementado grandemente (Alloway y Ayres, 1993), así como los bioensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar el daño genotóxico al ADN, entre los cuales se encuentra la prueba de *A. cepa* la cual se ha considerado dentro de las baterías para el monitoreo ambiental, por su alta sensibilidad y especificidad. Ésta se aplica para evaluar la genotoxicidad de las aguas residuales industriales y de mezclas complejas (Rank y Nielsen 1994). La mayoría de estos estudios emplea tiempos de exposición relativamente cortos, los cuales son importantes porque permiten determinar la genotoxicidad y/o el mecanismo de acción, sin embargo no hay que olvidar que los organismos se encuentran expuestos en la naturaleza a tiempos de exposición prolongados. En el presente trabajo se propone determinar el daño genotóxico inducido, así como el tipo de aberraciones cromosómicas que persisten al utilizar dos tiempos de exposición (24 y 72 horas).

OBJETIVOS

1. Realizar la calibración interna de la prueba de *A. cepa* utilizando dos mutágenos de referencia y el agua potable de un pozo de la región de Zimapán, Hidalgo, empleando las células del meristemo de la raíz por medio del análisis de micronúcleos y aberraciones cromosómicas en células en anafase y /o telofase.



2. Comparar dos tiempos de exposición en células meristemáticas de la raíz de *A. cepa* para la determinación del daño genotóxico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Compuestos químicos:

Metil metano sulfonato (MMS) es un metil éster del ácido metanosulfónico, se utiliza como catalizador en reacciones de polimerización, alquilación y esterificación y como disolvente; es un agente mutagénico de acción directa, formado por C (21.81%), H (5.49%), O (43.58%) y S (29.11%), (Index Merck, 1989; Reynolds, 1989) (**Cuadro V**).

La N-nitroso dimetilamina (DMN) es un líquido amarillo de baja viscosidad, miscible en agua, soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos y en lípidos, muy volátil, su fórmula química es $(CH_3)_2NNO$; está formada por C (32.42%), H (8.16%), N (37.82%) y O (21.6%) (Index Merck, 1989) (**Cuadro V**). Es usada como disolvente en la industria del plástico y la fibra, como antioxidante, como aditivo para lubricantes y en condensadores para incrementar la constante dieléctrica, también se utiliza como nematocida. Se ha encontrado en pequeñas cantidades en muestras de humo condensado de tabaco, en carnes curadas como el tocino, el pescado salado y ahumado. Así mismo se usa como disolvente y en la síntesis del combustible 1-1 dimetilhidrazina (Index Merck, 1989). Es un agente alquilante, potente carcinógeno (EMS, 1976) induce tumores en diferentes sitios según la ruta de administración, por ejemplo dosis de 25 y 50 ppm de DMN en la dieta de conejos ocasionan carcinomas hepatocelulares (Vogel y Natarajan, 1979 a y b); en ratas sometidas a inhalación repetida de la DMN se



inducen tumores en las cavidades nasales y en el riñón; cuando se administra por vía oral a diferentes líneas de ratones provoca sarcomas, carcinomas y adenomas en pulmón; en *Drosophila* induce mutaciones letales recesivas ligadas al sexo y pérdida cromosómica (Vogel y Natarajan, 1979 a y b). El descubrimiento de la actividad carcinogénica de la DMN ha permitido establecer que los compuestos N-nitroso y los agentes alquilantes constituyen una clase importante de compuestos carcinogénicos. La exposición a agentes alquilantes es exógena debido al estilo de vida u ocupación y endógena por la formación de compuestos N-nitroso dentro del organismo (Laval *et al*, 1990).

Cuadro V. Fuente y características químicas del Metil metano sulfonato (MMS) y la N-nitrosodimetilamina (DMN)

Compuesto	MMS	DMN
Proveedor /CAS	Aldrich/12, 1992-5	Sigma /62-75-9
Fórmula química condensada	$C_2 H_6 O_3 S$	$(CH_3)_2 NNO$
Peso molecular	110.13 g	74.08 g
Densidad	1.2943 g /ml	1.0048 g /ml
Solubilidad	Soluble en agua y poco soluble en disolventes no polares	Soluble en agua
Concentración	10 μ g / ml	10 mM
Efecto genético	Acción directa	Acción indirecta

(Tomado de Index Merck, 1989)



Colecta de la muestra de agua

Para este estudio, se escogió el Pozo "Tierra Colorada" de la región de Zimapán, Hidalgo, este pozo cuenta con 15 metros de profundidad. (INEGI, 1990, 1994). Se colectaron dos muestras de agua en botellas de polipropileno, a una de estas se le agregó 1 ml de ácido nítrico al 1% para fijarla, esta muestra fue usada para las determinaciones químicas, la otra muestra (sin fijador) se utilizó para el desarrollo de la prueba biológica. Se verificó al tomar las muestras que estas estuvieran libres de cloro por medio de un kit comercial (Chlorine Test, Proveedor Biológico, Mex.), esto con la finalidad de que el cloro no interfiriera en el sistema de prueba. Las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta su análisis, el cual se realizó en los siguientes 10 días después de su recolección.

Análisis químico de las muestras de agua

La muestra de agua fijada con ácido nítrico fue usada para determinar niveles ambientales de los metales pesados más frecuentes relacionados con la minería: As, Ni, Zn, Pb y Cr. Las concentraciones de los metales pesados fueron determinadas usando espectrofotometría de absorción atómica de flama.

Material biológico

Bulbos de cebolla de la variedad *A. cepa* L. ($2n = 16$) de tamaño uniforme con peso entre 20 y 30 g, adquiridas comercialmente.

Crecimiento de las raíces

A cada bulbo de *A. cepa* se le cortaron las raíces utilizando una navaja, dejando expuestos los primordios radiculares (durante este procedimiento se recomienda colocar



las cebollas en agua para evitar que los primordios se sequen). Para el crecimiento de las raíces los bulbos se colocaron en tubos homeopáticos (2 cm de diámetro y 10 cm de longitud) que contenían agua destilada y se conservaron durante 3 días en un lugar oscuro a temperatura constante de 21 °C (las raíces alcanzan una longitud de 2-3 cm) (Fig. 17 a)

Tratamiento

Al tercer día se seleccionaron los bulbos con crecimiento radicular, los cuales se expusieron a uno de tres tratamientos: DMN, MMS y agua del pozo antes mencionado. Se utilizaron dos modalidades de exposición: una de veinticuatro horas y la otra de setenta y dos horas; los bulbos se colocaron en vasos de precipitado de 10 ml de capacidad que contenían las sustancias a probar, las soluciones se renovaron cada 24 h. Para cada tratamiento se utilizaron cinco bulbos por compuesto y como testigo negativo se utilizó agua destilada (Fig. 17 b).

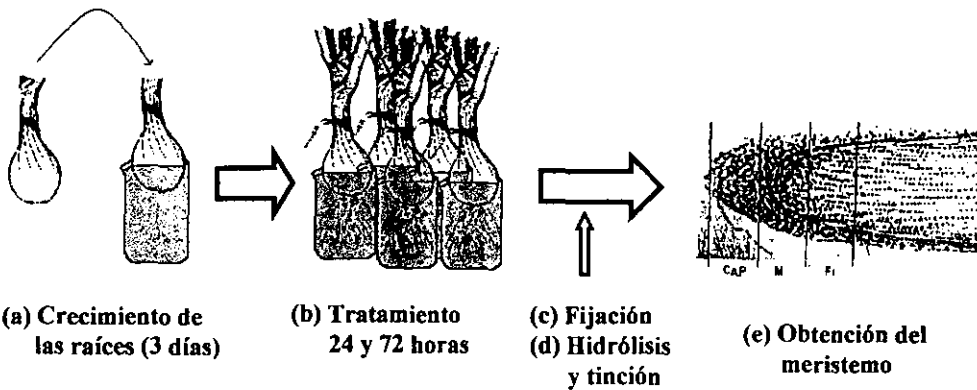


Figura 17. Metodología de la prueba de *Allium*



Fijación

Después del tratamiento se removieron las raíces de cada bulbo, las cuales se colocaron en tubos homeopáticos con fijador Carnoy (tres partes de metanol por una parte de ácido acético) durante 2 h, enseguida se transfirieron a alcohol metílico al 70% y se guardaron a 4° C, hasta la elaboración de las laminillas (Fig. 17 c).

Hidrólisis y tinción

Las raíces se expusieron a una solución de hidrólisis (ácido acético al 45% y ácido clorhídrico 1N, en una proporción de 9:1) a 50 °C durante 5 minutos, posteriormente se transfirieron a acetorceína al 2%, durante 30 minutos (Fig. 17 d)

Obtención de los meristemas

Transcurrido el tiempo de tinción, cada raíz se colocó en un portaobjetos y con la ayuda de unas pinzas de relojero se retiró cuidadosamente la cápside y se cortaron aproximadamente los primeros dos milímetros del extremo de la raíz (que corresponde a la región meristemática) (Fig. 17 e), posteriormente se colocó el cubreobjetos y se realizó el extendido de las células ("squash") con la finalidad de obtener una sola capa para facilitar la revisión al microscopio. Las preparaciones se sellaron con barniz de uñas transparente y se almacenaron a 4 ° C.

Análisis al microscopio

Se utilizaron 5 cebollas por compuesto, de cada bulbo se realizaron 5 preparaciones. El análisis se realizó a 100 X, cuantificando el número de células en mitosis, así como micronúcleos y aberraciones cromosómicas en células en anafase y telofase (Cuadro VI). Se realizaron dos repeticiones por cada experimento.



Cuadro VI. Número de células analizadas y parámetros considerados en la prueba de *Allium cepa*.

Parámetros	Etapa del análisis celular	Registro	Número de células analizadas	
			Por preparación	Total*
Índice mitótico	Todas las etapas del ciclo celular	Profase, metafase, anafase, telofase e interfase	500	12500
Aberraciones cromosómicas	Anafase y telofase	Fragmentos, puentes, cromosomas con centrómero inactivado, C-mitosis y células binucleadas.	100	2500
Micronúcleos	Interfase	Células en interfase	500	12500

*25 preparaciones por compuesto

Análisis estadístico

El procesamiento de los datos y el análisis estadístico se realizó por medio de las pruebas de "t" de Student, ji cuadrada (X^2) y las tablas de Kastenbaum-Bowman.



RESULTADOS

Metil-Metanosulfonato (MMS)

En los tratamientos de 24 h de exposición al MMS se observó que el índice mitótico disminuye notoriamente (7.2) en comparación con el testigo negativo (18.54) (**Tabla II**). Las aberraciones en las células meristemáticas en anafase y telofase encontradas a las 24 h del tratamiento fueron significativas (10.32 %) con respecto al testigo negativo (0.72 %), se encontró que los puentes y fragmentos son los más frecuentes (6.23 y 3.51 respectivamente) siendo significativos en comparación con el testigo (0.36 y 0.12 respectivamente) mientras que las demás aberraciones por si solas no son significativas (**Tabla II, Gráfica 1c**). Por otro lado, para micronúcleos resultó ser significativo (0.53 %) contra su testigo (0.09%) (**Tabla II**).

En células meristemáticas expuestas durante 72 h a MMS (**Tabla IV**), se encontró que se reduce notoriamente el índice mitótico (4.9) con respecto al testigo (20). Los resultados obtenidos mostraron ser significativos para aberraciones cromosómicas (54.7%) y micronúcleos (3.4%) comparados a su testigo (0.64% y 0.15% respectivamente). Para aberraciones cromosómicas nuevamente los puentes y fragmentos son los más frecuente sin embargo se encontró un ligero incremento de las demás aberraciones (cromosomas con centrómero inactivado, células binucleadas y C-mitosis) que en este tratamiento resultaron ser significativas (**Tabla IV, Gráfica 2c**). Para micronúcleos los resultados obtenidos resultaron ser significativos (3.4%) contra su testigo (0.15%) (**Tabla IV**).



N-Nitroso dimetilamina (DMN)

Los resultados obtenidos en el tratamiento de 24 h muestran un ligero incremento en el índice mitótico el cual resulta ser significativo (22.0) con respecto a su testigo (18.54) (**Tabla II**). Para aberraciones cromosómicas se encontró un incremento significativo (34.87%) en comparación con su testigo (0.72%). Las células multipolares (3.37%), anafases y telofases alteradas (7.83%), C-mitosis (10.46%) y mitosis alteradas (12.12%) son las aberraciones más frecuentes en este tratamiento, mientras que los puentes, fragmentos y células con centrómero inactivado son escasos y resultan ser no significativos (**Tabla II, Gráfica 1d**). Con respecto a micronúcleos, este compuesto tuvo una respuesta similar al testigo (0.1% y 0.09% respectivamente) (**Tabla II**).

A las 72 h de exposición el índice mitótico es similar al testigo (21.3 y 20 respectivamente, **Tabla IV**). La DMN indujo aberraciones cromosómicas (14.8%) y micronúcleos (0.3%) de manera significativa con respecto al testigo, con un porcentaje de 0.64% para aberraciones cromosómicas y 0.15% para micronúcleos. Las principales alteraciones inducidas fueron aquellas que afectan el huso y en menor proporción los puentes, fragmentos y cromosomas con centrómero inactivado (**Tabla IV, Gráfica 2d**).

Pozo "Tierra Colorada"

En la muestra de agua del Pozo "Tierra Colorada" en el tratamiento de 24 h de exposición no se encontraron diferencias significativas en el índice mitótico (21.2) en comparación con su testigo (18.54). Para aberraciones cromosómicas el incremento no fue significativo, sin embargo se encontró una respuesta positiva para micronúcleos (0.25%) contra su testigo (0.09%, **Tabla II**).



En el tratamiento de 72 h se encontró un ligero incremento en el índice mitótico (22.4) que resultó ser significativo con respecto al testigo (20, **Tabla IV**) No se encontraron diferencias significativas para aberraciones cromosómicas (0.71%) ni para micronúcleos (0.16%) en comparación con el testigo (0.64% y 0.15% respectivamente).

Tabla I. Número total de células analizadas para índice mitótico, micronúcleos y aberraciones cromosómicas en el tratamiento de 24 h. en *A. cepa*.

Compuesto [mM]	Índice mitótico		Micronúcleos		Aberraciones cromosómicas	
	Total de células analizadas	Total de células en mitosis	Total de células en interfase analizadas	Total de células con micronúcleos	Total de células en mitosis analizadas	Total de células con aberraciones
Testigo negativo	13057	2422 (18.54)	11228	10 (0.09)	2500	18 (0.72)
Pozo	11288	2389 (21.2)	10563	26 (0.25) (+)	2100	19 (0.90)
MMS	12679	909 (7.2) (+)	12468	67 (0.53) (+)	2278	235 (10.32) (+)
DMN	12195	2653 (22.0) (+)	12000	11 (0.1)	2400	837 (34.87) (+)

(+) = positivo

Tabla II. Alteraciones inducidas en células meristemáticas de *A. cepa* en el tratamiento de 24 h.

C	IM ^a	P ^b	F ^b	CCI ^b	CB ^b	A y T		M		% Ab ^c	% MN ^c
						Mp ^b	A ^b	C-M ^b	A ^b		
Testigo	18.54 ± 2.6	0.36 (9)	0.12 (3)	0.2 (5)	0.04 (1)	0	0	0	0	0.72 ± 0.5 (18)	0.09 ± 0.09 (10)
Pozo	21.2 ± 1.1	0.33 (7)	0.38 (8)	0.09 (2)	0.05 (1)	0	0	0.05 (1)	0	0.90 ± 0.5 (19)	0.25 ± 0.15 (26) (+)***
MMS [10 µg/ml]	7.2 ± 0.7(+)*	6.23(+) (142)***	3.51** (80)(+)	0.13 (3)	0.22 (5)	0	0	0.22 (5)	0	10.32 ± 2.2 (235)(+)***	0.53 ± 0.24 (67) (+)***
DMN [10 mM]	22.0 ± 0.08(+)*****	0.42 (10)	0.29 (7)	0.38 (9)	0.0 (0)	3.37** (81)(+)	7.83** (188)(+)	10.46** (251)(+)	12.12** (291)(+)	34.87 ± 7.6 (837)(+)***	0.1 ± 0.03 (11)

a=Diagnóstico estadístico mediante la "t"
de Student, a dos colas

b=Diagnóstico estadístico mediante las
tablas de Kastenbaum-Bowman

c= Diagnóstico estadístico mediante la X²

(+) = positivo

*, P < 0.001

** , P < 0.01

***, P < 0.05

****, P < 0.10

C= Compuesto;

IM= Índice mitótico

P= Puentes

F= Fragmentos

CCI=Cromosomas con centrómero inactivado

CB= Células binucleadas

A y T= Anafases y telofases

M= Mitosis

Mp= Anafases

multipolares

A= Figura alterada

C-M= C-mitosis

Ab= Aberraciones

MN= Micronúcleos

Tabla III. Número total de células analizadas para índice mitótico, micronúcleos y aberraciones cromosómicas en el tratamiento de 72 h. en *A. cepa*.

Ompuesto [mM]	Índice mitótico		micronúcleos		Aberraciones cromosómicas	
	Total de células analizadas	Total de células en mitosis	Total de células en interfase analizadas	Total de células con micronúcleos	Total de células en mitosis analizadas	Total de células con aberraciones
Testigo negativo	12672	2503 (20.0)	12500	19 (0.15)	2500	16 (0.64)
Pozo	12228	2744 (22.4) (+)	12000	19 (0.16)	2400	17 (0.71)
MMS	12548	613 (4.9) (+)	12572	427 (3.4) (+)	364	199 (54.7) (+)
DMN	12762	2722 (21.3)	12500	38 (0.3) (+)	2500	370 (14.8) (+)

(+) = positivo

Tabla IV. Alteraciones inducidas en células meristemáticas de *A. cepa* en el tratamiento de 72 h.

C	IM ^a	P ^b	F ^b	CCI ^b	CB ^b	A y T		M		% Ab ^c	% MN ^c
						Mp ^b	A ^b	C-M ^b	A ^b		
Testigo	20.0 ±1.0	0.40 (10)	0.08 (2)	0.0 (0)	0.04 (1)	0	0	0.12 (3)	0	0.64±0.24 (16)	0.15±0.02 (19)
Pozo	22.4** ±0.75(+)	0.25 (6)	0.34 (8)	0.08 (2)	0.04 (1)	0	0	0	0	0.71± 0.6 (17)	0.16± 0.05 (19)
MMS [10 µg/ml]	4.9* ±1.5(+)	17.3** (63)(+)	31.1** (113)(+)	1.4** (5)(+)	1.92** (7)(+)	0	0	3.02** (11)(+)	0	54.7±15.9 (199)(+)**	3.4 ± 1.6 (427)(+)**
DMN [10 mM]	21.3 ± 1.0	0.36 (9)	0.4 (10)	0.08 (2)	0.0 (0)	0.56** (14)(+)	5.4** (135)(+)	3.04** (76)(+)	4.96** (124)(+)	14.8 ± 5.0 (370)(+)**	0.3 ± 0.04 (38)(+)**

a=Diagnóstico estadístico mediante la "t"
de Student, a dos colas

b=Diagnóstico estadístico mediante las
tablas de Kastenbaum-Bowman

c= Diagnóstico estadístico mediante la X²

(+) = positivo

*, P< 0.001

** , P< 0.01

***, P< 0.05

****, P< 0.10

C= Compuesto;

IM= Índice mitótico

P= Puentes

F= Fragmentos

CCI=Cromosomas con centrómero inactivado

CB= Células binucleadas

A y T= Anafases y telofases

M= Mitosis

Mp= Anafases

multipolares

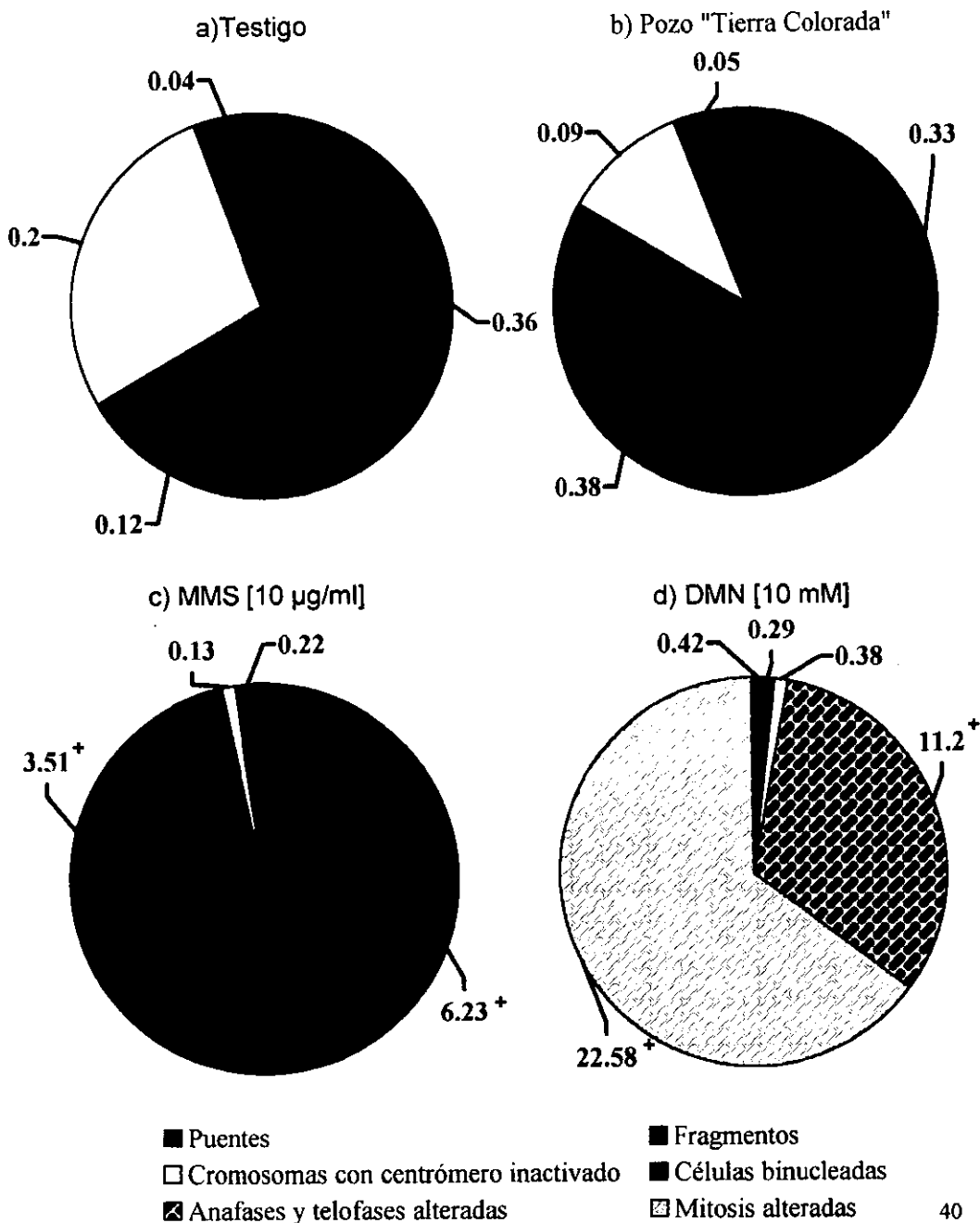
A= Figura alterada

C-M= C-mitosis

Ab= Aberraciones

MN= Micronúcleos

Gráfica 1. Alteraciones inducidas en células meristemáticas de *A. cepa* en el tratamiento de 24 horas.





DISCUSIÓN

Metil-Metanosulfonato

Se observó que el tratamiento con MMS a las 24 y 72 h disminuye de manera significativa el índice mitótico (7.2 y 4.9 respectivamente) en comparación con el testigo negativo (18.54 y 20 respectivamente, **Tablas II y IV**). Esta reducción es aproximadamente de un 61 % para el tratamiento de 24 h y de un 75.5 % para el tratamiento de 72 h de exposición. Varios autores proponen que un índice mitótico por debajo del 50 % del testigo negativo tiene efectos letales en el organismo (Antonsiewicz, 1990; Panda y Sahu, 1985). Sharma en 1983 lo llamó valor límite de citotoxicidad y es utilizado para monitorear niveles de contaminación en aguas superficiales (Smaka *et al.*, 1996). Debido a la reducción del índice mitótico en ambos tratamientos, el número de células en mitosis es escaso (**Tablas I y III**), dificultando el registro de aberraciones en células en anafase y/o telofase. A pesar de esta dificultad se observó un incremento significativo de aberraciones cromosómicas a las 24 y 72 h de exposición (10.32% y 54.67 % respectivamente). Los puentes y los fragmentos son las aberraciones que se encontraron con mayor frecuencia, en ambos tratamientos (**Gráficas 1c y 2c**), sin embargo, se observa que en el tratamiento de 72 h de exposición hay un ligero incremento de cromosomas con centrómero inactivado, células binucleadas y C-mitosis que resultaron ser significativas (**Tabla IV y Gráfica 2c**).

Por medio del análisis de micronúcleos, se detectó la actividad clastogénica en ambos tratamientos (0.53 % y 3.4 % para 24 y 72 h respectivamente, **Tablas I y III**). Los micronúcleos son el resultado de la acción que se tiene sobre el centrómero del cromosoma debido a alteraciones del huso o a la actividad clastogénica (fragmentos



acéntricos), que darán origen en la siguiente división celular a los micronúcleos. Autores como Heddle y Carrano en 1997 y Yamamoto y Yasumoto en 1980 han establecido que cuando el micronúcleo es pequeño, éste es el resultado de la actividad clastogénica del agente químico sobre la estructura del cromosoma y, cuando el compuesto actúa a nivel del centrómero o de las proteínas del cinetocoro, afecta la interacción con las fibras del huso provocando micronúcleos más grandes. En el presente trabajo se encontró que el MMS produce una mayor proporción de micronúcleos pequeños en los dos tratamientos, lo que sugiere que probablemente son productos de la actividad clastogénica (fragmentos acéntricos). Se observa una correlación para aberraciones y micronúcleos en ambos tratamientos. Aunque la respuesta es similar se observa un incremento en el daño genotóxico de aproximadamente 5 veces en el tratamiento de 72 h (**Tabla IV**). La respuesta obtenida para el MMS es similar a la encontrada por Rank y Nielsen en 1993 cuando expusieron células del meristemo de *A. cepa* a MMS a 10 µg/ml durante 24 h de exposición, ellos encontraron disminución del índice mitótico (63%) y un incremento significativo de micronúcleos (1%), así como de aberraciones cromosómicas (5.4%), con respecto al testigo negativo con un índice mitótico del 76.6% y del 1.9% para aberraciones cromosómicas, no encontrando micronúcleos.

N-Nitroso dimetilamina

La DMN es un agente alquilante de acción indirecta, es decir, requiere de la activación metabólica del organismo para producir su efecto genotóxico. Hasta ahora no se han reportado estudios de este mutágeno en la prueba de *A. cepa*, por este motivo se eligió la concentración de 10 mM con base en los estudios realizados en *Drosophila melanogaster*, en la cual este compuesto induce mutación y



recombinación somática (Martínez, 1999). En los resultados que se obtuvieron en la prueba de *A. cepa* no se observó que se afectara el índice mitótico en ambos tratamientos (24 y 72 h, **Tablas II y IV**). Se encontró que las alteraciones que induce este compuesto en las células del meristemo son principalmente a nivel del huso mitótico y en menor proporción aquellas que producen daño a los cromosomas (**Gráficas 1d y 2d**). Las alteraciones al huso mitótico como C-mitosis, mitosis, anafases alteradas y células multipolares dan posteriormente lugar a células con aneuploidías, las cuales son visibles si se analizan células en metafase, mientras que en células en anafase y/o telofase las alteraciones que se observan son: cromosomas con centrómero inactivado y células donde la formación del huso mitótico se ha afectado notoriamente formándose, en algunos casos, más de un huso. En el tratamiento de 24 h de exposición a la DMN, las aberraciones cromosómicas se incrementaron de manera significativa (34.87, **Tabla I**), gran parte de esta respuesta es generada al dañarse el huso mitótico y no a un efecto clastogénico. Sin embargo para micronúcleos la respuesta fue significativa solamente en el tratamiento de 72 h (0.3% **Tabla III**) debido a que en este tratamiento las células tuvieron aproximadamente tres ciclos de división, lo cual favoreció la aparición de los micronúcleos. Es importante hacer notar que el ensayo de *A. cepa* mostró la capacidad de bioactivar un promutágeno como la DMN ya que se observaron efectos genotóxicos en ambos tratamientos. Estos resultados demuestran claramente que la prueba de *A. cepa* es versátil debido que permite recuperar los efectos de genotoxicidad inducida por mutágenos de acción directa e indirecta. La biotransformación metabólica es posible debido a que las células de la raíz poseen enzimas que funcionan como oxidasas que son las responsables de la activación de muchos promutágenos a mutágenos (Fiskesjö, 1981).



Pozo "Tierra Colorada"

En la muestra de agua del Pozo "Tierra Colorada" no se encontraron diferencias significativas en el índice mitótico ni en aberraciones cromosómicas en el tratamiento de 24 h, pero en el análisis de micronúcleos se detectó un incremento significativo de 0.25% *versus* su testigo negativo 0.09% (**Tabla I**). Posiblemente existe alguna relación entre el efecto genotóxico y las características fisico-químicas de la muestra de agua (**Cuadro IV**), en la que se encontró que el único metal pesado que rebasó el nivel permisible es el cadmio (0.021 mg/L), este metal se encontró 16 veces arriba de la norma establecida (0.005 mg/L) (Gaceta Ecológica, Meybeck *et al.*, 1990). Por otro lado, cuando las raíces se expusieron por 72 h a esta muestra de agua el índice mitótico presentó un incremento significativo de 22.4 con respecto al testigo (20), mientras que el incremento de las aberraciones cromosómicas y los micronúcleos no resultó ser significativo (**Tabla IV**). Como se observa en esta tabla hay una pérdida de la respuesta a micronúcleos a las 72 h mientras que a las 24 h (**Tabla II**) se obtiene una respuesta significativa, esto se puede atribuir a:

1) La inestabilidad de los micronúcleos durante las divisiones celulares posteriores. Considerando lo anterior en el tratamiento de 72 h las células meristemáticas pasaron 2 o 3 ciclos de división en comparación con el tratamiento de 24 h, lo cual podría explicar la pérdida de los micronúcleos.

2) Que las células presentan una respuesta adaptativa que les confiere menor susceptibilidad a los daños inducidos por los agentes genotóxicos presentes en la muestra de agua. La respuesta adaptativa se ha descrito en bacterias y en células de mamífero *in vitro* y en plantas superiores. Se ha propuesto que esta respuesta enciende los mecanismos de defensa celular y de reparación del ADN, que se refleja en una disminución de micronúcleos (Patra *et al.*, 1997).



A pesar que en la prueba de *A. cepa* solamente se encontró respuesta significativa para micronúcleos, este parámetro permitió detectar genotoxicidad del agua. Es importante resaltar que a las concentraciones encontradas de los metales pesados detectados (principalmente el cadmio) ya se observa la inducción de efectos genotóxicos en las células meristemáticas de *A. cepa*, lo cual demuestra que esta prueba puede detectar daño genotóxico a concentraciones muy bajas.

En un estudio realizado por Ramos-Morales y colaboradores en 1998 se mostró que el agua del Pozo "Tierra Colorada es genotóxica en larvas de 72 h de edad en *Drosophila melanogaster* en la prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART).

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que los tratamientos de 24 y 72 h de exposición son adecuados para detectar el daño genotóxico y proporcionan información sobre la persistencia y la respuesta adaptativa a las aberraciones cromosómicas en un organismo *in vivo*.



CONCLUSIONES

1. Se demostró que la prueba de *Allium cepa* es reproducible en su respuesta.
2. Los tiempos de tratamientos prolongados de 24 y 72 h de exposición demostraron ser buenos indicadores del daño genotóxico.
3. La prueba de *A. cepa* mostró la capacidad de bioactivar un promutágeno (DMN) y así recuperar sus efectos genotóxicos.
4. El sistema de prueba pudo discernir entre los efectos genotóxicos inducidos por dos mutágenos de diferente mecanismo de acción.
5. El sistema de prueba mostró sensibilidad elevada al detectar la genotoxicidad de una muestra de agua que contiene contaminantes a concentraciones ambientales.



PERSPECTIVAS

Para estudios de monitoreo ambiental empleando a *Allium cepa* como organismo centinela, se propone utilizar tratamientos de 24 y 72 h para conocer el daño genotóxico, así como la persistencia y/o las respuestas adaptativas que los organismos puedan presentar.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdou, R.F., Megalla, S.E., Moharram, A.M., Abdel-Gawad, K.M., Sherif, T.H.I., El-syed, M.A.L. y Lottfy, A.E. (1989) Cytological effects of fungal metabolites produced by fungi isolated from Egyptian poultry feedstuffs. *J. Basic Microbiol.* 29: 131-139.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. (1994) Molecular biology of the cell. (3rd. ed.) Garland Publishing. Nueva York. Pag. 864.

Alloway, B.J. y Ayres, D.C. (1993) Chemical Principles of Environmental Pollution. London. Chapman and Hall.

Al-Sabti, K. (1989) *Allium* test for air and water borne pollution control. *Cytobios.* 59: 71-78.

Al-Sabti, K. y Kurelec, B. (1985) Chromosomal aberrations in onion (*Allium cepa*) induced for water chlorination by-products. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 34 : 80-88.

Antonsiewicz, D. (1990) Analysis of the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* under influence of Ledakrin. *Folia Histochem. Cytobiology.* 28: 79-96.

Armienta, M.A. y Rodríguez, C.R. (1993) Estudio de reconocimiento de la contaminación por Arsénico en la zona de Zimapán, Hidalgo. *Rep. Tec., Instituto de Geofísica, UNAM.*

Armienta, M.A. y Rodríguez, C.R. (1995) Evaluación de riesgo ambiental debido a la presencia de Arsénico en Zimapán, Hidalgo. Memoria final, 42 pp. Instituto de Geofísica, UNAM. Fund. MAPFRE, España.

Armienta, M.A. y Rodríguez, C.R. (1996) Arsénico en el Valle de Zimapán (México). Problemática ambiental. *MAPFRE seguridad.* 63 (3er trimestre): 33-43.

Armienta, M.A., Rodríguez, C.R., y Cruz, O. (1997 a) Arsenic content in hair of people exposed to natural arsenic polluted groundwater at Zimapán, México. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59: 583-589.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



Armienta, M.A., Rodríguez, R., Aguayo, A., Ceniceros, N. Villaseñor, G. y Cruz, O. (1997 b) Arsenic contamination of groundwater at Zimapán, México. *Hydrogeology J.* 5 (2): 39-46.

Bašić-Zaninović T., Papeš, D. y Franekić, J. (1991) Cycloheximide genotoxicity in *in vitro* and *in vivo* test systems. *Mutat. Res.* 63: 203-210.

Brusick, D. y Auletta, A. (1985) Developmental status of bioassays in genetic toxicology: A report of Phase II of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 153: 1-10.

CNA (1992) Estudio de prospección geohidrológica y exploración geofísica en la zona de Tecozautla-Vizarron, estados de Hidalgo y Querétaro. IGAMSA, informe Técnico.

Constantin, M.J. y Nilan, R.A. (1982 a) Chromosome aberration assays in barley (*Hordeum vulgare*). *Mutat. Res.* 99: 13-36.

Constantin, M.J. y Nilan, R.A. (1982 b) The chlorophyll-deficient mutant in barley (*Hordeum vulgare*). *Mutat. Res.* 99: 37-49.

Constantin, M.J. y Owens, E.T. (1982) Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assays. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 99: 1-12.

de Nava, C.C., y Maffey, L. (1986) Genetic toxicology perspectives in Latin America, in: C. Ramel, B. Lambert y J. Magnusson (Eds.), *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis*. Liss, New York. pp. 301-305.

De Robertis, E.D.P. y De Robertis, E.M.F. (1986) *Biología Celular y Molecular*. Librería El Ateneo. Editorial Buenos Aires. 628 pp.

de Serres, F.J. (1978) Introduction: Utilization of higher plant systems as monitors of environmental mutagens. *Environ. Health Perspect.* 27: 3-6.

de Serres, F.J. (1992) Preface. Higher plants as a effective monitoring system



of environmental mutagens. *Mutat. Res.* 210: 1.

Degrassi, F. y Rizzoni, M. (1982) Micronucleus test in *Vicia faba* root tips to detect mutagen damage in fresh-water pollution. *Mutat. Res.* 97: 19-33.

Dixit, G.B. y Nerle, S.K. (1985) Cytotoxic effects of industrial effluents on *Allium cepa* L. *Geobios.* 12 : 237-240.

Donnelly, K.C., Brown, K.W. y Kampbell, D. (1987) Chemical and biological characterization of hazardous industrial waste. I. Prokaryotic bioassays and chemical analysis of a wood-preserving bottom-sediment waste. *Mutat. Res.* 180 : 31-42.

El-Khodary, S., Habib, A. y Haliem, A. (1989) Cytological effect of the herbicide garlon-4 on root mitosis of *Allium cepa*. *Cytologia.* 54: 465-472.

EMS (Environmental Mutagen Society) (1976) Environmental mutagen hazards. *Science.* 187: 503-514.

Fiskesjö, G. (1981) Benzo(a)pyrene and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in the *Allium* test. *Hereditas.* 95: 155-162.

Fiskesjö, G. (1985 a) The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas.* 102: 99-112.

Fiskesjö, G. (1985 b) *Allium* test on river water from Baån and Saxån before and after closure of a chemical factory. *Ambio.* 14 (2) : 99-103.

Fiskesjö, G. (1988) The *Allium* test -an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutat. Res.* 197: 243-260.

Giménez-Martín, G. (1982) Intensidad de la replicación del ADN en el ciclo celular de los meristemas.

Gómez-Arroyo, S. y Villalobos-Pietrini, R. (1995) Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in *Vicia faba* as genetic monitor of environmental pollutants. En: *Biomonitors and biomarkers as indicators of environmental change* (F.M. Butterworth , L.D. Corkum y J. Guzmán-Rincón, Eds.). Plenum Press, Nueva



York, pp. 95-113.

Gómez-Arroyo, S., Castillo-Ruiz, P. y Villalobos-Pietrini, R. (1986) Chromosomal alterations induced in *Vicia faba* by different industrial solvents: thinner, toluene, benzene, n-hexane, n-heptane and ethyl acetate. *Cytologia*. 51: 133-142.

Gopalan, H.N.B. (1986) Genetic toxicology in Africa: Problems and perspectives, in: C. Ramel, B. Lambert y J. Magnusson (Eds.), Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetics Effects and Applied Mutagenesis, Liss, New York, pp. 283-287.

Grant, W.F. (1978) Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. *Environ. Health Perspect.* 27: 37-43.

Grant, W.F. (1982) Chromosome aberrations assay in *Allium cepa*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 99: 273-291.

Grant, W.F. (1994) The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.* 310: 175-185.

Grant, W.F., Zinov'eva, Stahevitch, A.E., y Zura, K.D. (1981) Plant genetic test systems for the detection of chemical mutagens. En: Stich, H.H. y San, R.H.C. (Eds.) *Short Term Test for the Detection of Chemical Mutagens*. Nueva York, Springer, pp. 200-216.

Grover, I.S. y Malhi, P.K. (1988) Genotoxic effects of some organophosphorus pesticides. III. *In vivo* chromosomal aberration bioassay in root meristems of *Allium* and *Hordeum*. *Cytologia*. 53: 181-191.

Gurdak, J. (1997) An aqueous geochemical characterization of an arsenic contaminated aquifer, Zimapán, México. Bates College.

Heddele, J.A. y Carrano, A.V. (1977) The DNA contents of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutat. Res.* 44: 63-69.



Hoffmann, G.R. (1982) Mutagenicity testing in environmental toxicology. *Environ. Sci. Technol.* 16 (10): 560-575.

Index Merck (1989) Encyclopedia of chemical, drugs and biologicals. Publish by Merck and Co. Inc. Rahway. N. U.S.A. 11 ed. 1606 pp.

INEGI (1990) Zimapán de Reyes, estado de Hidalgo, Cuaderno Estadístico Municipal, Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. H. Ayuntamiento de Zimapán de Reyes. 86 pp.

INEGI (1994) Zimapán de Reyes, estado de Hidalgo, Cuaderno Estadístico Municipal, Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. H. Ayuntamiento de Zimapán de Reyes. 92 pp.

IPCS/WHO. (1985) Environmental Health Criteria 51. Guide to Short Test for Detecting Mutagenic and Carcinogenic Chemical. 79-89.

Kihlman, B.A. (1966) Action of chemicals on dividing cells. Prentice Hall. New Jersey, pp. 117-138.

Kihlman, B.A. y Andersson, H.C. (1984) Root tips of *Vicia faba* for the study of the chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. Handbook of Mutagenicity Test Procedures. 2a ed. Elsevier, Amsterdam. pp. 531-554.

Kostoff, D. (1931) Heteroploidy in *Nicotiana tabacum* and *Solanum melongena* caused by fumigation with sulphate. *Bull. Soc. Bot. Bulgar.* 4: 87; *Biol. Abstr.* 8: 10 (1934).

Kumar, D. y Sinha, S.P. (1989) Threshold dose of cytogenetic toxicity of lindane, malathion and metacid in *Allium cepa* root-tip cells. *Cytologia.* 54: 547-552.

Laval, J., Boiteux, S. y O'Connor, T.R. (1990) Physiological properties and repair of apurinic/aprimidinic sites and imidazole ring-opened guanine in DNA. *Mutat. Res.* 233: 73-79.

Levan, A. (1938) The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. *Hereditas.* 24: 471-486.



Linnainmaa, K., Meretoja, T., Sorsa, M. y Vaino, H. (1978) Cytogenetic effects of styrene and styrene oxide. *Mutat. Res.* 58: 277-286.

Ma, T.-H. (1982 a) *Tradescantia* cytogenetic test (root-tip mitosis, pollen mitosis, pollen mother-cells meiosis). *Mutat. Res.* 99: 293-302.

Ma, T.-H. (1982 b) *Vicia* cytogenetic test for environmental mutagens. *Mutat. Res.* 99: 257-271.

Ma, T.-H. y Harris, M.M. (1985) In situ monitoring of environmental clastogens. En Saxena, J. (Ed.). *Hazard assessment of Chemicals: Current Developments*. Vol. 4, Academic Press, Nueva York, pp. 77-106.

Ma, T.H., Xu, Z., Xu, Ch., McConnell, H., Valtierra, R.E., Arreola, G.A. y Zhang, Hongen, Z. (1995) The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat. Res.* 334: 185-195.

Martínez, V. M. (1999) Determinación de la actividad genotóxica de dos plantas medicinales (*Thevetia thevetioides* y *Plantago major*,) en la prueba somática de las alas de *Drosophila melanogaster*. *Tesis de Licenciatura*, Facultad de Ciencias, UNAM. 58 pp.

Meybeck, M., Chapman, D. y Helmer, R. Eds. (1990) GEMS: Global Environment Monitoring System. Global Freshwater Quality. A first Assessment, WHO, UNEP, 306 pp.

Nikoloff, H. y Gecheff, K. (1976) Methods of scoring induced chromosome structural changes in Barley. *Mutat. Res.* 34: 233-244.

Nilan, R.A. (1978) Potential of plant genetic systems for monitoring and screening mutagens. *Environ. Health Perspect.* 27: 181-196.

Panda, B.B. y Sahu, U.K. (1985) Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the organophosphorus insecticide fensulfothion. *Cytobios.* 42: 147-155.



Patra, J. Panda, K.K. y Panda, B.B. (1997) Differential induction of adaptative responses by paraquat and hydrogen peroxide against the genotoxicity of metal mercuric chloride, maleic hydrazide and ethyl methane sulfonate in plant cells *in vivo*. *Mutat. Res.* 393: 215-222.

Plewa, M.J. (1982) Specific locus mutation assays in *Zea mays*. *Mutat. Res.* 99: 317-337.

Ramos Leal, S.A. (1996) Parámetros estructurales que controlan la hidrodinámica de las aguas subterráneas en el área de Zimapán, Hidalgo. *Tesis de Maestría en Ciencias de la Tierra.*, UNAM. 100 pp.

Ramos-Morales P., Ordaz, M.G., Dorantes A., Rivas, H., Campos, P., Martínez, M. y Hernández, B. (en prensa) *Drosophila* is a reliable biomonitor of water pollution, in *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change: A Handbook, Part II*. Plenum Press.

Rank, J. y Nielsen, M.H. (1993) A modified *Allium* test as a tool in the screening of genotoxicity of complex mixtures. *Hereditas.* 118: 49-53.

Rank, J. y Nielsen, M.H. (1994) Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutat. Res.* 312: 17-24.

Rao, B.V., Rao, B.G.S. y Sharma, C.B. (1988) Cytological effects of herbicides and insecticides on *Allium cepa* root meristems. *Cytologia.* 53: 255-261.

Rédei, G.P. (1982) Mutagen assays with *Arabidopsis*. *Mutat. Res.* 99: 243- 255.

Reynolds, J.E.F. (1989) Martindale; The extra pharmacopoeia, 29 ed. The Pharmaceutical Press, London. 1896 pp.

Schairer, L.A. (1978) Exploratory monitoring of air pollution for mutagenicity with the *Tradescantia* stamen hair system. *Environ. Health Perspect.* 27:51.

Schwartzman, J.B. y Cortes, F. (1977) *Chromosoma.* 62: 119-131.



Schwartzman, J.B., Cortes, F., González-Fernández, A., Gutiérrez, C. y López-Zaes, J.F. (1979) On the nature of sister-chromatid exchanges in 5-bromodeoxyuridine-substituted chromosomes. *Genetics*. 92: 1251-1264.

Sharma, C.B.S.R. (1983) Plant meristems as monitors of genetic toxicity of environmental chemicals. *Curr. Sci*. 52: 1000-1002.

Shelby, M.D. (1980) Plants as monitors for environmental mutagens. En: Worf, D.L. (Ed.). *Biological Monitoring for Environmental Effects*. Lexington Books (Health), Lexington, Ma. pp. 350-405.

Smaka-Kincl, V., Stegnar, P., Lovka, M. y Toman, M.J. (1996) The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. *Mutat. Res.* 368: 171-179.

Vant' Hof, J. y Schairer, L.A. (1982) *Tradescantia* assay system for gaseous mutagens. *Mutat. Res.* 99: 303-315.

Vedt Brat, S. (1965) Study of the chromosome in *Allium cepa*. *Chromosoma*. 15: 486-499.

Vig, B.K. (1982) Soybean (*Glycine max* [L.] merril) as a short term assays for the study of environmental mutagens. *Mutat. Res.* 99: 339-347.

Villalobos-Pietrini, R., Flores-Marquez, A.R. y Gómez-Arroyo, S. (1994) Cytogenetic effects in *Vicia faba* of the polluted water from rivers of the Tlaxcala hydrological system, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 10: 88-83.

Vogel, E. y Natarajan, A. (1979 a) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkilating agents in eukaryotic systems. I. Recessive lethal mutations and translocations in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 62: 51-100.

Vogel, E. y Natarajan, A. (1979 b) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkilating agents in eukaryotic systems. II. Total and partial sex chromosome loss in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 62: 101-123.



Yamamoto, K.I. y Yasumoto, K. (1980) A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat. Res.* 71: 127-131.