

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**



USO Y PERSPECTIVAS DE LA PRUEBA DEL COMETA

**TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE
MONOGRAFÍA**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA:
GUILLERMINA PADILLA PARRA**

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL. NOVIEMBRE DE 2005



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias

Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura
en Biología

151/ C. C. BIOLOGÍA

C. GUILLERMINA PADILLA PARRA
PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSTGRADO** opción **TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN** con el título : **USO Y PERSPECTIVAS DE LA PRUEBA DEL COMETA** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo al : **DR. CESAR MENDOZA CORNEJO** y como asesor / a: **DRA. ANA ISABEL RAMÍREZ QUINTANA** y el **DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA**

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Las Agujas, Zapopan., 07 de Abril del 2005


DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN


DRA. ANA ISABEL RAMÍREZ QUINTANA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



C.c.p. DR. CESAR MENDOZA CORNEJO - Director del trabajo

Dr. Carlos Álvarez Moya.
Presidente del Comité de Titulación.
Carrera de Licenciado en Biología.
CUCBA.
Presente.


Por medio de la presente nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad de: **INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSTGRADO**, opción **TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN** con el título: **USO Y PERSPECTIVAS DE LA PRUEBA DEL COMETA** que realizó la pasante Guillermina Padilla Parra con número de código 077519289 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión.


Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

ATENTAMENTE

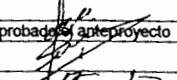
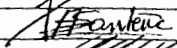

Las Agujas, Zapopan., 21 de Julio de 2005


DR. CESAR MENDOZA CORNEJO
DIRECTOR.


DRA. ANA ISABEL RAMÍREZ
QUINTANA
ASESOR.


DR. CARLOS ALVAREZ MOYA
ASESOR.

*VoBo
Carla A.
21/07/05
Carlos A. Moya*

Nombre completo de los sinodales	Firma de aprobación del anteproyecto	Fecha de aprobación
Biol. Sergio Álvarez Barajas		21-07-05
Dra. Anne Santerre Lucas		20-08-05
Dra. Ana Isabel Ramirez Quintana		25/Julio/05
Supl. Dr. Pedro Macedonio García López		

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, Dr. Cesar Mendoza Cornejo, por ofrecerme su apoyo, su comprensión y motivación, en el transcurso de la elaboración de este trabajo.

A mi asesor, Dr. Carlos Álvarez Moya, por ofrecerme la oportunidad de conocer su trabajo de investigación, por darme su respaldo y valiosas contribuciones que otorgaron la calidad cognitiva del presente.

A mis sinodales, por sus aportaciones y buena disposición que tuvieron todo el tiempo hacia conmigo.

A Moni, por su respaldo y amistad; por motivarme siempre a seguir adelante hasta concluir.

A Dios, por su amor y misericordia para conmigo y los míos.

DEDICATORIA

A mi familia

Mario Gonzalo

Nellicalli

Aztlí Tonalli

Cuauhtlí Yetuani

INDICE

	página
Resumen	02
1. Las sustancias químicas tóxicas	03
1.1 Los tóxicos en el aire	06
1.2 Los tóxicos en el agua	09
1.3 Los tóxicos en el suelo	09
1.4 Residuos tóxicos y peligrosos	12
- Bifenilos policlorados (PCB)	14
- Dioxinas	15
- Nitrosaminas	18
- Aditivos alimentarios	20
1.5 Contaminación ambiental por plaguicidas	21
2. Mutación y mutágenos	23
2.1 Mutágenos físicos	23
2.2 Mutágenos químicos	24
2.3 Mutágenos biológicos	25
3. Bioensayos genéticos	26
3.1 Pruebas de detección de agentes genotóxicos	27
3.2 Prueba de Ames	28
3.3 Prueba de micronúcleos	30
3.4 Cariotipo	32
3.5 Prueba de mutación rosa	33

4. Prueba Cometa Alcalina	37
4.1 Exposición al agente a probar	39
4.2 Análisis del ADN dañado obtenido en la PCA	40
4.3 Análisis estadístico	41
5. Comparación de la Prueba del Cometa con otros sistemas de prueba	43
6. Detección de agentes genotóxicos con la PCA	45
7. Perspectivas de uso de la prueba Cometa	46
7.1 PCA como biomonitor ambiental	46
7.2 Integridad del ADN: la PCA como herramienta de diagnóstico	46
7.3 Comportamiento genotóxico de sustancias con la prueba del Cometa	49
7.4 Análisis de la comida expuesta a pesticidas y radiación	50
7.5 PCA en plantas	50
7.6 Prueba del Cometa y cáncer	51
7.7 Comentario final.	52
8. Referencias bibliográficas.	54
9. Glosario	74

RESUMEN

La prueba del cometa es una excelente herramienta para detectar el efecto genotóxico inducido por agentes químicos, físicos e inclusive biológicos en las células de cualquier ser vivo independientemente de que éste sea o no utilizado como biomonitor. Esta característica le otorga ventajas sobre otros sistemas de prueba que sólo evalúan la actividad genotóxica inducida bajo condiciones controladas; es además, sensible, sencilla y reproducible.

Con un creciente uso, la prueba del cometa empieza a utilizarse en diferentes disciplinas biológicas con diversos propósitos. En el presente trabajo se realiza una revisión de artículos relacionados con el empleo, ventajas y potencialidad de la prueba del cometa con respecto a otras pruebas para evaluar genotoxicidad.

LAS SUSTANCIAS QUIMICAS TOXICAS

La conciencia sobre los peligros de las sustancias químicas tóxicas ha proliferado en años recientes. Las noticias de primera plana describen de manera lúgubre acontecimientos tales como la tragedia de Bhopal, India, donde la liberación accidental de gas de una fábrica de pesticidas mató a varios miles de personas y provocó enfermedades crónicas en decenas de miles más. En Estados Unidos el gobierno reubicó toda la ciudad de Times Beach, Missouri, debido a la contaminación del suelo con dioxina. A la miríada de temores que enfrenta el mundo moderno, la humanidad agrega ahora el temor a que un camión o un tren cargado de material tóxico pueda chocar, exponiendo a numerosas personas a su contenido potencialmente letal, o a que un niño que juega en un lote baldío pueda regresar a su casa cubierto de algún polvo irreconocible que escapó de un barril desintegrado que se hallaba enterrado ahí (Harte, J. *et al.*, 1995).



Figura 1. Trabajadora mozambiqueña fumiga con DDT sus tierras.

En la década de 1940, el insecticida diclorodifeniltricloroetano (DDT) parecía casi milagroso. En el trópico, el DDT salvó millones de vidas al matar los mosquitos transmisores del paludismo. Los mayores rendimientos agrícolas conseguidos al destruir plagas de insectos con DDT salvaron a muchos millones más de morir de inanición (figura 1).

El químico suizo Paul Müller, descubridor de sus propiedades como plaguicida, se hizo acreedor al Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1948. La gente confiaba en el advenimiento de una nueva era libre de plagas de insectos,

sin sospechar que el uso indiscriminado de este plaguicida estaba deshaciendo la compleja trama de la vida (Audesirk, T. *et al.*, 2004).

Distintas sustancias químicas como el DDT y otras nuevas, son fuentes de deterioro ambiental en contra de muchas especies, en especial de las aves. Águilas, halcones, gavilanes, carroñeros y otras aves de presa han sido muy vulnerables a la contaminación química (Guzmán y Anaya, 2001).

Las actividades humanas generan productos que directa o indirectamente, afectan la calidad de los cuerpos de agua receptores. Este tipo de contaminación es generada por emisiones de industrias, plantas tratadoras de aguas residuales, descargas municipales tratadas o no, etc.

Muchos de los hijos de mujeres que consumieron peces contaminados por Bifenilos policlorados (PCB; compuestos clorados que se utilizan en los transformadores y cables eléctricos) del lago Michigan, presentan un desarrollo intelectual retardado (Harte, J. *et al.*, 1995). La exposición a niveles altos de plaguicidas y otros contaminantes persistentes ha sido vinculada a ciertas formas de cáncer, infertilidad, afecciones cardiacas e inhibición de la función inmunitaria en los seres humanos (Audesirk, T. *et al.*, 2004).

Los indígenas inuit que habitan al norte del Círculo Ártico tienen niveles altos de PCB y clordano (un plaguicida prohibido similar al DDT) en su cuerpo debido al consumo de grasa de ballena y de otros depredadores marinos. Varios productos químicos sintéticos de uso muy extendido comparten la tendencia del DDT a persistir, acumularse e interferir en las funciones hormonales. Estas sustancias químicas, llamadas "perturbadores endocrinos" son emitidos por los plásticos, detergentes y plaguicidas y como productos colaterales de los procesos de manufactura (Audesirk, T. *et al.*, 2004).

También es preciso considerar los residuos peligrosos que producen la industria, los laboratorios, los talleres y las empresas de servicios. La legislación

ambiental considera peligrosos los residuos corrosivos, reactivos, explosivos, tóxicos, inflamables y biológico-infecciosos. (Guzmán y Anaya, 2001).

Mientras que esos acontecimientos dramáticos justificadamente captan la atención de los encabezados periodísticos, un aspecto de igual importancia respecto al problema de las sustancias tóxicas ha sido relegado: las exposiciones pequeñas pero recurrentes a las sustancias químicas pueden provocar cáncer y otras enfermedades (Repetto, 1995). Dicha exposición a largo plazo se denomina crónica, en contraposición con la exposición más breve que resulta de los grandes derrames y otros accidentes, a la cual se le da el nombre de aguda. La exposición crónica puede ocurrir con cada bocado de alimento o cada trago de agua que ingerimos y con cada bocanada de aire que inhalamos; ocurre diario mientras trabajamos en el jardín, la oficina o cuando preparamos los alimentos (Harte, J. *et al.*, 1995).

Los compuestos inorgánicos juegan un doble papel en la fisiología, algunos son indispensables para la vida y se denominan esenciales, mientras que otros pueden ser tóxicos, dependiendo de la dosis; a dosis alta todos son tóxicos (Repetto, 1995). Nuestra sociedad está atrapada en sustancias químicas, tanto las de origen natural que le provee su entorno, como las sintetizadas por su propia industria.



Figura 2. Cada año se introducen al mercado más de 1000 nuevas sustancias a través de diversos productos y la velocidad con la que se producen supera la velocidad con la que se diagnostica su peligrosidad genética.

Cada año de las últimas décadas se manufacturan e introducen al mercado aproximadamente 1000 nuevas sustancias químicas. Casi todos los aspectos de nuestras vidas son tocados por estas sustancias, desde la producción de alimentos, utensilios, herramientas hasta la recreación (figura 2).

No importa que tan cuidadosamente las utilizemos, alguna porción termina de manera inadvertida en nuestra comida, agua o aire. Y no toda la exposición es inadvertida; una gran cantidad de sustancias químicas comerciales, como conservadores alimentarios y pesticidas, son introducidas de forma deliberada en nuestro ambiente. Preocupan principalmente aquellas que se cree provocan cáncer, defectos congénitos, mutaciones y otros problemas de salud para los humanos, como daño hepático o problemas respiratorios (Harte, J. *et al.*, 1995).

La reciente implantación de la disciplina de toxicología como el estudio de los efectos adversos de sustancias químicas sobre los seres vivos (Klaassen y Watkins, 2001), en distintas facultades universitarias de habla española, no se ha visto acompañada de un aporte bibliográfico en este idioma que facilite el estudio y la metódica adquisición de conocimientos (Repetto, 1995).

Por otra parte, los datos sobre los riesgos de los tóxicos para la salud son escasos y cargados de incertidumbre experimental. La literatura técnica contiene muchas contradicciones y son comunes los desacuerdos entre los científicos. Además, la naturaleza política del problema de los tóxicos implica que no toda la información disponible para el público sea imparcial (Harte, J. *et al.*, 1995).

LOS TOXICOS EN EL AIRE



Figura 3. La contaminación del aire producida por las cenizas del combustible de los automóviles puede ser un problema en ciudades en las que se concentra un gran número de vehículos de gasolina y diesel.

Los efectos conocidos de la contaminación del aire (figura 3) en la salud pueden dividirse en agudos (a corto plazo), los crónicos (a largo plazo), cáncer pulmonar y efectos no respiratorios. Efectos respiratorios agudos de la contaminación del aire son: reacciones hiperreactivas de las vías respiratorias, ataques asmáticos,

infecciones respiratorias y cambios reversibles en la función pulmonar. Los dos efectos crónicos principales de la exposición a largo plazo a contaminantes del aire, aparte del cáncer pulmonar, son la *enfermedad pulmonar obstructiva crónica* (EPOC) y los cambios en el desarrollo y envejecimiento de los pulmones (Vander, A. J., 1991)

La EPOC corresponde a un grupo de enfermedades que comparten los síntomas comunes de falta de aire, ya que el diagnóstico bien definido suele ser imposible hasta después de la muerte. El grupo incluye: la bronquitis, el enfisema y la enfermedad de las vías respiratorias pequeñas crónicas. Estas enfermedades pueden aparecer por separado o de manera conjunta.



Figura 4. Las macropartículas se asocian a una amplia gama de patologías, entre ellas las enfermedades cardíacas y pulmonares.

Las principales causas de EPOC son:

Tabaquismo, exposición ocupacional a sustancias como el polvo de carbón y de algodón, las concentraciones elevadas de dióxido de azufre, factores genéticos y particulados (figura 4). La mala calidad del aire da lugar al aumento de la tasa de asma y otras afecciones respiratorias.

La contaminación del aire participa en forma importante, aumentando las infecciones infantiles y contribuyendo a la enfermedad pulmonar en edades avanzadas (Amdur, Mary O, 1995).

Cáncer pulmonar

Es responsable de una cuarta parte de todas las muertes por cáncer. Aunque el tabaquismo es la causa principal de este padecimiento, la

contaminación del aire provoca cierto porcentaje de los cánceres pulmonares; exactamente cuanto, está en discusión todavía.

Los análisis químicos del aire muestran la presencia de productos secundarios de la combustión, causales de cáncer como los benzo-(a)-pirenos y las dioxinas, fibras como el asbesto y metales como el arsénico y el cadmio (Amdur, Mary O., 1995).

Estudios toxicológicos muestran que extractos de aire contaminado pueden producir tumores pulmonares en ratones, ratas y hámsteres y es posible que produzca lesión al material genético ADN. En estudios en poblaciones humanas se ha encontrado aumento de la frecuencia de cáncer alrededor de fundidoras y fábricas, en ciudades comparadas con áreas rurales y con la duración de la exposición a la contaminación (Turiel, I., 1995).

El humo del tabaco interactúa sinérgicamente con otros carcinógenos como el radón, el asbesto, el arsénico y el alcohol, aumentando el riesgo subyacente de cáncer de cada uno de estos materiales.

Entre los efectos no respiratorios, el plomo presente en el aire ha causado trastornos nerviosos en niños, incluyendo problemas de aprendizaje (disminución en el coeficiente intelectual) e hiperactividad; daño renal que favorece presión sanguínea elevada en niños y adultos, y en casos extremos, envenenamiento. Los niveles de plomo han caído dramáticamente en los últimos 15 años conforme se eliminó la gasolina con plomo, pero los depósitos en el suelo de los años anteriores son una fuente de exposición persistente.

El benceno es una causa de leucemia en trabajadores del caucho y de la industria química, y se halla en el aire proveniente de operaciones de refinamiento y combustión de gasolina. En vista de que las concentraciones de benceno en el aire son bajas, es difícil conocer que efecto tiene en la población general.

LOS TOXICOS EN EL AGUA

Contaminantes que se agregan en el origen: varían dependiendo de la geología local, actividades agrícolas y fuentes industriales/municipales de contaminación. Como regla general, el agua subterránea contiene más contaminantes minerales (nitratos, arsénico y bario) que el agua superficial; ésta tiende a contener más contaminantes biológicos (bacterias y virus) y más contaminación orgánica natural podrida. Ambas fuentes pueden contener desperdicios industriales de origen orgánico e inorgánico.



Figura 5. Los metales liberados en el agua nunca se degradan, y permanecen como un peligro que puede volverse a movilizar en el futuro.

representa un riesgo significativo contra la salud al beber esta agua, aunque la exposición ocupacional al asbesto se relaciona con cánceres gastrointestinales.

Contaminantes que se agregan al sistema de distribución: la corrosión de las tuberías puede liberar metales como plomo, cadmio, hierro, zinc, níquel y otros al suministro de agua (figura 5), el asbesto también puede liberarse por la falla de tubos de asbesto-cemento que utilizan algunos sistemas. Se desconoce si el asbesto

LOS TOXICOS EN EL SUELO

Los contaminantes del aire generalmente se emiten sobre la tierra, por eso es comprensible que muchos tóxicos abandonen la atmósfera cayendo a la tierra y penetrando en el suelo.

Ya en el suelo es probable que los contaminantes sean transformados químicamente por los organismos que habitan en él. Ya sea que los contaminantes en el suelo se transformen químicamente o no, a la larga tendrán uno de cuatro destinos.

Primero, pueden ser captados por plantas que luego podrían ser ingeridas por las personas u otros organismos. Una segunda posibilidad es que los contaminantes del suelo sean limpiados por la lluvia hacia cuerpos de agua, como ocurre desde los campos agrícolas hasta los ríos y lagos. Una tercera posibilidad es que el contaminante del suelo sea tan volátil que pase hacia la atmósfera. El DDT es un ejemplo de esto, se codestila con la evaporación del agua proveniente de la superficie de la tierra, y una vez en la atmósfera, pueden viajar grandes distancias. Por último, algunos contaminantes del suelo, en particular algunos metales tóxicos, residen virtualmente para siempre en la tierra debido a que no son volátiles, solubles ni accesibles a las plantas (Harte, *et al.*, 1995).

Los sitios donde se tiene alta probabilidad de contaminar los suelos, son las industrias, centros poblacionales, sitios de almacenamiento (de combustibles, aceites, solventes, pesticidas y lubricantes), vehículos de transporte de químicos o sitios de disposición 'final' de residuos municipales e industriales.



Figura 6. La producción de cantidades enormes de residuos plantea el problema de su eliminación, por ello se destinan al abandono y se acumulan en vertederos.

En muchos casos, los métodos utilizados para el control de la contaminación van dirigidos a purificar el aire y depósitos de agua, no tanto a la protección del suelo (figura 6). Estos contaminantes, por tanto, pueden llegar a él por aplicación directa de químicos tales como pesticidas y fertilizantes; por derrames accidentales de sustancias,

por la deposición de contaminantes atmosféricos o por disposición de residuos antropogénicos. El daño que causan al suelo, depende tanto de la cantidad, como de la naturaleza física y química del contaminante (Enkerlin, *et al*, 1999).

Las industrias y los centros poblacionales están íntimamente ligados por la dependencia económica que existe entre uno y otro. Siendo éstas las fuentes primarias de generación de residuos, constituyen el primer punto que debe ser abordado para disminuir su cantidad en el ambiente, por medio de la implementación de estrategias de minimización de residuos.

Potencialmente, los medios físicos que sirven para transportar tanto los productos como los residuos industriales y municipales, constituyen la segunda fuente de contaminación en importancia. Esto se da cuando ocurren accidentes o cuando los conductores de estos vehículos descargan clandestinamente los materiales que transportan. Debe buscarse en este caso, la manera de minimizar la cantidad de material a transportar, así como cumplir con las recomendaciones de seguridad para evitar fugas o accidentes.

Los sitios de almacenamiento, ya sea temporal, como es el caso de productos comercializables y de los combustibles, o permanente, como en el caso del confinamiento de residuos sólidos deben manejar estrategias propias para la minimización y el manejo de dichos residuos. El sobrecrecimiento poblacional hace complicado por sí solo el problema de la generación de residuos.

Siendo éste un problema social, su solución no depende tanto de la ciencia, es necesario amortiguar el aumento en la demanda de bienes y generación de residuos, mediante una planeación integral para el aprovechamiento óptimo de los recursos naturales y la debida divulgación de la información pertinente a la población; su implementación comprometida por todos, su monitoreo y evaluación de los resultados.



Figura 7. Los métodos convencionales para enfrentarse a los desperdicios que se generan en la sociedad industrializada no difieren mucho de los utilizados por nuestros antepasados; los enterramos o los incineramos cuando se acumulan.

permiten observar sustancias cuyos efectos son inmediatos pero también de sustancias cuyos efectos no son visibles inmediatamente y pueden pasar años antes de que se vean sus consecuencias (Denison y Ruston, 1990).

Muchos desechos industriales son carcinogénicos y pueden estar contaminando agua, aire y suelo, que al convivir con ellos de forma cotidiana se tiene prácticamente garantizado el cáncer o anomalías en los hijos de estas personas; síndrome de Down, por ejemplo (Garro y Lieber, 1990).

RESIDUOS TOXICOS Y PELIGROSOS

Se aplica a los materiales sólidos, líquidos o gaseosos que contienen sustancias que por su composición, posibilidad de combinación o mezcla representan un riesgo para la salud humana, los recursos naturales y el medio ambiente. Pueden estar contenidos en recipientes que son destinados al abandono. Ejemplos de residuos tóxicos y peligrosos son los productos farmacéuticos, los aceites usados o las pilas con mercurio.

Los residuos generados por las actividades humanas (figura 7) pueden contaminar al aire, suelo y agua. Los contaminantes del suelo, al igual que los contaminantes del aire y agua, pueden sufrir transformaciones químicas y desplazarse en dirección horizontal y vertical.

Debido a que hay varios tipos de suelos, el comportamiento de un contaminante depende de la composición y características físicas de los mismos. Tanto contaminantes

Los principales componentes que dan a los residuos su carácter peligroso son: metales pesados, cianuros, dibenzo-p-dioxinas, biocidas y productos fitosanitarios, éteres, amianto, hidrocarburos aromáticos policíclicos, fósforo y sus derivados, y compuestos inorgánicos del flúor.

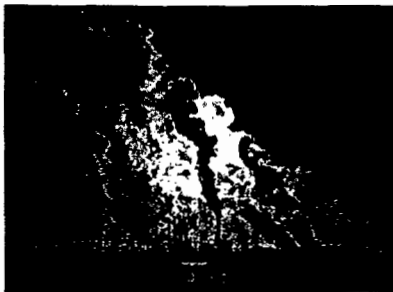


Figura 8. Las fuentes de los principales contaminantes incluyen las actividades industriales y la generación de energía.

Las actividades principales que generan este tipo de residuos son la minería, la energía nuclear y la industria en general (papelera, química o siderúrgica, entre otras) (figura 8). Los sistemas básicos de gestión de los residuos tóxicos y peligrosos son: la incineración, el tratamiento físico-químico, el depósito de seguridad y la

recuperación o reciclaje. Cada país en materia legislativa adopta sus normativas correspondientes para la gestión de estos residuos, así como diversos organismos internacionales como la Agencia de Protección Ambiental de EEUU (EPA), la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), la Comunidad Europea (CE) y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) (Enkerlin, *et al.*, 1990; OCDE, 1998).

La industrialización ha supuesto un aumento espectacular en la exposición a agentes químicos, algunos de ellos nuevos. Entre éstos destacan productos inorgánicos como el plomo, mercurio, arsénico, cadmio y asbesto, o productos orgánicos como los bifenilos policlorados (BPC), el cloruro de vinilo, o el pesticida diclorodifeniltricloroetano (DDT). Una peculiaridad de algunos de estos agentes químicos es la capacidad de facilitar el desarrollo de un cáncer por producir cambios químicos en el ADN (Herrera, *et al.*, 1992), como el cáncer de pulmón y

los mesoteliomas relacionados con el asbesto, el cáncer de hígado por cloruro de vinilo, o las leucemias relacionadas con la exposición al benceno. La enfermedad de Minamata, producida por ingerir pescado contaminado por mercurio, y la enfermedad de Yusho, relacionada con alimentos contaminados con furanos clorados, son ejemplos de procesos tóxicos agudos que acaecen fuera del ámbito laboral (Repetto, 1995).

No se conoce con detalle el efecto perjudicial de la mayoría de los tóxicos del entorno. La incidencia y frecuencia de cada enfermedad guardan relación con la dosis de toxina. Para los efectos crónicos o retardados, como el cáncer o las alteraciones en los descendientes de los individuos expuestos, no hay un umbral de dosis seguro por debajo del cual no se desarrolla la enfermedad. En consecuencia, el efecto cancerígeno de ciertos agentes ambientales contaminantes como el DDT o los BPC es de una magnitud desconocida (Calow, 1990).

BIFENILOS POLICLORADOS (PCB)

Sustancias consideradas como residuos tóxicos y peligrosos, que son utilizadas sobre todo en mezcla líquida con triclorobenceno en el aislamiento eléctrico y la refrigeración de determinados tipos de transformadores eléctricos. Estos transformadores pueden estar situados en postes de vías públicas o terrenos privados, así como en el interior de edificios, industrias o locales. Las fuentes de PCB en la naturaleza proceden exclusivamente de la actividad humana.

Son sustancias poco biodegradables y se acumulan en los organismos; en los peces, algunos de los efectos que producen son: la inhibición del crecimiento de organismos marinos, mayor probabilidad de aparición de tumores y la

disminución de la resistencia a parásitos. El hombre tiene contacto con estas sustancias al ingerir sobre todo pescado.

En el caso del ser humano, las exposiciones repetidas pueden dar lugar a irritación de piel, afecciones hepáticas, neurológicas y bronquitis crónica.

En la mayoría de países, la fabricación de PCB está totalmente prohibida y también se han dictado normas en relación al transporte, almacenamiento y etiquetado; además, es precisa una autorización para gestionar y eliminar los residuos de PCB (Harte, J., *et al.*, 1995).

DIOXINAS

Cada uno de los compuestos orgánicos conocidos químicamente como dibenzo-p-dioxinas, están formados por dos anillos de benceno unidos por un par de átomos de oxígeno: $\left[\text{C}_6\text{H}_4 - \text{O} - \text{O} - \text{C}_6\text{H}_4 \right]$

Son poco solubles en agua y muy estables, ya que pueden permanecer en el aire, el agua y el suelo durante varios años sin ser degradados. Generados en distintos procesos industriales, son compuestos altamente contaminantes y tóxicos (Enkerlin, *et al.*, 1999). Las principales fuentes de emisión de dioxinas son los procesos de incineración, los de fabricación de Cloruro de polivinilo (PVC) y algunas industrias del metal y del papel (Tschirley, F., 1986).



Figura 9. En 1976, la explosión de la planta química italiana Seveso, que expuso a miles de personas a la dioxina acentuó la inquietud general hacia este producto

El 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (2,3,7,8-TCDD), o solamente dioxina, es el más tóxico de todos ellos. Puede originar enfermedades en la piel y anomalías genéticas, así como varios tipos de cáncer. En 1976 se produjo un accidente industrial en Seveso (Italia), liberándose a la atmósfera una cantidad importante de este compuesto (figura 9), lo que

llevó a la evacuación de unas 700 personas y ocasionó la muerte de un gran número de animales. No se conocen aplicaciones benéficas de la dioxina.

El dioxano y el tetrahidrofurano (THF) son disolventes muy útiles debido a su relativa baja reactividad frente a otros reactivos; son miscibles en el agua y en muchos compuestos orgánicos. El tetrahidrofurano se emplea con frecuencia, en lugar del éter etílico, como disolvente en reacciones de Grignard y en reacciones de reducción con hidruros metálicos.

El furano generalmente se halla combinando en las estructuras de muchos productos naturales. En sus reacciones, el furano se asemeja bastante a sus análogos de nitrógeno y azufre, el pirrol y el tiofeno. El tiofeno exhibe muchas de las propiedades de un éter cíclico, de un sistema diénico 1, 3 y de un compuesto aromático. El ácido acuoso se rompe formando un compuesto dicarbonílico 1, 4; adiciona cuatro átomos de hidrógeno dando tetrahidrofurano y experimenta muchas reacciones de sustitución electrofílica (Repetto, 1995).

Los procesos industriales generan, además:

1. **TETRACLOROETILENO:** solvente de las tintorerías rápidas; genera reacciones alérgicas; puede provocar abortos y cáncer.
 2. **FENOL o HIDROXIBENCENO:** Se usa para prevenir o reducir el deterioro oxidativo de los alimentos. Al igual que algunos conservadores como el Hidroxitolueno (BHT) y el hidroxianisol butilado (BHA), tienen efecto antimicrobiano. Se les combina para conservar la calidad del alimento.
- intoxicación crónica: La absorción de fenol en pequeñas dosis de forma repetida puede provocar trastornos digestivos, irritación de las vías respiratorias y trastornos nerviosos (marasmo félico). Pueden estar acompañados de manifestaciones cutáneas (eritemas, eczema, etc.).

- Intoxicación aguda. Acción sobre la piel y las mucosas; el fenol provoca lesiones locales cuya gravedad está en función del tiempo del contacto o de la concentración de las soluciones, hasta producir gangrena fénica. Acción por ingestión: puede sobrevenir la muerte en un lapso de tiempo generalmente corto por síncope respiratorio.
 - Puede causar la muerte por cianosis, ya que transforma la hemoglobina en meta hemoglobina (donde la porción HEM está en estado férrico). De este modo, este componente esencial de la sangre pierde su capacidad de transportar oxígeno a los tejidos.
3. BENCENO: respirar benceno puede causar somnolencia, mareo y pérdida del conocimiento; la exposición de larga duración produce alteraciones en la médula de los huesos, puede causar anemia y leucemia.
 4. CADMIO: las fuentes más comunes son las pilas, pinturas, barnices, el PVC. Daña los pulmones, los riñones e irrita el tubo digestivo. Es cancerígeno y puede provocar afecciones serias en el embarazo.
 5. CLOROBENCENO: los efectos por respirarlo incluyen pérdida de la conciencia, temblores, agitación y la muerte. La exposición prolongada ha producido daño al hígado y los riñones y el SNC.
 6. CROMO: La exposición ocurre al ingerir alimentos o agua contaminada o al respirar aire contaminado en el trabajo. La exposición a altos niveles de cromo puede dañar la nariz y producir cáncer.
 7. HIDROCARBUROS POLICICLICOS AROMÁTICOS: sospechosos como agentes de cáncer de pulmones. Se sintetizan cuando se calientan los aceites y sobre todo en productos ahumados. Están relacionados con cáncer de colon y próstata.

8. **NITRATOS:** originados en desechos cloacales. Modifica la capacidad de la hemoglobina para transportar oxígeno. Genera cianosis.
9. **NITRITOS:** también afecta la hemoglobina; además, puede formar compuestos cancerígenos, como las nitrosaminas.
10. **PENTACLOROFENOL:** pesticida de uso restringido. Se usa industrialmente para preservar la madera. Aumenta la temperatura corporal, afecta al hígado, daña al sistema inmunitario, afecta la reproducción y el desarrollo.
11. **PLOMO:** síntomas precoces; fatiga, dolor de cabeza, dolores óseos, abdominales, musculares, trastornos del sueño, de la conducta, impotencia, etc. Síntomas avanzados: anemia, cólicos intestinales, náuseas, vómito, impotencia sexual, trastorno renal, delirio, esterilidad, daños al feto, hipertensión arterial, estreñimiento agudo, afectación de los nervios, problemas óseos, cáncer, muerte. Causa el saturnismo, enfermedad que puede desembocar en la locura. Deteriora la capacidad de aprendizaje.
12. **TALIO:** en dosis altas se han descrito vómitos, diarrea, caída del cabello, efectos al sistema nervioso, pulmones, corazón, hígado y riñones (Córdoba, 1991; Klaassen y Watkins, 1999).
13. **EL CLORURO DE POLIVINILO (PVC):** El plástico envuelve gran cantidad de quesos y fiambres, además de usarse en botellas y embalaje. Como al resto de plásticos, para hacerlos maleables, se les agrega ablandadores, estabilizantes, lubricantes, blanqueadores, etc. Los elastificantes del PVC pertenecen a la familia de los ftalatos, comprobados como cancerígenos (Repetto, 1995). Algunos alimentos grasos como los quesos, son particularmente sensibles al fenómeno de migración, donde se transfieren componentes desde el envase hacia el producto contenido en ellos debido a cambios físicoquímicos (Harte, J. *et al.*, 1995; Klaassen y Watkins, 1999)

NITROSAMINAS

En Noruega en 1962, después de un brote epidémico de intoxicación por pienso en las ovejas, se detectaron concentraciones muy altas de nitrosaminas en harina de arenque que se había tratado con nitrito como conservante. Las ovejas presentaron una grave alteración hepática y muchas murieron (Shibamoto, 1996).

La preocupación creció a partir de observaciones hechas por Magee y Barnes en 1967, al advertir el carácter tóxico de la N-nitrosodimetilamina (NDMA). Dos años más tarde, en 1969, los mismos autores descubrieron el carácter mutagénico y carcinogénico de esta misma sustancia.

Las nitrosaminas son insolubles en el medio acuoso, y generalmente se separan como aceites amarillos.

Las N-nitrosaminas pueden encontrarse en alimentos de diversa naturaleza, aunque generalmente se hallan siempre en cantidades muy pequeñas en ellos. Posteriormente, otras investigaciones evidenciaron la formación de N-nitrosaminas a partir de precursores durante el procesamiento y el almacenamiento de alimentos (figura 10) e incluso *in vivo* en el estómago (Sen, *et al.*, 1969) en el intestino por acción bacteriana (Shepard, *et al.*, 1987) y en la boca a partir de los componentes de la saliva (Tannenbaum, *et al.*, 1976).



Figura 10. Los nitritos son elaborados en especial para usarse en la conservación de carnes (jamón, tocino, salchichas) y pescado encurtidos.

Las sustancias de las que se sospecha son por tanto, aminas secundarias, primarias y terciarias, diaminas y agentes nitrosantes, como los nitritos, que

durante largo tiempo han sido utilizados para tratar y conservar carnes y otros alimentos. Los nitritos se combinan en los alimentos o en el organismo humano con aminos y amidas naturales para formar nitrosaminas. Se cree que los altos niveles de nitritos/nitrosaminas presentes en la dieta contribuyen a la elevada incidencia de cáncer esofágico características del norte de China e Irán (Repetto, 1995).

Desde principios de la década de 1960 hay conciencia de los problemas potenciales de los nitritos, aunque la alarma aumentó en 1973 cuando se detectaron nitrosaminas en el tocino frito (OMS, 1978).

Los nitrosocompuestos han demostrado ser carcinógenos potentes y, recientemente, se ha tomado consideración en el uso de nitritos como conservadores de alimentos. Las bacterias estomacales reducen los nitratos a nitritos y, en presencia del HCl estomacal, los nitritos se convierten a ácido nitroso. Así, el ácido nitroso reacciona con ciertas aminos secundarias corporales formando nitrosaminas (Repetto, 1995; Klaassen y Watkins, 1999).

ADITIVOS ALIMENTARIOS

Los aditivos alimentarios son agregados intencionadamente a los alimentos y bebidas, a diferencia de los contaminantes (presencia generalmente accidental), con el objeto de modificar sus caracteres organolépticos, facilitar o mejorar su proceso de elaboración y/o conservación.

Aunque muchos de estos aditivos han sido usados durante largo tiempo y se consideran sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS) las intoxicaciones crónicas que se han producido por su presencia en múltiples alimentos, los fenómenos de hipersensibilidad y riesgo de cancerogénesis, hacen que continuamente se estén investigando las posibles acciones de estas sustancias, sus mecanismos de toxicidad y se revisen las reacciones idiosincrásicas (reactividad anormal) a las mismas.

CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR PLAGUICIDAS

Con el incremento de la contaminación por pesticidas aumentó la necesidad de la población por conocer los efectos causados por dichas sustancias (Carrillo y Velez, 1996). Los plaguicidas son ampliamente utilizados en todo el mundo (figura 11) a pesar del daño ecológico que muchos han provocado debido a su baja tasa de biodegradabilidad, como el DDT, aldrín y dieldrín (Klaassen y Watkins, 1999).



Figura 11. El uso de insecticidas incluye la aplicación en polvo o en forma de líquido atomizado; en los cultivos muy extensos, los plaguicidas se esparcen con avionetas.

Muchos de estos compuestos están prohibidos en México pero algunos otros continúan utilizándose. Se han detectado pozos de agua contaminados con 1,2 dibromo-3-cloropropano, en el área de Fresno, California (Grella, *et al.*, 1994; Zou, *et al.*, 1995; Klos, 1996).

Por otra parte en México se detectaron plaguicidas llamados organoclorados en aguas de riego en el Valle de Mexicali (Carrillo y Vélez, 1996). Varios tipos de pesticidas fueron encontrados en camarón de granjas acuícolas del centro de Sinaloa y el puerto de San Blas, Nayarit (Ramírez *et al.*, 1996).

Los efectos directos de la exposición a plaguicidas en el hombre comprenden daños que van desde simples irritaciones epidérmicas hasta envenenamientos, mutaciones genéticas, cáncer y finalmente la muerte (Gómez, *et al.*, 1992; Moses, 1992; IARC, 1991).[†]

Al mismo tiempo, los efectos genotóxicos de pesticidas y sus mezclas se reportan *in vitro* (Dolara *et al.*, 1994). Por lo anterior, la contaminación del suelo, aire y agua por pesticidas es un riesgo. El plaguicida DDT y muchas otras sustancias elaboradas por el hombre que experimentan amplificación biológica contienen cloro, el cual tiende a estabilizar las moléculas. Todas las sustancias de este tipo tienen tres propiedades que las hacen peligrosas:

1. No son biodegradables, es decir, los organismos descomponedores no las degradan fácilmente a sustancias inocuas.

2. Son venenos universales, causan envenenamiento no selectivo en los animales.

3. Son solubles en grasas, pero no en agua; por tanto, se acumulan en el cuerpo de los animales, especialmente en la grasa, en vez de ser degradadas y excretadas en la orina acuosa.

En virtud de que estas sustancias permanecen en el cuerpo, un depredador acumula el veneno de su presa a lo largo de muchos años (Turk, Turk, Wittes; 1991; Audesirk T. *et al.*, 2004).

MUTACION Y MUTÁGENOS

Una mutación es un cambio en el material genético de las células; este cambio puede ser espontáneo o por causas externas, y si ocurre durante el desarrollo de una célula sexual, las mutaciones pasan a la generación siguiente.

Los mutágenos son agentes externos que pueden ocasionar cambios en el material genético de células (Ramírez, 2001), debido a esto, la frecuencia de mutación puede incrementarse con la exposición a ellos. Se dividen en tres grupos: agentes físicos, químicos y biológicos.

MUTÁGENOS FÍSICOS

Aquí se agrupan varios tipos de radiaciones que elevan la frecuencia de eventos mutacionales como: rompimientos, rearreglos y/o distorsión de la cadena de ADN al alterar las bases (dímeros de timina) bloqueando así futuras replicaciones (Ramírez, 2001). Las radiaciones pueden ser ionizantes como los rayos alfa, beta, gamma (figura 12); y las radiaciones no ionizantes como los rayos X, rayos ultravioleta, etc.



Figura 12. Una bomba nuclear libera radiación que origina lesiones graves a largo plazo en los individuos que sobreviven a la explosión inicial.

- Rayos Ultravioleta (UV)

Los rayos ultravioleta inducen mutaciones de tipo puntual y cromosómica (Griggs y Bender 1973; Meltz, 1991) y se han obtenido un gran número de mutantes en *Neurospora* en diversas levaduras (Lí y Loretz, 1991).

En adición, el sistemático deterioro de la capa de ozono incrementó la penetración de este tipo de radiación y algunos estudios señalan la relación entre la exposición

solar y el incremento de cáncer de piel. La radiación ultravioleta se emplea para esterilizar superficies porque mata a bacterias y virus.

- Rayos X

Las mutaciones causadas por la acción de los rayos X fueron descubiertas por Muller, H.J. en 1927, desde entonces, el modelo más utilizado para estudiar las radiaciones a sido la *Drosophila melanogaster* y es con ella, que se han obtenido gran cantidad de datos sobre la inducción de mutaciones génicas y variaciones estructurales por estos agentes (Lindsley y Grell, 1968).

- Ondas ultrasónicas

Las ondas ultrasónicas con una frecuencia de 400.000 ciclos por segundo pueden producir mutaciones letales en *Drosophila melanogaster* (Ciaravino *et al.*, 1986), así como variaciones estructurales en los cromosomas somáticos de plantas (Meltz 1991).

MUTÁGENOS QUÍMICOS



Fig. 13 Siempre queda un resto de sustancia en el envase, que termina normalmente en la basura acumulando residuos peligrosos potencialmente mutágenos.

Los mutágenos químicos producen cambios en el ADN como son las sustituciones de bases y ocasionan errores de apareamiento. Se calcula que en la actualidad un ser humano común puede estar expuesto a un promedio de 100 mil diferentes sustancias (figura 13).

Aunque se calcula que en la actualidad existen aproximadamente 13 millones de diferentes compuestos

orgánicos y cien mil de los inorgánicos, la velocidad con la que se diagnostica su peligrosidad genética es notablemente inferior a la cantidad de nuevas sustancias producidas (Ramírez, 2001; Franco, *et al.*, 2003).

Entre los mutágenos químicos se pueden citar los análogos de bases del ADN (como la 2-aminopurina), moléculas que se parecen estructuralmente a las bases púricas o pirimidínicas pero que muestran propiedades de apareamiento erróneas; los agentes alquilantes como la nitrosoguanidina, que reacciona directamente con el ADN originando cambios químicos en una u otra base y produciendo también apareamientos erróneos; y, por último, los agentes intercalantes como las acridinas, que se intercalan entre 2 pares de bases del ADN, separándolas entre sí (Harte, *et al.*, 1995; Ramírez, 2001).

MUTÁGENOS BIOLÓGICOS

Respecto a los mutágenos biológicos éstos producen cambios que van desde simples rompimientos cromosómicos hasta la pulverización total del complemento cromosómico (Ramírez, 2001). Los virus pueden producir diferentes tipos de cánceres en animales, por ejemplo, en el ser humano, el virus de Epstein-Barr se asocia con el linfoma de Burkitt, el carcinoma nasofaríngeo y los linfomas, el virus de la hepatitis B está implicado con el hepatocarcinoma, el virus herpes simple (tipo 2) y varios tipos de papiloma virus humanos están relacionados con el cáncer cervical (Ramírez, 2001).

Como mutágenos biológicos podemos considerar la existencia de virus capaces de integrarse en el genoma; el virus provoca una mutación al integrarse en medio de un gen e inactivarlo.

BIOENSAYOS GENÉTICOS

El sistema más adecuado para detectar actividad mutagénica es aquel que localiza los mutágenos antes de que estos manifiesten sus efectos en los seres humanos. Por lo anterior, resulta apropiado basarnos en datos obtenidos en sistemas de prueba sobre otros organismos (bioensayos), siempre y cuando estén expresadas las limitaciones y diferencias en el metabolismo y en los sistemas de reparación del ADN (Li y Loretz, 1991).

Algunos autores opinan que tales diferencias no son tan evidentes y que los resultados pueden extrapolarse inclusive al hombre; estos tipos de estudios se han recomendado a la Organización Mundial de la Salud (Grant, *et al.*, 1994).

En muchos países se establecieron los requisitos de ensayos (agudo o de corto plazo y crónico o de largo plazo) y se fijaron normas y niveles de tolerancia, así como el desarrollo de una serie de bioensayos de tiempos cortos para la observación de cambios genéticos. Estos sistemas de prueba tienen diferentes propósitos como son:

1. búsqueda de productos ambientales con propiedades carcinogénicas.
2. identificación de carcinógenos en fluidos del cuerpo.
3. entendimiento de los mecanismos de la activación química de carcinógenos y sus reacciones con el ADN y
4. predicción de carcinogenicidad de sustancias.

Generalmente se requieren de 2 o 3 bioensayos para afirmar que una sustancia química es carcinogénica (Casiano, 1991).

Actualmente se cuenta con una gran variedad de pruebas con las que se puede determinar daño genético o detectar compuestos genotóxicos; estas pruebas pueden ser bioquímicas, realizarse *in vivo* o *in vitro*, con microorganismos

o macroorganismos, pueden determinar daño microscópico o molecular (Han, *et al.*, 1995; Seraj, 1996).

PRUEBAS DE DETECCION DE AGENTES GENOTOXICOS

Los agentes genotóxicos son sustancias que pueden dañar al ADN y pueden ser tanto mutagénicos como carcinogénicos (Harte, *et al.*, 1995).

Debido al gran número de compuestos que se liberan al ambiente y a que los métodos de prueba tradicionales para evaluar su potencial toxicológico presentan algunas desventajas, como el tiempo empleado y el consecuente incremento en el costo, se están explorando posibles metodologías alternativas a la utilización de animales vivos. En este campo los estudios de toxicología *in vitro* han ganado aceptación durante los últimos años (Flint, 1988).

Algunas ventajas de utilizar sistemas *in vitro* para evaluar la toxicidad de los compuestos radica en el hecho de que estos modelos pueden propagarse y dividirse en réplicas idénticas, caracterizarse y conservarse por congelamiento, crecer en medios selectivos, separarse genotípicamente a fin de obtener clones celulares con bastante uniformidad y ser tratadas con dosis controladas de sustancias. Durante la evaluación de la toxicidad de los compuestos pueden analizarse parámetros como viabilidad, respiración e integridad de la membrana (Camatini *et al.*, 1996).

El impacto provocado en la salud por la exposición a agentes genotóxicos radica en que la inducción de daño genético ocasiona un incremento en la tasa de mutación de las células germinales de humanos (ovocitos, espermatozoides y sus precursores) y puede ocasionar un incremento en la incidencia de enfermedades genéticas en generaciones futuras.

Por su parte, las mutaciones en células somáticas pueden contribuir a varios desórdenes en la generación presente, como la inducción de padecimientos cardíacos, procesos de envejecimiento y principalmente en la formación de neoplasias (Hoffman, 1992).

La realización de pruebas de genotoxicidad de corta duración para evaluar la posible carcinogenicidad de las sustancias se fundamenta en la teoría de que los procesos neoplásicos son provocados en una primera etapa por un daño al material genético de las células (Weinstein, 1988; Ames, 1975).

Las pruebas microbiológicas para detectar actividad genotóxica se basan en dos premisas: primera, que los sistemas de ensayos microbianos proporcionan un método eficiente para detectar agentes que podrían interactuar con el ADN y causar mutaciones. Y segundo, que en general el ADN de los microorganismos tiene la misma estructura doble helicoidal y los mismos nucleótidos que los demás organismos, entre los que se incluye al hombre; por lo tanto, la prueba con bacterias es válida para la detección de agentes genotóxicos (Sobels, 1987).

PRUEBA DE AMES, USOS E IMPORTANCIA



Figura 14. La prueba mejor conocida para valorar mutágenos es la prueba de Ames, en la que se administra una sustancia química a una cepa de bacterias *Salmonella*.

Uno de los métodos más utilizados y validados es el ensayo de *Salmonella*/microsomal o prueba de Ames, la cual emplea diferentes cepas de *Salmonella typhimurium* auxótrofas a la histidina (figura 14).

La detección de mutágenos se basa en la capacidad del compuesto para revertir la mutación de auxotrofia, la cual se observa por el crecimiento de la bacteria en un medio de cultivo carente del aminoácido limitante (Ames *et al.*, 1975).

Esta metodología ha sido reconocida por varios laboratorios para detección de agentes carcinogénicos y evaluación de riesgos genéticos en mezclas complejas, aditivos alimenticios, residuos industriales, aguas potables y residuales (Kier et al., 1986).

Modificación genética en las cepas de la prueba de Ames: Existen diversas cepas de prueba con características particulares. Estas cepas contienen diferentes tipos de mutaciones que afectan la síntesis de histidina (auxotrofia). En general, se agrupan en dos clases: las cepas que detectan sustituciones de pares de bases y cepas que detectan mutaciones que ocasionan corrimiento del marco de lectura del ADN (Maron y Ames, 1983).

Adicionalmente a la auxotrofia a histidina, las cepas de prueba han sido manipuladas genéticamente para hacerlas más sensibles a la detección de mutágenos: (Padilla C., Feria V., 2001).

Mutación *rfa*, la cual ocasiona una pérdida parcial de la barrera lipopolisacárida que protege a la bacteria, con aumento de su permeabilidad a moléculas de alto peso molecular que no penetran una pared celular normal en la bacteria.

Mutación *uvr B*, que impide el mecanismo de reparación por escisión, del ADN.

Plásmido pKM101, que incrementa la mutagénesis inducida y espontánea, con apoyo al sistema de reparación del ADN propenso al error, normalmente presente en estos organismos.

Plásmido pAQ1, presente en la cepa TA 102, que acarrea la mutación defectiva para la biosíntesis de histidina.

Cada una de las cepas de prueba presenta un número característico de reversión espontánea. Es importante determinar el valor de reversión espontánea en cada prueba de mutagenicidad que se realice (tabla 1).

Genotipos	Cepas de prueba				
	TA 1535	TA 1537	TA 98	TA100	TA 102
his- (auxotrofia a histidina)	+	+	+	+	-
rfa (daño a la permeabilidad de la membrana)	+	+	+	+	+
uvr B (sistema de reparación por escisión dañado)	+	+	+	+	-
Plásmido pkM101 (afectación al sistema de reparación de ADN propenso al error)	-	-	+	+	+
Plásmido pAQ1 (acareea la auxotrofia a histidina)	-	-	-	-	+
Rango de reversión espontánea	3-18	4-18	1-46	45-179	240-320

Tabla 1. Cepas de prueba y sus genotipos

En la actualidad, la prueba de Ames es una herramienta importante para la evaluación rápida de nuevos agentes, que probablemente estarán en contacto con los humanos, así como de los agentes ya existentes, con la finalidad de tener su completo perfil toxicológico y evaluar riesgos de manera oportuna (Alvarez M.C., 1998).

PRUEBA DE MICRONÚCLEOS

Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que espontáneamente o por causa de agentes clastógenos, como las radiaciones, o aneuploidógenos, como la vincristina, quedaron fuera del núcleo (Heddle *et al.*, 1991; Schmid, 1975).

Los animales en general presentan gran variación en las frecuencias de MN (figura 15) desde sumamente bajas a frecuencias de MN espontáneos en buen número (Zúñiga *et al.*, 1996; Zúñiga *et al.*, 2000). Cuando estos organismos son expuestos a genotóxicos micronucleogénicos, los MN se incrementan de manera significativa en sus eritrocitos y pueden ser los organismos con estas características bioindicadores naturales (Zúñiga *et al.*, 1998; Alvarez, *et al.*, 2002).

Su forma es generalmente redonda o almendrada. Después de la telofase los cromosomas completos, así como los fragmentos que posean centrómeros, dan origen a los núcleos de las células hijas. Los elementos rezagados quedan incluidos en el citoplasma y una proporción de éstos es transformada en uno o varios núcleos secundarios, mucho más pequeños que el núcleo principal, de ahí su nombre de micronúcleos (Heddle, *et al.*, 1983)



Figura 15. Los micronúcleos forman pequeños núcleos secundarios y pueden ser o no característicos de una especie.

En el humano, el número de MN espontáneos en eritrocitos de sangre periférica es cercano a uno por 100,000 eritrocitos en condiciones normales; si se expone a genotóxicos como las drogas antineoplásicas o si por indicación del hematólogo es esplenectomizado, de inmediato se incrementa en éste el número de estas estructuras.

Entre las ventajas de la técnica de MN como bioindicador natural se incluyen la facilidad y rapidez, la posibilidad de probar la actividad mutagénica de un solo químico sin otros compuestos, la abundancia de células analizables en diferentes periodos del ciclo celular y el hecho de que los MN formados durante la

división celular persisten al menos durante la siguiente interfase (Heddle, *et al.*, 1991; Heddle *et al.*, 1983; Schmid, 1975; Hayashi *et al.*, 1990).

Entre sus limitaciones está que la prueba no detecta agentes que no producen fracturas o rezagos anafásicos (como translocaciones e inversiones en los cromosomas); tampoco es útil en poblaciones celulares que no se dividen, ni cuando se prueban carcinógenos órgano-específicos o especie-específicos (Heddle, *et al.*, 1983; Schmid, 1975).

CARIOTIPO

El método clásico para la observación de daño citogenético es el examen de preparaciones en metafase de células tratadas con el agente que se va a probar in vivo o in vitro. La prueba de cariotipo consiste en obtener los cromosomas metafásicos del organismo y mediante la observación al microscopio con el objetivo de inmersión 100X Determinar si el número de pares de cromosomas observados corresponde al de la especie y mediante técnicas de bandeo, revisar cada uno de los cromosomas para verificar que éstos se encuentran completos (figura 16).

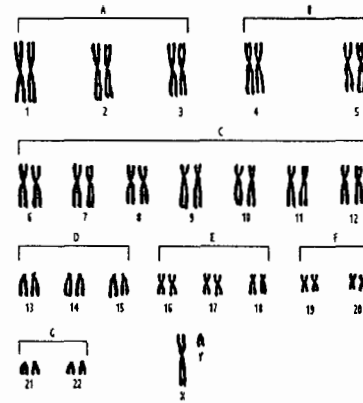


Figura 16. Cada especie tiene un número de cromosomas determinado; en la especie humana hay 23 pares de cromosomas en 8 grupos según el tamaño y la forma. Las diferencias entre individuos reflejan la combinación genética de estos juegos de cromosomas al pasar de una generación a otra.

Algunos inconvenientes que presenta la técnica del cariotipo para el estudio de los genotóxicos son:

- a) se requiere conocer la morfología de los cromosomas de la especie con que se va a trabajar.
- b) En el caso de los cultivos, la técnica es costosa, consume mucho tiempo y requiere de la observación de gran número de metafases para concluir validez estadística.
- c) Muchas especies de aves, reptiles y anfibios presentan complementos cromosómicos constituidos por macro y microcromosomas, éstos últimos son las más de las veces imposibles de analizar. (Duellman y Trueb, 1994; Takagi *et al.*, 1972).

PRUEBA DE MUTACIÓN ROSA EN *Tradescantia* (CLON 4430)

Una prueba muy empleada y confiable para evaluar genotoxicidad es la prueba de mutación rosa en los pelos estaminales de *Tradescantia*; se destaca por su sencillez y se utilizó para detectar el efecto de un amplio espectro de agentes químicos y mezclas complejas (Underbrink *et al.*, 1973; Schairer *et al.*, 1982; Ahmed y Grant, 1992; Grant y Salamone 1994; Ma. *et al.*, 1994; Sandhu *et al.*, 1994; Álvarez, 1998).

Se basa en los cambios de color de las células de los pelos estaminales como criterio para determinar mutación. Se utiliza la condición heterocigota (Aa) en la que se expresa como dominante el color azul y el color rosa como recesivo. La pérdida, inactivación o mutación del alelo dominante resulta en una célula rosa (Álvarez, 1998).

La prueba de mutación rosa es un bioensayo utilizado para la detección de cambios genéticos provocados por diferentes compuestos químicos y físicos en el medio ambiente, sin embargo, los resultados pueden variar de acuerdo a la naturaleza de los agentes (Aguilera, 1996).

Algunas especies de *Tradescantia*, entre ellas, *Tradescantia virginiana* tienen la característica de poseer pocos cromosomas. Existen mas especies como son:



Figura 17. Flor de *Tradescantia* clon 4430.

Tradescantia occidentalis,
Tradescantia ohioensis, *Tradescantia subacalis* y *Tradescantia hirsutiflora*, con estas dos últimas se logró obtener un híbrido conocido como clon 4430 (figura 17).

(Grant, *et al.*, 1992; Alvarez, 1998).

El clon 4430 se propaga vegetativamente y se puede mantener en condiciones de invernadero donde florece por largos periodos de tiempo. El principio básico de prueba de *Tradescantia* (clon 4430) se basa en el color de las células estaminales de la flor como criterio para determinar mutaciones (Mericle y Mericle 1967). El clon es heterocigoto para el color de la flor (Aa) en la que se expresa el color azul de los pelos estaminales como dominante y el color rosa como recesivo (Mericle y Mericle 1967; Ma, *et al.*, 1994).

Cuando los pelos estaminales son jóvenes se encuentran en división celular activa, esta etapa es adecuada para la inducción de mutaciones. Cada pelo estaminal se deriva de una célula epidérmica simple y crece a través de divisiones sucesivas de células terminales y subterminales.

En la madurez los estambres muestran un rango de 40-70 pelos cada uno conteniendo arriba de 32 células aproximadamente; el número varia de acuerdo al clon y a las condiciones de cultivo (figura 18) (Aguilera, 1996).

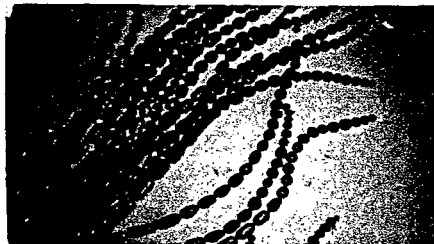


Figura 18. Pelos estaminales de *Tradescantia* clon 4430

PRUEBA DEL COMETA ALCALINA

Otra sensible prueba para detectar actividad genotóxica es la prueba del cometa, la cual fue reportada por Singh y colaboradores en 1988. Esta prueba permite la visualización de daño directamente en el material genético mediante la observación en el microscopio de células individuales sometidas a un campo electroforético. Mostró su eficiencia en núcleos de *Tradescantia* para la detección de daño genético inducido por hidrazida málica, entre otras sustancias químicas (Álvarez *et al.*, 2001b).



Figura 19. Núcleo cometizado donde se observa rompimiento en el ADN.

La PCA permite medir el rompimiento en el ADN (figura 19) y detectar sitios sensibles al álcali en células de mamífero y algunas plantas (Arévalo, 1999; Tebbs *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 1998; Kopen y Vershaeve, 1996; Álvarez, *et al.*, 2002) y es muy empleada ya que es rápida, simple y sensible.

Otras técnicas utilizadas para medir el daño al ADN, detectan la fragmentación pero involucran la lisis de una población de células de modo que ellas miden la media de la respuesta de las células individuales y no la respuesta de cada célula.

Bastan sólo unas cuantas células (1-10,000) para realizar el ensayo y los resultados se obtienen en un día (McKelvey-Matin *et al.*, 1993). Con esta prueba se estudió la inducción de daño sobre el ADN en células cultivadas y en suspensión, así como en sistemas *in vivo*.

Con la PCA es posible obtener imágenes, lo que facilita la observación y el análisis (figura 20), además de que su costo es sumamente bajo, por lo que es una excelente herramienta para la detección de agentes genotóxicos.

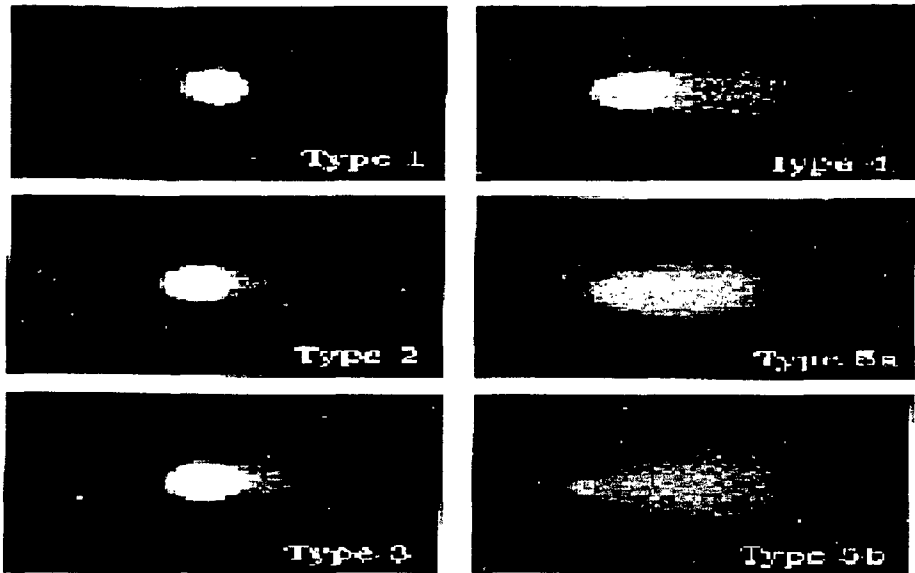


Figura 20. Con la PCA se pueden obtener imágenes que permiten medir el grado de rompimiento del ADN en la célula individual.

La PCA tiene varias ventajas:

- a) Es posible investigar el grado de rompimiento del ADN en pequeñas muestras de tejidos animales y biopsias humanas.
- b) Se lleva a cabo en pocas horas y, si se cuenta con un analizador de imágenes, los resultados son obtenidos y evaluados inmediatamente.
- c) En términos generales, el equipo es el mismo utilizado para otros ensayos de poca duración con excepción del analizador de imágenes, el cual es costoso, pero resulta ventajoso tenerlo (Singh, *et al.* 1988; Álvarez, *et al.*, 2002).

METODOLOGIA EMPLEADA EN LA PCA

En esta técnica las células se colocan dentro de un gel de agarosa sobre un portaobjetos (figura 21), posteriormente se someten a electroforesis por poco tiempo bajo condiciones alcalinas, ya que esta condición facilita la apertura de la doble hélice. Las células con un incremento de daño en su ADN presentan una mayor migración hacia el ánodo o bien, una mayor intensidad (fluorescencia) de la cauda con respecto a las células normales. El resultado de lo anterior es un núcleo con apariencia de un cometa en la cual pueden analizarse distintos parámetros que miden el daño genético.

Prueba Cometa Alcalina

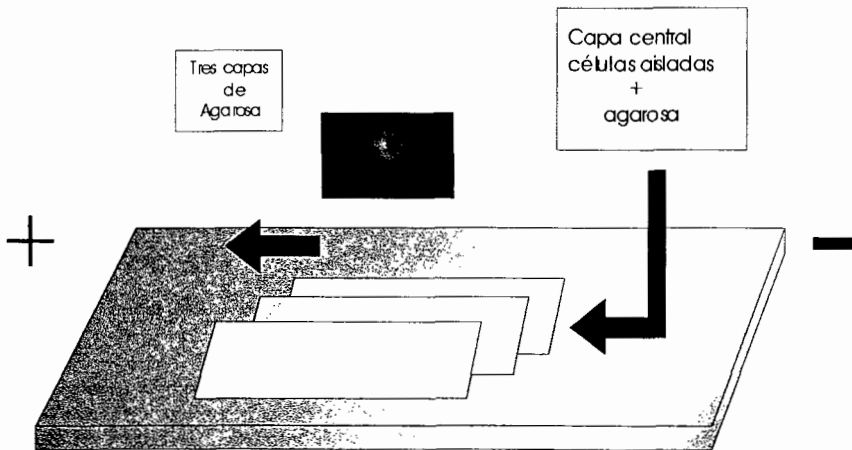


Figura 21. En esta técnica los núcleos de las células o las células mismas se colocan dentro de un gel de agarosa sobre un portaobjetos, posteriormente son electroforizadas bajo condiciones alcalinas.

La longitud de la migración se cuantifica por la tinción con bromuro de etidio en el microscopio de fluorescencia (Singh *et al.*, 1988). Un esquema general del protocolo de la prueba del cometa se presenta en la figura 22.

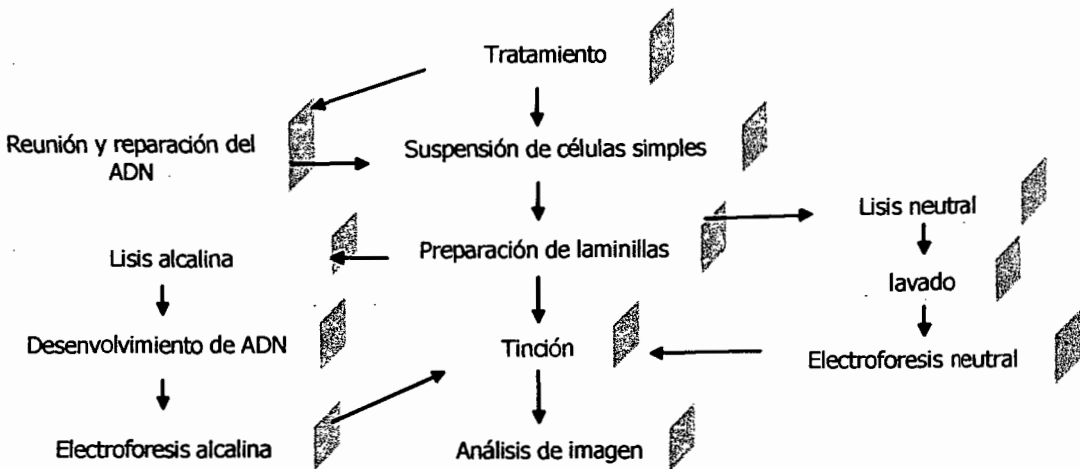


Figura 22. Esquema del procedimiento general para la prueba del cometa (Singh, *et al.*, 1988).

Varios laboratorios en el mundo utilizan la metodología descrita por Singh *et al.*, en 1988. Los pasos que él empleó son los siguientes: los linfocitos son separados de la sangre, luego se lavan y suspenden en una solución amortiguadora de fosfato a una concentración de 3 millones de células /ml. De 1000 a 500,000 células son mezcladas con 25 μ l de 0.5% de agarosa de baja temperatura de gelificación (LMP) y después son puestos en una laminilla perfectamente limpia en donde previamente se deposita una capa delgada de agarosa de temperatura normal de solidificación (NMP) para que exista una unión firme con la segunda capa. La suspensión de células es cubierta con un cubreobjetos y la laminilla se coloca a 4°C por 5 minutos para permitir la solidificación de la agarosa. Posteriormente se remueve el cubreobjetos y el portaobjetos es cubierto con una tercera capa de LMP, después se pone nuevamente a 4° C.

Exposición al agente a probar

Las células encontradas dentro de la agarosa se exponen al agente a probar. Para evitar la reparación del ADN dañado por los agentes las laminillas se colocan a 4° C y luego en solución amortiguadora (sarcosinato de sodio 1%, NaCl 2.5 M, Na₂-EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10, y Triton X-100 1%) por una hora para lisar las células y permitir desenvolvimiento de las bases del ADN.

Después, las laminillas son depositadas en una cámara de electroforesis horizontal y se llena con solución amortiguadora de electroforesis fresca (Na₂-EDTA 1 mM, y NaOH 300 mM) a un nivel de 0.25 cm arriba de las laminillas y se dejan en esta solución de alto pH durante 20 minutos para permitir la separación de las hebras del ADN antes de la electroforesis.

El paso siguiente es la electroforesis; durante 20 minutos a 25 voltios. Es recomendable realizar todos los pasos anteriores bajo luz amarilla para prevenir mayor daño al ADN. Después las laminillas se lavan en una solución Tris 0.4 M, pH 7.5. para remover el álcali y detergentes que puedan interferir con la tinción del bromuro de etidio. A los 5 minutos las laminillas son teñidas colocando 25 μ l de bromuro de etidio (20 μ g/1 ml) en agua destilada y se procede a cubrir las laminillas con un cubreobjetos.



Figura 23. Núcleos cometizados observados con microscopía de fluorescencia, donde se observa el típico "cometa".

Para la observación, las laminillas se colocan en un microscopio de fluorescencia que tenga un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrido de 590 nm. En este paso se pueden obtener microfotografías a una magnificación de 400X o bien utilizar el analizador de imágenes (Comet Assay System) (figura 23). Es posible medir manualmente la longitud y área de la

cola del cometa a partir de microfotografías pero, obviamente, es preferible contar con el equipo para el análisis de las imágenes ya que proporciona más información, permite medir la intensidad de la fluorescencia y no sólo la longitud como en el caso de los negativos de las microfotografías. La migración se determina en por lo menos, 20 células escogidas al azar en cada grupo estudiado. Obtenidas las migraciones se procede a los cálculos estadísticos.

Análisis del ADN dañado obtenido en la PCA

Cuando los núcleos o células son procesados con la PCA se observa un centro bien teñido seguido de una “cauda” que se desliza hacia el ánodo, ésta es de menor intensidad que la del centro de las células o núcleos. Cuando hay rompimiento del ADN, la cauda se extiende al ánodo con mayor longitud que el ADN de células no dañadas (figura 24).



Figura 24. gráfica donde se observa la longitud de la cauda de una célula cometizada.

En otros casos, la longitud de la cola puede mantenerse igual a la de células testigo, pero la intensidad de la fluorescencia se incrementa significativamente en las células con material genético dañado (Gedik *et al.*, 1992). Mientras que la longitud de la cola cambia sólo un 21%, cuando existe gran cantidad de rompimientos del ADN la intensidad de la misma puede llegar a ser más del doble (Olive *et al.*, 1990).

Aunque la longitud de la cola se usa para medir daño genético, sobre todo cuando existen altos niveles de rompimiento de hebras, por sí sola, no es un buen parámetro de medición porque no se incrementa cuando existen bajos niveles de daño. La mejor forma de cuantificar el incremento de ADN dañado consiste en

calcular el "momento de la cola" (tail moment). Este parámetro es un híbrido de la longitud de la cola y el porcentaje del ADN en la cola y se calcula directamente en el programa para el análisis de imágenes (Comet Assay System) (Olive *et al.*, 1990).

Análisis estadístico

La longitud de la cola del cometa es empleada para medir el daño genético, por lo tanto, es necesario determinar una media de migración de ésta en cada punto experimental. Se deben obtener los datos de la distribución de la longitud de los cometas de cada tratamiento. La información generada se analiza con pruebas estadísticas paramétricas como el análisis de Varianza (ANOVA), las cuales asumen una distribución normal y unimodal respectivamente de valores (McKelvey-Matin *et al.*, 1993).

Aunque lo importante en las pruebas de genotoxicidad es determinar si un agente es o no genotóxico, siempre es deseable medir la relación lineal dosis-respuesta. Debido a que esta condición no se cumple con la PCA se sugiere que el área o momento de cola se utilice para una mejor determinación de la genotoxicidad (McKelvey-Matin *et al.*, 1993).

Algunas variaciones opcionales al método publicado por Singh *et al.*, se presentan en el cuadro 1. Estas modificaciones se realizaron de acuerdo al propósito de cada trabajo:

Erbes *et al.*, (1997) realizaron cambios menores como el uso de amortiguador alcalino con detergentes y la reducción de los tiempos de preincubación y electroforesis. También Tebbs *et al.*, (1999) cuantificaron el rompimiento de hebras de ADN en células individuales de muestras de tejido muy pequeñas. Una modificación de la PCA utilizando una enzima bacteriana

reparadora de ADN: uracil ADN glicosidasa se empleó para detectar la incorporación errónea de uracilo en ADN humano Duthle, McMillan, (1999).

PROCEDIMIENTO	NATURALEZA DE LA VARIACIÓN	COMENTARIOS
Concentración de agarosa	Capa 1: 1% APNGT (75-85 μ l) en CSP a 65° C Capa 2: 0.7-1% ABPG (75-85 μ l) en CSP 37° C conteniendo la suspensión celular en CSP a una proporción de 10:1 Capa 3: 0.7-1% ABPG (65-75 μ l) en CSC a 37° C	(1) La concentración de agarosa descrita es la mínima para trabajar. (2) Si se trabaja con agua ultra pura en lugar de CSP se requiere de 0.8% (75ul) de APGN para la capa 1 y para las capas 2 y 3, 0.5& (75 μ l) de ABPG.
Capa adicional de agarosa	1 ml de APGN 1% es aplicada sobre la laminilla antes de la primera capa. Esta capa permitirá, una vez eliminada con una segunda laminilla, incrementar la adhesión.	Mejora la adhesión.
Lisis	No es necesario el sarcosinato de sodio	
Tiempo de desempaquetamiento y temperatura de la electroforesis	El tiempo de desempaquetamiento puede extenderse por arriba de los 40 minutos: desempaquetamiento y temperatura de electroforesis 4° C / 5° C/ 10° C/ 15° C.	A temperaturas de 15° C o por arriba, es posible inducir cometas de células control.
Tiempo de electroforesis y voltaje	20V (1V/ cm), 3000 mM, 24 minutos o 25 V, 15 minutos o 25 V, 300 mA, 25 minutos.	El incremento en el tiempo de la electroforesis incrementa la longitud de las colas del cometa.
Tinción	4,6-Diamidino-2-fenilindol (5 μ g / ml de H ₂ O), naranja de acridina (8.5 mg/ml), Hoechst 33258 (0.5 mg). Se requiere de filtros de excitación y barrido.	Una sensibilidad comparable para detectar daño genético en cometas teñidos se obtiene con BrdUrd.
Reuso de laminillas	Las laminillas congeladas pueden ser reusadas pero requieren sonicación o lavar perfectamente en camptox 10% seguida de varias lavadas con agua destilada.	No es recomendado.

APGN= agarosa de punto de gelificación normal, CSP= células de sangre periférica, ABPG= agarosa de bajo punto de gelificación, BrdUrd= Bromuro de oxiuridina.

Cuadro 1. Variaciones opcionales en la metodología de la PCA.

COMPARACION DE LA PRUEBA DEL COMETA CON OTROS SISTEMAS DE PRUEBA

La PCA se utiliza en combinación con otros sistemas para evaluar el efecto de los agentes genotóxicos y garantizar un mayor grado de certeza. En el cuadro 2 se presentan algunos estudios que utilizaron la PCA en combinación con otras pruebas.

Cuadro 2. Utilización conjunta de la PCA y otras pruebas para detectar daño genético.

TIPO DE EXPOSICION	AGENTE PROBADO	TIPO DE CÉLULAS UTILIZADAS	PRUEBAS EMPLEADAS	DAÑO GENETICO	COMENTARIO	REFERENCIA
<i>In vitro</i>	H ₂ O ₂	Linfocitos	PCA PMN	+ +		Cordelli, et al., 1999
M	Paclitaxel	Linfocitos	PCA PMN	+ +		Digue, et al., 1999
<i>In vitro</i>	1 clorohexano 2,3- diclorobutano 1,2-dicloroetano tetracloruro hexacloroetano	Linfocitos	PCA PMN	+ +	Positiva para 3 de 5 reactivos pero detecta efecto sinérgico. No detecta efecto sinérgico.	Stocker, al., 1998
<i>In vitro</i>	TMTD	Linfocitos Esplenocitos	PCA PCA PMN	+ - -		Villalobos, et al., 1995
<i>In vivo</i>	Humo de cigarro	Linfocitos	PCA PMN	+ +		Anord, et al., 1997
O	1-3 butadieno	Linfocitos	PCA PMN PAC ICH	- - + +		Repetto, 1995
O	Estireno	Linfocitos	PCA PAC	+ -		Sobels, 1987
<i>In vivo</i>	Ciclofosfamida	Linfocitos	PCA	+		Miyamae, et al., 1998
<i>In vitro</i>	Benzo(a) pireno	Hepaticitos	PMN PAC	+ +		Villani, 1998
<i>In vitro</i>	Etopóxico isoproturon	Ovario de hamster chino	PCA PAC	+ +		Vander, 1991

PMN prueba de micronúcleos, PCA prueba del cometa alcalino, PAC porcentaje de aberraciones cromosómicas, ICH intercambio de cromátides hermanas, O ocupacional, M médico

Como se observa, es frecuente el uso de la PCA simultáneamente con la prueba de micronúcleos (PMN), al parecer, ambas pruebas tienen eficiencia similar para detectar daño genético, pero PMN depende del tipo de agente estudiado y la clase de células evaluadas (Monteith, 1995; Vrzoc, 1995).

Existe evidencia de que la PMN es menos sensible que la PCA para detectar daño genético producto del sinergismo de agentes genotóxicos (Tafazoli, 1998).

Las pruebas citogenéticas: frecuencia de aberraciones cromosómica e intercambio de cromátidas hermanas se utilizan junto con la prueba del cometa porque también detectan daño genético inducido (cuadro 2).

No obstante el uso frecuente de baterías de prueba, no existen estimaciones porcentuales de la eficiencia de la PCA con respecto a otros sistemas. La sensibilidad de la prueba puede incrementarse aún más cuando se inhibe la reparación del ADN durante la exposición, lo que repercute en una valoración más precisa de la actividad genotóxica (Martin, 1999), lo anterior, puede resultar una ventaja más sobre los otros sistemas.

DETECCION DE AGENTES GENOTOXICOS CON LA PCA

Con esta prueba más de 200 agentes químicos han sido examinados en varias especies, tanto *in vivo* como *in vitro*. El cuadro 3 presenta algunos de los estudios que emplean la PCA para detectar actividad mutagénica o bien, agentes con propiedades desmutagénicas, es decir, que neutralizan o revierten la actividad del mutágeno.

ANTIMUTÁGENO	AGENTE	TIPO DE CELULAS ESTUDIADA	REFERENCIA
	PARAQUAT	LINFOCITOS Y ÓVULOS DE HAMSTER	Vigreux, et al., 1998 Speit, et al., 1998
	RADIACIÓN CROMICA	LINFOCITO	Weinstein, 1988 Griggs, Bender, 1973
	RADIACIÓN GAMA	LINFOCITO	Balpaeme et al., 1998 Anderson, et al., 1998 Fairbair, et al., 1995
	ANILINAS		Przybajewska, 1998
	COBALTO		Anord, et al., 1997 Van-Goethem, et al., 1997
	METRONIDAZOL		Fhring, Engelke, 1997
	NIVALENOL		Tsuda, et al., 1998
	AEROSOL PRODUCIDO POR LA IRRADIACIÓN DE TEJIDO CON LASER	LINFOCITO	Stocker, et al., 1998
	1-CLOROHEXANO 2,3-DICLOROBUTANO, 1,2-DICLOROETANO	LINFOCITO	Tafazoli, et al., 1998
ACIDO FOLICO	PIRIMETAMINA	TEJIDO DE RATON	Tsuda, et al., 1998-bis
MELTONINA	ETIL METANOSULFONATO		Masatow, et al., 1998
YOGOURT		COLON DE RATA	Agrobusiness, 1996

Cuadro 3. Algunos agentes genotóxicos estudiados con la PCA.

PERSPECTIVAS DE USO DE LA PRUEBA COMETA

PCA COMO BIOMONITOR AMBIENTAL

Un importante elemento dentro de las ciencias ambientales es el monitoreo de agentes genotóxicos. Las pruebas empleadas para ello deben ser rápidas, baratas, exactas y reproducibles, pero no todas cumplen con estos requerimientos. En este sentido, PCA cumple con lo anterior y tiene un amplio campo de aplicación (Cuadro 4). Las mezclas complejas como aeropartículas urbanas (figura 25) fueron evaluadas con esta prueba (Poli *et al.*, 1999).

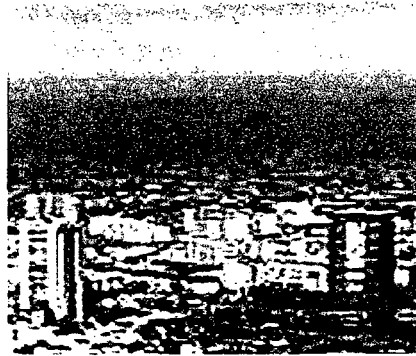


Figura 25. De las partículas que flotan en el aire, las más perjudiciales para la salud humana son las de un diámetro menor a 10 micras, ya que son inhalables.

Por otra parte, en México D.F., también se estudiaron las partículas suspendidas utilizando *Salmonella typhimurium* y mostraron fuerte actividad mutagénica (Villalobos *et al.*, 1995) aunque la PCA podría utilizarse para evaluar directamente el daño genético en los linfocitos de las personas expuestas a estas partículas.

INTEGRIDAD DEL ADN: LA PCA COMO HERRAMIENTA DE DIAGNOSTICO

La PCA se emplea no sólo como un sistema para detectar actividad genotóxica inducida por agentes xenobióticos, se utiliza también para diagnosticar alteraciones genéticas en las células independientemente de si fueron o no expuestas a genotóxicos (Collins *et al.*, 1997) (cuadro 4).

ORIGEN DEL DAÑO O FORMA DE CONTACTO CON EL AGENTE	TIPO DE AGENTE	MANIFESTACIÓN CLÍNICA	TIPO DE CELULAS ESTUDIADAS	MARCADORES GENETICOS DETECTADOS	REFERENCIA
M	Isofluoreno (Anestésico) Tolueno		Linfocitos		Anderson, et al., 1998-bis Baltaci, et al., 1998
A H	Radiación Violeta Humo del cigarro	Cáncer de piel	Linfocitos		Anord, et al., 1997 Djuzenova, et al., 1999 González, et al., 1999
G		Aborto habitual			Pítarque, et al., 1999
G		Síndrome Alveolar intersticial	Linfocitos	Presencia de artefactos	Palus, et al., 1999
G		Diabetes mellitus	Linfocitos		Zhong, et al., 1997
G		Ataxia Telangietasia	Linfocitos		Ulku, et al., 1999
M- A	Medicamentos y Desnutrición		Linfocitos		Frenzilli, et al., 1998
O	1,3 Butadieno, sílica, Acetona, Tolueno, fibra de vidrio,		Linfocitos		Sacaron, et al., 1998 Vijaya, et al., 1999 Villalobos, et al., 1995
M- A	Radiación		Linfocitos		Zhu, et al., 1999 López, et al., 1999
A	Virus A2/HK/68	Incremento de aborto habitual	Linfocitos		DeBoeck, et al., 1998
A	Aeroparticulas		Linfocitos		Woolions, et al., 1997
O	Polvo de Tabaco		Linfocitos		Poli, et al., 1999
A	Metales pesados y materiales de cerámica			Células branquiales de Ostión	Balpaerne, et al., 1998 Erbes, et al., 1997

H= habitual, A= ambiental, O= ocupacional, G= genético, M= médico

Cuadro 4. Algunos estudios que reportan daño genético en el hombre detectado con la PCA. En países como EE.UU. Rusia y Europa.

En México se requieren estudios de este tipo porque existe poca cultura para el uso de sistemas de protección a los mutágenos, lo cual evidentemente, incrementa el riesgo de sufrir alteraciones genéticas.

La PCA tiene gran potencial como biomonitor de daño genético en personas expuestas a mutágenos y carcinógenos. En México existen muchas áreas en donde se debería valorar el daño genético inducido por sustancias químicas, tanto en personas como animales o vegetales, por ejemplo:

En 1998 se utilizaron en nuestro país 50,000 toneladas de pesticidas (Semarnap, 1998) y esto ha tenido repercusiones no muy favorables para la salud (Palacios-Nava *et al.*, 1999). Por lo anterior, es necesario estudiar el efecto genotóxico de estos pesticidas sobre las personas o animales expuestos directa o indirectamente y la PCA es el candidato ideal.

La PCA es una herramienta ideal para la detección de agentes genotóxicos en ecosistemas acuáticos (Balpaeme *et al.*, 1998) y la utilización de las células de organismos propios de estos sistemas como la rana verde (*Rana clamitans*) (Ralph, 1998) o algas verdes (Erbes *et al.*, 1997) son muy adecuadas, especialmente en los cuerpos de agua cercanos a complejos industriales (Ralph, 1998). En México, los metales pesados como el Cd^{+2} y el Cr^{+3} se encuentran frecuentemente como contaminantes mortales (figura 26) en ecosistemas

acuáticos, por ello, la utilización de la PCA para el diagnóstico de daño genético puede resultar útil (Alvarez, *et al.*, 2002).



Figura 26. El cadmio, como residuo del empleo de fertilizantes y el cromo, de origen industrial, son tóxicos reconocidos presentes en el agua.

Debido a su simplicidad, sensibilidad y a que sólo se requiere de unas cuantas células, la PCA resulta ideal como prueba de genotoxicidad de corta duración (Tice, 1990). Esta prueba puede, teóricamente, ser utilizada en cualquier célula nucleada (Koppen, Verschaeve, 1996) pero, frecuentemente, se utilizan los linfocitos como células centinelas para detectar los efectos de la exposición a diversos agentes (Poli, *et al.*, 1999; Salama, *et al.*, 1999). Hay un factor importante que debe considerarse: ciertos órganos son más susceptibles que otros a los genotóxicos (Sasaki, *et al.*, 1997), por lo que, la PCA efectuada sobre células blanco será más representativa (Tsuda *et al.*, 1998; Sasaki, *et al.*, 1998).

COMPORTAMIENTO GENOTOXICO DE SUSTANCIAS CON LA PRUEBA DEL COMETA

Los agentes genotóxicos poseen peculiaridades en cuanto al tipo de células que afectan y las alteraciones genéticas que ocasionan. El metil metanosulfonato y dietilnitrosamida poseen genotoxicidad órgano-específica evidenciada con el empleo de la PCA (Ralph S., Petras M, 1998). En cuanto a la clase de daño, algunos aldehídos genotóxicos como el glioxal y metilacroleina producen un elevado "momento de cola" y manchas características de ADN con áreas pequeñas y altamente condensadas. Otras como la acroleina y el formaldehído no afectan el tiempo de la cola pero si cambian las manchas observadas en el ADN (figura 27) (Olive, *et al.*, 1990^a).

Las áreas condensadas son, quizá, consecuencia de la actividad de entrecruzamiento de estos aldehídos sobre el ADN, lo que sugiere que este sistema se puede utilizar para evaluar el tiempo de la cola y los cambios en las manchas de ADN (Kuchenmeister, 1998; Miyamae *et al.*, 1998; Andreoli *et al.*, 1999).

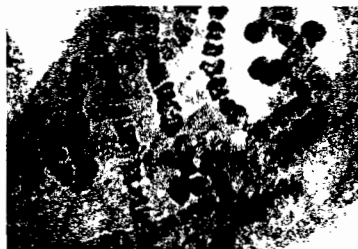


Figura 27. Los carcinógenos químicos actúan sobre porciones del ADN que sufren alteraciones y ocasionan el comienzo del fenómeno canceroso.

ANÁLISIS DE LA COMIDA EXPUESTA A PESTICIDAS Y RADIACION

Las carnes radiadas presentan células con ADN dañado (Cerdea *et al.*, 1991), por lo cual, el empleo de la PCA hace posible distinguir las de las no radiadas. Por otra parte, gran cantidad de alimentos de origen vegetal suelen contener residuos de pesticidas, muchos de ellos carcinogénicos (Moses, 1992), por ello, el daño en células de plantas o animales que consumen estas plantas, puede evidenciarse mediante el empleo de la PCA, ya que como se mencionó, es, teóricamente, aplicable a cualquier célula (Koppen, Angelis, 1998).

PCA EN PLANTAS

Las plantas son monitores muy útiles para detectar daño genotóxico pero pocos trabajos emplean la PCA en células vegetales (Poli *et al.*, 1999; Koppen *et al.*, 1999). La medición de daño en el ADN en los núcleos de las plantas, a través de esta prueba, es una nueva área de estudio. Sin embargo, los métodos para aislar los núcleos de las células de plantas causan altos niveles de daño al ADN, por ello, es importante mejorar estas metodologías para emplear la PCA con más eficiencia en plantas (Koppen *et al.*, 1999; Gichner, 1998). Recientemente este sistema fue utilizado en cepas de *Allium* e *Impatiens* para detectar el efecto genotóxico de mezclas complejas de contaminantes del aire como ozono, benceno, óxidos de nitrógeno y aeropartículas (Poli *et al.*, 1999).

También ha sido detectado daño genético en los núcleos de *Tradescantia* (4430) (figura 28) y *Agave tequilana* después de someter las plantas al efecto de la hidrazida málica (Arévalo, 1999).

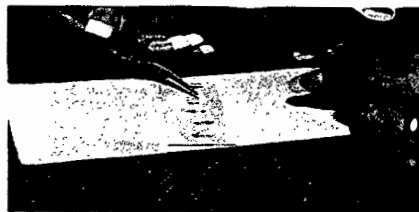


Figura 28. Preparación de la muestra

PRUEBA DEL COMETA Y CANCER

El monitoreo de pacientes tratados con quimioterapéuticos antineoplásicos resulta muy importante para conocer el daño genético inducido por estos agentes. En un reciente estudio, se reportó el efecto genotóxico comparativo *in vivo* de diferentes drogas anticáncer con el empleo de la PMN (Torres, 2000). La PCA ofrece también esta posibilidad y, además, su sensibilidad para detectar daño en células individuales posibilita la identificación de subpoblaciones resistentes o sensibles a agentes que dañan el ADN (Olive *et al.*, 1990). Permite también, demostrar la eficiencia de un agente antineoplásico o la resistencia del tumor, usando obviamente, las células de ese tumor (Huang *et al.*, 1998) y detecta la radiosensibilidad de líneas celulares de tumores cervicales en células individuales (McKelvey *et al.*, 1998; Marples *et al.*, 1998).

Lo anterior resulta relevante porque la resistencia a drogas es un gran impedimento para erradicación de tumores cancerosos.

Sin embargo, no es posible predecir el grado de resistencia del tumor, lo cual, es importante debido a que cerca del 50% de los pacientes con carcinomas invasivos tratados con radioterapia responden al tratamiento, lo que significa que el otro 50% pierde un tiempo muy valioso, por lo tanto, es muy útil conocer la radiosensibilidad de un tumor útil para reorientar el tratamiento.

En combinación con el uso de parámetros citogenéticos, bioquímicos y morfológicos la PCA puede servir como una novedosa herramienta para predecir la fase de diversas displasias (Udumudi *et al.*, 1998). La PCA es particularmente útil para monitorear al personal involucrado en el manejo de quimioterapéuticos que tienen un alto riesgo de sufrir alteraciones genéticas.

Una ventaja adicional de la prueba es que permite analizar la capacidad de reparación del ADN en las células estudiadas (Udumudi *et al.*, 1998; Afana, *et al.*, 1997), en este sentido, el estudio de sustancias que incrementan la capacidad de

reparación del ADN sería muy relevante. En el cuadro 5 se presentan algunos estudios que emplean la PCA en pacientes con cáncer tratados con diversos agentes anticáncer.

ACTIVIDAD OCUPACIONAL	PACIENTES TRATADOS CON	TIPO DE CANCER	CELULAS ESTUDIADAS	DANO GENETICO	REFERENCIAS
<i>In vivo</i>	Yodo 131	Hipertiroidismo		+	Griggs, 1973
<i>In vivo</i>	Ciclofosfamida		Linfocitos	+	Godard, et al., 1999
Enfermeras			Linfocitos	+	Koppen, 1999
<i>In vitro</i>	Cisplatino Oxoplatino		Linfocitos	+	Koppen, Angelis, 1998
<i>In vivo</i> <i>In vitro</i>	Etopoxido Clorotalonil		Células de médula ósea Timocitos Ovario de hámster chino	+	Gichner, Plewa, 1998

Cuadro 5. Algunos estudios que emplearon la PCA en personal hospitalario que maneja drogas antineoplásicas y pacientes con cáncer tratados con diversos agentes anticáncer.

COMENTARIO FINAL.

Para detectar daño genético inducido por agentes químicos y físicos se han diseñado diversos sistemas de prueba; todas ellas poseen ventajas y desventajas en cuanto a costo, duración y sensibilidad. Los agentes genotóxicos poseen peculiaridades respecto a la clase de alteraciones genéticas que ocasionan y el tipo de célula que afectan, de ahí que se hayan desarrollado tanto y tan diversos bioensayos.

Algunas técnicas utilizadas para medir el daño al ADN, detectan la fragmentación pero involucran la lisis de una población de células de modo que ellas miden la media de la respuesta de las células y no la respuesta de cada una.

La prueba del cometa alcalino es una excelente herramienta para detectar agentes genotóxicos ya que posee una sensibilidad igual o mayor a la de otros sistemas de prueba (cuadro 6). Su creciente aplicación permite visualizarla como una prueba útil en muchos campos de la investigación científica; puede utilizarse en células animales o vegetales y emplearse en el diagnóstico o monitoreo de los efectos de los agentes genotóxicos, ya que detecta alteraciones del ADN en células individuales y permite medir su rompimiento, evaluar diferencias intercelulares y estudiar los sistemas de reparación del material genético en células eucariotas (McKelvey-Matin, *et al.*, 1993; Singh, *et al.*, 1988; Tebbs, *et al.*, 1999; Wagner, *et al.*, 1998).

TECNICA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
COMETA	<ul style="list-style-type: none"> - Usada para detectar daño genético o actividad mutagénica. - Detecta mutación génica y cromosómica. -Resultados en 24 horas. -Reproducibile. -Barata, una vez teniendo el equipo. 	-Es necesario contar con el equipo inicial.
PRUEBA DE MUTACION ROSA	<ul style="list-style-type: none"> - económica. - Confiable - Fácil mantenimiento de las plantas - Sencilla. 	<ul style="list-style-type: none"> - resultados en 15 días. - depende del tipo de mutágeno estudiado. - necesidad de un invernadero.
MICRONUCLEOS	<ul style="list-style-type: none"> - rapidez. - Sencilla. - Económica. - Reproducible. 	- detecta solo mutágenos capaces de romper los cromosomas.
AMES	<ul style="list-style-type: none"> - económica. - Sencilla. - Reproducible. 	Sensibilidad dependiente del mutágeno estudiado.

REFERENCIAS.

1. Afana'ev GG, Iwanenku T, Krusze W , Ski M, Pelevinall. DNA damage, their repair and apoptosis in the distant descendents of L5178 Y(R) cells following radiation exposure (the DNA – comet method). *Tsitologia* 1997; 38: 740-746.
2. Agrobusiness. Mercado de plaguicidas. 1996. Diciembre 16.
3. Aguilera, J. Evaluación de la prueba de *Tradescantia* para la detección de daño mutagénico. (Tesis de Licenciatura). Universidad de Guadalajara. 1996. p 47
4. Ahmed M. and Grant W. F. Cytological effects of the pesticides phodrin and bladex on *Tradescantia* and *Vicia faba* root tips. *Canadian Journal of Genetic Cytology*, 1992; 14: 157-165.
5. Alvarez M. C. Comportamiento genotóxico de tres agentes xenobióticos en *Drosophila melanogaster* y en *Tradescantia*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Guadalajara. México, 1998. p14.
6. Alvarez M. C., Santerre L. A., Zúñiga G. G., Torres B. O., Padilla C. E., and Feria V. A. Evaluation of genotoxic activity of maleic hydrazide, ethyl methane sulfonate, and N-nitrosodiethylamine in *Tradescantia*. México, 2001b; 43: 563-569.
7. Alvarez, M.C., Ochoa H.S., Ayala C.N., Urbina C.P. Uso y perspectivas de la prueba del cometa. *Revista Scientia*. (Enpresna). 2002.

8. Amdur, Mary O. Air Pollutants, en Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. Editado por Klaassen, Curtis D., Amdur, Mary O. Y Doull, John. 5ª edición, Nueva Cork, Macmillan, 1995.
9. Ames B.N., McCaun J., Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsoma mutagenicity test. *Mutation Research*. 1975. 31, 347-364.
10. Anderson D., Yu TW., McGregor DB., Comet assay responses as indicators of carcinogens exposure, *Mutagénesis*. 1998; 13: 539-555.
11. Anderson D., Yu TW., Wright J., Loannides C. AN examination of DNA strand breakage in the comet assay and antioxidant capacity in diabetic patient. *Mutat Res*. 1998; 398: 151-161.
12. Andreolí C, Leopardi P, Rossi S, Crebelli R. Processing of DNA damage induced by hydrogen peroxide and methylmethane sulfonate in human lymphocytes; analysis by alkaline single cell gel electrophoresis and cytogenetic methods. *Mutagenesis* 1999; 14: 497-504.
13. Anord D., Kirsch-Volderms M., Elhajouji A., Belpaeme K., Lisan D. In vitro genotoxic effects of hard metal particles assessed by alkaline single cell gel and elution assay. *Carcinogenesis*. 1997; 18: 177-184.
14. Arévalo H A. Evaluación de daño genético en células de *Agave tequilana* con "marchitez del agave": uso de la prueba del cometa (Tesis). Universidad de Guadalajara, México, 1999.
15. Audesirk, T. et al., *Biology: Life on Earth, Sixth Edition*. Pearson Education Inc. 2004; 11: 232-235.

16. Balpaeme F, Cooreman K, Kirsch-Volders M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutat Res* 1998; 415: 167-184.
17. Baltaci V., Aygün N., Akyol D., Karakaya A.E., Arda S. Chromosomal aberrations and alkaline comet assay in families with habitual abortion. *Mutat Res.* 1998; 417: 47-55.
18. Betti C., Davini T., Giannessi L., Luprieno N., Barale R., Microgel electrophoresis assay (comet assay) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res.* 1994; 307: 323-333.
19. Calow P. Handbook of ecotoxicology, Oxford, Blackwell Sc Pub, 1990.
20. Camatini M., Colombo A., Bonfanti P., Doldi M., Urani C., Dibisceglia M. Y Nagelkerke J.F. In vitro biological systems as models to evaluate the toxicity of pesticides. *Intern J Environ Anal Chem.* 1996. 65: 153-167.
21. Carrera P., Miguel M., López J., De la Torre C., Navarrete MH., In vivo response of mouse liver to γ -radiation assessed by the comet assay. *Mutat Res.* 1998; 413: 23-31.
22. Carrillo-Cedillo E. y Velez L. E. Plaguicidas organofosforados en aguas de riego del Valle de Mexicali, II Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, México, 1996, p 15.
23. Casiano A. D. Introduction : historical perspectives of the genetic toxicology. En: Genetic Toxicology. (Li. P.A. y Heflich R.H., Eds.) CRC Press, Nueva Jersey, 1991, 1-12.

24. Cerda H, Hofsten BV, Johanson KJ. Identification of irradiated food by microelectrophoresis of DNA from single cells. En: Leonard M, Billisaro JJ, ed. Workshop on Recent Advances of New Methods of Detection of Irradiation Food; 1991, 24-26.
25. Ciaravino V., Miller M. W., Carstensen E. L. Sister- chromatid exchanges in human lymphocytes exposed in vitro to therapeutic ultrasound. *Mutat. Res.* 1986, 172: 185-188.
26. Collins A, Dusinska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S et al. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications. *Environ Mol Mutagen* 1997; 30: 139-146.
27. Cordelli E., Altavista P., Leter G., Castaldi L., Villani P., Análisis of oxidative damage in cells in different phases of the cell cycle. *Neoplasma.* 1999; 46: 44-45.
28. Córdoba D. Toxicología 2ª ed. Medellín, Universidad de Antioquia, 1991.
29. DeBoeck M., Lison D., Kirsch-Volders M. Evaluation of the in vitro direct and indirect genotoxic effects of cobalt compounds using the alkaline comet assay. Influence of interdonor and interexperimental variability. *Carcinogenesis.* 1998; 19: 2021-2029.
30. Denison, R.A. y Ruston, J., Recycling and Incineration: Evaluation the Choices. Environmental Defense Fund, Washington, D.C.: Island Press, 1990.
31. Digue L., Orsiere T., De Meo M., Mattei MG., Depetris D., Duffaud F., Favre R., Botta A.; Avaluation of the genotoxic activity of paclitaxel in the in vitro micronucleus test in combination with fluorescent in situ hybridation of DNA

- centromeric probe and the comet assay in human T-lymfocitos. *Environ Mol Mutagen.* 1999; 34: 269-278.
32. Djuzenova CS., Schindler D., Tapon H., Hoehn H., Flentje M., Identification of ataxia telangiectasia heterozygotes, a cancer-prone population using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Lab Invest.* 1999; 79: 699-703.
33. Dolaro P., Torricelli F. and Antonelli N. Cytogenetic effects on human lymphocytes of a mixture of fifteen pesticides commonly used in Italy, *Mutation Res.* 1994; 325: 47-51.
34. Duellman W.E., Trueb L. *Biology of amphibians.* Johns Hopkins Paperback, Baltimore, Londres. 1994. pp. 445-459.
35. Duthle SJ, McMillan P. Uracil misincorporation in human DNA detected using single cell gel electrophoresis. *Carcinogenesis*; 1999, 18: 1709-7014.
36. Enkerlin E., Cano G., Garza R., Vogel E., *Ciencia Ambiental y Desarrollo Sostenible.* Internacional Thomson Editores, 1999.
37. Erbes M, Wessler A, Obst U, Wild A. Detection of primary DNA damage in *chlamydomonas reinhardtii* by means of modified microgel electrophoresis. *Environ Mol Mutagen* 1997; 30: 448-458.
38. Fairbair DW., Olive PL., O'Neill KL., The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res.* 1995; 339: 37-59.
39. Fhring R., Engelke M., Reinvestigation in vivo genotoxicity studies in man. No induction of DNA strand breaks in peripheral lymphocytes after metronidazole therapy. *Mutat Res.* 1997; 395: 215-221.

40. Flint O.P. In vitro toxicology: A commercial proposition. *Xenobiotica*. 1988. 18: 707-714.
41. Franco De la Torre J., Carranza R.R., Gárate R.E.B. *Química Orgánica*. Editorial Minerva, 2003, México.
42. Frenzilli G., Lori A., Panasuik G., Ferdeghini M., Barale R: Comet assay on children's leukocytes 8 years after the Chernobyl disaster. *Mutat Res*. 1998; 415: 151-158.
43. Garro, A.J. y Lieber, C.S., Alcohol and Cancer, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1990; 30:219-249.
44. Gedik CM, Ewen SW B and Collins AR. Single cell gel electrophoresis applied to analysis of UV – C damage and its repair in human cells. *Int J Radiat Biol* 1992; 62: 313-320.
45. Gichner T, Plewa MJ. Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and a point mutation leaves of tobacco plants. *Mutat Res*; 1998: 40: 143-152.
46. Godard T., Fessard V., Huet S., Mourot A., Deslandes E., Potier D. Comparative in vitro and in vivo assessment of genotoxic effects of etoposide and chlorothalonil by the comet assay. *Mutat Res*. 1999; 444: 103-116.
47. Gómez A. S., Noriega, A. N., Osorio A., Galicia F., Ling S., Villalobos-Pietrini R. Sister chromatid exchanges analysis in a rural population of México exposed to pesticides. *Mutat. Res*. 1992; 281: 173-179.
48. González C., Nájera O., Cortés E., Toledo G., López L., Daño al ADN inducido por medicamentos en linfocitos de niños desnutridos. En el VI Congreso

conjunto de las sociedades de genética y toxicología genética. México, 1999.
Sep. 19-24.

49. Grant WF., et al., The present status of higher plant bioassay for the detection of environmental mutagens. *Mutat Res* 1994; 310:175 - 185.
50. Grant WF, Lee HG, Logan DM, Salamone MF. The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassay for the in situ detection of mutagens in an aquatic environmental. *Mutat Res* 1992; 270:53-64.
51. Grant WF, Salamone MF. Comparative mutagenicity of chemicals selected for test in the International Program on Chemical Safety's collaborative study on plant systems for the detection of environmental mutagens. *Mutat Res* 1994; 310: 187-209.
52. Grella A., Spinaci A. De Filippis P. Volatile organic halogen compounds in the drinking water of the city of Rome. *Annali di Igiene*, 1994; 6:909-919.
53. Griggs, H. G. and Bender M. A. Photoreactivation of ultraviolet induced chromosoma aberrations. *Science* 1973; 179: 86-88.
54. Gutierrez S., Carbonell E., Galote P., Creus A., Marcos R., The alkaline single cell gel electrophoresis assay applied to the analysis of radiation induced DNA damage in thyroid cancer patient treated with ¹³¹I. *Mutat Res*. 1998; 413: 111-119.
55. Guzmán R.; Anaya, C., Educación Ambiental. Mc Graw Hill. 2001.

56. Han H. et al., Induction of a ADN adduct detectable by 32P-postlabeling in the dorsolateral prostate of NBL/Cr rats treated with estradiol-17Bb and testosterone. *Carcinogenesis*, 1995; 16: 951-954.
57. Harte, J. et al. *Guía de las sustancias contaminantes. El libro de los tóxicos.* Grijalbo 1995.
58. Hayashi M. *et al.*, The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res.* 1990. 245: 245-249.
59. Heddle J.A., Hite M., Kirkhart B., Mavoumon K., Mac Gregor J.T., Newell G.W., Salamone M.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox program. *Mutat Res.* 1983. 123: 61-118.
60. Heddle J.A. Et al., Micronuclei as an index of cytogenetic damage : past, present and future. *Environ Mol Mutagen.* 1991. 18: 277-291.
61. Herrera, A., et al. Effect of permethrin on the induction of sister chromatid exchanges and micronuclei in cultured human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 1992.
62. Hoffmann G. Genetic toxicology. En Amdur M., Doull J. Y Klassen C. (eds.). Casarett and Doull's toxicology : The basic science of poisons. Pergamon Press, Nueva York, 1992. pp. 201-225.
63. Huang P, Olive PL, Durand RE. Use of the come assay for assessment of drug resistance and its modulation in vivo. *Brit J Cancer* 1998; 77: 412-416.

64. IARC. Occupational exposures in insecticide application and some pesticides. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks on humans. Vol 53, Lyon (1991).
65. Jiménez, C. B. E. La Contaminación Ambiental en México. (Causas, Efectos y Tecnología Apropriada). Capítulo 1 y 2. Editorial Limusa, S.A. de C.V. México, D. F. (2001)
66. Kier L.D. The salmonella typhimurium/mammalian microsomal assay. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gem-Tox Program. *Mutat Res.* 1986. 168: 69-240.
67. Klaassen C.D., y Watkins III J.B. Manual de Toxicología. Quinta edición. Mc Graw Hill, México, 1999.
68. Kloos H. 1,2 Dibromo-3-Chloropropane (DBCP) and the ethylene dibromide (EDB) in well water in the Fresno/Clovis metropolitan area, California. *Arch. Environ. Health* 1996; 51: 291-299.
69. Koppen G, Angelis KJ. Repair of X-ray induced DNA damage measured by the comet assay in root of Vicia faba. *Environ Mol Mutagen* 1998; 32:281-285.
70. Koppen G, Toncelli LM, Triest L, Verschaeve L. The comet assay: a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves. *Mech Ageing Dev* 1999; 110: 13-24.
71. Koppen G, Verschaeve L. The alkaline comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in Vicia faba root cells. *Mutat Res* 1996; 360: 193-200.

72. Kuchenmeister F, Schemezler P, Engelhardt G. Genotoxic bifunctional aldehydes produce specific images in the comet assay. *Mutat Res* 1998; 419: 69-78.
73. Li A. P., Loretz L. J. Assay genetic. En *Genetic toxicology*, Ed. CRC. Press, New Jersey, 1991, pp. 119-142.
74. Lindsley D. L., Grell E. H. Genetic variation of the *Drosophila melanogaster*. *Carnegi Instit. Public.* 1968; 627, 1-62 p.
75. López Duran RM., Aguilar-Santamaría MA., y Rodríguez-Cruz L. Efecto de la exposición a una cerámica sintética sobre la proliferación y el material genético de linfocitos humanos en cultivo. En VI Congreso conjunto de las sociedades de genética y toxicología genética. México, 1999; sep 19-24.
76. Ma T. H., Cabrera G. L., Cebulski-Wasilewska A., Chen R., Loarca F., Vandenberg A. L. and Salamone, M. F. *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay. *Mutation Research* 1994; 310: 211-220.
77. Magee P.N., Barnes, J.M. Carcinogenic nitroso compounds. *Advances in Cancer Research*, 1967; 10, 114-122.
78. Maron D.M., Ames B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res.* 1983. 113: 173-215.
79. Marples B, Longhurst D, Eastham AM, West CW. The ratio of initial / residual DNA damage predicts intrinsic radio sensitivity in seven cervix carcinoma cell lines. *Brit J Cancer* 1998; 7: 1108-1114.

80. Martin FL, Cole KJ, Orne MH, Grover PL, Phillips PH, Venitt Stanley. The DNA repair inhibitors hydroxyurea and cytosine e arabinoside enhance the sensitivity of the alkaline e single cell gel electrophoresis ('comet') assay in metabolically-competent MCL- 5 cells. *Mutagenesis* 1999; 445: 21-43.
81. Masatow SA., Anisimov VN., André V., Vigreux C., Godard T., Modulator effects of melatonin on genotoxic response of reference mutagens in Ames test and the comet assay. *Mutat Res.* 1998; 417: 75-84.
82. McKelvey VS, Ho ET, Mckeown SR, Johnston SR, McCarthy PS, Rajab NF et al. Emerging applications of the single cell gel electrophoresis assay. I. Management of invade transitional cell human blade, carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization comets to: the identification of damage and repaired DNA sequence in individual cells. *Mutagenesis* 1998; 13: 1-8.
83. McKelvey-Matin V J, Arcen M HL, Schemezzer P, Pool-Zobel BL, Deméo MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutat Res* 1993; 288: 47-63.
84. Meltz M. L. Physical mutagens. En: *Genetic Toxicology* (P.A. Li y R.H. Heflich, Eds.). CRC. Press, Nueva Jersey, 1991; pp. 143-202.
85. Mericle M. W., y Mericle R. P. Genetic nature of somatic mutation of flowers color in *Tradescantia* clon 02. *Rad. Bot.* 1967; 7 , 449-464.
86. Miyamae Y, Zaizen K, Ohra K, Mine Y, Sasaki Y F. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell gel electrophoresis (comet) between the onset of DNA damage in the characteristics of mutagens. *Mutat Res* 1998; 415: 229-235.

87. Monteith DK, Vanstone S. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage. *Mutat Res* 1995; 345: 97-103.
88. Moses MD. Cosecha dolorosa. San Francisco; Pesticide Education Center, 1992; 114 p.
89. OCDE, Análisis del desempeño ambiental. México. Perspectivas. 1998.
90. Olive PL, Banáth J, Durand RE. Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay. *Radiat Res* 1990a; 122:86-94.
91. Olive PL, Banath JP, Durand RE. Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual Chinese hamster cells. *J Natl Cancer Inst* 1990; 2: 774-783.
92. Organización Mundial de la Salud. Nitrates, Nitrites, and N-Nitroso Compounds, Ginebra, 1978.
93. Padilla C.E. y Feria V.A. Prueba de Ames, usos e importancia en la detección de agentes genotóxicos. En Alvarez M.C. (Ed.). *Genética, Ambiente y Salud*. Universidad de Guadalajara. 2001. pp.117-126.
94. Palacios-Nava M, Paz-Roman P, Hernández-Robles S, Mendosa-Alvarado L. Sintomatología persistente en trabajadores industrialmente expuestos a plaguicidas organofosforados. *Salud publica, México*, 1999; 41: 55-61.
95. Palus J., Dzuibaltowska E., Rydzyski K., DNA damaged by the comet assay in the white blood cells of workers in a wooden furniture plant. *Mutat Res*. 1999; 444: 61-74

96. Pitarque M., Vaglenov A., Nosko M., Hirvonen A., Norppa H., Creus A. Evaluation of DNA damage by the comet assay in shoe worker exposed to toluene and other organic solvents. *Mutat Res.* 1999; 441: 115-127.
97. Poli P, Buschini A, Restivo FM, Ficarelli A, Cassoni F, Ferrero I. Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in human leukocytes and plant cells in comparison with bacterial yeast. *Mutagenesis* 1999; 14: 547-556.
98. Przybajewska B., An evaluation of the DNA damaging effect of selected online derivatives using the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Mutat Res.* 1998. 394: 53-57.
99. Ralph S, Petras M. Caged amphibian tadpoles and in situ genotoxicity monitoring of aquatic environmental with the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Mutat Res* 1998; 413: 235-250.
100. Ralph S., Petras M., Comparison of sensitivity to methyl methanesulphonate among tadpole developmental stages using the alkaline single-cell gel electrophoresis (cometa) assay. *Environ Mol Mutagen.* 1998; 31: 374- 382.
101. Ramírez, C. J., Ordorica, F. C., López, J. O., Ríos, M. A., Osuna, R. I., Uribe, B. M. Plaguicidas en agua y camarón capturados en granjas acuícola del centro de Sinaloa, II Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, México, 1996; p 9.
102. Ramírez M. M. Mutágenos químicos, físicos y biológicos. In: Alvarez-Moya C. (Ed.). *Genética, Ambiente y Salud*. Universidad de Guadalajara. 2001; p. 51-69

103. Repetto, M. Toxicología avanzada. Ediciones Diaz de Santos. 1995. Madrid, España.
104. Sacaron R.J., Rössner P., Peltonen K., podrazilova K., Demopoulos NA., Chromosomal aberration, sister-chromatid exchanges, cells with high frequency of SCE, micronucleus and comet assay parameters in 1,3-butadiene-exposed workers. *Mutat Res.* 1998; 419: 145-154.
105. Salama SA, Serrana M, Av WW. Biomonitoring using accessible human cell for exposure and health risk assessment. *Mutat Res* 1999; 436: 99-112.
106. Sandhu, S.S., De-Serres, F.J., Gopalan, H.N., Grant, W.F., Svendsgaard, D., Veleminsky, J., and Becking, G.C. Environmental monitoring of genotoxicity with plant systems. *Mutation Research*, 1994; 310: 257-263.
107. Sasaki YF, Saga A, Akasaka M, Nishidate E, Watanabe-Akanuma M, Ohta T et al. In vivo genotoxicity of heterocyclic amines detected by a modified alkaline single cell gel electrophoresis assay in a multiple organ study in the mouse. *Mutat Res* 1997; 395: 57-73.
108. Sasaki YF, Saga A, Akasaka M, Ishibashi S, Yoshida K, Su YQ et al. Detection of in vivo genotoxicity of haloalkanes and haloalkanes carcinogenic to rodents by the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay in multiple mouse organs. *Mutat Res* 1998; 419: 13-20.
109. Schairer L. A., Sautkulis R. C. and Tempel N. R. Monitoring ambient air for mutagenicity using the higher plant *Tradescantia*. In: R.R. Tice, D.L. Costa and K.M. Schaich (eds). *Genotoxic effects of airborne agents*. Plenum Press, N. Y. 1982; p. 123-140.
110. Schmid W. The micronucleus tests. *Mutat Res.* 1975. 31: 9-15.

111. Semarnap. Programa de Gestión Ambiental de las sustancias tóxicas de atención prioritaria. 1998.
112. Sen N.P., Smith D.C., Schwinghamer L., Marleau J.J. Diethy Initosmine and other N-nitrosaminas in foods. *Journal-of-the-Association-of-Official-Analytical-Chemists*. 1969. 52 (1) 47-52.
113. Seraj. M. J. et al. DNA adduct formation by hormonal steroids in vitro. *Mutation Research*, 1996; 370: 49-49.
114. Shibamoto, Takayuki; Bjeldanes, Leonard F; Introducción a la toxicología de los Alimentos. Editorial Acribia. 1996.
115. Singh N.P, McCoy M.T, Tice R.R, Schneider E.L. A simple technique for quantification of low levels of ADN damage in individual cells. *Experimental Cell Res*. 1988; 175: 184-191.
116. Sobels F.H. In vitro testing as a step in the evaluation of in vivo genotoxicity. *Mutat Res*. 1987. 189: 7-10.
117. Somovoska M., Tilinska J., Barancokova M., Collins A., Liskova A., Vallova B., Petrovska H., Jahnova E., Vodicka P., Fuortes L., Dusinska M., The comet assay biomonitoring of occupational exposure in rubber factory and plastic lamination plant Comparison with cytogenetic and immune biomarkers. *Neoplasma*. 1999; 46: 23-25.
118. Speit G., Haupter S., Hartmann A., evaluation of the genotoxic properties of paraquat in V79 chinese hamster cell. *Mutat Res*. 1998; 412: 187-193.

119. Stocker B., Meier T., Fliedner TM., Plappert V., Laser pyrolysis products: sampling procedures, cytotoxic and genotoxic effects. *Mutation Res.* 1998; 412: 145-154.
120. Tafazoli M, Baeten A, Geerlings P, Kirsch-Volders M. In vitro mutagenicity and genotoxicity study of a number of short – chain chlorinated hydrocarbons using the micronucleus test and alkaline single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in human lymphocytes: a structure – activity relationship (QSAR) analysis of the genotoxic and cytotoxic potential. *Mutagenesis* 1998; 13: 115-126.
121. Takagi N. Et al., Chromosome studies in four species of *Ratitae* (aves) *Chromosoma Berl.* 1972. 36: 281-291.
122. Tannenbaum S.R., Weisman M., Fett D. The effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. *Food-and-Cosmetics-Toxicology.* 1976. 14 (6), 549-552.
123. Tebbs RS, Cleaver JE, Pedersen RA, Hartmann A. Modification of the comet assay for the detection of DNA strand break in extremely small tissue sample. *Mutagenesis* 1999; 14: 437-438.
124. Tice; R. The single cell gel/ comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. En: Phillips DH, Venitt S, ed. *Environmental Mutagens.* Oxford: Bios Scientific Publisher, 1990: 315-339.
125. Torres B. Evaluación de la genotoxicidad de drogas antineoplásicas mediante el conteo de micronúcleos y otras anomalías nucleares en la

mucosa bucal y micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica (Tesis).
Guadalajara: Universidad de Guadalajara, 2000.

126. Tschirley, F., "Dioxin". Scientific American, 1986; 254 (2): 29-35.
127. Tsuda S, Kosaka Y, Musakami M, Matsua H, Matsusaka N, Taniguchi K, Sasaki YF. Detection of nivalenol genotoxicity in cultured cell and multiple mouse organs by the alkaline single cell gel electrophoresis assay. Mutation Res 1998; 415: 191-200.
128. Tsuda S, Kosaka Y, Matsusaka N, Sasaki YF. Detection of pyrimethamine – induced DNA damage in mouse embryo and maternal organs by the modified alkaline single cell gel electrophoresis assay. Mutat Res 1998; 415: 69-77.
129. Turiel, I., Indoor Air Quality and Human Health en Harte et al. Guía de las sustancias contaminantes. El libro de los tóxicos. Grijalbo 1995.
130. Turk, Turk, Wittes. Ecología, contaminación y medioambiente. Editorial Interamericana, México1991.
131. Udumudi A, Jaiswal M, Rajaswari N, Desai N, Jain S. Risk assessment in cervical dysplasia patients by single cell gel electrophoresis assay: a study of DNA damage and repair. Mutat Res 1998; 412: 195- 205.
132. Ülkü U., Faruk B., Nursen B. Use of the alkaline comet technique for monitoring DNA damage for low dose radiation. J: Occup Environ Med. 1999; 41: 693-698.
133. Underbrink A. C., Schairer L. A., and Sparrow A. H. *Tradescantia* stamen hairs: a radiobiological test system applicable to chemical mutagenesis. In: A.

- Hollaender (ed.). Chemical mutagens: principles and methods for their detection. Vol. 3. Plenum Press, N. Y. 1973; p. 71-207.
134. Van-Goethem F., Lison D., Kirsch-Volders M., Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. *Mutat Res.* 1997; 392: 31-43.
135. Vander, A. J. Nutrition, Stress and Toxic Chemicals. An Approach to Environmental Health Controversies, Ann Arbor, MI, The University of Michigan Press, 1991.
136. Vigreux C., Poul JM., Deslandes E., Lebailly P., Godad T., Sichel F. Dna damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay (comet assay) and the chromosomal aberration test, in CHOKI cells. *Mutat Res.* 1998; 419: 79-90.
137. Vijaya Lakshmi AN., Ramana MV., Vijayashree B., Ahuja YR., Sharma G., Detection of influence Virus induced DNA damage by comet assay. *Mutat Res.* 1999; 442: 53-58.
138. Villalobos-Prietrin R, Blanco S, Gomez-Arroyo S. Mutagenicity assessment of air bone particles in Mexico city. *Atmos Environ* 1995; 29: 517-524.
139. Villani P., Andreoli C., Crebelli R., Pacchierotti F., Zijno A., Carere A., Analysis of micronucleus and DNA single strand break in mouse splenocytes and peripheral lymphocytes after oral administration of thiran. *Food Chem Toxicol.* 1998; 36: 155-164.

140. Vrzoc M, Petras ML. Comparison of alkaline single cell gel (comet) and peripheral blood micronucleus assay in detecting DNA damage caused by indirect acting mutagens. *Mutat Res.* 1995; 381: 31-40.
141. Wagner ED, Rayburn AL, Anderson D, Plewa MJ. Calibration of the single cell gel electrophoresis assay, flow cytometric analysis and forward mutation in Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis* 1998; 13: 81-84.
142. Weinstein I.B. The origins of human cancer: Molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment. *Cancer Research.* 1988. 48: 4135-4143.
143. Wojewódzka M., Kruszewki M., Iwanefiku T., Collins AR., Szumiel I. Application of the comet assay for monitoring DNA damage in worker exposed to chronic low-dose irradiation. *Mutation Res.* 1998; 416: 25-35.
144. Woollons A., Clingen PH., Price ML., Arlett CF., Green MH. Induction of mutagenic DNA damage in human fibroblasts after exposed artificial tanning lamps. *Brit J. Dermatol.* 1997; 137: 687-692.
145. Zhong BZ., Whong WZ., Ony TM. Detection of mineral-dust-induced DNA damage in two mammalian cell lines using the alkaline single cell gel/comet assay. *Mutat Res.* 1997; 393: 181-187.
146. Zhu CO., Lam TH., Jiang CQ., Wei BX, Lou X., Liu W. Lymphocyte DNA damage in cigarette factory workers measured by the comet assay. *Mutat Res.* 1999; 444: 1-6.
147. Zou X. x., Xu X., Zhang J., y Zhu Z. The determination of strong mutagen MX (3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2 (5H)-furanone in drinking water in China. *Chemosphere,* 1995; 30:2219-2225.

148. Zúñiga G., Torres-Bugarín O., Ramírez Muñoz M.P., Delgado Lamas J.L., De Loza Saldaña R., Cantú J.M.: Micronucleated erythrocytes in splenectomized patients with and without chemotherapy. *Mutat Res.* 1996. 361: 107-112.
149. Zúñiga G., Ramírez Muñoz M.P., Torres Bugarín O., Pérez Jiménez J., Ramos Mora A., Zamora Pérez A., Gallegos Arreola M.P., Sánchez Corona J. Induction of micronuclei in the domestic cat (*Felis domesticus*) peripheral blood by colchicine and cytosine-arabioside. *Mutat Res.* 1998. 413: 187-189.
150. Zuñiga, G. G., Torres, B.O., Luna, A. J., González, R. A., Zamora, P. A., Gómez, M.B.C., Ventura, A. A. J., Ramos, I. M. L., Ramos, M. A., Ortiz, G.G. & A. M. P. Gallegos. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds: Part two. *Mutation Research*, 2000.

GLOSARIO.

Agente alquilante: sustancia química de síntesis, utilizada en la quimioterapia del cáncer, que desnaturaliza las nucleoproteínas por combinación y provoca una alteración del núcleo celular y de los cromosomas.

Aneuploidogénico: agentes que agraden al huso mitótico.

Antineoplásico: Inhibe o impide la evolución de neoplasias; restringe la maduración y la proliferación de células.

Auxotrofia: tipo de mutación que afecta la síntesis de histidina.

Benzopireno: hidrocarburo poliaromático con tres anillos de benceno; se forma durante la combustión del carbono. Se encuentra en el hollín, humo del tabaco y alquitrán de hulla.

Bioacumulación: aumento progresivo, en función del tiempo, de la concentración en un organismo de una sustancia que procede de su ambiente.

Biodisponibilidad: característica de una sustancia presente en el ambiente por la cual puede ser absorbida y/o biotransformado por un organismo.

Bioensayo: determinación del poder activo de una droga por comprobación de su efecto sobre un organismo vivo o un preparado aislado de órgano.

Biomonitor: Organismo utilizado para detectar algún tipo de contaminante.

Carcinogénesis: inducción de tumores cancerosos, carcinomas (neoplasmas malignos).

Carcinógeno: agente químico, físico o biológico que puede actuar sobre los tejidos vivos de tal forma que se produzca un neoplasma maligno.

Centinela biológico: organismo que debido a que no se mueve o lo hace con dificultad, se emplea para estudios de vigilancia ambiental (monitoreo), para detectar el aumento en las concentraciones de sustancias persistentes y de las que se bioacumulan o biomagnifican. Los mejillones, ostiones, musgos y algas se han empleado para este fin.

Clastógeno: sustancia capaz de causar ruptura en el ADN.

Indicador biológico: valor de ciertas sustancias exógenas que refleja sus niveles de concentración en los organismos o los efectos causados por ellos o sus metabolitos en el organismo. Sirven para establecer límites máximos o tolerables o para señalar signos de alteraciones fisiológicas precisas. Organismo cuya presencia o ausencia en un sitio específico es característico de ciertas condiciones ambientales; por ejemplo, de calidad del agua.

Dioxina: cualquier compuesto cíclico con cuatro átomos de carbono y dos de oxígeno. Se aplica genéricamente a los derivados policlorados de las dibenzodioxinas (PCDD) y en particular a la tetracloro-dibenzodioxina (TCDD) que es uno de los contaminantes más tóxicos y teratogénicos que se conocen. Se pueden generar como subproductos en diferentes procesos químicos, en particular en la fabricación de fenoles clorados y de algunos herbicidas, así como en la incineración de diversos residuos.

Efecto sinérgico: el que se observa cuando el efecto combinado de dos sustancias tóxicas administradas de manera simultánea es mayor que la suma de los efectos de cada agente administrado por si solo.

Genotóxico: sustancia que puede dañar al ADN; los agentes genotóxicos pueden ser mutagénicos y carcinogénicos.

Hiperplasia: aumento de tamaño de un órgano o parte de él como resultado de la elevación en el número de sus células.

Micronúcleo: fragmento de un cromosoma o cromosoma completo que por alguna causa no puede ser integrado al núcleo y queda en el citoplasma.

Mutagénesis: inducción de mutaciones por alteraciones del ADN.

Mutágeno: agente físico, químico o biológico capaz de inducir en los tejidos vivos cambios que pueden transmitirse por herencia (mutación). Muchos mutágenos también son carcinógenos.

Neoplasia: crecimiento anormal de una línea celular.

Oncogénico: agente capaz de producir neoplasmas, ya sean benignos o malignos.

Teratogénico: Agente que produce o incrementa la incidencia de malformaciones congénitas.