

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO CITOGÉNÉTICO INDUCIDO POR NÍQUEL EN *Vicia faba*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A

YOLANDA RAMÍREZ DELGADO

21/02/99



BAJO LA DIRECCIÓN
DE LA DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
Laboratorio de Citogenética Ambiental
CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, UNAM.

MÉXICO D.F.

1999

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
LLA DE ORIGEN



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
 AUTÓNOMA DE VENEZUELA

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

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

EFFECTO CITOGENETICO INDUCIDO POR NIVEL EN Vicia faba

realizado por YOLANDA RAMIREZ DELGADO

con número de cuenta 6208877-8 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de tesis
 Propietario Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo
 Propietario Dr. Rafael Villalobos Pietrini
 Propietario M. en C. Josefina Cortés Eslava
 Suplente Dra. María Elena Calderón Segura
 Suplente Biól. Miguel Angel Meneses Pérez

Sandra Gómez Arroyo
Rafael Villalobos Pietrini
Josefina Cortés Eslava
María Elena Calderón Segura
Miguel Angel Meneses Pérez

Consejo Departamental de BIOLOGIA

Edna Ma. Suarez D.

DRA. EDNA MA. SUAREZ DIAZ

Al ejemplo, empuje y amor de mis padres Angelita y Waldo.

Al cariño y respeto de mis hermanos: Efraín, Ma. Eugenia, Martha, Isabel, José Ubaldo y Carlos.

A la comprensión, apoyo y amor de mi esposo Humberto y de mis hijos Humberto, Ma. Yolanda y Waldo para el logro de este paso tan importante en mi vida.

A la Biól. Ma. Antonieta Navarro Torres, por su amistad, colaboración y apoyo.

A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo mi agradecimiento especial por su apoyo entusiasta y su gran calidad humana.

A la M. en C. Josefina Cortés Eslava por su valiosa asesoría en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Roberto Villalobos Pietrini, a la Dra. Ma. Elena Calderón Segura y al Biól. Miguel Angel Meneses Pérez por su apoyo para concretar este trabajo.

Con toda sinceridad agradezco a todas las personas que en algún momento me ayudaron y apoyaron para el logro de este trabajo.

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
II. 1 Metales pesados	5
II. 1. 1. Efectos citotóxicos	9
II. 1. 2. Mutagénicos	11
II. 1. 3. Carcinogénicos	13
II. 1. 4. Teratogénicos	15
II. 1. 5 Niquel	16
II. 1. 6. Efectos genéticos	19
II. 1. 7. Sistema de prueba	21
II. 1. 8. <i>Vicia faba</i>	23
II. 1. 9. Intercambios de cromátidas hermanas	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS	30
IV. RESULTADOS	33
V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	35
VI. REFERENCIAS	37
VII. TABLA I	51
TABLA II	52
TABLA III	53
VIII. FIGURA 1	54
FIGURA 2	55

RESUMEN

Se evaluó el efecto citogenético de dos sales de níquel, cloruro (NiCl_2) y nitrato $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, en las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*, mediante la prueba de intercambio de cromátidas hermanas (ICH).

Las raíces fueron expuestas durante 20 horas en una solución de bromodesoxiuridina (BrdU), fluordesoxiuridina (FdU) y uridina (U). A continuación se trataron durante 2 horas con 1, 10, 100 y 500 $\mu\text{g} / \text{L}$ de NiCl_2 y 1, 10 y 100 $\mu\text{g} / \text{L}$ de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, en seguida fueron sometidas a la mezcla de BrdU, FdU y U fresca por otras 20 horas e inmediatamente se aplicó la técnica de tinción diferencial de cromátidas hermanas con el reactivo de Schiff.

Los resultados mostraron que ambas sales incrementaron de manera significativa la frecuencia de ICHs, con respecto a la concentración y en los dos casos la mayor dosis causó inhibición de la mitosis.

Los datos mostraron que el nitrato indujo mayores frecuencias de ICHs y también mayor toxicidad.

En este trabajo, *Vicia faba* probó una vez más que es un material biológico adecuado para detectar el daño provocado por los metales pesados y que el ICHs

es un método muy sensible para conocer el efecto de dosis bajas de contaminantes ambientales.

INTRODUCCIÓN

Un gran número de los individuos de la población humana vive en un ambiente ampliamente industrializado, en donde la contaminación del medio, aumenta en forma peligrosa la dosis de agentes perjudiciales para la salud. Para analizar el efecto que la contaminación produce es necesario considerar la edad, el sexo, la alimentación y especialmente el ambiente laboral, ya que en ocasiones los metales forman parte importante de la contaminación y se ha probado que algunos metales son tóxicos.

El desarrollo moderno de la industria ha generado la dispersión de metales tóxicos en el ambiente y se han llegado a reconocer síntomas de intoxicación por diversos agentes, como los provocados a lo largo de 100 años por el plomo y el mercurio que en la actualidad virtualmente han desaparecido. En general, el problema de contaminación por metales ha cambiado de una escala local a una mundial en proporción al aumento de los mismos en el medio, enfocándose actualmente la atención a los efectos que se producen en el hombre a largo plazo, como el daño genético.

La importancia de los daños genéticos que pueden causar los diferentes agentes tóxicos presentes en el medio como por ejemplo los metales pesados y el interés por conocer las propiedades mutagénicas, carcinogénicas y teratogénicas de

éstos, ha llevado a que se prueben sus efectos en diversos sistemas tanto animales como vegetales (Sharma y Talukder, 1987).

Metales Pesados

Antecedentes

Dada la rápida industrialización actual, el peligroso incremento de la contaminación ambiental ha provocado interés acerca del estudio de los metales como factor potencial de mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis. Los metales y sus componentes forman una larga lista de contaminantes químicos, particularmente en las regiones altamente industrializadas. Los efectos dañinos de los metales en los seres vivos pueden ser observados en los niveles histológicos, celulares, subcelulares o moleculares y son modificados por diversos factores que incluyen el estado de salud de los organismos concernientes.

Los riesgos tóxicos de los metales en el hombre dependen de su toxicidad inherente, de su transferencia en el ambiente y de la asimilación del metabolismo de cada individuo (Sharma y Talukder, 1987).

En el grupo VIII B de la tabla periódica, los elementos: hierro (Fe), cobalto (Co), níquel (Ni), ruterio (Ru), rodio (Rh), paladio (Pd), osmio (Os), iridio (Ir) y platino (Pt), forman triadas de metales con actividad química similar. El hierro y el cobalto son considerados esenciales para la vida así como el níquel, mientras los otros no lo son. Sus estructuras atómicas tienen un papel dominante en su actividad biológica. En los fluidos biológicos, excepto Pd y Os, constituyen compuestos estables (Sharma y Talukder, 1987).

Los metales pueden entrar al organismo por absorción intestinal que depende de la solubilidad y las características del transporte celular; los que son inhalados permanecen por más tiempo en el organismo y son más comunes que aquellos que se ingieren. Ciertos compuestos insolubles pueden ejercer mayores efectos deteriorantes directamente a los pulmones como polvo de Cr, Ni y Be. La asimilación por la piel es posible ya que existen compuestos metálicos liposolubles (Léonard *et al.*, 1981, 1984).

Los metales se distribuyen en el cuerpo dependiendo del compuesto que formen. Los pesados a menudo se acumulan en el hígado y en los riñones. Algunos como el Mn, tienen afinidad por el sistema nervioso central o el páncreas. Muchos elementos están depositados en huesos y sus restos permanecen por largos periodos (Léonard *et al.*, 1984).

Los metales pesados son excretados en las heces fecales y frecuentemente por las glándulas salivales o biliares, otros pueden ser reabsorbidos o eliminados por la orina, piel, sudor y en algunos casos por el pulmón (mercurio metálico). La reacción de la excreción por orina o por heces fecales depende del metal y de los diferentes niveles de oxidación (Léonard, 1978).

Haciendo un seguimiento de las exposiciones crónicas de concentraciones subtóxicas de compuestos metálicos, se nota un decremento en el índice mitótico

y un incremento en las anomalías cromosómicas. Estos efectos son directamente proporcionales a las concentraciones aplicadas y la duración del tratamiento. La recuperación del organismo al tratamiento tiene una relación inversa a la concentración suministrada (Sharma y Talukder, 1987).

Los efectos del tratamiento con metales dependen de factores, como: tipo de agente, vehículo, forma de administración, sistema de prueba utilizado, desintoxicación, distribución en el organismo y retención en diferentes tejidos, interacción con sustancias exógenas y endógenas y acción con las macromoléculas biológicas (Sharma y Talukder, 1987).

En mamíferos, la actividad clastogénica de los metales dentro de cada grupo vertical de la tabla periódica es directamente proporcional al incremento del peso atómico, a la electropositividad y a la solubilidad de los cationes metálicos tanto en agua como en lípidos, excepto para Li y Ba. Este patrón de citotoxicidad inherente se incrementa en periodos sucesivos en el nivel horizontal, por la formación de complejos covalentes y de coordinados covalentes por metales pesados con las macromoléculas biológicas (Sharma y Talukder, 1987).

En plantas, la solubilidad de los metales en agua es de mucha más importancia. El grado de disociación de las sales metálicas y la tasa de absorción afecta

significativamente la frecuencia de aberraciones cromosómicas (Sharma y Talukder, 1987).

Efecto citotóxico de los metales pesados

Las alteraciones en la división celular pueden inducir el incremento de la mitosis, es decir acción mitogénica, o más frecuentemente una disminución en la frecuencia de división, presentando entonces un efecto mitostático. Una acción más severa conduce al paro de la división o a un desajuste en la separación de los cromosomas. En las plantas, la formación de la placa media entre las células puede ser también inhibida. La alta afinidad de muchos metales por los enlaces disulfuro destruyen las fibras del huso (Sharma y Talukder, 1987).

El efecto de los metales en las células es diverso, ya que pueden dañar el sistema membranoso, cambiando la permeabilidad de la célula o de la membrana mitocondrial, lo que hace variar la energía metabólica celular o modifica la estabilidad de la membrana lisosómica, lo cual trastorna la función celular a partir de la liberación de ácidos hidrolíticos (Sharma y Sharma, 1980; Sharma *et al.*, 1987).

A nivel molecular, los metales pueden interactuar con proteínas desnaturalizándolas, precipitándolas, o produciendo efectos alostéricos o alteraciones en las enzimas y en su síntesis. A menudo, los metales pueden ligarse a los ácidos nucleicos y alterar la conformación nucleoproteica. Una o ambas actividades pueden afectar la división celular y la estructura y el comportamiento del aparato mitótico. Los efectos citotóxicos de los metales han

estado y continúan recibiendo especial atención debido a la identificación de ciertos metales como carcinogénicos y teratogénicos. Los metales causantes de efectos genotóxicos generalmente son carcinogénicos (Flessel **et al.** 1980). Se presenta una correlación positiva, aunque no siempre se cumple, entre el grado de mutagenicidad de un compuesto metálico y la incidencia de malignidad, fenómeno similar a lo descrito para otros agentes químicos tóxicos (Leonard **et al.**, 1981).

Los efectos en la división celular y en la inducción de anomalías cromosómicas forman un importante criterio para la identificación del daño en sistemas genéticos (Sharma y Sharma, 1980; Hsu, 1982).

Efectos mutagénicos de los metales pesados

El conocimiento de los efectos dañinos de la contaminación industrial, ha aumentado la cantidad de publicaciones relacionadas con las propiedades mutagénicas de los metales. Dichos estudios sobre la detección de las mutaciones génicas y de las aberraciones cromosómicas se han realizado con diversos sistemas de prueba que van desde experimentos *in vitro* con microorganismos y plantas, hasta observaciones *in vivo* en animales y en el hombre (Flessel, 1978; Léonard, 1978; Kazantzis y Lilly, 1979).

Dos sistemas utilizados en bacterias son: el ensayo-Rec en *Bacillus subtilis* y mutaciones revertantes en *Escherichia coli* o el de Ames en *Salmonella typhimurium*. Los resultados positivos en el ensayo-Rec generalmente permiten identificar uniones covalentes al ADN o rompimiento del mismo, pero el modo de acción es confuso. Por el contrario, el análisis más confiable es el de *Salmonella typhimurium*, ya que es posible detectar el daño ocasionado por los compuestos por mecanismos de inducción de corrimiento del marco de lectura o por sustitución de pares de bases y se correlaciona adecuadamente con el potencial carcinogénico de los metales (Leonard *et al.*, 1984).

Las aberraciones cromosómicas y la segregación de los cromosomas después del tratamiento con metales han sido comúnmente estudiados en plantas y de acuerdo con Kihlman (1975), existe una buena correlación entre la capacidad de algunos agentes químicos para inducir aberraciones cromosómicas tanto en

plantas como en células de mamíferos. Sin embargo para los metales pesados en varios casos esto no se cumple, ya que muchos de estos reportes son muy cuestionables debido a lo inadecuado de las técnicas de evaluación utilizadas (Trepel, 1976).

Las alteraciones en los cromosomas traen cambios en su número o estructura. Los agentes causantes de rompimientos de segmentos cromosómicos son llamados clastógenos (Sharma y Talukder, 1987).

Efectos carcinogénicos de metales pesados

El desarrollo de tumores es un proceso que se realiza en varias etapas y su inducción puede darse a partir de distintos factores promotores del crecimiento de las células. La probabilidad de que un tumor surja depende de las concentraciones. Ciertos compuestos insolubles de cromo, níquel y berilio son mucho más carcinogénicos que los solubles si se aplican en altas concentraciones y tiempo prolongado a las células blanco, lo cual puede ser debido a las propiedades fisicoquímicas y superficiales de este material o a una acción selectiva en ciertas células cuando entran en contacto (Leonard *et al.*,1984).

La información acerca de los efectos carcinogénicos de los metales se origina de estudios epidemiológicos, en investigaciones experimentales con animales o de pruebas mutagénicas en microorganismos. Un resultado positivo de *Salmonella typhimurium* o ensayos similares son una buena fuente de información acerca de una sustancia que implica riesgo carcinogénico pero estos no representan evidencia absoluta. Cuando se observan tumores en distintas especies y/o diversos tejidos, se deberá considerar la presencia de un agente carcinogénico a pesar de no contar con datos en el caso de los humanos. Es mucho más difícil juzgar la relevancia de un tumor solitario en un órgano y en una sola especie, como los tumores renales en ratas después de administrarles plomo (Leonard *et al.*, 1981).

Los estudios epidemiológicos sobre la inducción de cáncer en el hombre tienen los mismos inconvenientes que los de las aberraciones cromosómicas en linfocitos circulantes: la exposición es raramente confinada a un solo agente y los testigos apropiados son difíciles de encontrar (Leonard *et al.*, 1984).

Efectos teratogénicos de los metales pesados

Los organismos superiores son durante el desarrollo son particularmente susceptibles a la acción de ciertos metales pesados. Todas las fases del desarrollo pueden ser afectadas. Sin embargo las malformaciones ocurren principalmente cuando el agente actúa en el periodo de organogénesis (hasta el día 13 en ratones y 60 en el hombre). Posteriormente, durante la etapa fetal y antes del alumbramiento, surgen cambios sutiles en el desarrollo. En todos los casos es necesario considerar, factores maternos, equilibrio hormonal y funciones de placenta, ya que juegan un papel importante. La acción de los metales después de la implantación, está determinada por la capacidad de alcanzar al feto, dado que sólo algunos iones metálicos logran cruzar la barrera placentaria, como el cromo que lo hace sólo en forma de compuesto orgánico (Leonard *et al.*, 1981,1984).

A pesar de que los efectos carcinogénicos de los metales en organismos superiores han sido estudiados en menor medida se han obtenido datos experimentales en roedores y pollos las malformaciones detectadas generalmente involucran al esqueleto o malformaciones en el sistema nervioso central y el sistema ocular. Los datos epidemiológicos generalmente son poco confiables, pero algunos estudios donde mujeres embarazadas continuaron trabajando en ambientes contaminados o ciertos agentes fueron utilizados como abortivos, proveen información útil (Leonard *et al.*, 1984).

Níquel

Entre los metales reconocidos como cancerígenos se encuentra el níquel (Ni) del cual se producen anualmente en el mundo alrededor de 825,700 toneladas, de las que aproximadamente el 47% son empleadas en aleaciones con el acero, 21% en otras aleaciones, 13% en electroplateado y el 19% restante en monedas, compuestos para la catálisis química, cerámica, baterías, circuitos eléctricos, tintaciones de vidrio y propileno (Stokinger, 1981), así como en incrustaciones dentales y en prótesis metálicas (Elves *et al.*, 1975).

Del níquel la comida es el medio más común de contacto para las personas que no están expuestas a él en su actividad profesional. El promedio diario de asimilación de níquel en alimentos ha sido estimado en 250 μg ; la concentración del mismo en agua potable debe ser menor a 20 $\mu\text{g/litro}$ (NAS, 1975). El contenido de níquel en el aire rural y en el suburbano no debe exceder de 70 y 80 $\mu\text{g} / \text{m}^3$, respectivamente, pero las industrias emisoras de níquel pueden arrojar al medio cerca de 200 ng / m^3 . El níquel que se encuentra en el aire se origina principalmente de la combustión en automóviles, carbón y petróleo. Los cigarrillos contienen un promedio de 2.3 μg de níquel por cigarrillo (Sunderman, 1961). Los peligros de la exposición al níquel para el grueso de la población son parecidos a los originados por el cromo, aumentan los riesgos de alergia y puede inducir tumores en los senos nasales y pulmonares (Leonard *et al.*, 1984).

Las sales de níquel son absorbidas por el tracto gastrointestinal (aprox. 5%). Su entrada por medio del aire es significativa sólo en casos de constante exposición ; la remoción de materiales en los pulmones depende de la solubilidad de los mismos y es más lenta en el caso de níquel metálico o sus óxidos que son insolubles, las sales solubles se eliminan a mayor velocidad. Este metal alcanza altas concentraciones en el esqueleto, hígado y riñones y en la sangre es enviado a la macroglobulina como "níqueloplasmina", excretado principalmente por la orina y comparativamente con otros metales pesados (exceptuando al cromo) permanece poco tiempo en el organismo, aproximadamente una semana (Leonard, 1978; Leonard *et al.*, 1984).

Exposiciones agudas a carbonato de níquel pueden provocar síntomas severos generalizados, como dolores de cabeza, delirio, edema pulmonar y muerte repentina; la ingestión oral de níquel es más dañina. Es responsable de cerca del 5% del eczema en el hombre y alrededor del 10% de la población evaluada es potencialmente alérgica (Leonard *et al.*, 1984).

El níquel es un metal necesario para el metabolismo celular en mamíferos, ya que su carencia retrasa el crecimiento (Schneegg y Kirchgessner, 1975) y produce anemia debido a que reduce la concentración de hemoglobina e inhibe la absorción intestinal de hierro (Sunderman, 1977), pero es indispensable para la biosíntesis de enzimas como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Kirchgessner y Schneegg, 1977).

Por otra parte, se han descrito varias proteínas que transportan al níquel en el organismo, destacando entre ellas la albúmina (Peters, 1977); de igual manera, se han detectado sustancias en la fracción ultrafiltrable del suero que transportan al níquel intracelularmente, como son la histidina y el ácido aspártico (Soestbergen y Sunderman, 1972).

El níquel puede causar la muerte y varias anomalías en los embriones de pollo (Ridgway y Karnofsky, 1952; Gilani y Marano, 1980). La administración de níquel a ratas preñadas por vía oral no produce malformaciones, pero incrementa la mortalidad prenatal y natal de las crías y reduce el crecimiento (Schroeder y Mitchener, 1971; Ambrose *et al.*, 1976; Nadenko *et al.*, 1979). Cabe señalar, que la administración de níquel en ratones antes de la implantación puede producir malformaciones al nacimiento (Storeng y Jonsen, 1980, 1981). Defectos como el deterioro cístico pulmonar, se presentan en los cuyos al inhalar níquel antes de la implantación (Sunderman *et al.*, 1979). También se ha descrito la inducción de malformaciones en el ojo (anoftalmia y microftalmia) surgidos en la progenie de ratas después de ser tratadas con níquel (Sunderman *et al.*, 1980).

Efectos genéticos

Con respecto a su acción a nivel genético se ha mencionado que el modo de administración influye en los resultados. La inyección crónica intraperitoneal de sulfato de níquel (3-6 mg/Kg) en ratas de 7 a 14 días no provoca aberraciones en las células de la médula ósea (Mathur *et al.*, 1978), mientras que el suministro crónico oral aumenta el índice mitótico, la frecuencia de rompimientos cromosómicos y disturbios en el huso acromático (Sanyal *et al.*, 1980).

En plantas, Komczynnski *et al.* (1963) confirmando resultados previos de Glaess (1955, 1956 a,b), demuestran que $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, NiCl_2 y NiSO_4 producen alteraciones nucleares y aberraciones cromosómicas en *Vicia faba*. El tratamiento con NiSO_4 en las células de la raíz de la *Allium cepa* da como resultado una contracción de sus cromosomas (Singh, 1979).

Los huecos cromosómicos, se incrementaron en un grupo pequeño de trabajadores expuestos a Ni_3S_2 , NiO , NiCl_2 , y NiSO_4 pero no los ICHs (Wakswik *et al.*, 1984), sin embargo no se mencionan cuantas células fueron registradas, por lo que estos datos no son concluyentes.

El níquel, particularmente como sulfuro, aparece como un clastógeno débil, sus efectos dependen del grado de asimilación y de la concentración usada. (Leonard *et al.*, 1989).

Los resultados de otros estudios mutagénicos han sido revisados en detalle por Léonard *et al.* (1984) y son resumidos en la tabla I.

Sistemas de prueba

En virtud de que no es ético realizar experimentación directa en el hombre se han utilizado una serie de sistemas biológicos de prueba.

Las investigaciones sobre el comportamiento de los cromosomas de las plantas superiores constituyen un excelente criterio de evaluación para conocer el posible efecto que pueden ocasionar contaminantes ambientales, ya que se ha establecido una alta correlación con los resultados obtenidos en otros organismos. El creciente interés por establecer el daño genético inducido por agentes mutagénicos ambientales ha estimulado la revisión de la utilidad de una extensa variedad de plantas (de Serres y Shelby, 1978).

En los vegetales superiores es posible observar un espectro amplio de interacciones genéticas que incluyen mutaciones y aberraciones cromosómicas. Y además tienen gran diversidad de aplicaciones en el estudio del ambiente, como la determinación del efecto de materiales de desecho mutagénico provenientes de industrias que los descargan en arroyos y ríos o de contaminantes atmosféricos en medios rurales urbanos. Los vegetales pueden servir no sólo para elucidar la mutagenidad del compuesto original sino también para activarlos metabólicamente y con esto facilitar la detección del efecto de sus metabolitos, muchos de los cuales son similares a aquellos encontrados en organismos animales completos. Otra de las ventajas de las plantas superiores como sistema de prueba es que no

están restringidas al laboratorio y son usadas en el campo y por su fácil manejo pueden utilizarse para el monitoreo de mutágenos ambientales tanto de tipo físico (radiaciones ionizantes) como químico (metales, disolventes, plaguicidas etc.) (Grant 1982, Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1995, Villalobos-Pietrini *et al.*, 1994).

Vicia faba

Es muy común que las investigaciones sobre los efectos mutagénicos de agentes químicos se lleven a cabo con ***Vicia faba*** más que con cualquier otra especie vegetal ya que sus grandes cromosomas son ideales para la observación de los efectos genéticos de la radiación así como de los agentes químicos (Gómez-Arroyo *et al.*, 1986).

Más de un tercio de los estudios realizados en plantas superiores para valorar daños cromosómicos han sido desarrollados en ***Vicia faba***, debido a que es muy eficiente (Shelby, 1976). Existen numerosos experimentos para la detección de aberraciones cromosómicas producidas en sus células (Glaess, 1956 a,b; Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1983; Gómez-Arroyo *et al.*, 1985, 1986) y también ha sido ampliamente utilizada en pruebas de intercambio de cromátidas hermanas (Kihlman, 1975; Kihlman y Kronborg, 1975; Gómez-Arroyo y Castillo-Ruiz, 1985; Gómez-Arroyo *et al.*, 1988 a,b 1989; Xing y Zhang 1990; Zhang *et al.*, 1991) e incluso fue propuesta como sistema de prueba citogenética para mutágenos ambientales en el Gene-Tox Program (Ma, 1982).

Desde los primeros estudios sobre la existencia del intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en los cromosomas de plantas, reportados por Taylor *et al.* (1957) se empleó a ***Vicia faba*** como material experimental. Posteriormente se han efectuado numerosas investigaciones para explorar los mecanismos de formación

de los ICHs, así como para detectar mutágenos y/o carcinógenos potenciales (Gómez-Arroyo *et al.*, 1997).

Sus cromosomas son de gran tamaño y su número no es elevado $2n=12$ lo cual la hace muy útil en los estudios de citogenética (Evans y Scott, 1964; Ma, 1982). Su cariotipo está constituido por seis pares de cromosomas el más grande corresponde a cromosomas metacéntricos (M-cromosomas), que poseen un gran satélite y con una longitud de casi el doble de la de los otros cinco pares denominados subacrocéntricos (S-cromosomas). Su ciclo celular es de: 19.3 horas a 19°C de temperatura, del cual, 4.9 horas se consideran en el período presintético (G₁), la síntesis del ADN (S) se realiza en 7.5 horas, el período postsintético (G₂) en 4.9 horas y la mitosis (M) en 2 horas (Evans y Scott, 1964).

El uso de ***Vicia faba*** como bioensayo para determinar la genotoxocidad de mutágenos ambientales ha tenido buena correlación con bacterias y mamíferos (de Kergammeaux *et al.*, 1983), como sistema de ensayo es barato, fácilmente manipulable y además no requiere de equipo sofisticado.

Las investigaciones en ***Vicia faba*** como biomonitor citogenético de contaminantes ambientales, se han basado en su sensibilidad a ensayos de tratamiento corto (Grant, 1982; Grant *et al.*, 1992) y como la metodología se ha estandarizado, los

resultados entre diferentes laboratorios son comparables (Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1995).

Intercambio de cromátidas hermanas (ICH)

El ICHs involucra un intercambio simétrico en un lugar dado entre cromátidas hermanas sin alterar la morfología del cromosoma (Perry y Evans, 1975). Este fenómeno es considerado como indicador de la presencia de lesiones en el ADN, por ello la prueba ha sido utilizada para evaluar el efecto de mutágenos (Perry y Evans 1975, Stetka y Wolff 1976). Se han desarrollado diferentes procedimientos para distinguir las cromátidas hermanas entre los que se cuenta el de fucsina leucobásica descrita por Tempelaar *et al* .(1982), y consiste en la exposición de las células a 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdUrd), un análogo de la timina, de tal manera que los cromosomas de la segunda mitosis poseen una cromátida sustituida por BrdUrd en una hebra de ADN, mientras que su cromátida hermana es sustituida en sus dos hebras por BrdUrd para posteriormente ser teñidas diferencialmente con el reactivo de Schiff. Debido a que las plantas no incorporan eficientemente la BrdUrd se agregan otros además los análogos fluordesoxiuridina (FdUrd) y uridina (Urd) (Kihlman y Kronborg, 1975).

Algunos estudios han evidenciado que el proceso de ICHs, requiere que la célula pase por la etapa de síntesis (S) del ADN (Wolf, 1974) y se ha sugerido que es durante o inmediatamente después de que se ha formado la horquilla de replicación, cuando se lleva a cabo el intercambio de doble banda entre las cadenas de ADN (Kato, 1980). Con respecto a las causas se plantea que el ICHs puede ser inducido por una multitud de circunstancias como daño al ADN (Perry y Evans, 1975; Nakanishi y Schneider, 1979), inhibición del proceso de síntesis del

ADN (Ishii y Bender, 1980; Rainaldi y Mariani, 1982), supresión de las enzimas involucradas en dicho proceso (Ishii y Bender, 1980) o inhibición de enzimas involucradas en la respiración (Oikawa *et al.*, 1980; Morgan y Cleaver, 1982).

Se ha demostrado que al coincidir la inducción de los daños con el inicio de la fase S, se obtiene el incremento en la frecuencia de ICHs (Latt y Loveday, 1978; Schvartzman y Gutiérrez, 1980). Estas observaciones han conducido a considerar que los ICHs se forman como consecuencia del daño en el ADN que altera el patrón de replicación.

También se ha probado la eficiencia de *Vicia faba* en la determinación del daño cromosómico por compuestos químicos mutagénicos con la prueba de ICHs. Mediante esto es posible detectar el efecto provocado por concentraciones hasta diez veces menores que los requeridos para producir aberraciones cromosómicas de compuestos promotores de cáncer (Kato, 1974; Latt *et al.*, 1981; Takehisa, 1982).

El primero en describir la frecuencia de ICHs recíprocos involucrando material de dimensiones menores del diámetro total de la cromatina en *Vicia faba* fue Kihlman (1975). Posteriormente estos minúsculos ICHs parecidos a puntos fueron analizados en *Allium cepa* (Schvartzman y Cortés, 1977; Schvartzman *et al.*, 1978; Cortés *et al.*, 1983 a, b).

La cantidad de ICHs es proporcional a la longitud del cromosoma, por lo que en las especies que presentan grandes cromosomas, se muestran más ICHs (Ikushima y Wolff, 1974; Bloom y Hsu, 1975; Kihlman y Andersson, 1982).

En conclusión, los ICHs son una consecuencia de la alteración de los patrones de replicación del ADN que no conducen a la muerte celular (Schvartzman *et al.*, 1978).

Vicia faba ha probado ser un sistema sensible y confiable para la detección de ICHs inducidos por agentes químicos (Xing y Zhang, 1990; Zhang *et al.*, 1991), sin embargo, Kihlman y Andersson (1982) describen que esta prueba en sistemas vegetales puede ser inexacta, ya que no se considera el metabolismo. Recientemente se ha demostrado que las plantas poseen sistemas enzimáticos para metabolizar y transformar sustancias no mutagénicas a mutagénicas tan eficientes como los del hígado de mamíferos (Plewa y Gentile, 1982; Takehisa *et al.*, 1988; Gómez-Arroyo *et al.*, 1995).

Como se menciona anteriormente entre los metales reconocidos como cancerígenos se encuentra el níquel (Ni), ya que se ha demostrado que induce cáncer en animales de laboratorio (National Research Council, 1975; International Agency for Research on Cancer, 1976) e incrementa la posibilidad de que se presente esta enfermedad en individuos expuestos ocupacionalmente (NIOSH,

1977) por lo que es de suma importancia estudiar sus efectos y el de sus derivados en los seres vivos, por ello en este trabajo se pretende establecer el efecto que a nivel citogenético producen las sales de níquel, cloruro y nitrato, en ***Vicia faba*** mediante el análisis de intercambio de cromátidas hermanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron semillas de *Vicia faba* (variedad minor) que se lavaron con agua corriente durante dos horas; se mantuvieron en la obscuridad durante veinticuatro horas a temperatura constante (21° C) sumergidas en agua, con el propósito de acelerar su germinación, se lavaron nuevamente por diez minutos en agua corriente y se colocaron entre dos capas de algodón humedecido; se mantuvieron en la obscuridad hasta la aparición de las radículas y se les removi6 la testa para evitar la contaminación por hongos.

Cuando las raíces alcanzaron de dos a tres centímetros se introdujeron en una solución 10 μM de 5-Bromodesoxiuridina (5-BrdUrd) 0.1 μM de 5-Fluordesoxiuridina (5-FdUrd) y 5 μM de Uridina (Urd), durante un ciclo de replicación (20 horas) a 19°C, utilizando un tubo de ensayo de 5 ml en gradillas con tapa, para evitar la exposición a la luz.

Transcurridas las veinte horas, se trataron en promedio ocho plántulas por concentración: 1, 10, 100 y 500 $\mu\text{g/L}$ de cloruro de níquel (NiCl_2) y 0, 1, 10 y 100 $\mu\text{g/L}$ de nitrato de níquel $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$. Estas cantidades fueron determinadas por experiencias previas. Durante el tratamiento de dos horas, las raíces de las plántulas testigo permanecieron sumergidas en agua destilada. Posteriormente, las raíces se colocaron en la solución de BrdUrd, FdUrd y Urd fresca durante un segundo ciclo de replicación, después del cual se cortaron dos milímetros a partir

de la punta y a continuación se expusieron durante tres horas a colchicina 0.05% en la oscuridad.

Los cortes se fijaron con acético glacial durante una hora a temperatura ambiente y se transfirieron a etanol-ácido acético (3:1) a 4°C durante 48 horas. Para iniciar la tinción los cortes se pusieron en etanol al 70% a 28°C por 15 minutos, se hidrolizaron con HCl 5N durante 80 minutos en baño maría a 28°C, se enjuagaron con agua destilada, tres veces cuando menos y se secaron perfectamente, se tiñeron con el reactivo de Schiff durante 12 minutos en la oscuridad. Los cortes se trataron con pectinasa al 2% disuelta en amortiguador de citratos (pH 4.7) durante 15 minutos a 28°C. En seguida se pusieron en ácido acético al 45% por 10 minutos y se sometieron a etanol al 70% frío por 30 minutos. El aplastamiento en monocapa se llevó a cabo con dos gotas de ácido acético al 45% y las preparaciones fueron hechas permanentes por la técnica de hielo seco (Conger y Fairchild, 1953), deshidratando con dos cambios de butanol y se montaron en bálsamo de Canadá.

La interpretación de los datos se hizo de acuerdo con el criterio de Kihlman y Kronborg (1975) en 50 cromosomas metacéntricos y 250 subacrocéntricos, que son equivalentes a 25 metafases, además con el propósito de comprobar la validez de los resultados se hizo una repetición del experimento. Con el fin de evitar prejuicios en los análisis las preparaciones fueron reetiquetadas, de tal manera, que el observador no supiera a que grupo pertenecían.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Newman Keuls para verificar la existencia de diferencias significativas con respecto al testigo y cada concentración de níquel.

RESULTADOS

Se probó el efecto de dos sales de níquel; cloruro y nitrato, se realizó un experimento y su réplica con cada una de ellas, en vista de que no se encontraron diferencias significativas entre réplicas al aplicar las pruebas de t de Student, se promediaron ambos valores para cada una de las sales (Tablas II y III).

En la tabla II se presentan los resultados obtenidos con el cloruro de níquel a concentraciones de 1, 10, 100 y 500 $\mu\text{g/L}$, notándose que conforme aumenta la concentración se incrementó la frecuencia de ICHs y en la mayor concentración se produjo inhibición de la división celular, por lo que no se evaluaron los ICHs.

En el caso del nitrato de níquel, se observaron mayores frecuencias de ICHs que con el cloruro, manifestándose también elevación al aumentar la concentración, además la toxicidad fue más evidente, ya que a partir de 10 $\mu\text{g} / \text{L}$ se provocó la inhibición de la división celular (Tabla III).

En ambas sales de níquel, al aplicar el análisis de varianza (ANOVA), se obtuvieron valores de F con $p < 0.0001$ al contrastar todos los grupos, por lo cual se procedió a utilizar la prueba de comparación múltiple de Newman Keuls entre

cada concentración y el testigo, siendo en todos los casos significativo con $p < 0.001$.

Se realizó el ajuste de los datos con el fin de obtener las rectas de regresión y las pendientes, observándose que para el caso del cloruro de níquel, la pendiente fue de 0.06 (Fig. 1), mientras que para el nitrato esta fue de 1.89 (Fig. 2).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

A partir de los primeros experimentos que se hacen en *Vicia faba* sobre los efectos cromosómicos de los metales pesados (Glaes, 1956 a,b; Degraeve, 1971) se ha demostrado su sensibilidad. En análisis posteriores, utilizando la prueba de intercambio de cromátidas hermanas para evaluar el daño ocasionado por metales pesados en la misma planta, se corrobora dicha sensibilidad (Gómez-Arroyo *et al.*, 1988 a,b, 1989, 1995,1997).

Los datos obtenidos en esta investigación demuestran que tanto el cloruro como el nitrato de níquel incrementan de manera significativa la frecuencia de ICHs, siendo más efectivo el nitrato aunque también más tóxico (Tablas II y III). Al calcular las rectas de regresión se observa que la pendiente es mayor en el caso del nitrato de níquel lo cual implica que tiene una mayor potencia mutagénica que el cloruro, donde se nota un comportamiento casi asintótico (Figs. 1 y 2)

Estos datos coinciden con los encontrados con cloruro y nitrato de cadmio, en donde también el nitrato es más efectivo en la inducción de ICHs en *Vicia faba* (Gómez-Arroyo *et al.*, 1989), pero difieren de los descritos por Bedolla-Cansino (1997), de que el cloruro de cobalto provoca mayores frecuencias de ICHs que el nitrato en *Vicia*.

Con respecto a la acción de ambas sales, los datos encontrados en la Literatura son contradictorios, ya que el cloruro de níquel en los ensayos en *Bacillus subtilis* (Nishioka 1975) *Escherichia coli* (Green *et al.* ,1976) y *Salmonella typhimurium* (Bulsemainer *et al.* , 1972) y de mutaciones génicas en células de mamífero *in vitro* (Miyaki *et al.*, 1977) y de aberraciones cromosómicas (Paton y Allison, 1972) se obtuvieron resultados negativos, lo mismo que en personas ocupacionalmente expuestas a este compuesto (Umeda y Nishimura, 1979), mientras que en *Vicia faba* induce aberraciones cromosómicas (Glaes, 1955, 1956 a). En el caso del nitrato de níquel los estudios realizados en los que se prueba esta sal, son escasos, observándose que provoca aberraciones cromosómicas en *Vicia faba* (Glaes 1955, 1956 a,b) lo que coincide con los resultados encontrados en este trabajo, donde se demuestra que tanto el $NiCl_2$ como el $Ni(NO_3)_2$ son buenos inductores de ICHs (Tablas II y III)

Para las plantas, la solubilidad de los agentes químicos en agua es de mayor importancia que en los mamíferos. La asimilación de metales está relacionada a la endocitosis celular (Steinman *et al.*, 1983; Huebner *et al.*, 1985). En general, en las plantas los cationes y la disociación gradual de sales metálicas afecta la cantidad de aberraciones. Los efectos en los cromosomas pueden ser o no debidos a la interacción con el ADN pero son responsables de la creación de condiciones celulares generadoras de alteraciones mitóticas. El metal puede interactuar con los enlaces disulfuro en el citoplasma y provocar anomalías del uso mitótico. Muchos de estos disturbios se hallan en esta categoría. Los

metales también constituyen complejos ligados con grupos cíclicos u otros metales. Esta formación de complejos pueden alterar nuevamente la composición y la viscosidad citoplásmica, lo que conduce tanto a efectos clastogénicos como trastornos disfuncionales.

A pesar de que se ha descrito para las plantas que el pH de las soluciones (de 6 a 8) y el tipo de anión usado (cloruro, bromuro, ioduro, nitrato, sulfato y acetato) no influye en los resultados (von Rosen, 1954; Degraeve, 1971), en esta investigación la clase de anión fue importante, debido a que el nitrato causa mayores frecuencias de ICHs y más toxicidad que el cloruro (Tablas II y III), lo que puede estar relacionado con los diferentes mecanismos de entrada de las sales a las células, ya que el ingreso del nitrato ocurre generalmente por transporte activo, estimulado por la ATPasa, pero para el cloruro, el tipo de transporte no se ha establecido, excepto en plantas que viven en lugares muy salinos (Clarkson, 1984), posiblemente el níquel en forma de nitrato tiene mayor facilidad de penetración lo que redundo en el incremento de las frecuencias de ICHs.

Referencias

Ambrose, A.M., Larson, P.S., Borzelleca, J.F. y Hennigar, G.R. Jr. (1976). Long term toxicologic assessment of nickel in rats and dogs. *J. Food Sci. Technol.* **13**, 181-187.

Bedolla-Cansino, R. M. (1997). **Intercambio de cromátidas hermanas inducidos por cobalto y zinc en *Vicia faba***. Tesis de Licenciatura en Biología, ENEP-Iztacala, UNAM Edo. de Méx.

Bloom, S. E. y Hsu, T. C. (1975). Differential fluorescence of sister chromatids in chicken embryos exposed to 5-bromodeoxyuridine. *Chromosoma* **51**, 261-267.

Bulsermainer von, W., Rochrborn, G. y Propping, P. (1972). Mutagenitacts Untersuchungen mit Pesticiden im Host-mediated assay aud mit an der Maux. *Biol. Zentralhl.* **91**, 311-325.

Clarkson, D.T. (1984). Ionic relation. En: ***Advanced plants physiology***. Pitman Pub. Londres, 337p.

Conger, A. D. y Fairchild, L.M. (1953). A quick-freeze method for making smear slides permanents. *Stain. Technol.* **28**, 280-283.

Corbett,T.H., Heidelberger, C. y Dove, W.F. (1970). Determination of the mutagenic activity to bacteriophage T4 of carcinogenic and noncarcinogenic compounds. *Mol. Pharmacol.* **5**, 667-669.

Cortés, F., Escalza, P., Rodríguez-Higueras, J. M. y Muñoz-García, J. (1983a). Frequency and distribution of spontaneous and induced SCEs in BrdU-substituted satelized chomosomes of ***Allium cepa***. *Mutat. Res.* **109**, 249-257.

Cortés, F., Escarza, P. y Rodríguez-Higuera J. M. (1983b). Insight of plant chromosome structure provided by the FPG technique. *Exp. Cell Res.* **147**, 221-225.

de Kergameaux, D.J., Grant, W.F. y Sandhu, S.S. (1983). Clastogenic and physiological response of chromosomes to nine pesticides in the *Vicia faba in vivo* root tip assay system. *Mutat. Res.* **124**, 69-84.

de Serres, F.J. y Shelby, M.D. (1978). Higher plant systems as monitors of environmental mutagens. *Environ. Health Perspect.* **27**, 1-206.

Degraeve, H. (1971). Modification des effets du méthane sulfonate d'éthyle au niveau chromosomique. I. Les ions métalliques. *Rev. Cytol. Biol. Veget.* **34**, 233-244.

Elves, M.W., Wilson, J.N., Scales, J.T. y Kemp, H.B. (1975). Incidence of metal sensitivity in patients with total joint replacements. *Brit. Med. J.* **4**, 376-378.

Evans, H. J. y Scott, D. (1964). Influences of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by X-rays and maleic hydrazide in *Vicia faba*. *Genetics* **48**, 17-38.

Flessel, C. P. (1978). Metals as mutagens. En: *Inorganic and nutritional aspects of cancer*. Shauze, G. (Ed.). Plenum Press. Nueva York, pp. 117-128.

Flessel, C.P., Furst A. y Radding, S. B. (1980). A comparison of carcinogenic metals. En: *Metal ions in biological systems* Siegel, H. (Ed.), Vol 10. Marcel Dekker, Nueva York, pp. 23-54.

Gilani, S. H. y Marano, M. (1980). Congenital abnormalities in nickel poisoning in chick embryos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **9**, 17-22.

Glaess, E. (1955). Untersuchungen ueber die Einwirkung von Schwermetallsalzen auf die Wurzelspitzenmitose von *Vicia faba*. Z. Bot. **43**, 359-403.

Glaess, E. (1956a). Untersuchungen ueber die Einwirkung von Schwermetallsalzen auf die Wurzelspitzenmitose von *Vicia faba*. Z. Bot. **44**, 1-58.

Glaess, E. (1956b). Die Verteilung von Fragmentation und achromatischen Stellen auf den Chromosomen von *Vicia Faba* nach Behandlung mit Schwermetallsalzen. Chromosoma **8**, 260-284.

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

Gómez-Arroyo, S. y Castillo-Ruiz, P. (1985). Sister chromatid exchanges induced by thinner in *Vicia faba*. Contam. Ambient. **1**, 17-23.

Gómez-Arroyo, S., Baiza, A.M., López, G. y Villalobos-Pietrini, R. (1985). A comparative study of the cytogenetic effects of insecticides heptachlor, malathion and methyl parathion in *Vicia faba*. Contam. Ambient. **1**, 7-16.

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.

Gómez-Arroyo, S., Castillo-Ruiz, P., Cortés-Eslava, J. y Villalobos-Pietrini, R. (1988a). *Vicia faba*-sister chromatid exchanges of the organophosphorus insecticides methyl parathion, dimethoate, oxydemeton methyl, azinphos methyl and phoxim. Cytologia **53**, 627-634.

Gómez-Arroyo, S., Hernández-García, A. y Villalobos-Pietrini, R. (1988b). Induction of sister chromatid exchanges in *Vicia faba* by arsenic-contaminated drinking water. *Mutat. Res.* **208**, 219-224.

Gómez-Arroyo, S. Abarca-Hernández, J.C., Cortés-Eslava, J. y Villalobos-Pietrini, R. (1989). Sister chromatid exchanges induced by cadmium in *Vicia faba*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **5**, 71-82.

Gómez-Arroyo, S. y Villalobos-Pietrini, R. (1995). Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in *Vicia faba* as genetic monitors of environmental pollutants. En: *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change*. Butterworth, F.M., Corkum, L.D. y Guzmán-Rincón, J.(Eds.). Plenum, Nueva York, Vol. **8**, pp. 95-113.

Gómez-Arroyo, S., Calderón-Segura, M.A., Villalobos-Pietrini, R. (1995). Sister chromatid exchanges in human lymphocytes induced by propoxur following plant activation by *Vicia faba*. *Environ. Mol. Mutagen.* **26**, 324-330.

Gómez-Arroyo, S., Armienta, M. A., Cortés-Eslava, J. y Villalobos-Pietrini, R. (1997). Sister chromatid exchanges in *Vicia faba* induced by arsenic. Contaminated drinking water from Zimapan, Hidalgo, México. *Mutat. Res.* **394**, 1-7.

Grant, W.F. (1982). Plant mutagen assays based upon chromosome mutations. En: *Environmental mutagenesis, carcinogenesis and plant biology*. Klekowsky, E.J. (Ed.), Plaeeger, Nueva York, Vol.I, pp. 1-24.

Grant, W. F., Lee, H. G., Logan, D.M. y Salomone, M.F. (1992). The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the in situ detection of mutagens in an aquatic environment. *Mutat. Res.* **270**, 53-64.

Green, M.I., Muriel, W.J. y Bridges, B.A. (1976). Use of a simplified fructuations test to detect low levels of mutagens. *Mutat. Res.* **38**, 33-42.

Hsu, T.C. (1982). "Cytogenetic assays of environmental mutagens." Totowa, N. J. (Ed.) Allenheld, Osmun.

Huebner, R., Depta H. y Robinson, D.G. (1985). Endocytosis in maize root cap cells. Evidence obtained using heavy metal salt solutions. *Protoplasm* **129**, 214-222.

Ikushima, T. y Wolff, S. (1974). Sister-chrmatid exchanges induced by light flashes to 5-bromodeoxyuridine and 5-iododeoxyuridine-substituted Chinese hamster chromosomes. *Exp. Cell Res.* **87**, 15-19.

International Agency for Research on Cancer (1976). Nickel and nickel compounds. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man. Lyon, Vol. 11, pp. 75-112.

Ishii, Y. y Bender, M.A. (1980). Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet lighth induced sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* **79**, 19-32.

Kato, H. (1974). Induction of sister chromatid exchanges and its possible relevance to DNA repair. *Exp.Cell Res.* **85**, 239-249.

Kato, H. (1980). Evidence that the replication point is the site of sister chromatid exchange. *Cancer Genet. Cytogenet.* **2**, 69-77.

Kazantzis, G. y Lilly, L. J. (1979). Mutagenic and carcinogenic effects of metals. En ***Handbook on the toxicology of metals***. Friberg, L. Nordberg, G.F. y Vouk V.B.(Eds.) Elsevier, North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 237-272.

Kihlman, B.A. (1975). Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* **31**, 401-412.

Kihlman, B.A. y Kronborg, D. (1975). Sister chromatid exchanges in *Vicia faba*. I. Demonstration by modified fluorescent plus Giemsa (FPG) technique. *Chromosoma* **51**, 1-10.

Kihlman, B. A. y Andersson, H. C. (1982). Sister chromatid exchanges in plants. En: ***Handbook of mutagenicity test procedures***. Kilbey, B.J., Leggator, M., Nichols, W. y Ramel, C. (Eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 531-554.

Kirchgessner, M. y Schnegg, A. (1977). Malate deshydrogenase and glucose -6-phosphate activity in liners of nickel deficient rats. *Bioinorg. Chem.* **18**, 343-348.

Komczynnski, I., Novak, H. y Reyniak, I. (1963). Effect of cobalt, nickel and iron on mitosis in the roots of the broad bean (*Vicia faba*) *Nature (Londres)* **198**, 1016-1017.

Latt, S. A. y Loveday, K. S. (1978). Characterization of sister-chromatid exchange induction by 8-methoxypsoralen plus near UV light. *Cytogenet. Cell Genet.* **21**, 184-200.

Latt, S.A., Allen, J., Bloom, S.E., Carrano, A., Falke, C., Kram. D., Scheneider, E., Schrech, R., Whilfield, B. y Wolff, S. (1981) SCE: a report of the gene-tox program *Mutat. Res.* **87**,17-62.

Leónard, A. (1978). Carcinogenic and mutagenic effect of metal (As,Cd,Cr,Hg,Ni). Present state of knowledge and needs for further studies. En: ***Trace metals: exposure and health effects***. Di Ferrate E. (Ed.). Pergamon., Nueva York, pp 199-216.

Léonard, A. Lauwerys, R.R. y Jacquet, P. (1981). Carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity of mercury. *Mutat. Res.* **114**, 1-18.

Léonard, A., Gerber, G.B., Jacquet, P. y Lauwerys, R.R. (1984). Carcinogenicity, mutagenicity, and teratogenicity of industrially used metals. En: ***Mutagenicity, carcinogenicity, and teratogenicity of industrial pollutants***. Kirsch-Volders, M. (Ed.), Plenum, Bruselas, pp. 59-126.

Ma, T.H. (1982). ***Vicia*** cytogenetic test for environmental mutagens. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* **99**, 257-271.

Mathur, A.K., Drikshith, T.S.S., Lat, M.M. y Tandon, S.K. (1978). Distribution of nickel and cytogenetic in poisoned rats. *Toxicology* **10**, 105-113.

Miyake, M., Murata, I., Osabe, M. y Ono, T. (1977). Effect of metal cations on misincorporation by *E.coli* DNA polymerases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77**, 854-860.

Morgan, W. F. y Cleaver, J. E. (1982). 3-amine benzamide synergistically increases sister chromatid exchanges in cells exposed to methane sulfonate but not to ultraviolet light. *Mutat. Res.* **104**, 326-366.

Nadenko, V.G., Lenchenko, V.G., Arkhipenko, T.A., Saichenko, S.P. y Petrova, N. N. (1979). Embryotoxic effect of nickel ingested with drinking water. *Gig. Sanit.* **6**, 86-88.

Nakanishi, Y. y Schneider, E. L. (1979). ***In vivo*** sister chromatid exchanges: a sensitive measure of DNA damage. *Mutat. Res.* **60**, 329-337.

National Research Council (Committee on medical and biological effects of environmental pollutants). (1975). Nickel. Nat. Acad. Sci. Washington, D.C., pp. 144-188.

NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) (1977). Criteria for recommended standard: Occupational exposure for inorganic nickel. DHEW/NIOSH Pv. No. 77-164, US. Gov. Printing Office. Washington, D.C., pp. 1-282.

Nishioka, H. (1975). Mutagenic activities of metal compounds in bacteria. *Mutat. Res.* **31**, 185-189.

Oikawa, A., Thoda, H., Kanai, M., Miwa, M. y Sugimura, T. (1980). Inhibitors of poli (adenosine diphosphate ribose), polymerase induce sister chromatid exchanges. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **97**, 1311-1316.

Paton, G.R. y Allison, A.C. (1972). Chromosome damage in human cell cultures induced by metal salts. *Mutat. Res.* **16**, 332-336.

Perry, P. y Evans, H.J. (1975). Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature (Londres)* **258**, 121-125.

Peters, T. (1977). Serum albumin: recent progress in the understanding of its structure and biosynthesis. *Clin. Chem.* **23**, 5-12.

Plewa, M.J. y Gentile, J. M. (1982). The activation of chemicals into mutagens by green plants. En: ***Chemicals mutagens: principles and methods for their detection***, de Serres, F.J. y Hollaender, A. (Eds.). Plenum, Nueva York. Vol. 7, pp. 401-420.

Rainaldi, R. y Mariani, T. (1982). The distribution of induced sister-chromatid exchanges: a tool for identifying agents directly interacting with DNA. *Mutat. Res.* **103**, 333-337.

Ridgway, L.P. y Karnofsky, D.A. (1952). The effects of metals on the chick embryo; toxicity and production of abnormalities in development, *Ann. N. Y Acad. Sci.* **55**, 203-215.

Riverdahl, E. y Sanner, T. (1980). Synergistic effect on morphological transformation of hamster embryo cells by nickel sulfate and benz(a) pyrene. *Cancer Lett.* **8**, 203-208.

Sanyal, R., Giri, A. K., Talukder, G. y Sharma, A. (1980). Effects of cobalt and nickel on mammalian cellular systems. *Biol. Bull. India* **2**, 85-90.

Schnegg, A. y Kirchgessner, M. (1975). Essentiality of nickel for the growth of animals. *Z. Tierphysol. Tiernah. Intlermittel Futtermitheykonde* **36**, 63-74.

Schroeder, H. A. y Mitchener, M. (1971). Toxic effects of trace elements on the reproduction of mice and rats, *Arch. Environ. Health* **22**, 557-560.

Schvartzman, J. B., y Cortés, F. (1977). Sister-chromatid in *Allum cepa* L. *Chromosoma* **62**, 119-133.

Schvartzman, J. B., Cortés, F. y López-Saez, J. F. (1978). Sister-subchromatid exchanges segments and chromosome structure. *Exp. Cell Res.* **114**, 443-446.

Schvartzman, J. B. y Gutiérrez, C. (1980). The relationship between the cell time available for repair and the effectiveness of a damaging treatment in provoking the formation of sister-chomatid exchanges. *Exp. Cell Res.* **134**, 73-79.

Sharma, A. K., y Sharma (1980). "**Chromosome techniques-theory and practice**," 3rd Ed. Butterworths, Londres.

Sharma, A. K. y Talukder, G. (1987) Effects of metals on chromosome of higher organisms. *Environ. Mutagen.* **9**, 191-226.

Shelby, M. D. (1976). Chemical mutagenesis in plants related compounds. The Environmental Mutagen Information Center Staff. ONRL/EMIC-7, Oak Ridge, Teun., Oak Ridge National Laboratory.

Shirasu, Y., Moriya, M., Kato, K., Furihashi, A. y Kado, T. (1976). Mutagenicity screening of pesticides in the microbial system. *Mutat. Res.* **40**, 19-30.

Singh, O. P. (1979). Effects of certain chemical pollutants on plant chromosomes. Ph. D. Thesis submitted to the University of Calcutta.

Soestbergen, M. y Sunderman, F.W. Jr. (1972). ⁶³Ni complexes in rabbit serum and urine after injection of ⁶³NiCl₂. *Clin. Chem.* **18**, 1478-1484.

Steinman, R. M., Mellman, I. S., Mueller, W. A. y Cohn Z. A. (1983). Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J. Cell Biol.* **96**, 1.

Stetka, D.G. y Wolff, S. (1976). Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens II. *In vitro* test for compounds requiring metabolic activation. *Mutat. Res.* **41**, 333-342.

Stokinger, H. E. (1981). The metals. En ***Pattys industrial hygiene and toxicology***. 3th ed., Wiley, Nueva York, pp. 1820-1841.

Storeng, R. y Jonsen, J. (1980). Effect of nickel chloride and cadmium acetate on the development of preimplantation mouse embryos *in vitro*. *Toxicology* **17**, 183-187.

Storeng, R. y Jonsen, J. (1981). Nickel toxicity in early embryogenesis in mice. *Toxicology* **20**, 45-51.

Sunderman, F.W. Jr. (1961). Nickel poisoning. XI. Implication of nickel as a pulmonary carcinogen in tobacco smoke. *Am. J. Clin. Phatol.* **35**, 203-209.

Sunderman, F.W. Jr. (1977). The metabolism and toxicology of nickel. En: ***Clinical chemistry and chemical toxicology of metals***. Brown, S.S. (Ed.). Elsevier, Nueva York, pp. 231-259.

Sunderman, F. W. Jr., Allpass, P. R., Mitchell, J. M., Baselt, F. C. y Albert, D. M. (1979). Eye malformations in rats. Induction by prenatal exposur to nickel carbonyl. *Science* **203**, 550-553.

Sunderman, F. W. Jr., Shen, S. K., Reid, M. C. y Allpass, P. R. (1980). Teratogenicity and embryotoxicity of nickel carbonyl in Syrian hamsters. En: ***Spurenelementsposium Nickel***, Anke, M., Schneide H. J. y Brueckner, C. (Ed.). Karl Marx Universitaet Leipzig, Friedrich Schiller Universitaet Jena, pp. 301-307.

Swieringa, S.H. y Basrur, P.K. (1968). Effect of nickel on cultured rat muscle cells, *Lab. Invest.* **19**, 663-674.

Takehisa, S. (1982). Induction of SCE by chemicals agents En: ***Sister chromatid exchange***. Wolff, S. (Ed.) Wiley, Nueva York, pp. 87-143.

Takehisa, S., Kanaya, N. y Rieger, R. (1988). Promutagen activation by ***Vicia faba***: an assay based on the induction of sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* **197**, 195-205.

Taylor, J. H., Woods, P. S. y Hughes, W. L. (1957). The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labelled thymidine. *Proc. Natl. Acad. (USA)* **43**, 122-128.

Tempelaar, M.J., de Both, M.T.J. y Versteegh, J.E.G. (1982) Measurement of SCE frequencies in plants: a simple Fulgen-staining procedure for ***Vicia faba***. *Mutat. Res.* **103**, 321-326.

Trepel, F. (1976). Das lymphatische Zellsystem: Struktur, allgemeine Physiologie und allgemeine Pathophysiologie, in Blut und Blutkrankheiten, Teil 3. Leukocytoresund retikulöres System Begeemann, H. (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-191.

Umeda, M. y Nishimura, M. (1979). Inducibility of chromosomal aberrations by metal compounds in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.* **67**, 221-229.

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**, 83-88.

von Rosen, G. (1954). Breaking of chromosomes by the action of elements of the periodical system and some other principles. *Hereditas* **40**, 258-263.

Waksvik, H., Boyseen, M., Broegger, A., Saxholm, H. y Reith, A. (1980). *In vivo* and *in vitro* studies of mutagenicity and carcinogenicity of nickel compounds in man. Tenth Ann Meeting Eur. Environ. Mutagen Soc. Atenas, Poster 32.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Wakswik, K. H., Boysen, M. y Hoegtveit, A. C. (1984). Increased incidence of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of retired nickel workers. *Carcinogenesis* **5**, 1525-1527.

Wolff, S. (1974). Sister chromatid exchanges: the most sensitive mammalian system for determining the effects of mutagenic, carcinogenic. *Expert. Conference Oslo, Noruega*, pp. 11-13.

Wulf, H. C. (1980). Sister chromatid exchanges in human lymphocytes exposed to nickel and lead. *Dan. Med. Bull.* **27**, 40-42.

Xing, W. y Zhang, Z. (1990). A comparison of SCE test in human lymphocytes and *Vicia faba*; a hopeful technique using plants to detect mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.* **241**, 109-113.

Zhang, Z., Yang, J., Zhang, Q. y Can, X. (1991). Studies on the utilization of a plant SCE test in detecting potential mutagenic agents. *Mutat. Res.* **261**, 69-73.

Tabla I Resumen de las pruebas mutagénicas realizadas con sales de níquel tomado de (Leónard *et al.*, 1984)

Especie	Prueba	Compuesto	Resultado	Referencias
Bacteriófago	T4 inactivación	NiSO ₄	+	Corbett <i>et al.</i> , 1970
Bacteriófago	Mutación de Gene	NiSO ₄	-	Corbett <i>et al.</i> , 1970
<i>Bacillus subtilis</i>	Ensayo - Rec	Ni Cl ₂	-	Nishioka, 1975
		NiS ₄ N ₂ C ₅ H ₈	-	Shirasu <i>et al.</i> , 1976
		NiS ₄ N ₂ C ₆ H ₁₂	-	Shirasu <i>et al.</i> , 1976
<i>Escherichia coli</i>	Mutaciones revertantes	NiCl ₂	-	Green <i>et al.</i> , 1976
<i>Salmonella typhimurium</i>	Mutaciones revertantes	NiCl ₂	-	Bulselmaier <i>et al.</i> , 1972
<i>Vicia faba</i>	Aberraciones cromosómicas	Ni (NO ₃) ₂	+	Glaess, (1955, 1956 a,b)
	Aberraciones cromosómicas	Ni Cl ₂	+	Glaess, (1955, 1956 a,b)
	Aberraciones cromosómicas	NiSO ₄	+	Komczynnski <i>et al.</i> , 1963
Células de mamífero <i>in vitro</i>	Mutaciones génicas	NiCl ₂	~	Miyaki <i>et al.</i> , 1977
	Transformación celular	Ni ₃ S ₂	+	Waksvik, <i>et al.</i> , 1980
	Transformación celular	NiSO ₄	+	Riverdahl, 1980
	ICH	Ni ₃ S ₂	+	Wulf, 1980
	ICH	NiSO ₄	+	Waksvik <i>et al.</i> , 1980
	Aberraciones cromosómicas	NiS	+	Swieringa y Basrur, 1968
		NiS	+	Umeda y Nishimura, 1979
		Ni	-	Paton y Alison, 1972
		NiO	-	Paton y Alison, 1972
		NiCl ₂	~	Paton y Alison, 1972
		Ni (CH ₃ COO) ₂	~	Umeda y Nishimura, 1979
		K ₂ Ni (CN) ₄	+	Umeda y Nishimura, 1979
Linfocitos humanos <i>in vivo</i>	Aberraciones cromosómicas	Ni ₃ S ₂	+	Waksvik <i>et al.</i> , 1980
	Huecos	NiO	+	Waksvik <i>et al.</i> , 1980
		NiCl ₂	+	Waksvik <i>et al.</i> , 1980
		NiSO ₄	+	Waksvik <i>et al.</i> , 1980

TABLA II. FRECUENCIAS DE INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR CLORURO DE NÍQUEL EN *Vicia faba*^a

TRATAMIENTO μg / L	ICH / METAFASE		
	\bar{X}	±	EE
0	29.72	±	0.73
1	34.84*	±	0.72
10	35.96*	±	0.80
100	41.16*	±	0.95
500	INHIBICIÓN DE LA MITOSIS		

^an= 50 metafases en dos experimentos

Se obtuvieron diferencias significativas entre el testigo y cada grupo de tratamiento por análisis de varianza F= 34.016 con p<0.0001, entonces se aplicó la prueba de comparación múltiple de Newman Keuls, * p< 0.001

TABLA III. FRECUENCIAS DE INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR NITRATO DE NÍQUEL EN *Vicia faba*^a

TRATAMIENTO μg / L	ICH / METAFASE		
	\bar{X}	±	EE
0	29.72	±	0.73
1	39.84*	±	0.91
10	52.12*	±	0.31
100	INHIBICIÓN DE LA MITOSIS		

^an= 50 metafases en dos experimentos

Se obtuvieron diferencias significativas entre el testigo y cada grupo de tratamiento por análisis de varianza F= 259.38 con p< 0.0001, entonces se aplicó la prueba de comparación múltiple de Newman Keuls, * p< 0.001

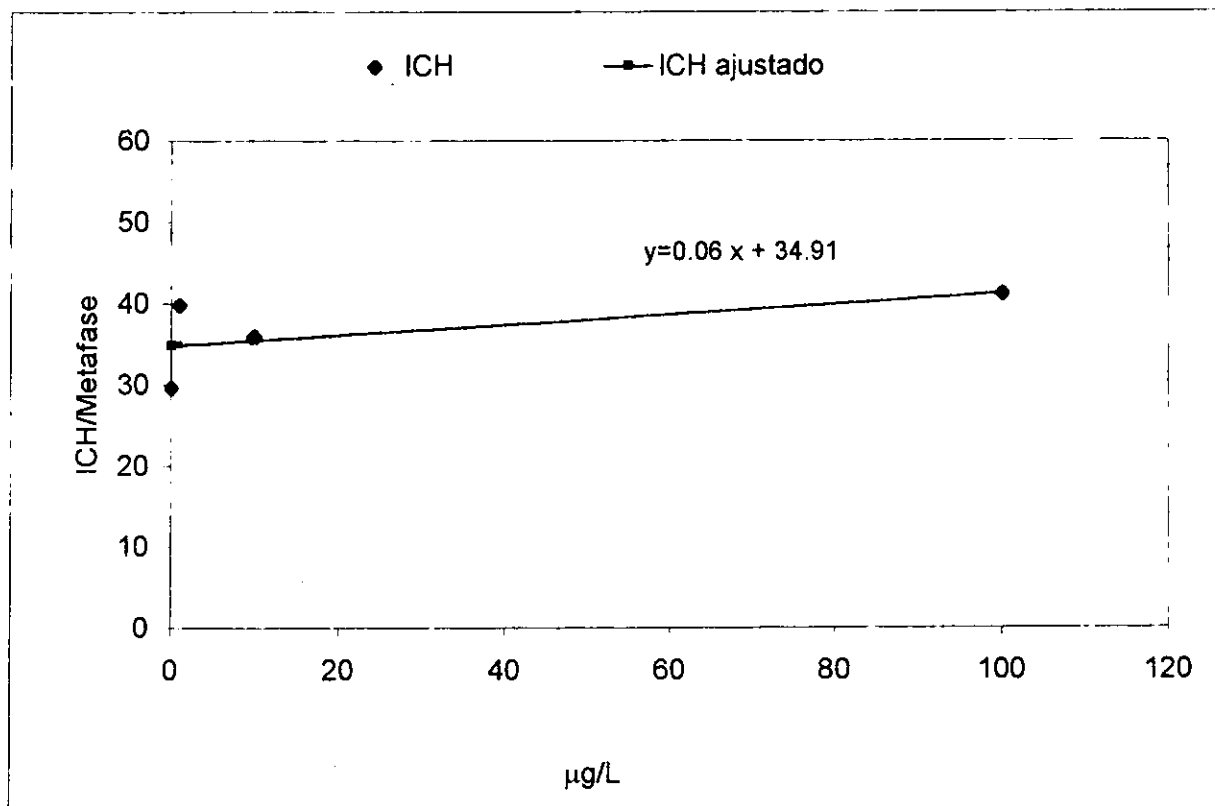


Fig. 1. FRECUENCIAS DE ICH EN *Vicia faba* POR CLORURO DE NIQUEL

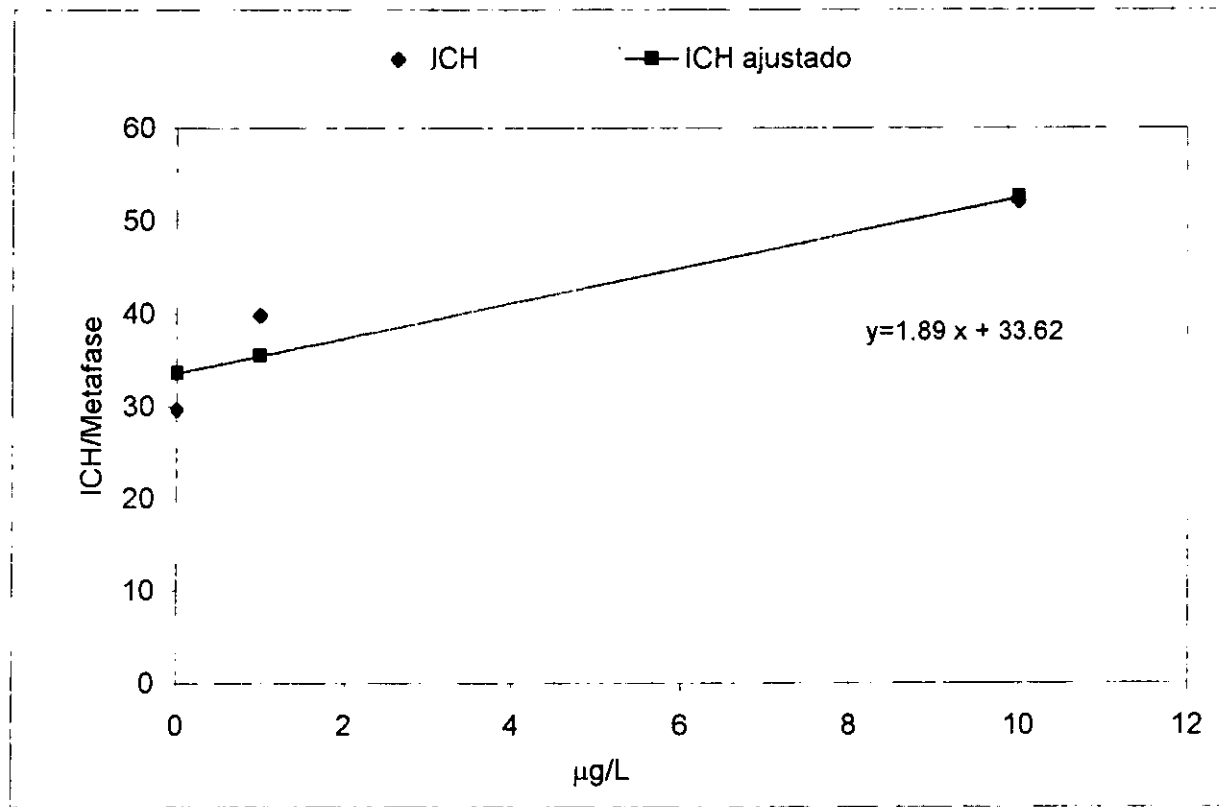


Fig. 2. FRECUENCIAS DE ICH EN *Vicia faba* POR NITRATO DE NIQUEL