

108  
Leg.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

RELACION ENTRE EL TIEMPO DE ACCION  
DE DOS MUTAGENOS Y EL TAMAÑO DE  
MANCHA INDUCIDOS EN CELULAS  
SOMATICAS DE LAS ALAS DE  
*Drosophila melanogaster*.

## FALLA DE ORIGEN

### T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

### B I O L O G O

P R E S E N T A,

ADRIANA MUROZ HERNANDEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

MEXICO, D. F.

1995



FACULTAD DE CIENCIAS  
RECIBIDA EN



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**

**Tesis Digitales**

**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE**

Jefe de la División de Estudios Profesionales

Facultad de Ciencias

Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron la pasante(s) ADRIANA MUÑOZ HERNANDEZ

con número de cuenta 8624023-7 con el Título:

RELACION ENTRE EL TIEMPO DE ACCION DE DOS MUTAGENOS Y EL TAMAÑO  
DE MANCHA INDUCIDO EN CELULAS SOMATICAS DE LAS ALAS DE Drosophila  
melanogaster.

Otorgamos nuestro **Voto Aprobatorio** y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de BIOLOGO

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Dra.	Patricia	Ramos Morales	
Director de Tesis			
Dra.	Rocio	Vargas Sanders	
Dr.	Jesús Manuel	León Cazares	
M. en C.	Juan Carlos	Gaytán Oyarzun	
Suplente			
Biol.	Miguel Angel	Palomino Garibay	
Suplente			

**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE  
GENÉTICA Y EVOLUCIÓN**

**"THEODOSIUS DOBZHANSKY"**

**DE LA FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la directora de tesis:**

**Dra. Patricia Ramos Morales**

**Por su invaluable amistad, consejos, motivación, apoyo y dedicación en la realización de este trabajo.**

**A los sinodales:**

**Dra. Rodolfo Vargas Sanders  
Dr. Jesús Manuel León Cazares  
M. en C. Juan Carlos Gaytán Oyarzun  
Biol. Miguel Ángel Palomino Garibay**

**Por sus valiosos comentarios y consejos en la revisión y corrección de esta tesis.**

**A mis compañeros de trabajo del laboratorio de Genética:**

**Edna, Lupita, Julian, Armando, Yolanda, Irma, Patricia Orozco, Ma. de Jesús, Judith y en especial a Juan Carlos por su gran amistad e incondicional colaboración en mi formación profesional.**

## **DEDICATORIAS**

**A mi madre:**  
Ma. del Socorro Hernández Valdespino

**A mi hermano:**  
Molsés Muñoz Hernández

Por brindarme siempre su afecto, apoyo, comprensión y mucho más.

**A mis tíos:**  
Lucero Hernández de Gómez  
Luis Jaime Gómez Méndez

Por su gran amor, consejos e incondicional apoyo.

**A mi abuela:**  
Carmen Valdespino Vda. de Hernández

Por dedicar gran parte de su vida a mi educación y sembrar en mí el amor al estudio.

**A la familia Esquivel:**  
Sra. Lila, Sr. José, Adriana, Pollo, Pilar, Pepo, Liz, Cecilia y Lisa

Por brindarme su cariño y amistad.

**A Ramón:**

Por tu insustituible amor y presencia que me motivan a seguir superándome; por los hermosos momentos que compartimos juntos. Eres lo más importante en mi vida.

## ÍNDICE

I. RESUMEN	2
II. INTRODUCCIÓN	5
Metabolismo	7
Agentes Alquilantes	11
Sistemas de Prueba	16
<u>Drosophila</u> como Sistema de Prueba	20
Biología del Desarrollo	23
Prueba de Mutación y Recombinación	
Somática (SMART)	27
Objetivo	34
III. MATERIALES Y METODOS	34
Sistema de Cruza	34
Obtención de larvas	35
Compuestos químicos	36
Tratamiento	37
Fijación y elaboración de laminillas	37
Análisis estadístico	39
IV. RESULTADOS	40
V. DISCUSIÓN	46
VI. REFERENCIAS	53

## I. RESUMEN

El desarrollo de nuevos productos químicos para diversos usos como medicamentos, cosméticos, colorantes, aditivos de alimentos, plaguicidas, y compuestos de uso industrial, conduce a la realización de estudios para caracterizar fuentes potenciales de daño genético en los organismos vivos.

La capacidad de un producto químico para interactuar y alterar el ADN de las células está influida por propiedades físicas y químicas del propio compuesto así como por factores ambientales y características fisiológicas de cada individuo.

El análisis de las modificaciones que ocurren, en relación con la vía de ingreso, ha permitido distinguir entre dos tipos de compuestos: aquellos que provocan un efecto por sí mismos independientemente de la ruta de entrada (directos) y los que tienen un efecto cuando son biotransformados por el organismo (indirectos). La N-nitroso-dimetil amina (DMN) es un ejemplo de agente alquilante de acción indirecta que se ha encontrado en pequeñas cantidades en el humo del cigarro y en el pescado ahumado. En contraste se ha observado que el metilmetanosulfonato (MMS), agente alquilante de acción directa, provoca el mismo orden de respuesta en tratamientos por alimentación o por inyección.

La prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) de Drosophila melanogaster detecta la inducción de mutaciones somáticas producidas por mutación puntual, delección y recombinación. Mediante el análisis de alteraciones inducidas

durante el desarrollo de las larvas se producen manchas sobre las alas de la mosca adulta, las cuales son indicadoras del mecanismo de acción de un compuesto químico. Una limitación de esta prueba es que se trata masivamente a las larvas por lo que se desconoce la cantidad de compuesto que ingresa a cada una de ellas y, en consecuencia, no es posible hacer estimaciones de la potencia genotóxica de los compuestos porque no se conoce la dosis administrada. Esta puede obtenerse mediante la administración de los compuestos por inyección.

En esta tesis se utilizó la técnica de inyección para determinar la respuesta inducida por dos mutágenos de referencia (DMN y MMS) en células de las alas de Drosophila melanogaster mediante la prueba de mutación y recombinación somática.

Se inyectaron larvas de tercer estadio con diferentes concentraciones de DMN y MMS. Se esperó a que completaran su desarrollo y se comparó el número y tipo de manchas inducidas por ambos compuestos.

Un efecto importante de la inyección fue la inducción temprana de la pupación, la cual ocurrió a las 86 horas siendo que de manera regular sucede a las 120 horas de edad. Únicamente en la concentración más alta de DMN [2.5 mM] el compuesto incrementó significativamente la frecuencia de manchas totales. El MMS no incrementó la frecuencia de ningún tipo de mancha. Los datos obtenidos indican que aparentemente ninguno de los compuestos resultó genotóxico para el sistema utilizado. Los resultados obtenidos en esta tesis no concuerdan con la actividad genotóxica

característica de estos mutágenos de referencia. Se sugiere que la manipulación y la forma de administración de los compuestos indujo una respuesta de estrés que enmascaró la inducción de actividad genotóxica. Se recomienda estudiar y caracterizar la respuesta inducida.

## II. INTRODUCCIÓN

La acumulación de sustancias contaminantes en el ambiente incrementa la probabilidad de que los seres humanos se expongan a éstas. La interacción entre los organismos y los contaminantes ambientales es un proceso que se lleva a cabo por períodos prolongados e incluye concentraciones mínimas de éstos, por lo que en muchas ocasiones se dificulta la detección del efecto provocado. Este tipo de exposición resulta de gran interés pues se asocia con el desencadenamiento de procesos malignos los cuales a su vez van en detrimento de los organismos vivos (Vega *et al*, 1990).

Se han desarrollado métodos analíticos de alta sensibilidad para detectar y cuantificar la presencia en el ambiente de cantidades mínimas de sustancias potencialmente tóxicas. Los resultados así obtenidos han ayudado a determinar el significado toxicológico de la exposición a bajas concentraciones (Vega, 1985).

Las sustancias tóxicas pueden agruparse en relación a la forma en la que el hombre está expuesto a ellas; se calcula que más de 100,000 productos químicos han sido elaborados para uso comercial, industrial y doméstico, por ejemplo: fármacos, aditivos de alimentos, plaguicidas, sustancias químicas de uso industrial, toxinas naturales y venenos domésticos (Tabla I). Cada año entran al mercado entre 500 a 1 000 productos nuevos (Albert, 1988). Muchos de éstos son capaces de provocar alteraciones en los organismos vivos con efectos a corto, mediano y largo plazo.

Las consecuencias de esta exposición han sido estudiadas principalmente en las células germinales de diversos organismos,

**Tabla I. Clasificación de mutágenos ambientales ( Modificado de Moutschen, 1985).**

<b>Sustancias mutagénicas sintetizadas por el hombre y usadas directamente en condiciones específicas.</b>				
<b>A. Farmacéuticos</b>	<b>B. Plaguicidas</b>		<b>C. Aditivos</b>	
a. agentes antitumorales o. narcóticos e. anestésicos	b. antibióticos d. anticonceptivos f. anestésicos	a. insecticidas o. herbicidas e. nematocidas	b. ratocidas d. fungicidas	a. alimentos b. otros (cosméticos)
<b>Sustancias mutagénicas usadas en la industria o que se encuentran en el ambiente como productos industriales.</b>				
<b>A. Agentes astringentes</b>	<b>B. Solventes orgánicos compuestos organo-metálicos</b>	<b>C. Contaminantes del agua</b>	<b>D. Contaminantes del aire</b>	<b>E. Metales pesados</b>
<b>Sustancias mutagénicas naturales</b>				
<b>A. Alcaloides</b>		<b>B. Productos del metabolismo microbiano.</b>		

sin embargo, con el tiempo se ha acumulado información del impacto de contaminantes ambientales en las células somáticas, lo que hace evidente la importancia de su detección y estudio, ya que con frecuencia la exposición a éstos se relaciona con procesos cancerosos (Ames et al, 1973; Ames, 1983; Moutschen, 1985). Además, las evidencias experimentales indican que la capacidad recombinogénica de una sustancia y su potencial cancerígeno se encuentran asociados (Vogel, 1991). Se han propuesto metodologías experimentales que permiten evaluar tanto la capacidad de mutación como la de recombinación somática empleando diversos organismos (Brusick, 1987).

Se conocen numerosos factores capaces de inducir cáncer, los cuales pueden ser: físicos (radiación), químicos (fármacos, solventes, metales pesados) o biológicos (toxinas animales, vegetales y virales).

Aquellos compuestos que no son constituyentes propios del organismo son denominados compuestos xenobióticos y pueden clasificarse con base en su mecanismo de acción en: directos, debido a que reaccionan con macromoléculas como el ADN y las proteínas sin requerir activación metabólica y los llamados indirectos, agentes precursores genotóxicos o promutágenos, los cuales requieren ser biotransformados (Vogel, 1991).

Gran parte de los agentes genotóxicos son promutágenos y/o procarcinógenos, por lo que al entrar al organismo estas genotoxinas son convertidas, en órganos como el hígado, riñón o testículo, a derivados altamente reactivos pero químicamente débiles, capaces de unirse a macromoléculas (Vogel, 1991).

### **Metabolismo**

La absorción, distribución, biotransformación y excreción de los agentes genotóxicos, requiere transporte de sustancias a través de las diversas membranas celulares, por lo que deben tenerse en cuenta los mecanismos mediante los cuales los compuestos pueden atravesarlas, así como las propiedades fisicoquímicas de las moléculas y de las membranas que afectan esta transferencia, el tamaño, forma molecular, grado de ionización, la solubilidad relativa en lípidos de las formas ionizada y no ionizada de las

moléculas es también una característica importante, entre otras (Goodman *et al*, 1990) (Fig 1).

La absorción describe la velocidad a la que un compuesto abandona el sitio de entrada y depende básicamente de la

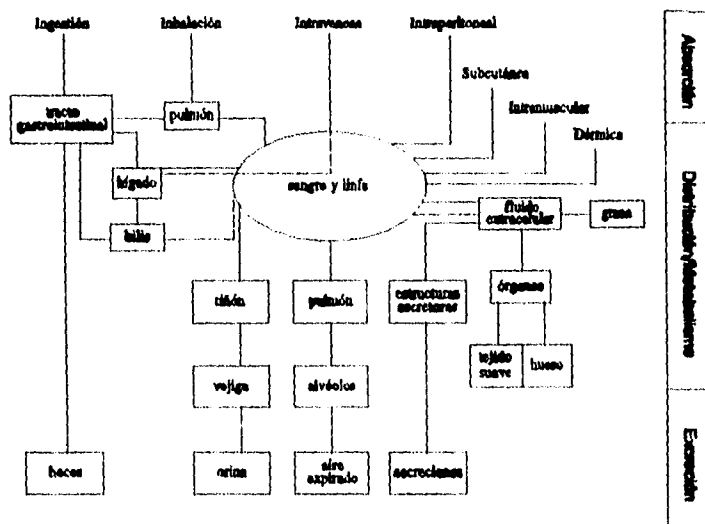


Figura 1 Rutas de absorción, distribución y excreción de los compuestos tóxicos en el cuerpo humano (Modificado de Cassaret y Doull, 1985).

solubilidad del mismo. La distribución también puede estar restringida por la unión del compuesto a proteínas plasmáticas, ya que limita su concentración en los tejidos y en el sitio de acción, y sólo la forma libre está en equilibrio a través de las membranas. Debido a que la unión de los compuestos a las proteínas plasmáticas puede ser poco específica, los compuestos con características

fisicoquímicas similares pueden competir entre sí y con sustancias endógenas por sitios de unión. El efecto del compuesto finaliza comunmente con su biotransformación y excreción, pero también puede deberse a su redistribución desde el sitio de acción a otros tejidos o sitios (Goodman *et al*, 1990; Timbrell, 1989).

Las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, que permiten el transporte rápido a través de las membranas celulares durante la absorción y la distribución, también alteran su posterior excreción. Así, la biotransformación enzimática de los compuestos a metabolitos más polares o menos liposolubles incrementa su excreción y disminuye su volumen de distribución. Esta biotransformación reduce la carga de sustancias extrañas y es crítica para la supervivencia del organismo. El estudio de los genes que codifican las enzimas que participan en la transformación metabólica de los compuestos, sugiere que éstos evolucionaron como un mecanismo que elimina a los constituyentes tóxicos de los alimentos, como flavonas, terpenos, esteroides y alcaloides, así como a los tóxicos ambientales (Goodman *et al*, 1990).

En mamíferos, los sistemas enzimáticos responsables de la transformación metabólica están localizados en el retículo endoplasmático liso del hepatocito (designado en centrifugaciones diferenciales como fracción microsomal, al cual pertenecen una gran familia de enzimas dependientes de citocromo P450). Se distinguen dos tipos de reacciones metabólicas, las llamadas de fase I y las de fase II.

Las reacciones de fase I convierten al compuesto original en

un metabolito más polar por oxidación, reducción o hidrólisis. Las reacciones de fase II, que también se denominan reacciones de conjugación o síntesis, requieren de la unión del compuesto o de su metabolito polar, con un sustrato endógeno como glucuronato, sulfato, acetato o un aminoácido (Goodman *et al*, 1990; Timbrell, 1989; Vogel, 1991).

Existen cuatro grupos de mutágenos químicos, cuyos mecanismos de acción sobre el ADN han sido estudiados: 1) análogos de bases; 2) compuestos que actúan directamente sobre las bases del ADN; 3) agentes alquilantes y 4) tintes de acridina (Fig. 2) (Vogel, 1991).

En éste trabajo se seleccionaron únicamente agentes

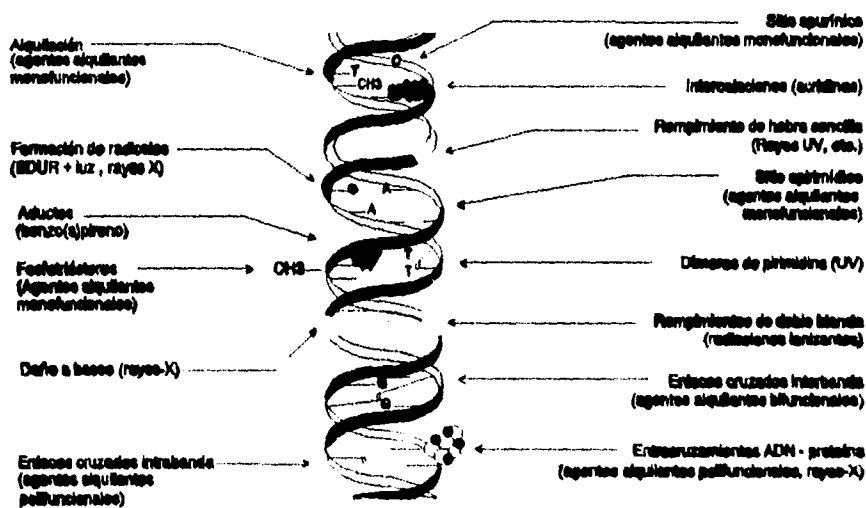


Figura 2 Interacción del DNA con agentes físicos y químicos (Modificado de Vogel, 1991).

alquilantes como compuestos modelo.

### **Agentes alquilantes**

Los agentes alquilantes son compuestos muy reactivos que adicionan un grupo alquilo (como el etilo o el metilo) en varias posiciones sobre las bases del ADN y alteran las propiedades de apareamiento de éstas. Se utilizan como sustancias modelo para estudiar la relación causa-efecto en mutagénesis química debido a que su interacción con el ADN y otras macromoléculas es conocida (Vogel, 1991). Su aplicación como compuestos antitumorales ha sido extensiva. Varios han sido evaluados en el carcinoma Walker de ratas, que ha mostrado tener mayor sensibilidad a estos compuestos (Hellman, 1972).

En eucariotos, la única base que se ha encontrado metilada en el ADN es la 5-metilcitosina (mC), la cual es de 3 a 5% más abundante que la citosina en el ADN animal y mucho más abundante en algunos ADN de plantas, pero está virtualmente ausente en otros ADN, como en el caso de algunos insectos. La síntesis de un residuo mC en el ADN es similar a la reacción de la timidilato sintetasa; un residuo nucleofílico de la enzima (probablemente un grupo tiol) ataca al carbono 6 del anillo pirimídico de la citosina, la cual activa al carbono 5 para la formación de un enlace carbono-carbono. En el ADN de procariotos las bases más metiladas son N<sup>6</sup>-metiladenina y en menor cantidad la N<sup>4</sup>-metilcitosina, lo que corresponde a menos del 1% (Mathews y van Holde, 1990).

En bacterias la metilación ocurre en sitios específicos. En

E coli la metilación de residuos A en la secuencia 5'...GATC ...3' participa en la corrección de errores de apareamiento y metilación de otros sitios del ADN protegidos contra los cortes de las endonucleasas de restricción. En animales, la metilación se encuentra solo en residuos C que tienen inmediatamente al extremo 5' residuos G, en una secuencia ...CpG... Cuando una C es metilada, la C correspondiente en la cadena complementaria también lo es. En el ADN de plantas la secuencia es CpNpG..., donde N puede ser cualquier base. Además se ha probado que la metilación en un sitio particular es un fenómeno heredable. Cuando el ADN eucariotes se duplica, la presencia de una metilasa asegura que todos los sitios que fueron metilados en el ADN parental, estén metilados en el ADN de las duplex hijas y los sitios desmetilados así permanecen (Mathews y van Holde, 1990). Los agentes alquilantes tales como la mostaza nitrogenada y la mostaza sulfurada -primeros mutágenos estudiados-, el metil y etil metanosulfonato (MMS y EMS), la nitrosoguanidina (NTG) y muchos otros, tienen efectos severos sobre el ADN. El mecanismo de mutagénesis asociado con los agentes alquilantes puede provocar, como en el caso del EMS, la etilación en la posición 7-N y posición 6-N de la guanina. Otras bases producto de la alquilación activan procesos de reparación como los que intervienen en la reparación de dímeros de timina. Algunos agentes alquilantes, particularmente los alquilantes difuncionales (con dos grupos alquil reactivos), inducen entrecruzamiento de cadenas de ADN/ADN y/o ADN/proteínas y originan rompimientos en los cromosomas y varias clases de aberraciones cromosómicas asociadas

con alteración en la integridad del DNA. Otros agentes alquilantes exhiben menor especificidad en su mutagenicidad como los análogos de bases, ácido nitroso o acridinas, los cuales inducen todos los tipos de mutación, incluyendo transiciones, transversiones, rompimientos y aberraciones cromosómicas, con frecuencias relativas dependiendo de la especificidad del agente alquilante empleado (Horsfall et al, 1990).

Las N-nitrosoguanidinas son un grupo grande de compuestos, muchos de los cuales son conocidos por tener fuerte actividad genotóxica. La nitrosoguanidina (NTG), uno de los mutágenos químicos más potentes, induce grupos de mutaciones ligadas en los segmentos de los cromosomas en duplicación durante el tratamiento. Los mutantes aislados después del tratamiento con la NTG, pueden portar mutaciones múltiples y mutaciones ligadas (Gardner, 1988).

La N-nitroso-dimetil-amina (DMN), ha mostrado ser un compuesto altamente mutagénico y carcinogénico en un amplio intervalo de especies animales y en gran variedad de tejidos. La DMN es un agente alquilante que puede metilar al ADN y provocar inestabilidad metabólica por hidroxilación del átomo de carbono alfa; se produce una hidroximetil-metil-nitrosamina inestable, la cual origina un ion alquildiazonium y posteriormente un ion carbonium, que es la molécula reactiva análoga (Vogel, 1991) (Fig. 3). Al ser administrada a ratas, la DMN se metaboliza a una forma que metila activamente al ADN en un número apreciable de sitios diferentes. Un producto del ADN formado por la acción metilante es la O<sup>6</sup>-metilguanina, que se forma en los sitios dG/dC. La DMN induce

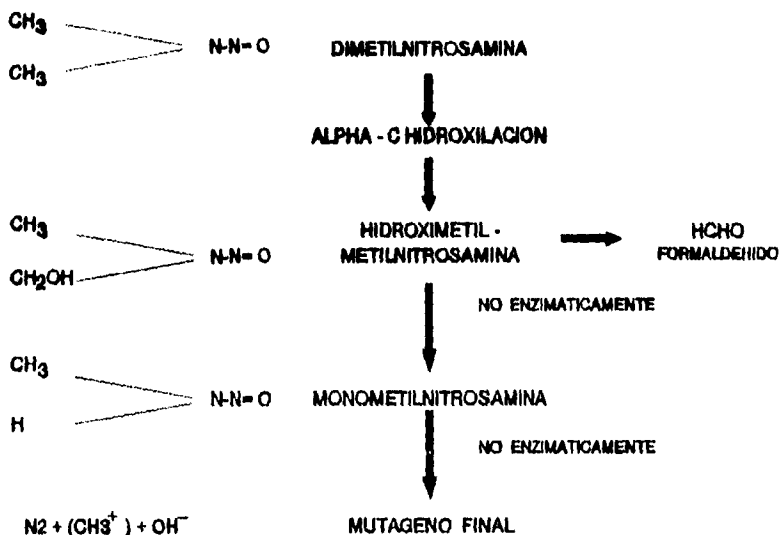


Figura 3 Biotransformación de la N-Nitrosodimetilamina (DMN) (Tomado de Mergle y O'Connor, 1979).

específicamente la formación de tumores en el riñón de ratas, a pesar de que la O<sup>6</sup>-metilguanina se produce en el ADN de otros órganos, tales como el hígado, de la misma forma que en el ADN de riñón. Tanto el riñón como el hígado poseen sistemas que eliminan la O<sup>6</sup>-metilguanina del ADN y lo reparan. La susceptibilidad de las células del riñón a la inducción de tumores por la DMN, en comparación con las del hígado, se relaciona con la disminución en la eficiencia del sistema reparador del riñón para eliminar del ADN a la O<sup>6</sup>-metilguanina a dosis elevadas de DMN. La persistencia de daño en el ADN de las células del riñón conduce a la inducción de tumores, debido a la persistencia de mutaciones cuando el ADN es

reparado (Ayala, 1984).

El metilmetanofulsonato (MMS), agente alquilante monofuncional, es un metil éster del ácido metanosulfónico, es soluble en agua y ligeramente soluble en solventes no polares; se usa como catalizador en reacciones de polimerización, alquilación y esterificación y como disolvente. Es un agente mutagénico de acción directa (Index Merck, 1989). Pertenece al grupo de los alquilalcanosulfonatos, que al igual que los alquilsulfatos tienden a reaccionar como moléculas neutrales por un mecanismo de asociación  $S_N2$ , que consiste en el ataque a los anillos de nitrógeno altamente nucleofílicos (Horsfall *et al*, 1990).

La capacidad de los agentes alquilantes monofuncionales como el MMS y EMS de producir deleciones en Drosophila ha recibido considerable atención. Lim y Snyder (1974) analizaron cromosomas X de las glándulas salivales de 22 líneas de Drosophila probadas para la inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al X por MMS y no encontraron evidencias citológicas de deficiencias pequeñas (Vogel y Natarajan, 1979). Por su parte, Fahmy y Fahmy (1961) reportaron que el 17% de los letales inducidos por MMS estaban asociados con deleciones detectables citológicamente.

En otro estudio, Lim y Snyder (1969) detectaron una deleción entre 54 letales recesivos inducidos por MMS. Esta discrepancia es sorprendente debido a que las concentraciones de MMS usadas en los experimentos por inyección fueron del mismo intervalo (4.5 y 7.5 mM).

Liu y Lim (1975) analizaron citológicamente 106 cromosomas de

moscas portadoras de mutaciones letales recesivas inducidas por MMS, localizando alteraciones en las regiones 3A1 y 3C2 del cromosoma X; con una excepción, estos mutantes presentaban lesiones restringidas a un solo loci (Vogel y Natarajan, 1979).

Las tablas II y III muestran la actividad genotóxica de la DMN y MMS, respectivamente, en pruebas de mutagenicidad con células germinales y somáticas. Las concentraciones tan bajas como 0.5 mM para DMN, y 0.05 mM para MMS resultan positivas en la prueba SMART cuando se administran por alimentación a larvas de Drosophila.

#### Sistemas de prueba

El estudio del impacto de los contaminantes ambientales en los organismos requiere del empleo de métodos experimentales capaces de proporcionar información de diversos eventos genéticos en un tiempo reducido y con bajo costo (Brusick, 1987; Ramos et al, 1990a,b).

La Toxicología se ocupa de la evaluación y cuantificación del riesgo de la exposición a las sustancias químicas; así como de la predicción de sus efectos en los individuos de una especie, con base en pruebas realizadas con otras especies (OMS, 1980). Un elemento central de la toxicología es establecer el uso seguro de los compuestos químicos, mediante la identificación del "daño", definido como la probabilidad de que un compuesto químico pueda producir una lesión bajo condiciones específicas; y el establecer los "límites de seguridad", definidos como la certeza de que un compuesto químico no provocará daño bajo condiciones específicas de cantidad y manera de uso (OMS, 1980; Cassaret y Doull, 1975).

Tabla II. Análisis comparativo del efecto del MMS en tres pruebas de genotoxicidad en Drosophila melanogaster.

Prueba	[mM]	Tratamiento	Linaje Celular	Frec. Inducida/ Frec. Control	Diag- nóstico Esta- dístico	Referencia
SLRLT	0.1	a.a. 26h	espermatozoides	15.0	+	Vogel y Natarajan (1979)
	0.25			77.5	+	
	0.50			105.8	+	
	0.50	a.a. 48h	espermatozoides	129.2	+	
			espermatidas	134.2	+	
			espermatidas y espermatoцитos II	92.5	+	
	1.0	i.a.	espermatozoides	316.6	+	
SMART OJO	0.05	a.l. 6h	células de los ojos	1.9	+	Ordaz (1991)
	0.10			2.6	+	
	0.5			4.7	+	
	1.0			11.7	+	
SMART ALA	0.1	a.l. 6h	células de las alas	2.3	+	Delgado (1990)
	0.5			3.1	+	
	1.0			7.1	+	
	2.35	a.l. 2h		6.3	+	Graf (1995)
	11.8			27.3	+	

\* a.a., alimentación adultos; i.a., inyección adultos; a.l., alimentación larvas.

Tabla III. Análisis comparativo del efecto del DMN en tres pruebas de genotoxicidad en Drosophila melanogaster.

Prueba	[mM]	Tratamiento	Linaje Celular	Frec. Inducida/ Frec. Control	Diag-nóstico Esta-distico	Referencia
SLRLT	1.0	a.a. 48h	espermatozoides	43.3	+	Vogel y Natarajan (1979)
				125.0	+	
			espermatidas y espermatocitos II	55.8	+	
SMART OJO	0.5	a.l. 6h	células de los ojos	15.5	+	Ordaz (1991)
	1.0			38.8	+	
	12.5			121.1	+	
	25.0			320.0	+	
SMART ALA	1.0	a.l. 6h	células de las alas	4.3	+	Delgado (1990)
	12.5			21.9	+	
	25.0			33.7	+	
	50.0			43.3	+	

\* a.a., alimentación adultos; i.a.,inyección adultos; a.l., alimentación larvas.

Por otra parte, la principal función de la genética toxicológica es la instrumentación de métodos y pruebas para identificar y evaluar el impacto de los compuestos que se encuentran en el ambiente y cuya presencia puede alterar la integridad de los componentes hereditarios; además, trata de conocer la secuencia de acontecimientos iniciales a partir de la interacción primaria del agente con el ADN, hasta el paso final que es la expresión del daño genético. Dada la vinculación entre la actividad mutagénica de diversas sustancias químicas con su capacidad carcinogénica, la genética toxicológica desempeña un doble papel, por un lado se ocupa de valorar el daño que ocasionan los agentes químicos y físicos en las células germinales, y por el otro, estudia las asociaciones predictivas entre genotoxicidad y el inicio de neoplasias (Cassaret y Doull, 1975; Vogel, 1991; Lippmann, 1992).

La toxicidad está relacionada con las características físicas y químicas del compuesto, condiciones, tiempo y frecuencia de la exposición, la ruta por la cual ésta ocurre, y la dosis administrada (Cassaret y Doull, 1975).

En las pruebas experimentales de toxicidad, la exposición puede ser aguda, si el organismo recibe la dosis total del compuesto en una sola ocasión —generalmente la dosis recibida es alta y la duración de la exposición es breve—. En contraste, es sumamente importante evaluar los efectos de la exposición crónica en la cual la dosis total se reparte en varias exposiciones —durante un periodo de tiempo prolongado—, por lo que aún dosis

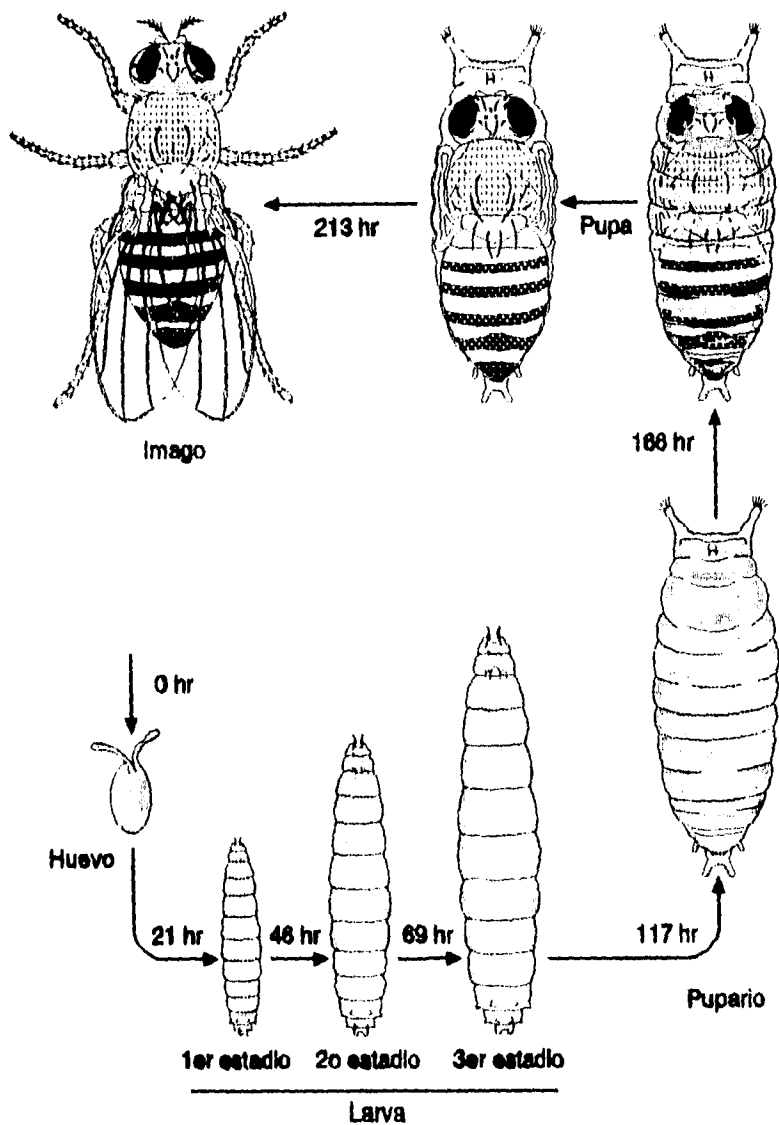
sumamente bajas pueden producir efectos detectables. Por lo regular los efectos tóxicos se detectan a dosis elevadas, por lo que es necesario determinar la probabilidad de que se obtengan respuestas similares para las concentraciones de exposición bajas y más frecuentes (OMS, 1980).

El primer paso para el estudio de la acción farmacológica de una sustancia es la obtención de una curva dosis-respuesta. En este proceso a diferentes grupos de organismos se administran dosis crecientes de la misma sustancia y se observan los efectos provocados. La relación entre la dosis administrada y la proporción de los animales expuestos que muestran algún efecto definido, previamente determinado, constituye la base de la curva dosis-respuesta (Ramos, 1994).

En el campo de la Genética Toxicológica surgen diversos planteamientos en relación con el número y tipo de sistemas de prueba que han de emplearse a fin de estimar el riesgo de la exposición a los diferentes contaminantes ambientales.

#### Drosophila como sistema de prueba

La mosca de la fruta Drosophila melanogaster, es considerada un organismo adecuado para estimar riesgos heredables ya que puede detectar mutaciones en las células germinales. Ofrece diversas ventajas que la hacen un sistema de prueba eficiente para los estudios de mutagénesis. Tiene un ciclo de vida corto (10 días a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  (Fig. 4), lo que permite el análisis de progenie numerosa, pero que es suficientemente largo para distinguir entre los efectos



**Figura 4** Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* a  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  (Tomado de Maldonado, 1994).

de exposiciones crónicas, agudas y fraccionadas, además, presenta una gran cantidad de marcadores fenotípicos que facilitan el análisis genético (Lindsley y Zimmering, 1985), su mantenimiento es relativamente económico; por otro lado es el eucarioto mejor conocido desde el punto de vista genético, su gametogénesis ha sido ampliamente estudiada, por lo que se pueden valorar alteraciones ocasionadas por compuestos químicos al ADN en los diferentes estadios de las células germinales (Zimmering, 1976; Salceda, 1984 y Kilbey et al, 1981). Posee un paquete enzimático con una fracción microsómica similar a la S-9 del hígado de los mamíferos, con enzimas que participan en la degradación o en la activación in vivo de sustancias mutagénicas o carcinogénicas, lo cual hace posible evaluar compuestos tanto de acción directa como indirecta (Chandley y Bateman, 1962; Vogel, 1975 y Zijlstra, 1984). Los compuestos pueden administrarse por diferentes vías tales como alimentación de larvas y adultos, inyección, inhalación y ducha vaginal. Mediante sistemas de cruza específicas se puede detectar la inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo, mutaciones letales dominantes, pérdida parcial y/o total de cromosomas sexuales y autosómicos, translocaciones, deleciones, duplicaciones y no disyunción en células germinales y mutación y recombinación en células somáticas (Valencia et al, 1984; Lee et al, 1983; Würigler et al y Graf et al, 1984).

En 1994 Ramos dice: "Su principal limitación se asocia con las dificultades encontradas frecuentemente para determinar de manera cuantitativa la dosis real administrada a las moscas por

alimentación. En consecuencia, se requieren estudios exhaustivos preliminares de toxicidad para valorar la ingesta del compuesto, previos a la ejecución de la prueba de manera que se seleccione la forma de exposición más apropiada; especialmente cuando se analizan probables no genotóxicos. El empleo de técnicas de microinyección pueden resolver los problemas de la ingesta del material de prueba" y permite determinar la relación entre el efecto inducido y la dosis administrada (Ramos, 1994). La relación dosis-respuesta, en comparación con la de concentración-respuesta permite determinar la potencia genotóxica de un compuesto al considerar la cantidad de compuesto activo por biomasa del organismo expuesto que es capaz de inducir daño. En el caso de la relación concentración-respuesta, se desconoce la cantidad real del compuesto que ingresó al organismo expuesto y por lo tanto, impide determinar la potencia del compuesto en estudio.

### **Biología del Desarrollo**

La larva de Drosophila presenta dos linajes celulares diferentes: las células larvarias y las células imagales. Las células larvarias forman el cuerpo de la larva, estas células han perdido su capacidad de división y solamente aumentan de tamaño, en algunas se presentan cromosomas politénicos, son poliploides y están determinadas genéticamente. Las células imagales (no están participan en la expresión de genes funcionales en la etapa larvaria), se encuentran contenidos en estructuras similares a pequeños sacos denominadas discos imagales, son distinguibles de

las células larvarias por su tamaño pequeño, constitución cromosómica diploide, retención de la capacidad de división celular y porque alcanzan su diferenciación hasta que entran a la metamorfosis; los discos imagales aumentan de tamaño por divisiones mitóticas sucesivas, las cuales ocurren a determinado tiempo durante el desarrollo larvario (Demerec, 1965).

Los discos imagales constan de capas de células epiteliales uniformes, ordenadas alrededor de un lumen estrecho. Las células de estos discos presentan pocas señales de diferenciación; todas se parecen mucho. Tienen un núcleo grande, relativamente poco citoplasma y contienen gran cantidad de ribosomas.

El medio hormonal de las larvas permite que proliferen los discos imagales, pero no que se diferencien. La diferenciación celular se produce por la activación y represión selectivas, y en series ordenadas de los genes (Markert y Ursprung, 1973).

Durante la metamorfosis, la hormona ecdisterona o ecdisona desencadena una serie de cambios, este proceso incluye la destrucción de ciertos tejidos y órganos larvarios (histólisis) y la organización de las estructuras del adulto a partir del complejo de células primordiales, los discos imagales. Los órganos que son completamente histolizados durante la metamorfosis son las glándulas salivales, el intestino, los cuerpos grasos y los músculos. Todos los órganos del adulto son formados a partir de los discos imagales y por las células larvarias que se diferencian en el momento de la reorganización del estado pupal, los tubos de Malpighi son poco alterados durante la metamorfosis aunque sí

sufren algunos cambios en su composición estructural, el tórax se forma por la combinación de varios discos imagales. Las extremidades, ojos, antenas, alas y aparato genital se diferencian a partir de su respectivo disco imagal que sufre una histogénesis durante el desarrollo pupal (Fig. 5) (Demerec, 1965).

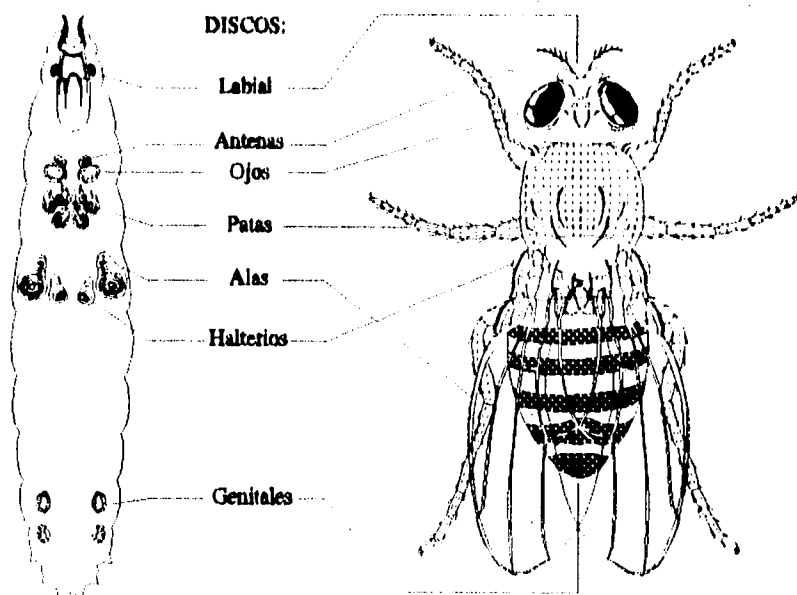


Figura 5 Determinación de las estructuras en el adulto de *Drosophila melanogaster* a partir de sucesivas divisiones mitóticas de los discos imagales (Tomado de Maldonado, 1994).

El imago rompe el extremo anterior del pupario, por donde sale. Al principio, el cuerpo de la mosca es alargado, sin el pigmento característico y tiene las alas totalmente plegadas; durante aproximadamente una hora la mosca bombea linfa a las alas (que son una especie de sacos que se extienden gradualmente hasta

quedar turgentes), el contacto con el aire seca las alas que posteriormente son vaciadas al excretar la mosca el exceso de linfa; conforme pasan las horas, el adulto adquiere su color característico y alcanza su madurez sexual alrededor de ocho o nueve horas después de haber abandonado el pupario.

Durante el desarrollo de un disco imagal, grupos de células se determinan juntas, lo que constituye un policlón. Después de la formación del blastodermo, las 10 a 50 células que constituyen el disco imagal mesotorácico están agrupadas en dos policlones. Uno de los policlones genera la porción anterior del ala y el tórax dorsal, el otro policlón producirá la parte posterior del ala y la parte del tórax restante. Cuando se genera un clon mutante es posible seguir la evolución de la formación del mismo durante el desarrollo de la mosca. Se ha determinado que una mutación en un policlon podría propagarse en uno de estos compartimentos, pero no en otro. El siguiente fenómeno determinativo separa el disco del ala del disco de las patas. La cutícula mesotorácica de este segmento está dividida en policlones anterior y posterior en el estado de blastodermo. La separación del segmento dorsal hacia el segmento ventral ocurre a las primeras 10 horas del desarrollo (Demerec, 1965).

El disco del ala (disco mesotorácico dorsal) se observa en el primer estadio larvario como un pequeño paquete de 15 a 30 células epidérmicas embrionarias. La sucesiva compartimentalización del disco imagal en regiones da origen al ala. Pasadas 24 horas de la formación del pupario la división de las células se detiene. El

disco toma una forma y tamaño característicos como el de un balón aplanado y altamente plegado (García-Bellido y Merriam, 1971; Crick y Lawrence, 1975).

Los discos de las alas y los de las patas se separan físicamente, cada uno mantiene sus uniones anterior-posterior originales. Esta unión está bisectada por otra división del respectivo disco en compartimentos dorsal y ventral. Cada uno de estos compartimentos del ala se divide en muchos más policlones y da origen al ala y al notum del tórax. La formación de los límites de los compartimentos se ha correlacionado con glicoproteínas de la superficie celular del disco imagal del ala; la formación de los compartimentos dorsal-ventral ocurre en el disco del ala en el tercer estadio y también ha sido correlacionado con comunicaciones celulares (Morata y Lawrence, 1975 y 1977).

#### **Prueba de mutación y recombinación somática (SMART).**

El empleo de las células corporales de Drosophila permite detectar la actividad mutagénica y recombinogénica de compuestos químicos a nivel somático (Delgado, 1990; Ordaz, 1991).

La prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART), detecta compuestos de diferente estructura química, es económica, se realiza en una sola generación y permite analizar un gran número de células blanco (cerca 1,000,000) en un tamaño de muestra de 40 alas (García Bellido y Merriam, 1971; Graf et al, 1984; Vogel y Szakmary, 1990); se basa en el tratamiento de larvas en etapas tempranas del desarrollo, previas a la metamorfosis. El número de

manchas recobradas en la mosca adulta indica la frecuencia de acontecimientos genéticos, y el tamaño de las manchas refleja el tiempo de formación durante la embriogénesis.

La SMART detecta eventos genéticos como mutaciones puntuales, deleciones y no disyunción, así como recombinación mitótica (Fig. 6). Estas alteraciones se manifiestan en el adulto por la aparición de manchas que expresan los fenotipos alternativos con los que se marcaron las células de los discos imagales de las larvas (Graf et al, 1984).

Se utilizan marcadores fenotípicos para los tricomas (pelos) que forma cada una de las células epiteliales (Maldonado, 1994).

El marcador flare, flr<sup>1</sup> (3-38.8), es codificado por un gen recesivo que es letal para el organismo en condición homocigótica; sin embargo, cuando se expresa en las células somáticas es viable y produce tricomas anormales con forma de flama, se caracteriza porque el eje de los tricomas está frecuentemente encorvado y ramificado, los tricomas son cortos y aparecen como abultamientos o hinchamientos sobre las células del ala y como rosetas en las células de la cutícula del abdomen (García Bellido y Dapena, 1974).

Debido a que el gene flr<sup>1</sup> es letal homocigótico, para mantener a las moscas portadoras se requiere la presencia de un cromosoma balanceador, el cromosoma TM3 "Third multiple", que presenta múltiples inversiones que impiden recobrar productos del entrecruzamiento entre los cromosomas homólogos y cuya presencia se distingue porque porta el gen Serrata (Ser) (3-92.5), el cual permite identificar a los organismos portadores; produce un

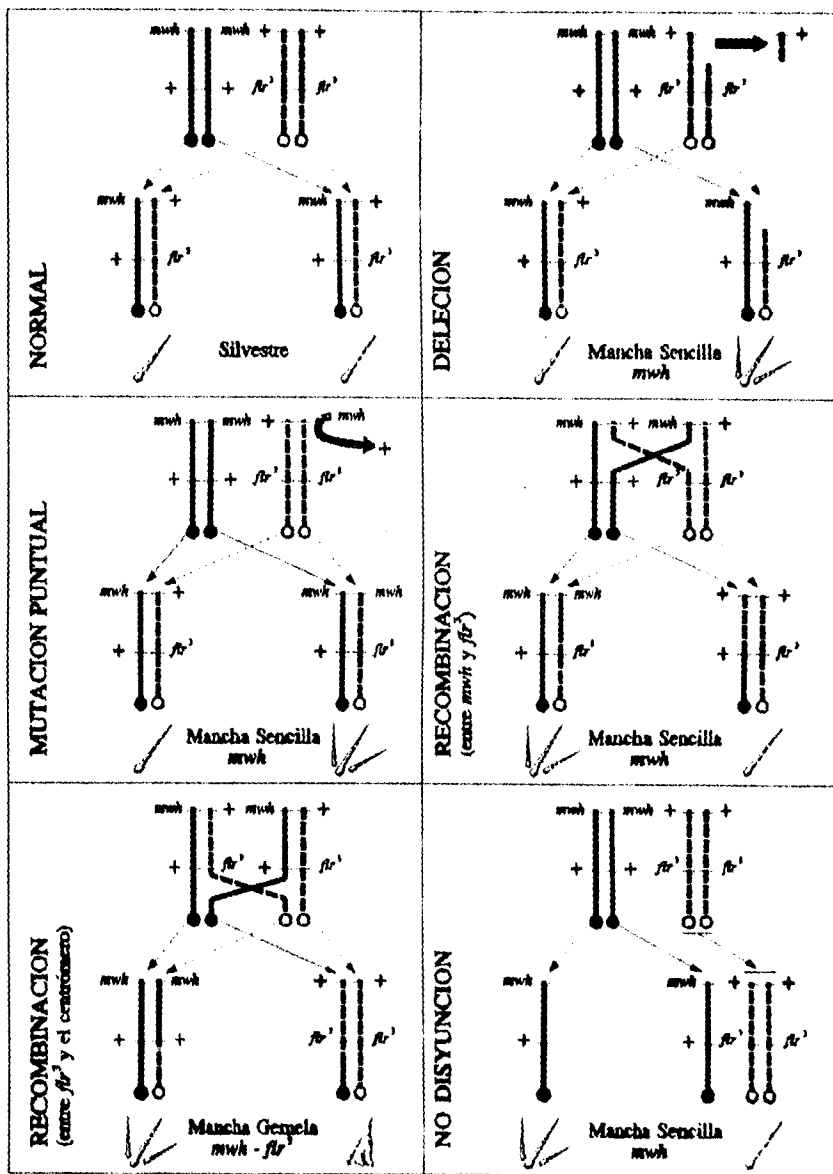


Figura 6 Eventos genéticos que detecta SMART (Modificado de Graf *et al*, 1984).

fenotipo de bordes discontinuos o muescas en el extremo de las ala; es un gen letal dominante en condición homóciga, por lo que en cada generación sexual sólo se recobran organismos heterocigotos flr<sup>1</sup>/Ser (Lindsley y Zimmering, 1985).

La mutación multiple wing hair, mwh (3-0.0), es recesiva y en condición homocigótica cada célula de las alas forma tricomas múltiples (en promedio de 2 a 5) en lugar de uno, como es característico del fenotipo silvestre (Lindsley y Grell, 1968).

En la progenie transheterociga pueden recobrase manchas mutantes que expresan uno de los genes marcadores como producto de: recombinación somática entre flr<sup>1</sup> y mwh, mutaciones puntuales, delección y no disyunción; además aparecen manchas gemelas, es decir, clones adyacentes que expresan ambos genes marcadores los cuales se originan exclusivamente por recombinación mitótica entre el centrómero y el marcador flr<sup>1</sup>. En contraste, en la progenie portadora del cromosoma balanceador, los fenómenos de recombinación son suprimidos por lo que sólo se recobran manchas debidas a acontecimientos no recombinogénicos. Así, la comparación del número de manchas obtenidas en ambos tipos de progenie permite estimar la contribución de la recombinación a la frecuencia de manchas totales recobradas (Graf et al, 1984).

La frecuencia de clones mwh se incrementa exponencialmente con la edad de la larva (Fig. 7). Esto se basa en la hipótesis de que la longitud del ciclo mitótico, de una división a la siguiente, es constante y puede ser medida por el tiempo necesario para doblar el número de clones mwh por disco imagal del ala, el cual se estima en

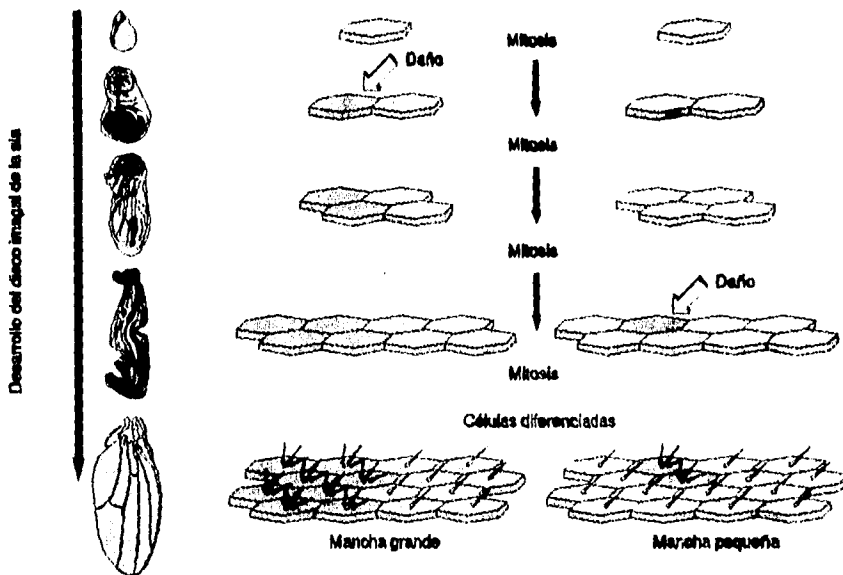


Figura 7 Formación de dices durante el desarrollo del ala (Tomado de Maldonado, 1994).

8.5 horas, así, se ha sugerido que el número total de células que forman el ala en el adulto se origina en 15.6 divisiones celulares, de éstas, las 3.5 divisiones nucleares originan a las 12 células primordiales del disco imagal durante las primeras horas del desarrollo; las otras 12 divisiones celulares podrían darse en aproximadamente 120 horas, lo cual correspondería a 8.5 horas por cada división.

Al término del primer estadio larvario cada disco imagal del ala cuenta aproximadamente con 96 células, en el segundo con 768, en el tercero con 12,288 y finalmente en la pupación, poco antes de que empiece la diferenciación celular, cuenta ya con

aproximadamente 52,000 células (Tabla IV) (García Bellido y Merriam, 1971). El número de células mwh por clon decrece con la edad de la larva tratada, lo cual coincide con la suposición de que el tamaño del clon celular, y posteriormente de la mancha mutante

Tabla IV. Dinámica de crecimiento celular en el disco imagal del ala por hora y estadio larval (Tomado de García-Bellido y Merriam, 1971).

H o r a s (Ciclo de división)	# Células en el Disco imagal del ala	Estadio larvario
0	0	Ovoposición
21.0	12	Eclosión
29.5	24	1°
38.0	48	1°
46.5	96	1°
55.0	192	2°
63.5	384	2°
72.0	768	2°
80.5	1 536	3°
89.0	3 072	3°
97.5	6 144	3°
106.0	12 288	3°
114.5	24 576	3°
117.0	31 804	3°
123.0	49 152	División ya forma- do el pupario.

que resulta, es inversamente proporcional al número de células en el disco imagal del ala al momento del tratamiento. En otras palabras, cuando la alteración que conduce a la formación de una mancha mutante ocurre tempranamente en el desarrollo, se recuperan

pocas manchas pero de mayor tamaño, que cuando la alteración se presenta en los últimos ciclos de división. La frecuencia espontánea de manchas mwh por ala se encuentra en el intervalo 0.2 a 0.4 (García-Bellido y Merriam, 1971).

En resumen, el tipo y tamaño de las manchas inducidas por determinado compuesto químico puede ser un indicador de la participación del metabolismo en la reactividad del compuesto. De esta manera la comparación del tipo y tamaño de las manchas inducidas por compuestos directos e indirectos mostrará el tiempo requerido para que la biotransformación se lleve al cabo mediante el tamaño promedio de clase clonal.

El tamaño promedio de clase clonal se obtiene al agrupar los clones de acuerdo con el número mínimo de divisiones celulares necesarias para que se obtenga tal tamaño de mancha. Así, las manchas se clasifican en los siguientes tamaños de clase clonal: 1, 2, 3 a 4, 5 a 8, 9 a 16 células, y así, sucesivamente. Las clases se numeran empezando con el 1. El tamaño promedio de clon se estima entonces, por medio del tamaño promedio de mancha (Graf et al, 1984).

Para la evaluación de los efectos genotóxicos inducidos por compuestos químicos en la prueba SMART, se comparan las frecuencias de manchas en las series tratadas con las observadas en los grupos testigos. Esta frecuencia depende del número de células expuestas al agente químico, lo que está relacionado con la edad de la larva al momento del tratamiento (García Bellido y Merriam, 1971; Szabad et al., 1983 y Graf et al, 1984).

El determinar la relación dosis-respuesta en la prueba SMART de Drosophila mediante el método de inyección permitirá analizar con mayor precisión el potencial genotóxico de un compuesto químico y establecer relaciones de genotoxicidad entre compuestos químicamente similares, y con otros diferentes; además de lo anterior, proporcionaría información del tiempo que se requiere para activar a un promutágeno y, en consecuencia, posibilitaría discernir más claramente entre mutágenos y promutágenos, así como proponer su posible mecanismo de acción.

#### Objetivo

En el presente trabajo se comparó la respuesta inducida por dos mutágenos de referencia en células de las alas de Drosophila melanogaster mediante la prueba de mutación y recombinación somáticas. Se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1) Determinar la relación dosis-respuesta de dos mutágenos de referencia en células de las alas mediante inyección de larvas.
- 2) Comparar la curva dosis-respuesta producida por cada compuesto en las células de las alas de Drosophila melanogaster.
- 3) Obtener la relación de genotoxicidad de los compuestos utilizados.

### III. MATERIAL Y METODO

#### -Sistema de cruce-

En este trabajo se emplearon dos líneas de Drosophila melanogaster: flr<sup>1</sup>/TM3, Ser y mwh/mwh de las cuales se obtuvieron

hembras vírgenes y machos, respectivamente.

Como resultado de esta cruce se obtienen dos tipos de progenie: larvas transheterócigas ( $+ flr^1/mwh +$ ), que constituyen la mitad de la progenie y la otra mitad, larvas portadoras del cromosoma balanceador ( $TM3, Ser/mwh +$ ), los tipos de larvas no son distinguibles por lo que se tratan juntas. Las moscas adultas se distinguen por la forma de las alas: silvestre y Serrata (Fig. 8).

#### Obtención de larvas

Tres días después de realizada la cruce, los progenitores se transfirieron a frascos con medio fresco para recolectar huevos

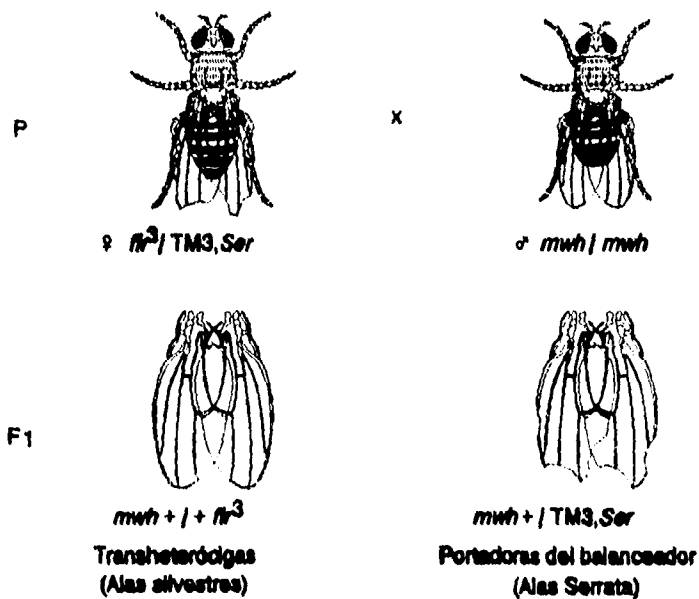


Figura 8 Cruza progenitora para SMART y fenotipos de las moscas que se obtienen en la F1 (Tomado de Maldonado, 1994).

durante un período de 4 horas. A las 72 ± 4 horas se procedió según Nöthinger (1970) a separar las larvas del medio de cultivo mediante una solución concentrada de sacarosa al 20%, se les hizo pasar por un embudo de separación de 0.4 mm de diámetro y se recolectaron sobre una tela nylon. Con la ayuda de un pincel se tomaron las larvas y se transfirieron a una caja de Petri con sacarosa al 5% para conservar la humedad, mientras eran tratadas.

#### Compuestos químicos

a) N-Nitroso-dimetil-amina (DMN) (Fig.9), agente alquilante y

<p><b>N-nitroso- dimetil amina (DMN)</b></p>	<p><b>Dimetil-metanosulfonato (MMS)</b></p>
<div data-bbox="270 1003 541 1125"> <math display="block">\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{N} - \text{S} - \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}</math> </div> <div data-bbox="195 1172 617 1303"> <p><b>* Propiedades genotóxicas:</b>  a. Agente alquilante monofuncional  b. Promutágeno (agente de acción indirecta)</p> </div>	<div data-bbox="705 1003 982 1153"> <math display="block">\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{CH}_3 - \text{O} - \text{S} - \text{CH}_3 \\    \\ \text{O} \end{array}</math> </div> <div data-bbox="642 1181 1064 1285"> <p><b>* Propiedades genotóxicas:</b>  a. Agente alquilante monofuncional  b. Agente de acción Directa</p> </div>

Figura 9 Estructura y características de los compuestos utilizados (Tomado de Vogel, 1991)

procarcinógeno (Index Merck, 1989). Se obtuvo de Sigma, (St. Louis MO). Las concentraciones probadas fueron 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.10, 1.0 y 2.5 mM

b) Metil-metanosulfonato (MMS) (Fig. 9), agente mutagénico de acción directa (Index Merck, 1989). Se obtuvo de Aldrich, (Milwaukee, WIS). Las concentraciones probadas fueron: 0.01, 0.025, 0.05, y 0.10 mM.

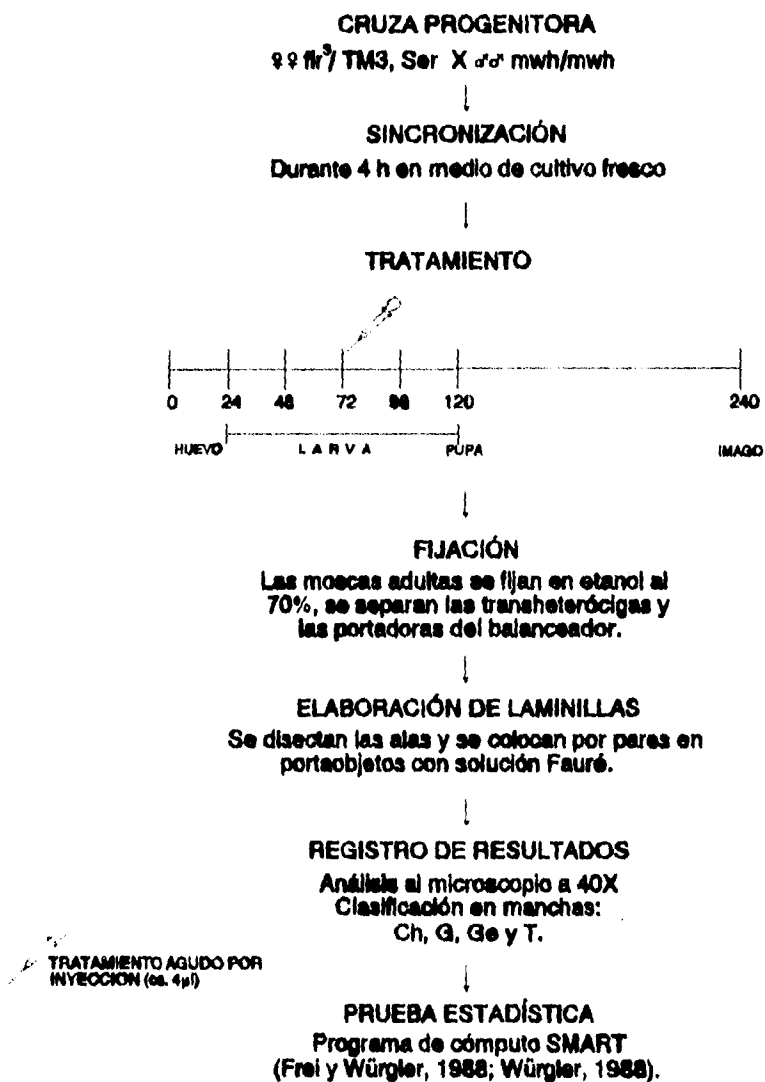
Ambos compuestos se disolvieron en una solución de sacarosa al 5 %, la cual se utilizó también como testigo negativo.

#### Tratamiento

Para conocer la relación entre el tiempo de acción y el tamaño de mancha se procedió a inyectar aproximadamente 4  $\mu$ l de la solución de prueba a larvas de  $72 \pm 4$  horas de edad, después de lo cual las larvas fueron transferidas a frascos con medio fresco hasta que completaron su ciclo de vida (Fig. 10).

#### Fijación y elaboración de laminillas

Los adultos flr<sup>1</sup> +/mwh se fijaron en alcohol al 70%. Para la elaboración de laminillas las alas se disectaron del cuerpo de la mosca y se colocaron en parejas sobre portaobjetos con solución Fauré (30 g de goma arábiga, 20 ml de glicerol, 50 gr de hidrato de cloral y 50 ml de agua) para su análisis posterior al microscopio óptico a 40x (Graf et al, 1984). El registro de manchas se realizó según su localización en el sector del ala (Fig. 11). Las manchas se clasificaron según el tamaño en: chicas (de 1 a 2 células) y



**Figura 10** Diseño experimental para la prueba de SMART en células somáticas del ala de *Drosophila melanogaster*.

grandes ( $> 2$  células), y por el fenotipo en manchas simples mwh, manchas simples flr<sup>1</sup> y manchas gemelas, con los dos fenotipos anteriores (Graf et al, 1984).

### Análisis Estadístico

Para determinar si existían diferencias significativas entre las frecuencias de manchas obtenidas en los tratamientos y la del lote testigo se utilizó el procedimiento de decisión múltiple de Frei y Würgler (1988) y el programa de cómputo SMART (Würgler, no publicado), los cuales se basan en la prueba no paramétrica de  $X^2$ .

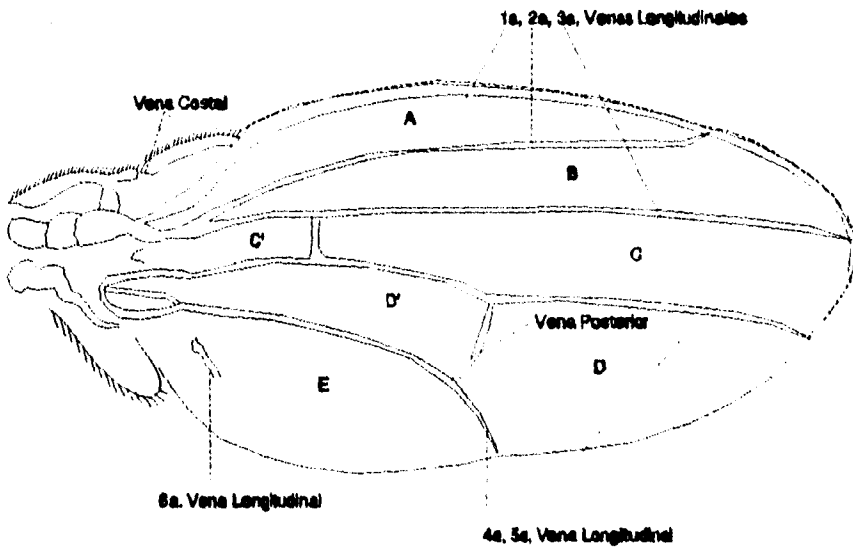


Figura 11 Zonas de registro de manchas en el ala de *Drosophila melanogaster* (Tomado de Maldonado, 1984).

#### IV. RESULTADOS

La aplicación de la técnica de inyección indujo gran mortalidad entre las larvas por lo que se hicieron numerosos ensayos preliminares para definir las condiciones que permitieran recobrar mayor número de organismos vivos. Un efecto importante de la inyección fue la inducción temprana de la pupación, la cual ocurre de manera regular a las 120 horas de edad, sin embargo, las larvas inyectadas formaban el puparium antes de 12 horas después del tratamiento, es decir, cerca de 84 horas de edad. Este efecto se incrementó en la temporada de calor (primavera y verano) en el que el fotoperíodo reduce el tiempo de desarrollo de la mosca de 10 a 9.5 días aproximadamente. Además de la inducción temprana de la pupación, el número de larvas que morían se incrementó notablemente (>80%), este fenómeno se encuentra asociado con la edad fisiológica de la larva, que es influida principalmente por el tamaño que alcanza la larva en las épocas cálidas, en la que ocurre el disparo de la ecdisona u hormona inductora del proceso de metamorfosis. Para contrarrestar este efecto se probó reducir el período de colecta de huevos de 8 a 4 horas. La edad de la larva para los tratamientos se modificó, de  $72 \pm 4$  horas a  $72 \pm 2$  horas, con lo que se obtuvo una viabilidad cercana al 60 %.

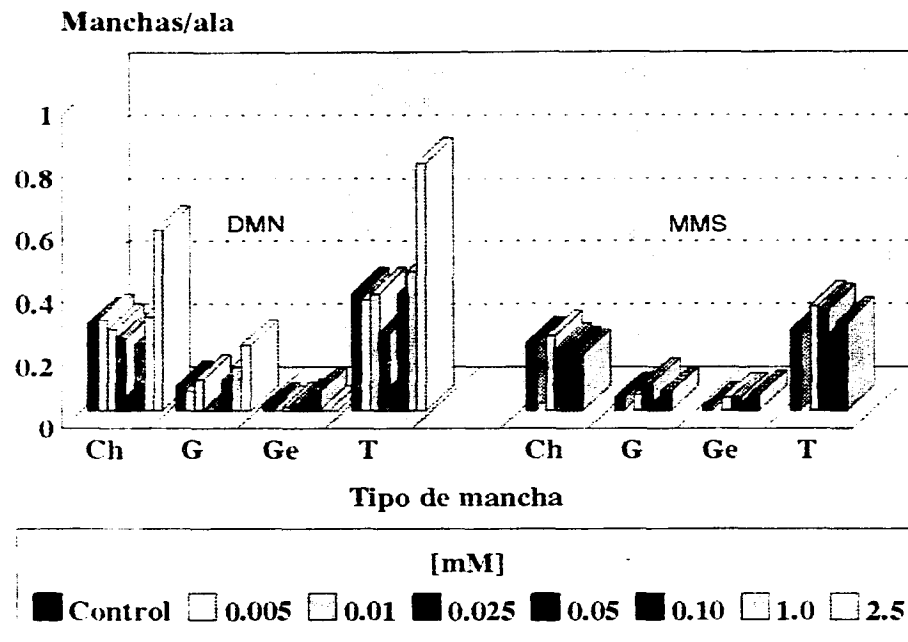
Para cada concentración se realizaron varias series de experimentos, al no encontrarse diferencias significativas entre las repeticiones, se sumaron los resultados obtenidos, con el fin de incrementar el tamaño de muestra por lote.

La tabla V y figura 12, muestran los resultados obtenidos

Tabla V. Número y frecuencia de manchas/ala inducidas por inyección de DMN (4µl) en larvas transheterocigas de Drosophila.

Com- puesto	Núme- ro de alas	Manchas por ala (Numero de manchas)				Man- chas mwh	Tama- ño prom- edio de clon	Frec. de formación de clon X 10 <sup>-5</sup>	
		Manchas simples chicas (1-2 cells) m = 2	Manchas simples grandes (> 2 cells) m = 5	Manchas Gemelas m = 5	Manchas Totales m = 2			obser- vada	control corregi- do
Control	126	0.28 (35)	0.08 (10)	0.01 ( 1)	0.37 ( 46)	45	1.72	1.5	
0.005	48	0.29 (14)	0.06 ( 3)	0.00 ( 0)	0.35 (17)	17	1.76	1.5	0.0
0.01	152	0.26 (40)	0.10 (15)	0.01 ( 1)	0.37 (56)	54	2.28	1.5	0.0
0.025	56	0.23 (13)	0.00 ( 0)	0.02 ( 1)	0.25 (14)	14	1.21	1.0	-0.4
0.05	46	0.04 ( 2)	0.00 ( 0)	0.02 ( 5)	0.07 ( 3)	3	1.67	0.3	-1.2
0.10	52	0.21 (11)	0.10 ( 5)	0.06 ( 3)	0.37 (19)	19	2.32	1.5	0.0
1.0	64	0.30 (19)	0.14 ( 9)	0.00 ( 0)	0.44 (28)	27	2.41	1.7	0.3
2.5	14	0.57 ( 8)	0.21 ( 3)	0.00 ( 0)	0.79 (11)	10	2.30	2.9	1.5

\* Analisis estadístico de acuerdo a Frei y Wurgler (1988). +, positivo; niveles de probabilidad: alpha = beta = 0.05.

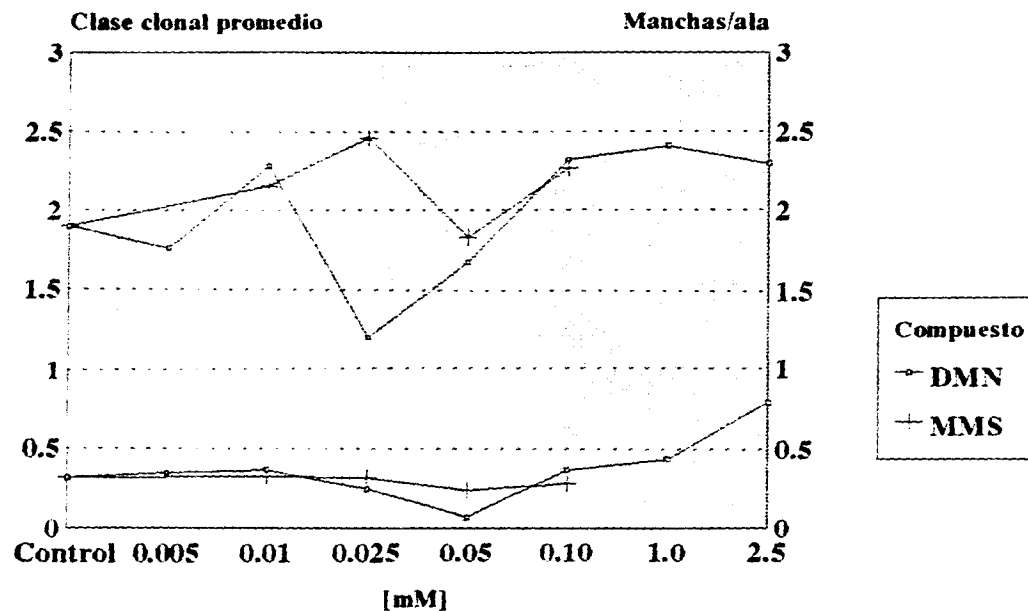


**Fig. 12 Frecuencia de manchas/ala inducidas por DMN y MMS**

Tabla VI. Número y frecuencia de manchas/ala inducidas por inyección de MMS (4µl) en larvas transheterocigas de Drosophila.

Com- puesto	Núme- ro de alas	Manchas por ala (Numero de manchas)				Man- chas <u>mwh</u>	Tama- ño prome- dio de clon	Frec. de formación de clon X 10 <sup>-5</sup>	
		Manchas sencillas chicas (1-2 cells) m = 2	Manchas sencillas grandes (> 2 cells) m = 5	Manchas Gemelas m = 5	Manchas Totales m = 2			obser- vada	control corregi- do
Control	106	0.22 (23)	0.04 ( 4)	0.01 ( 1)	0.26 ( 28)	28	2.04	1.1	
0.01	130	0.24 (31)	0.05 ( 7)	0.04 ( 5)	0.33 (43)	41	2.15	1.3	0.2
0.025	80	0.20 (16)	0.09 ( 7)	0.04 ( 3)	0.32 (26)	26	2.46	1.3	0.2
0.05	122	0.19 (23)	0.02 ( 3)	0.02 ( 3)	0.24 (29)	29	1.83	1.0	-0.1
0.10	108	0.18 (19)	0.06 ( 6)	0.05 ( 5)	0.28 (30)	30	2.27	1.1	0.1

\* Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Würigler (1988). Niveles de probabilidad: alpha = beta = 0.05.



**Fig. 13 Relación concentración/clase clonal promedio y manchas/ala inducidas por DMN y MMS en larvas de *Drosophila melanogaster***

después de inyectar larvas de Drosophila con diferentes concentraciones de DMN. Únicamente en la concentración más alta [2.5 mM] el compuesto incrementó significativamente la frecuencia de manchas totales. La frecuencia de manchas simples chicas y grandes se incrementó en relación con la frecuencia control, sin embargo el incremento no fue significativo; no se recobraron manchas gemelas. El tamaño promedio de clase clonal presentó variaciones en las diferentes concentraciones (1.21 a 2.32), aunque finalmente resultó similar al del lote testigo (1.72). La frecuencia de formación de clones/1 000 células (observada y corregida) sólo mostró un ligero incremento en 2.5 mM.

La tabla VI y la figura 12 muestran los resultados obtenidos con MMS. De la misma forma que la DMN, el MMS no incrementó la frecuencia de ningún tipo de mancha. El tamaño promedio de clase clonal mostró igualmente variaciones (1.83 a 2.46) similares al del lote testigo (2.04). La frecuencia de formación de clones/10 000 células (observada y corregida) no se modificó para ninguna concentración.

La relación entre la concentración/clase clonal promedio y manchas/ala, inducidas por DMN y MMS se presenta en la figura 13. Para ambos compuestos se obtuvo un patrón de curva similar, tanto para el tamaño promedio de clase clonal, como para la frecuencia de manchas por ala.

## V. DISCUSION

Los efectos que ejercen los agentes xenobióticos en los organismos son diversos e incluyen la participación de múltiples factores, entre los que se encuentran, las propiedades fisicoquímicas de los compuestos que participan, su solubilidad en agua y otros disolventes, su estabilidad en el ambiente, las interacciones con otras sustancias existentes; y por otra parte, características intrínsecas de los organismos como: edad, sexo, estado de salud y sus antecedentes genéticos, entre otros.

Además, la duración e intensidad de la exposición y la ruta por la que ingresa el compuesto a los organismos, contribuyen a modular la naturaleza de los efectos provocados.

De acuerdo con la ruta de ingreso, el xenobiótico debe atravesar una serie de barreras que -en combinación con las propiedades particulares del compuesto- restringen o facilitan su entrada. El análisis de las modificaciones que ocurren, en relación con la vía de ingreso, ha permitido distinguir dos tipos de compuestos: aquellos que provocan el mismo efecto, independientemente de la ruta de entrada (directos); en comparación con los que presentan su principal pico de actividad cuando son biotransformados por el organismo (indirectos). La N-nitroso-dimetil-amina (DMN) es un ejemplo de los segundos. Cuando se administra por alimentación, el orden de la respuesta es muchas veces mayor que la que se obtiene si una dosis equivalente es inyectada en Drosophila. En contraste, se ha observado que el metil-metano-sulfonato (MMS), provoca el mismo orden de respuesta

en tratamientos por alimentación o por inyección en células germinales de moscas adultas (Vogel y Natarajan, 1979; Ramos, 1994).

Los resultados obtenidos en esta tesis no concuerdan con la actividad genotóxica característica de estos mutágenos de referencia. De acuerdo con los antecedentes, los compuestos seleccionados guardan la siguiente relación de genotoxicidad: DMN < MMS, razón por la cual se eligieron concentraciones más elevadas para el primero.

La comparación entre el número y tamaño de mancha indicaría en cuánto tiempo la DMN es bioactivada a un metabolito reactivo, y permitir comparar la potencia genotóxica de ambos compuestos en el sistema de mutación y recombinación somáticas (SMART). Teóricamente se esperaba una mayor inducción de manchas por el MMS, las cuales tendrían un tamaño ligeramente mayor (ya que la actividad del mutágeno es independiente del metabolismo) a las inducidas por la DMN. Sin embargo, los datos obtenidos indican que aparentemente ninguno de los compuestos resultó genotóxico para el sistema utilizado. Tal conclusión no puede ser considerada como real debido a la gran cantidad de evidencias experimentales acerca de la actividad genotóxica de la DMN y el MMS (Tablas II y III).

La administración de los compuestos por medio de la inyección mostró serias desventajas como: la baja viabilidad obtenida (<60%); la interferencia de la metamorfosis en la viabilidad, ya que en aquellas larvas cercanas a esta etapa el efecto del tratamiento resultó letal; el fotoperiodo, el cual se ha reportado que en

diversas líneas mutantes de Drosophila provoca alteraciones en la fertilidad, duración del ciclo de vida y viabilidad, entre otros (Sankaranarayanan y Ferro, 1985). Otro aspecto que fue necesario confirmar fue si las larvas estaban siendo tratadas adecuadamente, es decir, que todas fueran inyectadas en igual forma y que al momento de retirar la jeringa, el compuesto fuera expulsado también. Lo anterior fue probado mediante el uso de un colorante (en experimentos paralelos) que indicaba la presencia del líquido inyectado, aún después de haber retirado la jeringa y varias horas después, por lo que no puede adjudicarse a la ausencia del compuesto la falta de respuesta obtenida.

Al considerar que la DMN es un promutágeno, se tomó en cuenta la posibilidad de que la falta de respuesta estuviera relacionada con la ruta de administración seleccionada en la cual se excluye la participación de ciertos tejidos que probablemente participan en la biotransformación y, en consecuencia, mediante la activación metabólica no se llegaría a formar la molécula final que posee actividad para actuar en el sitio blanco y provocar el daño. Sin embargo, lo anterior no puede explicar lo ocurrido con el MMS que no requiere bioactivación. Lo que no excluye la posibilidad de que aunque el MMS no requiere de activación metabólica, podría ser bloqueado, esto, sin embargo, no puede probarse mediante la técnica utilizada.

Durante las actividades experimentales se observó que el largo período que se requería para tratar a los organismos, provocaba una respuesta de estrés, la cual es inducida por compuestos altamente

tóxicos de dos formas principalmente: inducción temprana de pupación y pupación sobre el medio de cultivo (normalmente ésta se lleva al cabo sobre la pared del frasco, en las zonas superiores con menor humedad). Además de estas observaciones se encontró que conforme se incrementaba la concentración de los compuestos, la sobrevivencia de las larvas se reducía, muchas morían sin subir a la pared del frasco, y mostraban evidencias inequívocas del efecto tóxico provocado por los compuestos. El efecto de la toxicidad se puede observar en la figura 13. Conforme se incrementan las concentraciones la forma de la curva del tamaño de clase clonal vs. la concentración, la curva se vuelve errática aunque ninguna de las variaciones es significativa en relación con el valor del testigo. La frecuencia de manchas tampoco fue diferente a la del testigo, a excepción del tratamiento con 2.5 mM de DMN. En relación con el tamaño promedio de clase clonal (Tabla V y VI), éste no se incrementó en ninguna de las concentraciones lo cual podría estar indicando que aparentemente los compuestos no alcanzaron el blanco (DNA), debido a que de haber llegado a interactuar, aunque el tamaño promedio de la clase clonal no hubiese sido afectado, la frecuencia de manchas totales sí se incrementaría. No hubo respuesta en ninguno de los dos parámetros estudiados, por lo que se consideró que el probable estado de estrés pudo haber provocado: 1) que la capacidad de desintoxicación de genotóxicos se incrementara, haciendo más eficiente la eliminación de los compuestos (Zijlstra y Vogel, 1987), lo que de haber ocurrido no habría evitado que alguna fracción de células fuese afectada; 2)

que la inducción de proteínas de estrés provocara además, alteraciones en el paso de compuestos hacia el interior de la célula, impidiendo la entrada de la DMN y del MMS, lo cual probablemente no puede ser excluido con este método; o, 3) que aquellas células que resultaran alteradas no fueran viables, suposición que se considera probable debido a que si el daño a la célula es considerable y la reparación no es eficiente, o no ocurre, puede presentarse retardo en el ciclo de división de ésta, o bien, resultar letal (Canavee y White, 1995).

La respuesta al estrés es considerada un mecanismo de defensa celular en el que participan moléculas denominadas "proteínas contra el estrés" (Heat Shock Proteins, hsp). Estas proteínas participan en procesos metabólicos esenciales, como es la síntesis y ensamblaje de otras proteínas celulares; al parecer también dirigen a moléculas que participan en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular.

Se ha considerado que la respuesta al estrés confiere a la célula un estado de alerta que, en ciertas condiciones, proporciona un sistema de protección ante otras situaciones de emergencia. Las evidencias obtenidas experimentalmente sugieren que las hsp protegen a las células ante condiciones de estrés y que, en relación con la forma en que son inducidas: 1) éstas responden a situaciones de emergencia, siendo su expresión extremadamente rápida e intensa; 2) responden a diversas temperaturas en los diferentes organismos, pero, en cada caso, la inducción por temperatura refleja las condiciones de estrés del organismo y 3) su

inducción esta correlacionada con la inducción de tolerancia a la temperatura extrema, en una amplia variedad de células y organismos (Parsell y Lindquist, 1993).

Hightower (1980) propuso una explicación sobre el desencadenamiento de la respuesta al estrés, diciendo que los agentes que inducían dicha respuesta eran desnaturalizantes proteínicos, es decir, agentes que alteraban la conformación normal de las proteínas, por lo tanto, si estas proteínas desnaturalizadas o con una conformación anormal se acumulaban en el espacio intracelular desencadenarían tal respuesta (Welch, 1993).

● En Drosophila, Welch (1993) reportó respuesta al estrés al someter organismos a un choque térmico, detectando una elevación en la concentración de ciertas proteínas. Simultáneo a esto se detectaron engrosamientos correspondientes a sitios del ADN donde se producían nuevos ARN mensajeros específicos, que llevan la información genética para sintetizar las proteínas de choque térmico. Las proteínas anti-estrés (hsp70) en bacterias, levaduras y Drosophila se parecen en más del 50 %, lo cual permite suponer que se han conservado en el curso de la evolución y cumplen la misma e importante función en todos los organismos (Welch, 1993).

Con base en las condiciones bajo las cuales las proteínas anti-estrés son inducidas se clasificaron en dos tipos: 1) aquellas que se expresan en células bajo condiciones normales y 2) las que se expresan cuando la célula se encuentra sometida a estrés (Welch, 1993). Pelham y Munro (1986), han sugerido que la hsp70, una de las proteínas de estrés que se expresan de manera generalizada, podía

reconocer proteínas intracelulares desnaturalizadas y devolverles su conformación correcta, biológicamente activa. La familia de hsp70 comparte una serie de características como son: 1) afinidad por el ATP, 2) son constitutivas, es decir, se expresan tanto en condiciones normales como alteradas y 3) participan en los procesos de maduración de otras proteínas celulares. En células que no están sometidas a estrés la interacción entre los miembros de la familia hsp70 es transitoria y dependiente del ATP. Por el contrario, en células bajo estrés, las proteínas permanecen unidas a una hsp70 "acompañante" (Welch, 1993).

Se ha reportado que en E coli, la inducción de proteínas le confiere termotolerancia y termoresistencia a otros contaminantes como metales pesados (Imlay y Linn, 1988). Resulta interesante estudiar con mayor detalle la respuesta inducida por la inyección en la larva de Drosophila con el fin de caracterizar la aparente resistencia inducida ante los compuestos alquilantes DMN y MMS.

En este trabajo no fue posible estudiar el tiempo de acción de los dos compuestos alquilantes debido a que la forma de administración resultó demasiado dañina para la larva de la mosca. Se encontraron evidencias de la inducción de una respuesta al estrés, la cual se estudiará con el fin de caracterizarla.

## VI. REFERENCIAS.

- Albert L (1988) *Toxicología*, Limusa. México. 308 p.
- Ames B, W Durston, E Yamasaki y F Lee (1973) Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70(80): 2281-2285.
- Ames B (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens, *Science* 221: 1256-1264.
- Ayala JF y Kiger AJ (1984) *Genética Moderna*, Barcelona, 836 pp.
- Brusick EW, (1987) *Principles of genetic Toxicology*, 2a. ed. Plenum Press Nueva York, 204 pp.
- Canavee WK y RL White (1995) The Genetic Basis of Cancer, *Scientific American*, 272:50-57.
- Cassaret LJ y MDJ Doull (1975) *Toxicology of the poisons*, The basic science. Macmillan Publishing co., Inc. New York, USA.
- Chandley AC y JA Bateman (1962) Timing of spermatogenesis in Drosophila melanogaster using triatiated thymidine, *Nature*, 20:299-300
- Crick FC y PA Lawrence (1975) Compartments and Polyclones in In sect Development, *Science*, vol. 189.
- Delgado RA (1990) **Daño genético inducido por mutágenos positivos en células del ala de Drosophila melanogaster**. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. 75 pp.
- Demerec M (1965) *Biology of Drosophila*, Hafner Publishing company. Nueva York. 633 pp.
- Fahmy y Fahmy (1961) En: Vogel E. y A Natarajan (1979) The relatio between reaction kinetic and mutagenic action of monofunctional alkilating agents in eukaryotic systems. II. Total and partial sex chrmosome loss in Drosophila, *Mutation Res.* 62: 101-123.
- Frei H y FE Würgler (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from Drosophila assays indicate a positive, negative or inconclusive result, *Mutation Res.* 203: 297-308.
- García-Bellido A y JR Merriam (1971) Parameters of the wing imaginal disc development of Drosophila melanogaster, *Development Biology*, 24:61-87.

- García-Bellido A y J Dapena (1974) Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in Drosophila melanogaster, Molecular Genetics, 128:117-130.
- Gardner EJ (1988) **Principios de genética**, Ed. Limusa. México. 551 pp.
- Goodman GA, WT Rall, SA Nies y P Taylor (1990) **The pharmacological basis of therapeutics**. Panamericana, Octava edición. 1811 p.
- Graf UF, A Würgler, H Katz , H Frei, C Juon, C Hall y P Kale (1984) Somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster, Environ. Mutagen. 6: 153-188.
- Graf UF (1995) Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster, Experientia 51:68-173.
- Hellman K (1972) Anticancer drugs, Chem. Brit. 8: 69-72.
- Hightower LE (1980), En: Welch JW (1993) Respuesta de las células al estrés, Investigación y Ciencia, No. 202:22-29.
- Horsfall JM, JE Gordon, AP Burns, M Zielenska, GME van der Vliet y BW Glickman (1990) Mutational specificity of alkylating agents and the influence of DNA repair, Env. and Molec. Mutag. 15:107-122.
- Imlay JA y S Linn (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity, Science 240: 1302-1309.
- Index Merck (1989) **An Encilopedia of chemicals, drugs and biologicals**, 11a. ed, Rahway NJ EUA.
- Kilbey BL, JD MacDonald, C Auerbach, SF Sobels y WE Vogel (1981) The use of Drosophila melanogaster in test for environmental mutagens, Mutation Res. 85:141-146.
- Lee WR, S Abrahamson, R Valencia ES von Halle, FE Würgler y S Zimmering (1983) The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in Drosophila melanogaster, Mutation Res. 123:183-279.
- Lim y Snyder (1969) En: Vogel E. y A Natarajan (1979) The relatio between reaction kinetic and mutagenic action of monofunctional alkilating agents in eukaryotic systems. II. Total and partial sex chrmosome loss in Drosophila, Mutation Res. 62: 101-123.

- Lim y Snyder (1974) En: Vogel E. y A Natarajan (1979) The relation between reaction kinetic and mutagenic action of monofunctional alkylating agents in eukaryotic systems. II. Total and partial sex chromosome loss in Drosophila, Mutation Res. 62: 101-123.
- Lindsley DL y R Grell (1968) Genetics variations of Drosophila melanogaster, Carnegie Institution of Washington Publication, Washington, 472 p.
- Lindsley DL y GG Zimmering (1985) The genome of Drosophila melanogaster, Part I: genes a-k. Dros. Inf. Ser 62. 121.
- Lippmann Ph D (1992) Environmental toxicants Human Exposures and their Health Effects, Van Nostrand reinhold. Nueva York. 699 pp.
- Liu y Lim (1975) En: Vogel E. y A Natarajan (1979) The relation between reaction kinetic and mutagenic action of monofunctional alkylating agents in eukaryotic systems. II. Total and partial sex chromosome loss in Drosophila, Mutation Res. 62: 101-123.
- Maldonado LJ (1994) Comparación entre la estructura química y la actividad mutagénica de cinco compuestos orgánicos en células del ala de Drosophila melanogaster. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. 60 pp.
- Margison GP y PJ O'Connor (1979) Nucleic acid modification by N-Nitroso compounds, En: Chemical carcinogens and DNA (P.L. Grover, Ed) CRC Press, Boca raton (Florida), Vol. I, 111-160.
- Markert y Ursprung (1973) Genética del Desarrollo, Uteha, México, 225 pp.
- Mathews CK y KE van Hold (1990) Biochemistry, Benjamin/cummings. USA. 1129 pp.
- Morata G y PA Lawrence (1975) Control of compartment development by the engrailed gene in Drosophila, Nature, Vol. 255:614-617.
- Morata G y PA Lawrence (1977) Homoeotic genes, compartments and cell determination in Drosophila, Nature, Vol. 265: 211-216.
- Moutschen J (1985) Introduction to genetic toxicology, John Wiley & Sons. Nueva York. 184 pp.
- Nöthinger R (1970) Sucrose density separation: a method for collecting large numbers of Drosophila larvae, Dros. Inf. Ser. 45:177.
- Ordaz TMG (1991) Valoración de la prueba de detección de mutación

y recombinación somática (SMART) en las células del ojo de Drosophila melanogaster. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. 96 pp.

- Organización Mundial de la Salud (1980) Criterios de salud ambiental 6. Principios y métodos par evaluar la toxicidad de las sustancias químicas. Parte I. Organización Mundial de la salud, Organización Panamericana de la Salud. México. 287 pp.
- Parsell AD y S Lindquist (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins, *Annu. Rev. Genet.* 27: 437-496.
- Pelhamn HRB y S Munro (1986), En: Welch JW (1993) Respuesta de las células al estrés, *Investigación y Ciencia*, No. 202:22-29.
- Ramos MP, TMG Ordaz y AR Rodríguez (1990a) Determinación de la sensibilidad de la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en células del ojo de Drosophila melanogaster. En memorias de la I reunión Nacional de investigación de la Sociedad Mexicana de Genética, La Trinidad Tlaxcala, México.
- Ramos MP, RA Delgado y AR Rodríguez (1990b) Calibración de la prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en células del ala de Drosophila melanogaster. En memorias de la I reunión Nacional de investigación de la Sociedad Mexicana de Genética, La Trinidad Tlaxcala, México.
- Ramos MP (1994) Efectos Genotóxicos de algunas sales de arsénico en Drosophila melanogaster. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. 142 pp.
- Salceda VM (1984) Genética de Drosophila, Técnicas de Laboratorio, Limusa, México. 97 p.
- Sankaranarayanan K y W Ferro (1985) Studies on mutagen-sensitive and developmental toxicity of metals, En: *Handbook on the Toxicology of Metals*. I. General Aspects, Friberg L, GF Nordberg y VB Vouk Eds., Elsevier, 2a. ed., Amsterdam, pp. 391-392, 395-396, 401, 403, 414-417, 422-423.
- Szabad J, I Soós, G Polgár y G Héjja (1983) Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the Drosophila mosaic and the sex-linked recessive lethal test, *Mutation Res.* 113: 117-133.
- Timbrell JA (1989) *Introduction to toxicology*, Taylor & Francis Ltd. USA. 155 pp.
- Valencia RS, WR Abrahamson, ES Lee, RC Von Halle, FE Woodruff, F Würger y S Zimmering (1984) Chromosome mutation test (SCIT)

for mutagenesis in Drosophila melanogaster, Mutation Res, 134:61-88.

- Vega S (1985) Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales, Toxicología IV, Carcinogénesis química, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud. 10:1-47
- Vega LL, AC Yaschine, GAU González, MA Levi, ME Galicia, HE Aguirre, TMG Ordaz y MP Ramos (1990) Obtención de la curva de respuesta inducida por distintas concentraciones de DMN en células del ojo de Drosophila melanogaster. En memorias de la I reunión Nacional de investigación de la Sociedad Mexicana de Genética, La Trinidad Tlaxcala, México.1
- Vogel EW (1975) Some aspect on the detection of potencial mutagens in Drosophila, Mutation Res, 29:241-250.
- Vogel EW y A Natarajan (1979) The relatio between reaction kinetic and mutagenic action of monofunctional alkilating agents in eukaryotic systems. II. Total and partial sex chrmosome loss in Drosophila, Mutation Res. 62: 101-123.
- Vogel EW y A Szakmáry (1990) Basic principles and evaluation of results of assays masuring genotoxic damage in somatic cells of Drosophila, Mutation and the Environment, Part B, Wiley-Liss, Inc., pp. 149-158.
- Vogel EW (1991) Genotoxic chemicals an introduction into the basic principles of genetic toxicology, Laboratorium voor Stralengenetica en Chemische Mutagenese, Ru Leiden, Sylvius Laboratoria. 66 pp.
- Welch JW (1993) Respuesta de las células al estrés, Investigación y Ciencia, No. 202:22-29.
- Würgler F, F Sobels, y EW Vogel (1986) Drosophila as an assay system for detecting genetic changes. En: Handbook of mutagenecity test procedures. Elsevier/North Holland, Amsterda. 555-601 pp.
- Zijlstra JA (1984) Bioactivation and inactivation of mutagens in Drosophila melanogaster, Mutation Res, 130:276-322.
- Zijlstra J y EW Vogel (1988) Influence of inhibition of the metabolic activation on the mutagenicity of some nitrosamines, trizenes and seniciphylline, Mutation Res. 202: 251-267
- Zijlstra J y EW Vogel (1988) Metabolic inactivation of mutagens in Drosophila melanogaster, Mutation Res. 198: 73-83.

- Zimmering S (1976) Selected methodologies for mutagenecity testing in Drosophila melanogaster, Brown University. pp. 1-26.