

2ej
26



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

ESTUDIO DEL EFECTO DEL PARAQUAT
SOBRE LA PERDIDA PARCIAL Y TOTAL
DE CROMOSOMAS SEXUALES (SCLT) EN
Drosophila melanogaster.

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de

B I O L O G O

p r e s e n t a

ROSA MARIA BERNAL SALAS



México, D. F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE.

Página No.

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	11
Sistema de cruzas	11
Vía de administración	13
Procedimiento experimental	13
Medio de cultivo	14
Procedimiento estadístico	14
RESULTADOS	15
DISCUSION	17
TABLAS	20
FIGURAS	27
BIBLIOGRAFIA	31

RESUMEN.

En este trabajo se analizó el efecto del paraquat sobre la pérdida total y parcial de cromosomas sexuales en Drosophila melanogaster. Para realizar esta evaluación se empleó la cruce de hembras y^2w^s/y^2w^s por machos y/B^sYy^+ , utilizándose el sistema de camadas para la valoración de las diversas etapas de la espermatogénesis.

La administración del paraquat se realizó por inyección latero-ventral en machos de la línea y/B^sYy^+ . Las concentraciones empleadas fueron 100, 200 y 400 ppm que corresponden a las LD_{10} , LD_{15} y LD_{30} .

La evaluación se realizó analizando el fenotipo de la primera generación filial F_1 de cada una de las camadas: espermatozoide (A), espermátide (B) y espermatozocito (C).

Al analizar los resultados se encontró que el paraquat es un agente indirecto que requiere ser biotransformado por el paquete enzimático presente en espermátide y espermatozocito, pero presenta poca actividad clastogénica y no disyuncional. Se observa su mayor actividad con altos niveles de sobrevivencia, y a concentraciones más altas de 100 ppm existe una saturación o bien una excreción del metabolito que permite una disminución de la actividad clastogénica y no disyuncional en 200 y 400 ppm. Solo se encontraron significativos los resultados para los machos aneuploides de la camada C a 100 ppm y los machos con pérdida parcial de la camada B a 100 ppm. La evaluación estadística se realizó por medio de las tablas de Kastenbaum-Bowman (1970), con una significancia del 1%.

El paraquat mostró ser un agente de acción indirecta, débil clastógeno e inductor pobre de no disyunción, pero es un compuesto tóxico a nivel fisiológico.

INTRODUCCION.

A través de la historia, desde que el hombre puso en marcha la práctica del cultivo hasta nuestros días, se han desarrollado grandes mejoras que van desde las técnicas de recolección, la rotación de cultivos, el empleo de sustancias químicas que favorecen el rendimiento de los cultivos, la utilización de maquinaria sofisticada y las técnicas de ingeniería genética para el mejoramiento de semillas y plantas.

Todos estos avances, si se emplean en forma controlada y con las restricciones que cada uno requiere, brinden grandes beneficios al hombre.

En los países altamente desarrollados la producción de pesticidas es muy elevada, así en los Estados Unidos en 1975 fué de aproximadamente 7.3×10^8 Kg (Woodruff et al., 1983), pero existe también una reglamentación estricta que controla su empleo, ya que pueden ser en algunos casos, agentes genotóxicos (Tezuca et al., 1980; Waters et al., 1982).

Los pesticidas son compuestos químicos que funcionan combatiendo parásitos, sean animales o vegetales, que atacan a los cultivos agrícolas, a la ganadería o a los seres humanos (Barberá, 1976; Ware, 1978).

Esta definición abarca a un gran número de sustancias entre las que encontramos a los insecticidas, nematocidas, acaricidas, fungicidas y herbicidas; éstos últimos tienen gran importancia en la agricultura y son de amplia distribución principalmente en países como México, donde existe una gran explotación agrícola.

Los herbicidas tienen como función combatir las malas hierbas (De Ong, 1965), las cuales pueden ocasionar daños a los cultivos, y estos daños pueden ser:

- Competencia por los alimentos, lo que produce un mal desarrollo y bajo rendimiento del cultivo.
- Contaminación de semillas, que disminuye la viabilidad de éstas y reduce su precio comercial.
- Daño fisiológico, como la asfixia y la clorosis.
- Ser portadores de virus o bacterias que pueden provocarle una enfermedad al cultivo. (Barberá, 1976).

Debido a la variedad de daños que pueden causar estas plantas nocivas, se han creado un gran número de herbicidas que presentan distintos modos de acción.

Los herbicidas se pueden clasificar de acuerdo al compuesto activo que presentan, y los grupos principales son los siguientes: herbicidas alifáticos, benzóicos, fenólicos, carbamatos, inorgánicos, hormonales, uréicos, triazínicos, uracílicos y bupiridílicos (Klingman y Ashton, 1975).

Todas estas sustancias químicas son espercidas al medio al aplicarse a los cultivos, ya sean estos huertos, hortalizas o pastizales y pueden llegar a los seres humanos. El ciclo de los herbicidas constituye una cadena por la cual pueden pasar tanto el herbicida en forma directa, como los residuos que persisten en la tierra y puede existir una bioacumulación en las cadenas alimenticias. Esta contaminación comienza desde la elaboración del herbicida, su aplicación, persistencia en la tierra, vegetales, frutos y estructuras aéreas de la planta, su transporte por el viento y la lluvia, hasta completar un complejo ciclo (Figura 1) (Manshen, 1984).

La exposición constante a los herbicidas puede tener graves consecuencias para el hombre, pues puede causarle

daños tóxicos y genéticos al ganado, plantas, animales domésticos y así mismo el ser humano puede verse afectado directamente.

Dentro del grupo de los herbicidas bupiridilios, se encuentra el paraquat. Este es un herbicida que se produce a partir del ión bupiridilio, cuyo nombre químico es el de 1, 1'-dimetil-4, 4'bupiridilio (Figura 2). El bupiridilio es un ión bivalente, que puede formar sales con el cloro o con el bromo, siendo en ambos casos soluble en agua; la sal de cloro que es la más común, es ligeramente soluble en dimetilformamida y muy poco soluble en alcohol etílico (Barberá, 1976). Los cristales son de color blanco y al ponerse en contacto con el agua la solución adquiere un color que va de amarillo oscuro a rojo oscuro (Klingman y Ashton, 1975).

El dipiridilio tiene una gran facilidad para oxidarse y reducirse. En solución acuosa puede reducirse, pero con simple agitación se oxida nuevamente. Esta característica es de gran importancia para el mecanismo con el que actúa el bupiridilio sobre las plantas (Barberá, 1976).

Las formulaciones de paraquat deben contener sustancias anticorrosivas, pues el bupiridilio tiene un fuerte poder corrosivo hacia los metales (Barberá, 1976). También es sensible a la luz ultravioleta, pues se disocia en su presencia, por lo que debe mantenerse alejada de ésta antes de usarse.

El paraquat es un herbicida no selectivo que posee acción por contacto, es de acción muy rápida. El bupiridilio es rápidamente absorbido por las hojas, donde es dispersado a toda la planta por el sistema apoplástico (Ware, 1978). La acción de la luz y su facilidad de reducción producen iones libres de dipiridilio y estos pueden formar radicales OH^{\cdot} (Figura 3) que interfieren con la cadena fotosintética,

dando como resultado una rápida desecación del follaje en unas pocas horas (Black, 1965; Barberá, 1976; Klingman y Ashton, 1975; Ware, 1978). Su persistencia en el suelo es de unas pocas horas (Barberá, 1976).

Este herbicida es empleado en la destrucción de las hierbas para la preparación de terrenos de cultivo, en huertos y plantíos de árboles de ornato, aplicándose en los corredores. En México se ha empleado en grandes cantidades durante los últimos cinco años debido a su aplicación en la destrucción de plantíos de mariguana y amapola.

Las estadísticas realizadas en México por la Productora Nacional de Semillas (PRONASE) muestran que este herbicida ocupa el tercer lugar a nivel nacional tanto en producción como en consumo. Se estima que en 1985 la producción nacional de paraquat fue de aproximadamente 275 toneladas (PRONASE, Agroquímicos).

En México se produce paraquat por varios laboratorios de productos químicos y se le conoce comercialmente como: Paraquat, Gramoxone, Agroquat, AgroSANOquatex y Transquat (Tabla I).

Los primeros estudios que se realizaron sobre la toxicidad del paraquat fueron los de Dunachie y Fletcher (1967). Estos mostraron que al inyectar 0.25 ppm de paraquat en huevos de gallina se provocó la muerte de los embriones durante los primeros dos días de desarrollo y al tratarlos con una concentración de 0.15 ppm solo se obtuvo una viabilidad del 40%. Al tratar a gallinas adultas con paraquat por vía oral, se observó que la producción y viabilidad de los huevos decrecía (Fletcher, 1967).

La LD₅₀ oral para perro es de 155 mg/Kg de peso. El paraquat puede ser absorbido por la piel, la LD₅₀ en conejos administrado dérmicamente es de 240 mg/Kg de peso (Barberé, 1976).

En el hombre se han presentado algunos casos de ingestión accidental y voluntaria de paraquat (Steiff et al., 1973). Los daños y síntomas que puede ocasionar la ingestión de paraquat son: dolores abdominales, gastritis, ulceraciones gástricas y duodenales, colitis, fibrosis pulmonar progresiva, atrofia y destrucción de células de hígado y riñón, y puede llegar a producir la muerte (Sinow y Wei, 1973). Hasta la fecha no se conoce ningún antídoto a la ingestión de una dosis letal de paraquat.

Además de la ingestión directa, el hombre puede ingerir los subproductos del paraquat en los alimentos que hayan sido rociados durante su cultivo con este herbicida. La cantidad promedio de paraquat que contienen los alimentos que han sido tratados con este herbicida es de 10 ppm (Fletcher, 1967).

Por otro lado, el paraquat ha empezado a estudiarse desde el punto de vista genotóxico, aunque no se tiene hasta la fecha los datos de toda la batería de bioensayos.

Moriya y colaboradores (1983) realizaron pruebas de reversión génica en Escherichia coli (WP2 hor) y Salmonella typhimurium (TA 100, TA 98, TA 1535, TA 1537, TA 1538), agregándole al medio 5000 µg/caja de petri de paraquat teniendo resultados negativos.

A diferencia de estos resultados, Vaishampayan (1984) encontró que el paraquat tiene efectos tóxicos y léticos en la cianobacteria Nostoc muscorum y se obtuvo reversión de $het^- nif^-$ a $het^+ nif^+$ al someter a Nostoc a las LD_{25} , LD_{50} , y LD_{80} , evidenciando una semejanza con los resultados encontrados al tratar a Nostoc con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) proponiendo un efecto alquilante del paraquat sobre el DNA, tomando como base el hecho de que el ión bupiridilio posee varios grupos alquilo que son agentes alquilantes potenciales del DNA (Drake y Beltz, 1976).

En Saccharomyces cerevisiae también se obtuvieron resultados positivos. El paraquat fué capaz de inducir conversión génica aún con altos niveles de sobrevivencia (Perry, 1973).

En la cebolla (Allium fistulosum) aumenta la tasa de mutaciones en la descendencia de organismos tratados con 2, 4 Dipyridilio (Aleksperew, 1967).

En Drosophila melanogaster, Woodruff y colaboradores (1984) realizaron una prueba para pérdida parcial y total de cromosomas tratando machos que presentaban un cromosoma X en anillo y un cromosoma Y compuesto; los sometió a alimentación con 200 ppm (LD_{30}) de paraquat por tres días y los cruzó con hembras vírgenes deficientes en reparación postreplicativa y en reparación por excisión parcial y observó la inducción de pérdidas parciales y totales en espermatozoide maduro, siendo una respuesta no significativa respecto al control.

Los distintos tipos de daño tóxico y genético que se han reportado con el paraquat se resumen en la tabla II.

La evaluación del daño genético que puede ocasionar un compuesto o agente químico tiene gran importancia si tomamos en cuenta la enorme cantidad de éstos, que a partir de la Revolución Industrial se han comercializado, dejando al hombre y demás seres vivos expuestos constantemente a los contaminantes. Esta evaluación no puede realizarse directamente con el hombre por lo que se ha creado una batería de bioensayos que nos ayudan a conocer los posibles mutágenos, carcinógenos y teratógenos, que pueden constituir un riesgo para la salud del ser humano. Estos sistemas de prueba son una herramienta en la legislación sobre contaminación ambiental (Mayer y Flemm, 1975).

La batería de bioensayos incluye un gran número de organismos de toda la escala evolutiva, tales como bacterias, principalmente Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Neurospora crassa; hongos como Saccharomyces cerevisiae, Allium; se emplean también insectos como Drosophila, Cortophaga, mamíferos como monos, ratas, ratones, con los que se realizan estudios in vivo e in vitro, hasta llegar al hombre con el que se efectúan preferentemente estudios in vitro además de estudios in vivo en personas expuestas ocupacional o accidentalmente y por último todos estos resultados son reforzados por los datos que aportan los estudios epidemiológicos.

Algunos de estos bioensayos requieren de grandes inversiones de capital, por lo que en un país en donde se cuenta con pocos recursos para la investigación, pero donde se requieren estudios de valoración de posibles mutágenos, es necesario emplear bioensayos que sean económicos y eficientes.

Uno de los sistemas más económicos y versátiles es el bioensayo con Drosophila melanogaster. El empleo de la mosca

de la fruta presenta un gran número de ventajas, como las que se mencionen a continuación:

Drosophila melanogaster es el eucarionte mejor conocido genéticamente y con el que pueden realizarse estudios in vivo e in vitro (Zimmering, 1976).

Su mantenimiento es relativamente económico, y en espacios reducidos pueden obtenerse poblaciones grandes; en un periodo de tiempo corto se tienen varias generaciones y esto es posible por el poco tiempo que dura su ciclo de vida, siendo las etapas y su duración las siguientes: Huevo (un día), larva de primer estadio (un día), larva de segundo estadio (un día), larva de tercer estadio (dos días), prepupa (cuatro horas), pupa (cuatro días y medio), completándose el ciclo en 10 días a una temperatura de 25°C (Demerec, 1965; Zimmering, 1976).

Así mismo se conoce el tiempo de su gametogénesis y ésto nos permite evaluar cada una de las etapas de la espermatogénesis y tratar estados pre y postmeióticos, así como el poder establecer si el compuesto que se analiza es de acción directa o indirecta, pues se conocen las etapas de actividad del retículo endoplásmico (Chandley y Bateman, 1962; Vogel y Sobels, 1976) (Tabla III).

La presencia de un paquete enzimático en la fracción microsómica, muy semejante al del hígado humano, permite la biotransformación in vivo de los compuestos que se prueban, ésto tiene como ventaja el poder analizar compuestos que tengan acción directa y agentes indirectos sin necesidad de agregar fracción microsómica al sistema (Baars et al., 1980)

La exposición de Drosophila a los agentes químicos puede realizarse por diversas vías, puede hacerse por inyección latero-ventral en el tercer segmento abdominal o en la región torácica, por vía alimenticia, por exposición gaseosa o por ducha vaginal (Lee, 1976; Zimmering, 1976).

La mosca de la fruta puede emplearse en el monitoreo de contaminantes ambientales por la alta sensibilidad de algunas líneas mutantes (Manahan, 1984).

La versatilidad de Drosophila permite la valoración de una amplia gama de daños genéticos, dentro de estos pueden evaluarse la inducción de aberraciones cromosómicas realizando un estudio citogenético empleando el ganglio neural o las glándulas salivales de las larvas de segundo y tercer estadio respectivamente (Gatti et al., 1975); análisis de mutaciones puntuales mediante la prueba de letales recesivos ligados al sexo (SLRL) (Zimmering, 1976); inducción de mutaciones letales dominantes (Zimmering, 1976), traslocaciones cromosómicas; mutaciones somáticas y recombinación mitótica (SMART) (Graff, U. et al., 1984) y pérdida total y parcial de cromosomas autosómicos, al igual que de cromosomas sexuales (SCLT) (Valencia, R. et al., 1984). Estas alteraciones genéticas se evalúan analizando el fenotipo que presentan los individuos como la expresión de su genotipo (Kilbey et al., 1981). Por último Drosophila se emplea en la valoración de efecto teratogénico y carcinogénico (Schuler et al., 1982).

El problema de la contaminación en México, el abuso de los herbicidas y la gran producción de paraquat en el país, son los principales puntos que justifican que en este trabajo se evalúe un compuesto del cual no se conoce certeramente su espectro genotóxico y que puede constituir un peligro para el hombre. Por todo esto, se evaluará el efecto del paraquat sobre la inducción de pérdida parcial y total de cromosomas sexuales en Drosophila melanogaster analizando las diversas etapas de la espermatogénesis.

MATERIAL Y METODO.

Sistema de cruce

Para realizar la evaluación del efecto del paragest sobre la pérdida parcial y total de cromosomas sexuales se empleó el siguiente sistema de cruce: hembras $y^2 w^a / y^2 w^a$ y machos $y/B^S Yy^+$.

Las hembras de la línea $y^2 w^a$ tienen sus cromosomas X marcados con los alelos "yellow dos" (y^2 1:0.0) que es recesivo y produce cuerpo amarillo con cerdas y pelos negros cuando se encuentra en homocigosis como en este caso, y el alelo "white apricot" (w^a 1: 1.5) que es también un alelo recesivo y que por encontrarse en homocigosis es estas hembras les produce el fenotipo de ojos color durazno.

Los machos $y/B^S Yy^+$ presentan en el cromosoma X el marcador "yellow" (y 1:0.0) que es recesivo y produce el fenotipo de cuerpo amarillo con pelos y cerdas cafés; en el cromosoma Y presenta insertados dos fragmentos del cromosoma X localizados uno en el brazo corto y otro en el largo. Estos marcadores son el alelo "Barra de Stone" (B^S 1:57) que es dominante, por lo que se expresa en homocigosis y en heterocigosis, obteniéndose un fenotipo de ojos reducidos a una barra, este marcador se encuentra insertado en el brazo largo; el otro fragmento localizado en el brazo corto es el alelo silvestre del gene yellow, es decir y^+ , este impide la expresión del alelo recesivo yellow portado en el cromosoma X. La acción de estos marcadores hacen que el fenotipo del macho sea color de cuerpo silvestre, ojo reducido a una barra y de color rojo (Lindsley y Grell, 1968). Este sistema de cruce permite evaluar la no disyunción en machos, y la pérdida de uno o ambos marcadores del cromosoma Y, es decir, el efecto clastogénico, mediante el siguiente patrón fenotípico:

CRUZA PROGENITORA:

P y^2w^a/y^2w^a x $y/B^S y^+$
 (y^2w^a) Hembras con cuerpo
 amarillo, pelos y cerdas
 negros, ojos durazmo. (B^S) Machos con ojos en barra

Individuos de la primer generación filial (F₁):

EVENTO GENÉTICO	GENOTIPO	SEXO	FENOTIPO
NORMAL	y^2w^a/y	hembra	(y^2)Cuerpo amarillo, pelos y cerdas negros.
NORMAL	y^2w^a/B^2Yy^+	macho	(w^aB^S)Ojos en barra color durazmo.
PERDIDA DEL BRAZO LARGO DEL Y	y^2w^a/Yy^+	macho	(w^a) Ojos color durazmo.
PERDIDA DEL BRAZO CORTO DEL Y	$y^2w^a/B^S Y$	macho	($y^2w^aB^S$)Cuerpo amarillo, pelos y cerdas negros,ojos en barra color durazmo.
PERDIDA DEL X 6 Y 6 AMBOS MARCADORES DEL Y	$y^2w^a/0$ y^2w^a/Y	macho	(y^2w^a) Cuerpo amarillo con pelos y cerdas negros, ojos color durazmo.
NO DISYUNCIÓN EN MACHOS	$y^2w^a/y/B^S Yy^+$	hembra	(B ^S) Ojos en barra.
NO DISYUNCIÓN EN MACHOS	$y^2w^a/0$	macho	(y^2w^a)Cuerpo amarillo, con pelos y cerdas negros,ojos color durazmo.
NO DISYUNCIÓN EN HEMBRAS	$0/y$	macho	(y)Cuerpo amarillo, con pelos y cerdas café
NO DISYUNCIÓN EN HEMBRAS	$y^2w^a/y^2w^a/B^S Yy^+$	hembra	(w^aB^S)Ojos en barra color durazmo.
NO DISYUNCIÓN EN HEMBRAS	$y^2w^a/y^2w^a/y$	hembra	(y^2)Cuerpo amarillo con pelos y cerdas negros.

(Abrahamson y Lewis, 1971).

Vía de administración

La vía de administración que se empleó fué la de inyección latero-ventral en el tercer segmento abdominal, a machos de no más de 48 horas de haber emergido. Las agujas de vidrio se hicieron estirando una pipeta pasteur con ayuda de un mechero de gas. Para suministrar la solución se empleó un bulbo de goma que se colocó en el extremo superior de la jeringa.

Procedimiento experimental

El paraquat empleado en las pruebas fué la fórmula comercial fabricada por la empresa Transquímica, S.A. En pruebas preliminares se estableció la LD_{30} , que es la concentración aplicada en la cual mueren el 30% de los individuos tratados y sobreviven el 70% a las 48 horas, esta concentración corresponde a las 400 ppm y fué la más alta que se empleó, las otras concentraciones empleadas fueron 100 y 200 ppm que corresponden a la LD_{10} y LD_{15} . Las soluciones de paraquat se hicieron en sacarosa al 5% (Merck) que se usó como vehículo y como solución para el grupo testigo.

Se realizaron cinco experimentos, tratándose un total de 400 machos por cada uno. Cada experimento constó de 100 machos tratados para cada concentración mas 100 individuos del grupo testigo a los que se les aplicó sacarosa, teniendo al final 500 machos tratados para cada concentración al sumar los cinco experimentos. En cada experimento los 100 machos de cada concentración se repartieron en 4 frascos lecheros colocándose 25 machos por frasco a los que se les cruzó con 75 hembras vírgenes de no mas de 72 horas. Con el fin de evaluar los estados de la espermatogénesis: espermatozoide, espermatida y espermatozito, se realizó el sistema de camadas de la siguiente forma: después de dos días de

dejar a las hembras con los machos tratados se sacaron estos últimos con ayuda de un esterizador y se colocaron en frascos nuevos con hembras vírgenes también de no más de 72 horas y con éstas se mantuvieron por tres días, después de los cuales se volvieron a pasar a los machos con nuevas hembras vírgenes teniendo al final las tres camadas, la camada A que abarca del día 0 al día 2 (espermatozoide), la camada B del día 2 al día 5 (espermátida) y la camada C del día 5 al 9 (espermatozocito).

Las hembras progenitoras se eliminaron cinco días después de haberlas colocado en los frascos con medio, con el fin de no confundirlas con la progenie, que emergió aproximadamente 10 días después de la eliminación de las hembras. Una vez recuperada la primera generación se analizó cuantificando el fenotipo y número de hembras y machos tanto normales como excepcionales.

Medio de cultivo.

El medio de cultivo empleado está constituido por 12 gr de agar (Merck), 20 gr de dextrosa (Merck) 28 gr de azúcar, 50 gr de harina de maíz, 12 gr de levadura de cerveza disuelta en 160 ml de agua, y como agentes para evitar la contaminación se usó nipagin al 10% en alcohol etílico (Merck) 4 ml y 4 ml de ácido propiónico (Merck).

Los cultivos de *Drosophila* se mantuvieron a una temperatura constante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Procedimiento estadístico

La evaluación estadística de los resultados se realizó por medio de las tablas de Kastenbaum-Bowman (1970). Se utilizó un nivel de significancia del 1%.

RESULTADOS.

Para la evaluación del efecto del paraquat se analizó el fenotipo de cada individuo F_1 proveniente de la cruce de machos y/B^aYy^+ (tratados) por hembras y^2w^a/y^2w^a .

Esta determinación se realizó para los cinco experimentos. Los resultados de cada uno se sumaron pues no existían diferencias entre ellos ($P=0.05$).

En la tabla IV se muestran los resultados obtenidos para la camada A, que comprende desde el primer día del tratamiento hasta el día dos, se observa que no aparecen hembras XXY mientras que la frecuencia para machos aneuploides es de 0.17%. Tampoco se obtuvieron machos con pérdidas parciales en el grupo testigo. Para los grupos tratados se observa que aumenta la frecuencia de hembras XXY, pero en forma apenas perceptible, siendo no significativo. La frecuencia de machos aneuploides se ve casi duplicada en la concentración de 400 ppm. Las pérdidas parciales no se presentaron con 200 ppm, ni con 400ppm, pero si en 100 ppm, aunque no fué un aumento significativo.

En la camada B (Tabla V) existe un aumento muy ligero de la frecuencia de machos XO, aunque no llega a ser significativa. Las pérdidas parciales no se produjeron en el grupo testigo, pero al igual que en la camada A existe un aumento de machos con pérdida parcial a la concentración de 100 ppm existiendo en este caso diferencias significativas respecto al testigo.

Los resultados que se obtuvieron para la camada C se muestran en la tabla VI, notandose un aumento significativo en los machos aneuploides con la concentración menor de paraquat que se empleó. Así mismo, los machos con pérdidas

parciales de la misma concentración también aumentan, aunque no en forma significativa.

Los resultados obtenidos para las tres camadas A, B y C se resumen en la tabla VII donde se puede observar que solo fueron significativos las frecuencias de machos provenientes de pérdida parcial de la camada B en la concentración de 100 ppm y la de machos sneuploides de la camada C a 100 ppm.

DISCUSION.

El empleo de Drosophila en pruebas de mutagénesis se realiza desde que en 1927 H. J. MULLER desarrolló la prueba de letales recesivos ligados al sexo. A partir de entonces se han desarrollado un gran número de sistemas que permiten detectar innumerables daños ocasionados por agentes físicos, químicos o biológicos. Uno de los efectos más importantes es la pérdida parcial y total de cromosomas que pueden asociarse al ser humano con un gran número de enfermedades congénitas del metabolismo y con síndromes como el de Down, así mismo este tipo de alteraciones cromosómicas se han asociado en algunos casos como iniciadores de procesos neoplásicos. En el caso de Drosophila este tipo de daño puede ser evaluado mediante la prueba de pérdida parciales y totales, también conocida como de aneuploidías, que se ha desarrollado intensamente durante los últimos tres años (Valencia et al., 1984).

Los rompimientos del DNA pueden tener como consecuencia la pérdida parcial de cromosomas. Algunos agentes clatogénicos tienen preferencia por cierta fase del ciclo celular para producir estos rompimientos. Entre los grupos de los agentes que pueden inducir pérdida parciales de cromosomas se encuentran los agentes alquilantes como la EMSG (Drake y Baltz, 1976).

La pérdida total de cromosomas puede deberse a la falta de separación de los cromosomas homólogos durante la anafase I o bien a la carencia de separación de las cromátidas hermanas durante la anafase II. En ambos casos puede deberse a alteraciones de las proteínas que constituyen el huso o bien de las proteínas del centómero.

La no disyunción de los cromosomas sexuales en el macho de Drosophila pueden originar gametos que contengan la información XY y gametos que carezcan de los cromosomas XY, es decir que sean O (Figura 4).

Al analizar los resultados obtenidos en este trabajo, se observa que no existen aumentos significativos en la camada A, pero que existe mayor actividad clastogénica, tanto de pérdidas parciales como totales, en las camadas B y C que comprenden espermatidas y espermatoцитos respectivamente. Esto nos indica que el paraquat es un agente que necesita ser metabolizado por el paquete enzimático presente en espermátida temprana y espermatoцитo tardío que abarca las camadas B y C (Vogel y Sobels, 1976).

En las columnas de pérdidas totales se observa que existe un número mayor de machos XO que hembras XXY, esto se debe a que la frecuencia con que se recobran individuos XXY provenientes de gametos con ganancia de cromosomas es de 0.05% y la frecuencia de individuos aneuploides es de 3 a 8 veces mayor, ésto pone en evidencia que el mecanismo de no disyunción que origina hembras XXY es independiente al mecanismo que puede generar también machos XO. Estos pueden ser debidos a la no disyunción, pero también pueden producirse pérdida de cromosomas por otras razones, como por aumento de la temperatura (Zimmering et al., 1986).

La pérdida total de cromosomas es significativa en 100 ppm de la camada C, no obteniéndose una respuesta lineal, pues puede existir una saturación del metabolito del paraquat o bien ser lo suficientemente tóxico para que no se recobren pérdidas totales a 200 ni 400 ppm.

En las hembras no se obtienen resultados significativos a diferencia de los machos con pérdida total, esto nos indica que el mecanismo con el que se originan machos XO no es la no disyunción, sino que se encuentra involucrado algún otro

mecanismo que induce el paraquat.

En el caso de las pérdidas parciales se observa que la mayor actividad se produce también a 100 ppm, lo que coincide con los datos encontrados por Dunachie y Fletcher (1967) y Alekperew (1967) al trabajar con gallinas y cebollas respectivamente, en los que se obtienen resultados significativos con altos niveles de sobrevivencia, indicando que el paraquat, aunque no es un mutágeno potente, es un agente que tiene alta toxicidad principalmente en estados poco diferenciados como son los embriones y huevos de gallina o las espermatidas o espermatoцитos.

Las pérdidas parciales son significativas a 100 ppm en la camada B durante la cual tenemos que al final de esta camada se lleva a cabo la meiosis, y es aquí donde se tiene la mayor actividad clastogénica del paraquat, esto puede deberse a que el paraquat por ser un agente indirecto requiere de la actividad enzimática del retículo endoplásmico para ser biotransformado, y además a que el paraquat actúa preferentemente en el momento en que están condensados los cromosomas, por lo que encontramos mayor actividad en B que en C, además que puede disminuir la cantidad del metabolito por ser excretado o biotransformado.

Del análisis de estos resultados podemos decir que este herbicida es un agente clastogénico débil y que su mayor actividad la tiene con altos niveles de sobrevivencia, lo que nos muestra que en este sistema de prueba no es muy tóxico. Este agente indirecto debe ser empleado con moderación y puede substituir a otros herbicidas que son potentes agentes alquilantes y que constituyen un gran riesgo para la salud humana. Es necesario realizar mayor número de pruebas de genotoxicidad con el paraquat, ya que la persistencia del herbicida en los alimentos debe ser considerada, pues en un agente extremadamente tóxico a nivel fisiológico.

Table I. Empresas productoras de paraquat en México.

<u>NOMBRE COMERCIAL.</u>	<u>PRESENTACION.</u>	<u>EMPRESA.</u>
Paraquat	Concentrado acuoso	Prod. Agric. de Chiapas.
Gramoxone	Concentrado acuoso	I.C.I. de México S.A. de C.V.
Agroquat	Solución acuosa	Transfertil S. A.
Gramoxone	Concentrado acuoso	CANAMEX S.A. de C.V.
AgroSANOquatex	Solución acuosa	Química Agro-Sano S.A. de C.V.
Transquat	Solución acuosa	Transquímica S. A.

Tabla II. Efectos tóxicos y genéticos del paraquat en diferentes organismos.

ORGANISMO	EFFECTOS	REFERENCIA
<u>Escherichia coli</u> (WP2 hor)	No produce reversión	Moriya <u>et al.</u> , 1984.
<u>Salmonella thyphimurium</u> (TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538)	No produce reversión	Moriya <u>et al.</u> , 1984.
<u>Nostoc muscorum</u>	Produce reversión y lisis celular	Vaishampayan, 1984.
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	Conversión génica con altos niveles de so- brevivencia.	Perry, 1973.
<u>Allium fistulosum</u>	Aumenta la tasa de mu- taciones en la descen- dencia de progenitores tratados.	Alekperew, 1967.
<u>Drosophila melanogaster</u> (♂♂ R(1)2,yf/B ^S Yy ⁺) (♀♀ mus-302)	No produce pérdida par- cial ni total en esper- matozoide maduro.	Woodruff <u>et al.</u> 1984.
Gallinas	Muerte de los embriones al tratar directamente a los huevos. Al tratar a los adultos deciende la producción y viabilidad de los - huevos.	Dunachie y Fletcher, 1967. Fletcher, 1967.
Hombre	Dolores abdominales, gastritis, ulceraciones gástricas y duodenales, colitis, fibrosis pulm ₂ nar progresiva, atrofia y destrucción de células de hígado y riñón. Muerte.	Sinow y Wei, 1973.

Días después del tratamiento.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Estado	Espermatozoide		Espermátida E			Espermatocito			
Camada	A		B		C				
					R.E.				

M= Meiosis.

R.E.= Reticulo endoplásmico.

Tabla III. Duración de la espermatogénesis en Drosophila melanogaster.

Tomado de Chandley y Bateman, 1962.

Tabla IV. Número y porcentaje de individuos normales y excepcionales obtenidos en F_1 al tratar machos progenitores de Drosophila melanogaster con distintas concentraciones de Paraquat. Camada A de 0 a 2 días (Espermatozoide).

CONCENTRACION	NORMALES			PERDIDA TOTAL		PERDIDA PARCIAL	
	Hembras	Machos	Total	Hembras	Machos	Machos	
	(y^2)	$(w^a B^S)$		(B^S)	$(y^2 w^a)$	(w^a) , $(y^2 w^a B^S)$	
Ppm	XX	XY		XXY	XO		
Testigo	2662	1921	4583	-	8	0.17	-
100	2391	1677	4068	1	0.025	5	0.12
200	2585	1745	4330	1	0.023	6	0.14
400	2185	1505	3690	3	0.081	14	0.38
TOTALES	9823	6848	16671	5		33	7

Tabla V. Número y porcentaje de individuos normales y excepcionales obtenidos en F_1 al tratar machos progenitores de Drosophila melanogaster con distintas concentraciones de Paraquat. Camada B del día 2 al día 5 (Espermátida).

CONCENTRACION	NORMALES			PERDIDA TOTAL				PERDIDA PARCIAL	
	Hembras	Machos	Total	Hembras	Machos			Machos	
Ppm	XX (y^2)	XY ($w^a B^s$)		XXY (B^s)	XO ($y^2 w^a$)			(w ^a); ($y^2 w^a B^s$)	
				%	%			%	
Testigo	2509	1729	4238	1	0.024	1	0.024	-	
100	2060	1385	3445	2	0.058	2	0.058	16	0.46 *
200	2286	1624	3910	1	0.026	2	0.051	1	0.026
400	1857	1409	3266	1	0.031	3	0.092	-	
TOTALES	8712	6147	14859	5		8		17	

* Significativo al 1% en las tablas de Kastenbaum-Bowman (1970).

Tabla VI. Número y porcentaje de individuos normales y excepcionales obtenidos en F_1 al tratar machos progenitores de Drosophila melanogaster con distintas concentraciones de Paraquat. Camada C del día 5 al día 9 (Espermatocito).

CONCENTRACION	NORMALES			PERDIDA TOTAL				PERDIDA PARCIAL	
	Hembras	Machos	Total	Hembras	Machos			Machos	
	XX (y^2)	XY ($w^a B^s$)		XXY (B^s)	XO ($y^2 w^a$)			(w^a), ($y^2 w^a B^s$)	
				§	§			§	
Testigo	3266	2361	5627	3	0.053	4	0.07	3	0.053
100	2899	2037	4936	2	0.040	18	0.36*	8	0.16
200	2928	1982	4910	1	0.020	6	0.12	1	0.020
400	2853	2276	5129	-	-	7	0.14	4	0.078
TOTALES	11946	8656	20602	6		35		16	

* Significativo al 1% en las tablas de Kastenbaum-Bowman (1970).

Tabla VII. Número y porcentaje de individuos normales y excepcionales obtenidos en F_1 al tratar machos progenitores de Drosophila melanogaster con distintas concentraciones de Paraquat. Camadas A, B y C.

CAMADA	CONCENTRACION ppm	NORMALES			PERDIDA TOTAL			PERDIDA PARCIAL	
		Hembras	Machos	Total	Hembras	Machos	Machos		
		XX	XY		XXY	XO			
		(y^2)	($w^a B^S$)		(B^S) %	($y^2 w^a$) %	(w^a), ($y^2 w^a B^S$) %		
A	Testigo	2262	1921	4583	-	8	0.17	-	-
	100	2391	1677	4068	1	0.025	5	0.12	7 0.17
	200	2585	1745	4330	1	0.023	6	0.14	-
	400	2185	1505	3690	3	0.081	14	0.38	-
B	Testigo	2509	1729	4238	1	0.024	1	0.024	-
	100	2060	1385	3445	2	0.058	2	0.058	16 0.46*
	200	2286	1624	3910	1	0.026	2	0.051	1 0.026
	400	1857	1409	3266	1	0.031	3	0.092	-
C	Testigo	3266	2361	5627	3	0.053	4	0.07	3 0.053
	100	2899	2037	4936	2	0.040	18	0.36*	8 0.16
	200	2928	1982	4910	1	0.020	6	0.12	1 0.020
	400	2853	2276	5129	-	-	7	0.14	4 0.078
	TOTALES	30481	21651	52132	16		76		40
								TOTAL:	52264

* Significativo al 1% en las tablas de Kastensbaum-Bowman (1970).

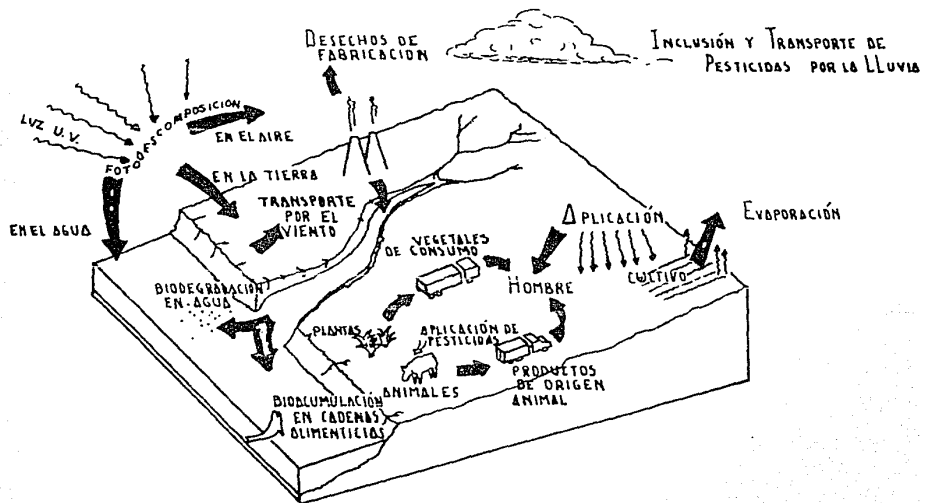


Figura 1. Ciclo de la contaminación por pesticidas.

Tomado de Manahan, 1934.

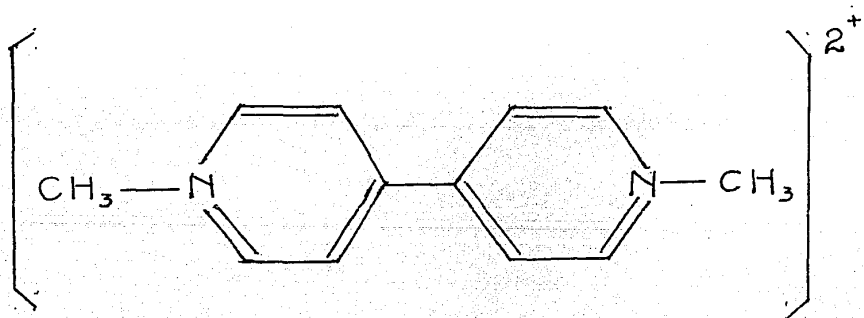


Figura 2. Estructura química del ión biperidilio.

Tomado de Klingman y Ashton, 1975.

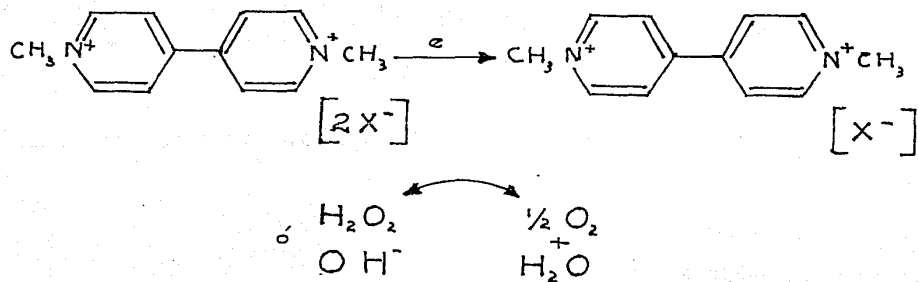


Figura 3. Formación y autooxidación del radical libre de paraquat.

Tomado de Klingman y Ashton, 1975.

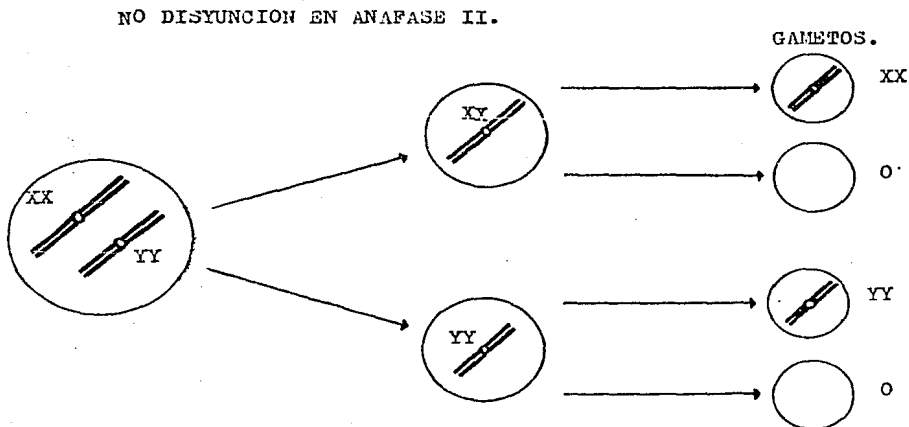
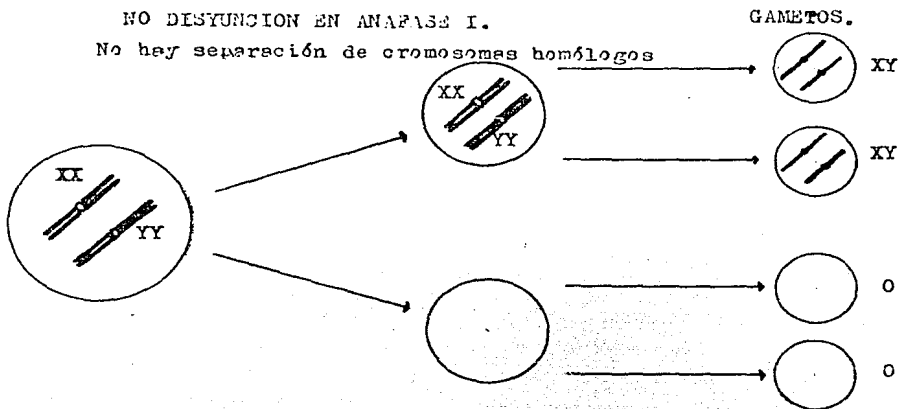


Figura 4. Esquema de no disyunción de cromosomas sexuales en machos de Drosophila melanogaster. (Tamarin, 1982).

BIBLIOGRAFIA.

- Abrahamson, S. y E. B. Lewis (1971) The detection of mutations in Drosophila melanogaster En: Chemical mutagens. Principles and methods for their detection. A. Hollander Eds. Vol. 2 Plenum press. Nueva York. p.p. 461-487.
- Alekperew, D. (1967) Dokl. Biol. Sci. 176, 594-596
- Bears, A. J., G. H. Blijleven, G. R. Mohn, A.T. Natarajan y D. D. Breimer (1980) Preliminary studies on the ability of Drosophila microsomal preparations to activate mutagens and carcinogens. Mutat. Res. 72, 257-264
- Barberó, J. (1976) Pesticidas agrícolas. Omega. Barcelona. 569 pp.
- Black, C.C. (1965) Reduction of trimethylene dipiridyl with illuminated chloroplasts. Science 49, 62-63
- Chendley, A.C. y A. J. Bateman (1962) Timing of spermatogenesis in Drosophila melanogaster using tritiated thymidine. Nature 20, 299-300.
- Demarec, M. (1965) Biology of Drosophila. Hafner Publishing Company. Nueva York.
- De Ong, L. (1965) Chemistry and uses of pesticides. Reinhold Publ. Co. Nueva York.
- Drake, J. W. y R. H. Beltr (1975) The biochemistry of mutagenesis. Ann. Rev. Biochem. 45, 11-37.
- Dunachie, J. P. y W. Fletcher (1967) Effect of some herbicides on the hatching rate of Hen's eggs. Nature 215, 1407.

- Fletcher, K. (1967) Production and viability of eggs from hens treated with paraquat. Nature 215, 1407-1408.
- Gatti, M., C. Tanzerella, S. Pimpinelli, A. de Marco (1975) Larval ganglia of Drosophila melanogaster as a new test system for the study in vivo of induced chromosomes aberrations. Mutat. Res. 29, 251.
- Greff, U.; F. E. Würgler; A. J. Ketz, H. Frei, H. Juon, C. B. Hall y P.G. Kale (1984) Somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster. Environ. Mutag. 6, 153-168.
- Kastenbaum, M. A. y K. O. Bowman, (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutat. Res. 9, 527-549.
- Kilbey, B. J.; D.J. MacDonald, C. Auerbach, F. H. Sobels, y E. W. Vogel (1981) The use of Drosophila melanogaster in test for environmental mutagens. Mutat. Res. 85, 141-146.
- Klingman, G. C. y F. M. Ashton (1975) Weed science: Principles and practices. John Wiley & Sons. Nueva York.
- Lee, W. R. (1976) Chemical mutagenesis. En: The genetics and biology of Drosophila. Ashburner, M. y E. Novitski Eds. Academic Press Inc. LTD. Londres. p.p. 1299-1341.
- Lindsley, D. L. y E. H. Grell (1968) Genetic variations of Drosophila melanogaster. Carnegie Institution of Washington Publ. Washington.
- Manshen, S. E. (1984) Environmental chemistry. Willard Grant Press. Boston.
- Mayer, V. W. y W. G. Flamm (1975) Legislative and technical aspects of mutagenicity testing. Mutat. Res. 29, 259-300

- Moriya, M., T. Ohta, K. Watanabe, T. Miyazawa, K. Kato y Y. Shirasu (1983) Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems. Mutat. Res. 116, 185-216.
- Muller, H. J. (1927) Artificial transmutation of the gene. Science 66, 84-87
- Perry, J. M. (1973) The induction of gene-conversion in yeast by herbicide preparations. Mutat. Res. 21, 83-91.
- Schuler, R. L.; B. Hardin y R. W. Niemeier (1982) Drosophila as a tool for the rapid assessment of chemicals for teratogenicity. Teratogenesis, carcinogenesis and mutagenesis. 2, 293-301
- Sinow, J. y E. Wei. (1973) Bulletin of environmental contamination and toxicology. 9, (3) 163.
- Staiff, D. C., G. K. Irle y W. C. Felsenstein (1973) Bulletin on environmental contamination and toxicology. 10, (4) 193.
- Tamarin, R. M. (1982) Principles of genetics. PUS. Publishers.
- Tezucs, H., N. Ando, R. Suzuki, M. Terhata, M. Moriya, Y. Shirasu (1980) Sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in cultures chinese hamster cells treated with pesticides positive in microbial reversion assays. Mutat. Res. 78, 177-191.
- Vaishampayan, A. (1984) Powerful mutagenicity of a bipyridyl herbicide in a nitrogen-fixing blue-green alga Nostoc muscorum. Mutat. Res. 138, 39-46.
- Valencia, R., S. Abrahamson, W. R. Lee, E. S. von Helle, R. C. Woodruff, F. E. Wurgler y S. Zimmering (1984) Chromosome mutation test for mutagenesis in Drosophila melanogaster. A report of the U.S.

Environmental Protection Agency Gene-Tox
Program. Mutat. Res. 134, 61-88

- Vogel, E. y F. H. Sobels (1976) The function of Drosophila
in genetic toxicology testing. En: Chemical
mutagens. Principles and methods for their
detection. A. Hollander Eds. Vol. 4 Plenum
Press. Nueva York. p.p. 93-142.
- Ware, G. W. (1978) The pesticides book. W. H. Freeman and
Co. San Francisco.
- Waters, M. D., Sandhu, V. G. Simmon, K. E. Mortelmans, A. D.
Mitchel, T. A. Joergenson, D. C. L. Jones,
R. Valencia y N. E. Garret (1982) Study of
Pesticide genotoxicity. En: Genetic toxicology
An agricultural. F. R. Hollander Eds.
- Woodruff, R. G., J. P. Phillips y D. Irwin (1984) Pesticide-
induced complete and partial chromosome loss
in screens with repair-defective females of
Drosophila melanogaster. Environ. Mutagen.
5, 535-545.
- Zimmering, S. (1976) Selected methodologies for mutagenicity
testing in Drosophila melanogaster. Brown
University. 1-26.
- Zimmering, S., J.M. Mason y C. Osgood (1986) Current status of
of aneuploidy testing in Drosophila. Mutat.
Res. 167, 71-87.