

00346 9  
24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**COMPARACIÓN DEL POTENCIAL  
ANEUPLOIDÓGENO DE COMPUESTOS  
CITOSTÁTICOS EN CÉLULAS DE LAS ALAS  
DE *Drosophila melanogaster***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS  
(BIOLOGÍA CELULAR)**

P R E S E N T A

**BIÓL. ADRIANA MUÑOZ HERNÁNDEZ**

Directora de Tesis: Dra. Patricia Ramos Morales.

MÉXICO, D. F.

1997

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

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

**"THEODOSIUS DOBZHANSKY"**

**DE LA FACULTAD DE CIENCIAS,**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**CON EL APOYO DE EL CONSEJO NACIONAL DE**

**CIENCIA Y TECNOLOGIA  
(CONACyT).**

## **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:**

<b>Dra.</b>	<b>Rocio Vargas Sanders</b>
<b>Dr.</b>	<b>Mario Enrique Zurita Ortega</b>
<b>M. en C</b>	<b>Victor Manuel Valdés López</b>
<b>Dr.</b>	<b>Mario Agustín Altamirano Lozano</b>
<b>Dr.</b>	<b>Emilio Rojas del Castillo</b>
<b>Dra.</b>	<b>María Eugenia Gonsebatt Bonaparte</b>

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

**A mis compañeros de trabajo del laboratorio de Genética, en especial a Juan Carlos y Lupita por su valiosa amistad y consejos a lo largo de mi trayectoria académica.**

## **DEDICATORIAS**

**A mi madre, por darme la vida, su gran amor, apoyo y comprensión. Por ser mi mejor ejemplo y mi mejor amiga.**

**A mi hermano Moisés, por brindarme siempre su afecto y apoyo.**

**A Rogelio por brindarme siempre su apoyo y por ser un gran amigo.**

**A mis tíos, Lupero y Luis, por demostrarme siempre su cariño sincero, por compartir conmigo el logro de cada una de mis metas, por sus consejos desinteresados e incondicional apoyo.**

**A mi abuela Germa, por todo su cariño y por los grates recuerdos que guardo de ella.**

**A la familia Esquivel, por brindarme su cariño y amistad.**

**A Ramón, por compartir conmigo estos momentos tan importantes.**

**A mis compañeros: Angélica, Pablo y Raúl, por los momentos de estudio tan agradables que compartimos y por su valiosa amistad.**

**A José Luis Bortolini, por tu amistad incondicional, por todo el apoyo que siempre me has brindado y por ser un excelente compañero de trabajo.... Mil gracias.**

## ÍNDICE

I. RESUMEN .....	2
II. INTRODUCCIÓN .....	5
<u>Drosophila</u> como Sistema de Prueba .....	6
Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) .....	9
Microtúbulos y maquinaria celular .....	11
Objetivo .....	22
III. MATERIAL Y MÉTODO .....	22
Sistema de Cruza .....	22
Obtención de larvas .....	24
Compuestos químicos .....	25
Tratamiento .....	26
Fijación y elaboración de laminillas .....	27
Análisis estadístico .....	28
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
V. CONCLUSIONES .....	40
VI. REFERENCIAS .....	41
VII. TABLAS Y GRÁFICAS .....	53

## RESUMEN

Los estudios para determinar el impacto del ambiente en los seres vivos se han incrementado de manera relevante en los últimos años. Un avance importante ha sido caracterizar fuentes potenciales de daño, ya sea como producto de la actividad humana (fábricas e industrias, entre otras), como de origen natural (actividad ígnea, depósitos minerales, aguas subterráneas, productos tóxicos elaborados por animales y por plantas). Las consecuencias de esta exposición han sido estudiadas principalmente en las células germinales de diversos organismos, sin embargo con el tiempo se ha acumulado información del impacto del ambiente sobre las células somáticas, haciendo evidente la importancia de la detección y el estudio de este tipo de procesos sobre todo para el hombre.

La prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) se ha utilizado para valorar la inducción de mutaciones puntuales, deleciones, pérdida de cromosomas y recombinación en las células somáticas de la mosca. Además, el diseño genético de esta prueba posibilita cuantificar la contribución de la recombinación somática en la producción de alteraciones genéticas.

Se han aportado evidencias experimentales de la sensibilidad de la prueba ante diferente tipo de compuestos, sin embargo, existe controversia en relación con la capacidad del sistema para detectar el efecto de aneuploidógenos, por lo que, finalmente, el trabajo se enfocó al análisis de la respuesta ante la exposición a este grupo de compuestos.

El objetivo de este trabajo fue comparar el potencial aneuploidógeno de compuestos citostáticos con diferente mecanismo de acción en células de las alas de Drosophila melanogaster.

Los compuestos seleccionados fueron: vinblastina, colchicina y vincristina, comúnmente conocidos como alcaloides de Vinca e hidrato de cloral, compuesto que interfiere con el ensamblaje de subunidades de tubulina y/o actina. Larvas de tercer estadio fueron tratadas por alimentación con los compuestos a diferentes concentraciones.

Para los cuatro compuestos seleccionados se analizó la frecuencia de inducción de manchas chicas, grandes, gemelas y totales. Se comparó la frecuencia de manchas inducidas por los compuestos entre moscas libres de inversiones y moscas que presentan múltiples inversiones, lo cual permite descartar la participación de la recombinación mitótica. Además se analizó el incremento en la frecuencia de manchas, en relación con el número de ciclos de división que genera las manchas registradas después de los tratamientos con cada uno de los compuestos. En el caso de vinblastina y colchicina, se encontraron variaciones evidentes entre las moscas silvestres y las portadoras de múltiples inversiones, por lo que para analizar con mayor detalle la respuesta genotóxica dependiente del genotipo de la mosca se propuso obtener una curva del tiempo de exposición-efecto en larvas flr<sup>1</sup>/mwh y TM3, Ser/mwh tratadas con vinblastina y colchicina a una concentración de [0.125] mM, ya que en ésta las frecuencias de manchas obtenidas en ambos tipos de moscas fue similar.

De manera colateral se observó que los tratamientos interrumpidos con vinblastina y colchicina produjeron, además de la respuesta genotóxica diferencial, gran cantidad de malformaciones en cabeza, ojos, proboscis, tórax y abdomen en un número significativo.

Otro aspecto interesante es la mayor proporción de moscas portadoras de inversión que se recobraron en todos los tratamientos, lo cual se relaciona con la inducción de fenocopias debido al comportamiento de los compuestos. Para descartar la participación de fenocopias como la causa del incremento en el número de moscas portadoras de inversiones, se diseñó un sistema de cruce alternativo que permitiera identificar mediante el color del cuerpo a los organismos portadores de inversiones múltiples. Los resultados del análisis morfológico para el color del cuerpo indicaron que efectivamente se tiene inducción de fenocopias, lo cual se hizo evidente obteniendo moscas silvestres para el color del cuerpo y muescas en los bordes de las alas (atributo que correspondería solamente a moscas con cuerpo color ébano y alas

serrata).

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

1. Drosophila melanogaster sí es capaz de detectar aneuploidógenos y que estas sustancias son además fuertes teratógenos para la mosca.
2. En Drosophila la vinblastina mostró actividad mutagénica no dependiente de recombinación mitótica, la colchicina y la vincristina parecen tener una débil actividad mutagénica la cual además podría implicar la participación de recombinación y el hidrato de cloral mostró actividad recombinogénica dependiente de actividad clastogénica.
3. En Drosophila, un efecto asociado con la exposición de aneuploidógenos es la formación de una muesca en las alas.
4. La disminución en la progenie + fir<sup>2</sup>/mwh + a tiempos de exposición prolongados podría explicarse por la inducción de efectos teratógenicos.
5. El uso del marcador ebony permite discriminar entre la progenie portadora de inversiones múltiples y las fenocopias inducidas.
6. Los resultados obtenidos indican que en Drosophila melanogaster la presencia de inversiones múltiples no parece conferir ventaja ante la genotoxicidad de los compuestos probados.

## INTRODUCCIÓN

Los estudios para determinar el impacto del ambiente en los seres vivos se han incrementado de manera relevante en los últimos años. Un avance importante ha sido caracterizar fuentes potenciales de daño, ya sea como producto de la actividad humana (fábricas e industrias, entre otras), como de origen natural (actividad ígnea, depósitos minerales, aguas subterráneas, productos tóxicos elaborados por animales y por plantas). Las consecuencias de la exposición a diversos factores han sido estudiadas principalmente en las células germinales de diversos organismos, sin embargo con el tiempo se ha acumulado información del impacto del ambiente en las células somáticas, haciendo evidente la importancia de la detección y el estudio de este tipo de procesos sobre todo para el hombre, ya que muchos de ellos se relacionan con cáncer o la inducción de malformaciones. Entre los factores implicados en la producción de alteraciones congénitas, se incluye también a los contaminantes ambientales con capacidad mutagénica y teratogénica, además de otros cuya acción se manifiesta en infertilidad, aborto y muerte fetal, entre otros.

Un mutágeno es una sustancia que produce cambios genéticos heredables que se manifiestan en la descendencia de los organismos expuestos, mientras que un teratógeno actúa preferentemente durante la organogénesis, en las células de los tejidos en desarrollo, provocando alteraciones que se expresan como malformaciones congénitas las cuales, aunque no son heredables, alteran el desarrollo de los organismos, llegando incluso a ser letales (WHO, 1984).

Un producto químico puede interactuar y alterar el ADN dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas, así como de la intensidad, forma y duración de la exposición, la dote genética de los organismos, sexo, edad, hábitos, salud, preñez, exposición a múltiples factores y asociación con otras enfermedades, entre otros factores (Ames, et al, 1973, Clayson 1980 y Graf et al, 1984).

## Drosophila como sistema de prueba

El empleo de los diversos bioensayos se orienta hacia la determinación del riesgo potencial que implica la exposición a alguna sustancia en particular, y hacia la predicción de la asociación entre genotoxicidad, teratogenicidad y carcinogenicidad, involucrando el estudio de los posibles mecanismos de acción (De Serres, 1979; Vogel y Natarajan, 1979a y b; Todd et al., 1983; Würgler et al., 1983 y Brusick, 1988).

Para determinar el impacto genotóxico de diversos factores se han establecido metodologías experimentales o sistemas de prueba en los que se controlan los parámetros en los que ocurre la exposición, para definir la naturaleza del factor causal y establecer en qué situaciones la exposición a éstos conlleva riesgo para los organismos. Algunas características que se han señalado para un sistema de prueba ideal son: costo moderado, corta duración del ensayo, detección de un rango amplio de eventos genéticos, reproducibilidad en el efecto detectado, potencial de biotransformación mediada por el metabolismo, producción de prole numerosa que proporcione muestras representativas, entre otras (De Serres, 1979; Kilbey et al., 1981 y Valencia et al., 1984).

La mosca de la fruta Drosophila melanogaster, es un eucarionte con sólo cuatro pares de cromosomas y un ciclo de vida corto (10 días a 25° C) en el que produce prole numerosa (Fig. 1). Se requiere poco espacio para mantenerla y los efectos inducidos pueden determinarse tanto en sus células germinales como en las somáticas (Vogel y Sobels, 1976 y Schuler et al., 1982). Los compuestos pueden ser administrados por: alimentación, inyección e inhalación a larvas y adultos, y ducha vaginal a adultos. Además, es un sistema de prueba in vivo, lo cual representa otra ventaja adicional, ya que Drosophila es capaz de transformar metabólicamente a los compuestos de manera similar a la activación mediada por la fracción S9 del hígado de mamíferos, lo que posibilita estudiar promutágenos sin necesidad de previa activación

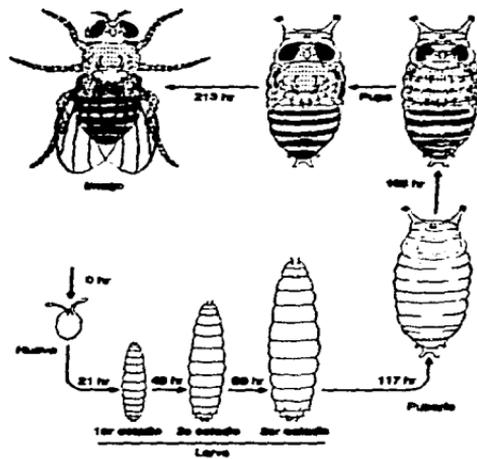


Figura 1 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* a 25 ± 1 C° (Tomado de Maldonado, 1984).

al metabolito reactivo (Baars, 1980; Hallstrom et al., 1982; Clark 1982 y Zijlstra y Vogel, 1988).

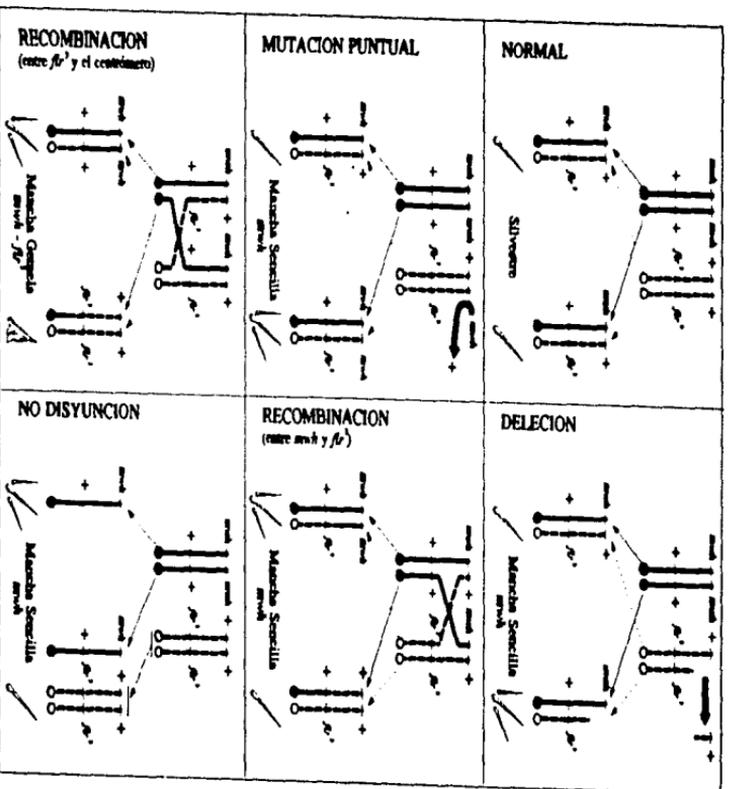
Entre las metodologías experimentales disponibles en Drosophila, la prueba de no-disyunción y pérdida de cromosomas sexuales (Sex chromosome loss Test, SCLT), se ha utilizado durante los últimos 20 años para cuantificar en células germinales el efecto de posibles genotóxicos. Mediante el análisis fenotípico de la progenie de organismos portadores de marcadores fenotípicos se distingue entre la inducción de no-disyunción y la pérdida parcial de cromosomas sexuales; además, el conocimiento de la gametogénesis de Drosophila permite discriminar el efecto de genotóxicos en células germinales con diferente grado de diferenciación, por ejemplo, entre células pre- y posmeióticas. Sin embargo, los resultados acumulados a través de los años han sugerido que Drosophila es poco sensible a la acción de los aneuploidógenos debido a dos factores principalmente. El primero, es que las hembras de Drosophila presentan un tipo de segregación de cromosomas que depende del apareamiento y la recombinación de los homólogos durante la meiosis, que se denomina quiasmática. Cuando en las hembras se sustituyen los cromosomas normales por otros portadores de numerosas inversiones se incrementa de manera importante la no-disyunción cromosómica como resultado de la ausencia de eventos de recombinación exitosos. El segundo argumento se asocia con las altas concentraciones utilizadas, por lo que se llegó a considerar que este organismo no resultaba sensible ya que se utilizaron concentraciones sumamente altas para obtener resultados (Zimmering, 1987).

En 1986, Foureman propuso otro ensayo para estudiar aneuploidia en Drosophila mediante el uso del marcador prune (pn: 1-0.8) que codifica para el color de los ojos. pn es autónomo en los discos imagales de los ojos y en las moscas recién emergidas produce ojos con una coloración café-rojizo-translúcido. Los ojos de los machos tienen aproximadamente 25% más de dropterina (pigmento rojo) que los ojos de los machos silvestres; en estas moscas, las concentraciones de xanthopterina y sepiapterina

(pigmento café) se incrementan arriba del 110% del de las moscas silvestres. El control de la síntesis de drosoterpina está relacionada con la actividad de la enzima GTP ciclohidrolasa (Lindsley y Zimm, 1992). Esta prueba permite detectar ganancias de cromosomas que resultan de la no-disyunción de los cromosomas sexuales en la primera o segunda división en machos; puede detectar intercambio de cromosomas X-Y y tiene un valor potencial ya que permite predecir la relativa sensibilidad de las dos divisiones meióticas a alteraciones en el número de cromosomas.

Otra metodología es la prueba de mutación y recombinación somáticas (Somatic Mutation and Recombination Test, SMART) (Graf et al, 1983). En esta prueba se utilizan células de los discos imagales de las alas que están determinadas genéticamente pero alcanzan la diferenciación hasta la metamorfosis. Mediante el uso de marcadores recesivos para los pelos o tricomas que se forman a partir de cada célula de las alas, puede observarse en el adulto la aparición de manchas con fenotipos mutantes en un contexto de tipo silvestre. Las manchas pueden ser simples (chicas o grandes) o gemelas. Las manchas simples se producen por mutación puntual, delección, recombinación y no disyunción, mientras que las gemelas se producen únicamente por recombinación entre el marcador proximal y el centrómero, el cual funciona como un tercer marcador (Fig. 2). El tamaño de la mancha es un estimador del tiempo que transcurrió entre la inducción de la alteración y la última división celular. De esta manera, las manchas chicas (de 1 a 2 células) se originan al final del desarrollo mientras que las manchas grandes (de más de 3 células) tienen un origen más temprano en el desarrollo.

El uso de cromosomas portadores de múltiples inversiones permite balancear arreglos genéticos y evita la actividad recombinogénica entre los homólogos. En esta metodología, la comparación de la frecuencia de manchas obtenidas entre moscas con arreglos silvestres y aquellas portadoras de cromosomas con inversiones múltiples permite distinguir la contribución de la recombinación en la frecuencia de manchas obtenida (Graf et al, 1984). También en esta prueba Drosophila ha mostrado ser sensible



**Figura 2** Eventos genéticos que detecta SMART  
(Modificado de Graf *et al.*, (1984).

a compuestos de naturaleza química diversa, sin embargo, no ha sido clara su sensibilidad para detectar el efecto de compuestos que alteran la maquinaria del huso mitótico.

#### **Microtúbulos y maquinaria celular.**

Los microtúbulos (MTs) están involucrados en una gran variedad de funciones celulares básicas y esenciales tales como segregación cromosómica, organización intracelular, transporte axonal, motilidad y determinación de la forma celular, entre otras. Todas estas funciones dependen de la capacidad de la tubulina -un componente mayoritario de los MTs, formada por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  - para polimerizar y despolimerizar (Avila, 1990).

La tubulina cuenta con dos sitios de unión al GTP, solo uno de ellos, el sitio E ubicado sobre la subunidad  $\beta$ , permite un libre intercambio con el nucleótido en solución. En el sitio E, el GTP es hidrolizado durante el ensamblaje.

En los MTs se pueden distinguir dos dominios: 1) las asociaciones longitudinales que llevan a la formación de protofilamentos, en los que las moléculas de tubulina están alineadas de acuerdo a su propio eje de longitud y 2) en el cilindro estos protofilamentos están asociados lateralmente dentro de las subunidades de la tubulina que están débilmente ancladas.

Existen proteínas que se unen a los MTs (Protein Associated Microtubules, MAPs). Cuando las MAPs están presentes en los MTs, se encuentran organizadas sobre la superficie de éstos formando una especie de látigos. Las moléculas de tubulina se encuentran arregladas con la misma polaridad cuando uno de los extremos tiene solo subunidades  $\alpha$  y/o subunidades  $\beta$  (Avila, 1990).

En 1968 y 1972 Weisenberg *et al.*, determinaron las características esenciales para las condiciones de polimerización:

- a. Se requiere GTP a concentraciones menores de 0.1 mM, el cual puede ser hidrolizado a GDP (que es acumulado) o reemplazado por análogos no hidrolizables.
- b. El GDP permanece firmemente unido en el polímero y todo el  $P_i$  es eliminado.

- c. El GDP por sí mismo es un fuerte inhibidor de la polimerización.
- d. Los MTs son sensibles al calcio.

A elevadas concentraciones, la tubulina pura puede ensamblarse en MTs, este efecto es revertido por la presencia de iones de calcio; además, las MAPs pueden ser reemplazadas por otros cofactores semejantes a policationes. En este proceso la densidad de carga es importante, si ésta es alta, una segunda capa de tubulina puede ser depositada alrededor de los MTs para formar los llamados MTs dúplex.

El proceso de disociación de los MTs puede ser medido, en condiciones donde el ensamblaje es completamente inhibido. Tales condiciones pueden ser obtenidas en diferentes formas, ej. por la rápida congelación a 4° C; por el rápido e irreversible consumo de GTP; usando enzimas; por la rápida asociación de tubulina no polimerizada a un inhibidor similar a la colchicina, la podofilotoxina, por iones de calcio; o simplemente por una dilución por debajo de la concentración crítica de tubulina (Avila, 1990).

El huso mitótico contiene la maquinaria responsable de la segregación de las cromátidas hermanas (Fig. 3). Está compuesto de un complejo y dinámico arreglo de microtúbulos (MTs), que están nucleados a partir de los polos del huso (Masuda H, 1995). El correcto ensamblaje y la función del huso mitótico durante la división celular son esenciales para asegurar que el genoma duplicado sea segregado a las células hijas (Fig. 4); en este proceso, la fosforilación de residuos está ampliamente implicada, así como varias proteínas cinasas y fosfatasa que regulan de igual forma estos procesos. En particular, mutaciones en el polo cinasa específico para serina-treonina en Drosophila y la cinasa Cdc5p en Saccharomyces cerevisiae, relacionadas estructuralmente, producen divisiones anormales tanto mitóticas como meióticas (Golsteyn et al., 1995).

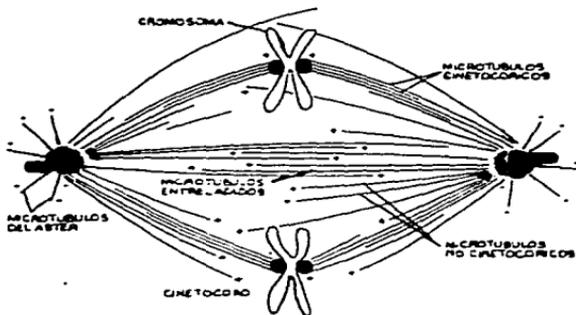


Fig. 3 Arreglo de los microtúbulos en el huso mitótico (McIntosh et al. 1985).

Se ha reportado que en Drosophila melanogaster, la gamma-tubulina es requerida para la estructura y la función de los centros organizadores de los microtúbulos (MTOCs). Esto se determinó mediante el estudio de un alelo mutante del gen de la gamma-tubulina localizado en la región 23C del brazo izquierdo (2L) del cromosoma 2. Esta mutación, denominada gamma-tub23CPI, es causada por la inserción de un elemento P en la cadena líder no traducida del transcrito de gamma-tubulina (Sunkel et al. 1995).

En Drosophila, mutaciones en la proteína KLP61F, del tipo de las cinesinas, producen alteraciones mitóticas que son letales para los organismos. KLP61F se expresa en la proliferación de los tejidos durante el desarrollo embrionario y larvario, teniendo un papel primario en la división celular. En ausencia de su función, los polos del huso no se separan, por lo que se forman husos mitóticos monopolares (Heck et al. 1993).

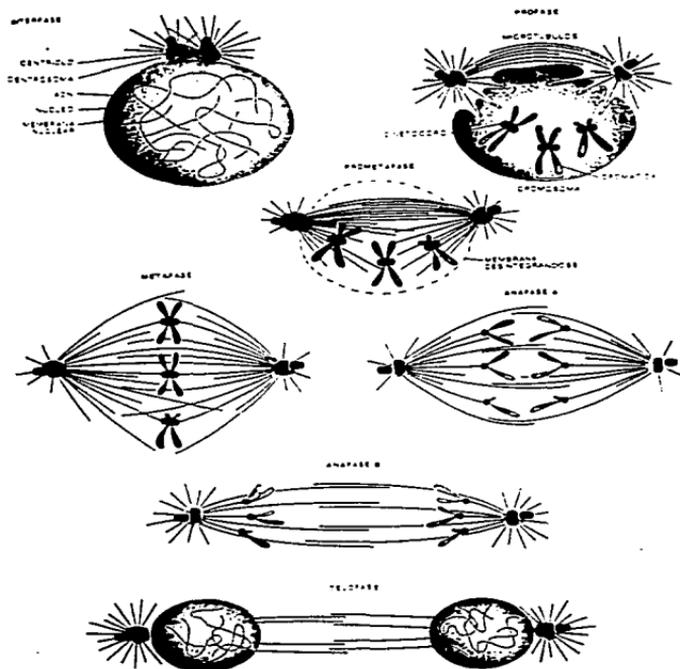


Fig. 4 Participación de los microtúbulos a lo largo del ciclo celular (McIntosh et al., 1985).

Al estudiar neuroblastos de Drosophila, González et al, (1991), determinaron que se requiere la presencia de un huso funcional para que se lleve al cabo la separación de las cromátidas hermanas en presencia de drogas despolimerizantes de los MTs tales como colchicina o un análogo reversible como el 2-methoxi-5-(2,3,4-trimethoxifenil)-2,4,6-cicloheptatrien-1-ona (MTC), la incubación de neuroblastos en colchicina provoca el bloqueo irreversible de las células en metafase, pero aunque la exposición de neuroblastos a MTC también causó arresto en la metafase, después de la reversión muchas de las células entraron a anafase y completaron la separación de cromátidas hermanas. Los mismos autores analizaron el efecto de regiones extra de heterocromatina y sugirieron que ésta tiene una función importante durante el apareamiento y la subsecuente separación de los cromosomas ya que durante la anafase temprana, los cromosomas que portaban heterocromatina extra separaron primero la región centromérica y después las regiones con heterocromatina extra.

Muchas otras moléculas como los análogos de la colchicina, los alcaloides de Vinca, las podofilotoxinas y el nocodazole entre otras funcionan como inhibidores que se unen específicamente a la tubulina impidiendo la correcta formación de MTs (Margolis y Wilson, 1977; Saltarelli y Pantaloni, 1983), mientras que otros como el taxol estabilizan con alta afinidad el ensamblaje de los microtúbulos (Schiff et al, 1979).

Se han modificado químicamente residuos de tubulina para determinar los aminoácidos centrales implicados en la unión de drogas o GTP a la tubulina o para analizar la capacidad de polimerización, pero en pocos casos se ha establecido de manera exacta él o los aminoácidos involucrados en estas uniones. Los residuos de cisteína 239 y 354 podrían estar involucradas en el ensamblaje de tubulina y en la interacción de tubulina con colchicina; mientras que los residuos de cisteínas 12 y 201 ó 211 podrían estar implicados en la unión de vinblastina y maytasine a la molécula de tubulina, pero no en la unión de colchicina. La

metilación de residuos de lisina de la tubulina indican que el residuo 394 de la subunidad  $\alpha$ , es importante ya que su modificación inhibe completamente la polimerización de la tubulina. Este residuo de lisina es especialmente reactivo, posiblemente por la estrecha proximidad de la histidina 393, lo que podría incidir en la formación de un agrupamiento de residuos básicos en la  $\alpha$  hélice (Avila, 1990).

La colchicina fue el primer compuesto con el que se inició el estudio de la interacción de drogas con la tubulina. Se le obtiene a partir de Colchicum autumnale y Gloriosa superba (Avila, 1990). La colchicina se une con alta afinidad ( $K_d = 5 \mu M$ ) a un sitio en la tubulina e impide que ésta sea incorporada en los polímeros en formación. Se ha sugerido que este sitio se localiza en la subunidad  $\alpha^{50}$  o en las subunidades  $\alpha$  y de tubulina. La proteólisis de tubulina con tripsina, ha mostrado que el sitio de alta afinidad a colchicina se localiza entre los aminoácidos 339-390 de la subunidad  $\alpha$  (Serrano, 1985; Serrano et al., 1984; Avila, et al., 1987).

Mediante inhibición por colchicina del entrecruzamiento entre la cisteína 239 y 354 de la  $\alpha$ -tubulina, Little y Ludueña (1985) han sugerido que el sitio de unión de la colchicina podría estar localizado en la  $\alpha$ -tubulina. Sin embargo, Deinum y Lincoln (1986) usando resonancia paramagnética han propuesto que el sitio de unión de la colchicina no está cercano a los sitios de unión del GTP,  $Mg^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , ni a las cisteínas reactivas de la  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina y que el cambio conformacional de la tubulina inducido por la colchicina es lo que impide el entrecruzamiento de los residuos de cisteína.

Uppuluri et al. (1993) usaron la digestión con tripsina y quimiotripsina y la hidrólisis de tubulina para localizar los sitios que intervienen en la unión con la colchicina. Mediante la digestión triptíca localizaron una banda de 4 kDa que contiene dos péptidos, uno con los residuos 1-36 y el otro con los residuos 213-242 para la quimiotripsina y un péptido con los residuos 1-46 y 214-241 para la tripsina. Para identificar cuál de los péptidos contiene el marcaje se digirió la  $\alpha$ -tubulina con tripsina, lo que

reportó la aparición de un péptido N-terminal de 16 kDa y otro C-terminal de 35 kDa. Estos resultados mostraron que al menos dos sitios en la -tubulina están específicamente involucrados en la unión con colchicina y que la extensión de esta molécula abarca ambos sitios en el monómero de la tubulina.

Al estudiar la estructura química de la colchicina, Banerjee et al (1981) observaron que la unión de esta molécula a la tubulina consiste en un proceso lento, no-reversible y dependiente de la temperatura, contrario al proceso de unión de algunos de sus análogos como la colchiceína. Basándose en datos de disociación propusieron que el anillo B de la colchicina presenta tres subdominios que favorecen la interacción colchicina-tubulina.

Por sus efectos en el ciclo celular, la colchicina es considerada un compuesto citostático que junto con otros alcaloides diméricos obtenidos de Catharanthus roseus: vinblastina y vincristina (también llamados alcaloides de Vinca), son utilizados en la quimioterapia del cáncer por sus propiedades antimitóticas. Los derivados de C. roseus muestran diferente toxicidad y efectividad en retardar el crecimiento de tumores. Las funciones de los alcaloides de Catharanthus ha sido descrita a nivel celular, relacionándose principalmente con la inhibición tanto in vitro como in vivo de la función de los microtúbulos al impedir el ensamblaje de la tubulina y provocar el desensamblaje de los microtúbulos a concentraciones relativamente bajas; a concentraciones mayores, ocasionan desprendimiento de protofilamentos de las paredes de los MTs. Sin embargo, los alcaloides de Catharanthus pueden afectar además diferentes procesos celulares como la síntesis de ADN y ARN, la biosíntesis de lípidos, el metabolismo cíclico de nucleótidos, el metabolismo del glutatión y el transporte de calcio dependiente de calmodulina (Skoufias y Wilson, 1992).

En células cerebrales de bovinos in vitro, compuestos como vincristina, vinepidina, vinblastina y la vindesina (un nuevo derivado de la vinblastina) inhiben la adición de subunidades de tubulina y su ensamblaje en los extremos de los MTs. Jordan et al (1985), reportaron que estos derivados de Catharanthus presentan

una potencialidad semejante, pero difieren en la capacidad de inhibir el ensamblaje, siendo vinblastina y vindesina inhibidores más potentes de la proliferación celular que vincristina y vinepidina.

La vinblastina es una droga antimitótica que además de inhibir el ensamblaje induce la auto-asociación de tubulina en los arreglos superenrollados de los protofilamentos, suprimiendo la tasa de crecimiento y acortamiento de los MTs y reduciendo la frecuencia de transiciones del estado de crecimiento o pausa al estado de acortamiento, lo que se conoce como estado de catástrofe.

En células de ratón tratadas con vinblastina, la duración promedio de una pausa (estado de dinámica atenuada en el que el crecimiento o acortamiento podrían ser detectados) y el porcentaje de tiempo total consumido en pausa se incrementaron significativamente. Se ha reportado que una concentración de 32 mM de vinblastina reduce la actividad dinámica de los MTs hasta en un 75% (Kallio et al, 1995).

Dhamodharan et al (1995), mostraron que en células de ratón tratados in vivo, vinblastina se une cinéticamente a los extremos de los microtúbulos y que uno de sus efectos principales como droga quimioterapéutica es suprimir la dinámica de los MTs en el huso mitótico.

Singer et al (1989) observaron que al adicionar vinblastina (2-200  $\mu$ M) a MTs estabilizados in vitro, éstos pasaban a un estado de despolimerización formando protofilamentos en espiral y otras formas agregadas de la proteína de los MTs. Al utilizar concentraciones intermedias de vinblastina ( $> 2 < 200 \mu$ M) determinaron que este estado de despolimerización correlaciona con concentraciones altas e intermedias de la droga y que se debe a la unión estequiométrica de ésta a la tubulina a lo largo de la superficie de los MTs.

En células HeLa incubadas durante un ciclo celular con 2 mM de vinblastina, se encontró por microscopía electrónica que el bloqueo mitótico de las células se asocia con ligeras alteraciones de la estructura del huso que provocaron: a) bloqueo del ciclo celular en

un estado similar a la prometafase o metafase; b) no segregación de los cromosomas en la anafase; c) reducción significativa del número de MTs unidos a los cinetocoros; d) alteración de centrosomas; e) pérdida de la estrecha asociación de los centriolos madre e hijo; f) aparición de vesículas membranosas en la región centrosomal; g) centriolos alterados con MTs que atravesaban su interior; sin embargo, no hubo alteración en la estructura de los MTs ni de los cinetocoros inducida por la droga (Wendell et al., 1993).

La inhibición mitótica inducida por drogas que se unen a la tubulina ha sido atribuida a la despolimerización de los MTs, sin embargo, en células HeLa con MTs del huso polimerizados y no polimerizados, concentraciones bajas de vinblastina y vincristina siguen induciendo arresto mitótico. También en este tipo celular, Jordan et al. (1992) compararon la actividad de vinblastina, podofilotoxina y nocodazole a diferentes concentraciones. Estas drogas afectaron la dinámica de polimerización de los MTs in vitro y despolimerizaron los MTs en las células. Al examinar la organización del huso por microscopía de inmunofluorescencia y mediante un ensayo de inmuoadsorbancia cuantificaron la masa de los MTs, reportando aumento en la concentración de tubulina y propusieron que los cambios en la organización de los husos mitóticos se deben a efectos similares de las tres drogas, que provocan arresto mitótico, pero no necesariamente producen despolimerización neta de los MTs. Con podofilotoxina, el arresto mitótico estuvo acompañado de la despolimerización de los MTs. En contraste, con vinblastina y nocodazole, el arresto mitótico ocurrió en presencia de un complemento total de MTs del huso. Las tres drogas indujeron un rearrreglo de MTs casi idéntico, una incrementada organización aberrante de cromosomas metafásicos y fragmentación de centrosomas. Estos datos sugieren que estas drogas bloquean la mitosis principalmente al inhibir la dinámica de los MTs del huso, más que por la simple despolimerización de los mismos.

Otros estudios han revelado que la vinblastina y la vincristina: a) producen oligómeros de tubulina sin microtúbulos,

b) afectan de manera preferente los sitios de emisión de tubulina, c) a diferencia de la colchicina no inducen desplegamiento de la hélice anfipática en el extremo carboxilo terminal de la -tubulina, d) inhiben el plegamiento colchicina-tubulina sin provocar el desplazamiento de la misma, e) incrementan el rompimiento quimiotriptico de la -tubulina en sitios posteriores a la tirosina 281, f) incrementan la especificidad del fotomarcaje de la -tubulina con colchicina, y por último f) inhiben la hidrólisis de GTP estimulada por la misma. Estos efectos se deben a que comparten un sitio de unión en común a la tubulina localizado en la hélice de la -tubulina, la cual es alterada en presencia de colchicina (Sackett, 1995).

En ratones machos, la administración de altas concentraciones de vinblastina y vincristina daña de manera directa a las células de Sertoli al destruirse los MTs y las mitocondrias. La vincristina daña de manera específica el sistema acrosómico y los puentes citoplasmáticos de las espermátidas inmaduras, lo que produce esterilidad.

En general, se ha determinado que en mamíferos estos compuestos provocan retraso de los cromosomas durante la segregación en la meiosis, lo que se manifiesta como micronúcleos (Kallio et al., 1995), poliploidías y aberraciones (Leopardi et al., 1993).

Sieber et al. (1978) compararon los efectos teratogénicos y citogenéticos de tres derivados de plantas (maitansina, VP16-213 y VM-26) con los producidos por colchicina y vincristina en ratones hembra tratados antes de la gestación. En los resultados obtenidos no hubo correlación entre el efecto teratogénico y el citogenético de los cuatro compuestos, aunque en todos los casos se recobraron malformaciones craneanas en la progenie incluyendo exencefalia, hidrocefalia, anoftalmia y microtia, además de malformaciones esqueléticas.

Otro compuesto que ha sido asociado con el funcionamiento del huso es el hidrato de cloral, un metabolito del tricloroetileno que se emplea en la industria farmacéutica como medicamento sedativo.

Induce aneuploidías asociadas con retraso celular, hiperploidías, no disyunciones, hipoploidías y ha sido clasificado como un clastógeno S-dependiente (Vian et al., 1995). En estudios in vivo en ratones produce c-mitosis (Miller y Adler, 1989); se ha reportado que en células germinales de hembras en ratones, afecta la forma del huso mitótico, la citocinesis y la progresión del ciclo celular (Eichenlaub y Betzendahl, 1995), así como cambios cromosómicos estructurales y numéricos (Mailhes et al., 1993); hay reportes contradictorios con respecto a la inducción de micronúcleos (MN), habiendo resultados positivos (Leuschner y Leuschner, 1991; Adler et al., 1991; Bonatti et al., 1992; Lynch y Parry, 1993) y negativos (Russo et al., 1992); en mamíferos induce hiperploidías en espermatocitos (Russo et al., 1984), pero es negativo en oocitos (Mailhes et al., 1988). En levaduras y Aspergillus es positivo para la prueba de tubulina in vitro (Parry, 1993).

Zordan et al. (1994) reportaron que en larvas de Drosophila el hidrato de cloral tiene actividad recombinogénica.

En seres humanos, el hidrato de cloral y sus metabolitos, el tricloroetanol y el ácido tricloroacético se acumulan en el suero y se unen a proteínas. Los tres compiten por un sustrato, la albúmina. Onks et al. (1992), empleando el método de peroxidasa y diálisis investigaron si estos compuestos compiten con la bilirubina para unirse a la albúmina. Los resultados mostraron que el hidrato de cloral y el tricloroetanol no afectan la unión de bilirubina-albúmina, mientras que el ácido tricloroacético sí lo hace.

En células meióticas de ratón, Eichenlaub-Ritter et al., (1995) analizaron mediante métodos citogenéticos y de inmunofluorescencia los efectos del hidrato de cloral en oocitos maduros in vitro. El hidrato de cloral bloqueó la maduración de los oocitos durante la meiosis I de manera irreversible y dependiente de la concentración, observándose la presencia de cromosomas bivalentes; los husos meióticos presentaron un arreglo asimétrico y los polos mostraron un aspecto fusiforme; indujo retardo de los cromosomas durante la telofase I, inhibió la enlongación del huso durante la anafase B y

provocó desplazamiento del plano ecuatorial en la metafase I y II. Los oocitos fueron irreversiblemente arrestados antes de madurar o en presencia del hidrato de cloral 8 h antes de la primera y segunda división. Con estos datos concluyeron que el hidrato de cloral es un potente aneuploidógeno en células germinales de hembras, afectando la forma del huso, la citocinesis y la progresión del ciclo celular.

El objetivo de la presente tesis fué:

Comparar la actividad de diversos aneuploidógenos en células de las alas de Drosophila melanogaster.

Para analizar la sensibilidad y especificidad de Drosophila ante este tipo de compuestos, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1.1 Establecer el potencial aneuploidogénico de compuestos citostáticos con diferente mecanismo de acción en células de las alas de Drosophila melanogaster.
- 1.2 Clasificar a los compuestos probados en relación con su potencial genotóxico.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### Sistema de cruce

Cruza 1. Se emplearon dos líneas de Drosophila melanogaster: flr<sup>1</sup>/ln(3LR)TM3, r1 p<sup>1</sup> sep l(3)89Aa bx<sup>123</sup> e Bd<sup>2</sup> y mwh/mwh, de las cuales se obtuvieron hembras vírgenes y machos, respectivamente. El marcador autosómico recesivo (3.00) mwh modifica la forma del pelo o tricoma produciendo tricomas múltiples (más de 2) por célula, a diferencia del fenotipo silvestre en el que se produce un tricoma por célula. El marcador autosómico recesivo flr<sup>2</sup> (3.39) es letal en condición homocigótica, sin embargo es viable en mosaicos somáticos produciendo tricomas amorfos con expresividad variable que van desde una mancha quitinosa sobre la superficie del ala hasta un tricoma en forma de flama, de donde recibe su nombre. Para

balancear al marcador fir<sup>2</sup> se utiliza el cromosoma balanceador (TM3, Bd<sup>2</sup>) el cual porta numerosas inversiones que evitan recobrar productos de recombinación en las moscas portadoras y un marcador letal dominante, Serrata (Ser). Para una descripción más detallada de los marcadores consultar Lindsley y Zimm (1992).

De esta cruce se obtienen dos tipos de progenie en igual proporción: larvas libres de inversión (+ fir<sup>2</sup>/mwh +) y larvas portadoras de inversiones por la presencia del cromosoma balanceador TM3: (TM3, Bd<sup>2</sup>/mwh +), los dos tipos de progenie no son distinguibles en estado de larva, por lo que ambas son tratadas. Las moscas adultas se distinguen fenotípicamente por la forma de las alas: silvestre (libres de inversión) y Serrata (portadoras de inversiones) (Fig. 5).

Cruza 2. Hembras fir<sup>2</sup>/In(3LR)TM3, r<sup>1</sup> p<sup>2</sup> sep 1(3)89Aa bx<sup>226</sup> e Bd<sup>2</sup> y machos mwh e / mwh e. Se obtiene el mismo tipo de progenie que en

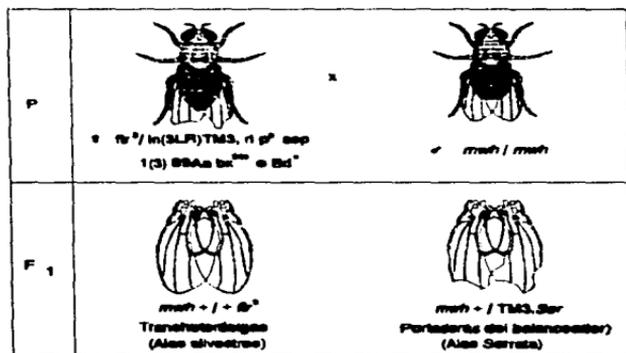


Figura 5 Cruza progenitora para SMART y fenotipos de las moscas que se obtienen en la F<sub>1</sub> (Tomado de Maldonado, 1994).

la cruce 1, pero el uso del marcador para color de cuerpo ébano (e) mejora la clasificación fenotípica de la progenie portadora de inversiones, ya que estas resultan homocigóticas para el marcador de color de cuerpo (Fig. 6).

#### Obtención de larvas

Tres días después de realizada la cruce, las moscas progenitoras se transfirieron a frascos con medio fresco para recolectar huevos durante un periodo de 8 h. 72 ± 4 h después, se procedió según Nöthinger (1970) a separar las larvas del medio de cultivo por flotación mediante una solución concentrada de sacarosa al 20%, se hizo pasara las larvas por un embudo de separación de 4 mm de diámetro y se recolectaron sobre una gasa fina de nylon. Con la ayuda de una espátula se colocaron grupos de 50 a 150 larvas en tubos homeopáticos que contenian medio de cultivo fresco adicionado

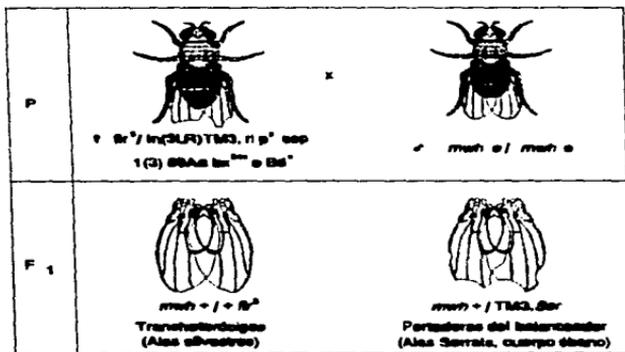


Fig. 6 Cruce progenitora diseñada en SMART para detectar fenocopias (Tomado de Maldonado, 1994).

con las diferentes concentraciones del compuesto a probar los que se agregaron después de la cocción y antes de que el medio solidificara.

### Compuestos

- Colchicina, agente, [CAS 64-86-8] (Index Merck, 1989). (Sigma, St. Louis MO) (Fig. 7)
- Hidrato de Cloral, [CAS 302-17-0] (Fig. 7)
- Sulfato de Vinblastina, [CAS 143-67-9], (Fig. 7) (Index Merck, 1989) (Aldrich, Milwaukee, WIS).
- Sulfato de Vincristina, [CAS 2068-78-2] (Index Merck, 1989) (Aldrich, Milwaukee, WIS). ( Fig. 7).

### Disolventes

Para colchicina e hidrato de cloral se utilizó agua destilada

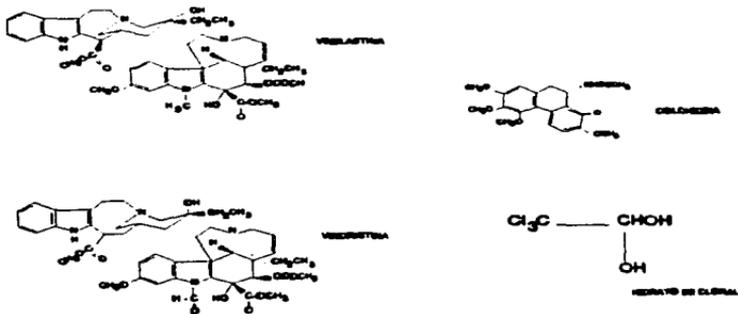


Figura 7 Estructura química de los compuestos utilizados.

como disolvente y también como testigo negativo.

Para el sulfato de vinblastina y sulfato de vincristina se utilizó como disolvente y testigo negativo una solución de alcohol etílico al 5%.

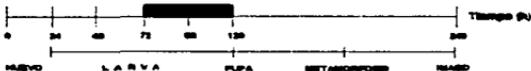
#### Tratamientos

Se utilizaron dos tipos de exposición:

1) Semicrónica. Larvas de 72 ± 4 h fueron alimentadas durante 48 h con medio de cultivo fresco adicionado con 0.032, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 mM de colchicina, vinblastina o hidrato de cloral, y 0.1, 0.3, 0.5 y 1.0 mM de vincristina respectivamente. Las larvas permanecieron en este medio hasta que entraron a metamorfosis y emergieron como moscas adultas (Fig. 8).

2) Interrumpida. Larvas de 72 ± 4 h en grupos de 50 - 150 se colocaron en 18 tubos homeopáticos que contenían medio de cultivo

Prototipo I: Exposición Semicrónica.



Medio de cultivo fresco (10 ml) con 0.1% de colchicina, 0.1% de vinblastina, 0.1% de vincristina, 0.1% de hidrato de cloral, 0.1% de etanol etílico al 5% y 0.1% de agua destilada.

Figura 8. Diseño experimental utilizado para la comparación del potencial antitumoral de compuestos clínicos en *Drosophila melanogaster*.

fresco (testigos) y medio de cultivo adicionado con colchicina o vinblastina [0.125 mM]. Cada 6 h se retiró un tubo con larvas testigo y uno con larvas tratadas, de manera que al final se tuvieran exposiciones de 6, 12, 18, 24 ... 48 h. Las larvas retiradas en cada intervalo de tratamiento se enjuagaron con agua corriente y se transfirieron a frascos con medio de cultivo fresco en los que concluyeron su desarrollo (Fig. 9).

**Procedo II: Exposición Interrumpida.**



- Tratamiento experimental con Vinblastina (disuelto en dimetil sulfoxido al 0.1%) o Colchicina (disuelta en agua dest.) al 1.125 mM.
- Comenzado de las larvas de 72 a 84 h. al proporcionar un sustrato con medio de cultivo.
- Transferencia de las larvas del medio de cultivo con Vinblastina o Colchicina al sustrato nuevo a intervalos de 6 h.

**Figura 9** Diseño experimental utilizado en la curva tiempo de exposición-efecto para la investigación del potencial antiproliferativo de vinblastina y colchicina en la *C. vicina* *mesasiatica*.

**Fijación y elaboración de laminillas**

Las moscas silvestres y las portadoras de inversiones se sacrificaron por exceso de anestesia y 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. 10). Las manchas se clasificaron según su tamaño en chicas (de 1 a 2 células) y grandes (> 2 células), y por su fenotipo en manchas simples mwh, manchas simples flr' y manchas gemelas, formadas por células adyacentes con los dos fenotipos

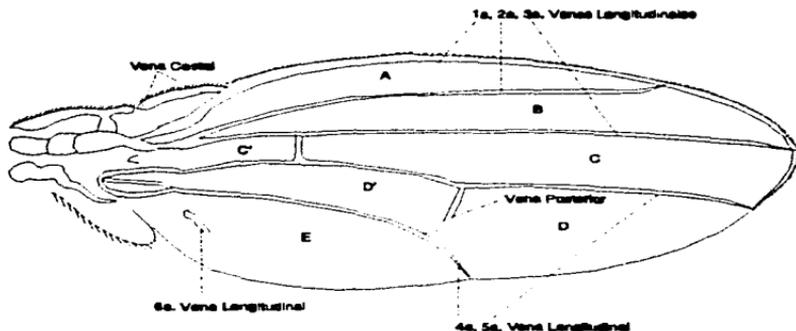


Figura 10 Zonas de registro de manchas en el ala de *Drosophila melanogaster* (Tomado de Maldonado, 1994).

indicados (Graf et al., 1984) (Fig. 11).

#### Análisis Estadístico

Para determinar si existían diferencias significativas entre la frecuencia de manchas obtenida en los tratamientos y la del lote testigo correspondiente se utilizó el procedimiento de decisión

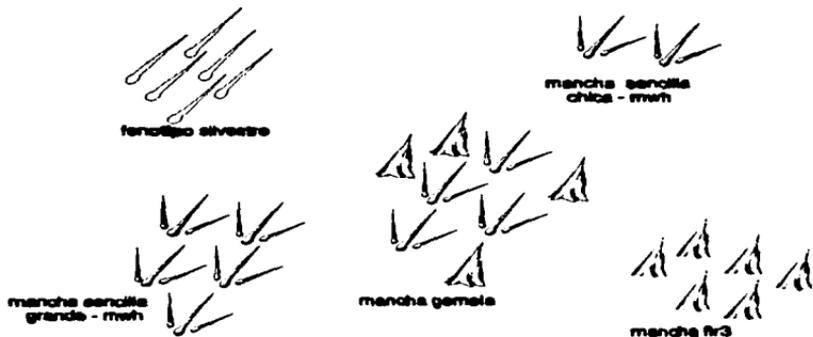


Figura 11 Tipos de manchas recobradas en la prueba de SMART.

múltiple propuesto por Frei y Würigler (1988), y el programa de cómputo SMART (Würigler, no publicado), ambos métodos se basan en la prueba no paramétrica de  $\chi^2$ .

Para evaluar la presencia de sobredispersión en la distribución del número de manchas por ala en las series experimentales y la testigo se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney-Wilcoxon (Zar, 1974). En ambos casos se utilizó un nivel de significación del ensayo  $\alpha = 0.05$ .

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para los cuatro compuestos seleccionados se analizó la frecuencia de inducción de manchas chicas, grandes, gemelas y totales. Para descartar la participación de la recombinación mitótica se comparó, además, la frecuencia de manchas inducidas por los compuestos entre moscas libres de inversiones y moscas

que presentan múltiples inversiones, lo que impide recobrar eventos de recombinación.

De manera cualitativa se observó que en todos los tratamientos realizados se recobraron menos moscas libres de inversión que portadoras del cromosoma balanceador (que se distinguen de las silvestres porque éstas presentan una muesca en el borde de las alas debido a la presencia del marcador dominante Serrata (Ser) en el cromosoma balanceador). Este comportamiento no es habitual ya que se espera que los dos tipos de progenie se obtengan en igual proporción, aunque por lo común la proporción de moscas libres de inversión es ligeramente mayor.

Vinblastina. La tabla 1 y gráficas 1a y 2a muestran los resultados obtenidos al comparar la frecuencia de manchas inducidas por vinblastina con respecto al testigo. En moscas libres de inversión, la vinblastina a 0.125 y 0.25 mM indujo manchas chicas, el efecto fue significativo incluso al sumar todos los tipos de manchas (manchas totales) ( $P < 0.05$ ). En moscas portadoras de inversiones múltiples la vinblastina indujo manchas simples chicas y totales a 0.032 mM, incrementó ligeramente la frecuencia de manchas simples chicas a 0.125 mM y de manera significativa la frecuencia de manchas simples grandes y totales a 0.125 y 0.25 mM.

Al comparar la dispersión en la distribución del número de células que forman cada mancha (gráficas 1b y 2b), se observó que tanto en moscas libres de inversión como en portadoras de inversiones múltiples, la vinblastina produjo manchas con un número de células claramente mayor a las observadas en las series testigo correspondientes. Este resultado revela que la vinblastina, además de ser un aneuploidógeno, tiene un efecto mutagénico que en apariencia es independiente de la recombinación ya que en las moscas portadoras del cromosoma balanceador TM3, Ser la recombinación está prácticamente ausente. Por otro lado, se asume que las células aneuploides tienen baja capacidad proliferativa, por lo que también se excluye a esta actividad como la causante de manchas de gran tamaño que implican el transcurso de varios ciclos de división (Dellarco et al., 1985).

Con respecto a la dispersión en la distribución del número de manchas por mosca (gráficas 1c y 2c) se observó que el número de moscas que presentaron más manchas que las moscas testigo se incrementó conforme a la concentración de vinblastina. En las moscas con inversiones el efecto fue similar y sólo en la concentración más alta se llegaron a recobrar hasta 7 manchas por mosca.

Colchicina. En moscas libres de inversión este compuesto indujo manchas simples chicas, siendo el efecto también significativo cuando se procedió a sumar los tres tipos de manchas en las concentraciones de 0.063, 0.125 y 2.0 mM (tabla II y gráficas 3a y 4a). En moscas portadoras de inversiones, la colchicina también indujo manchas simples chicas y totales a 0.032, 0.063, 0.25 y 0.5 mM ( $P < 0.05$ ). En la concentración más alta no se recobraron moscas portadoras de inversiones múltiples.

La comparación de la dispersión en la distribución del número de células por mancha mostró que en ambos tipos de mosca se observó claramente el efecto aneuploidogénico de la colchicina en el incremento en la frecuencia de manchas simples chicas, las cuales por su tamaño implican que no participaron en más ciclos de división. Adicionalmente, en las moscas libres de inversión se obtuvieron manchas de mayor tamaño que en las portadoras de inversiones, lo que concuerda con el potencial aneuploidogénico de la colchicina, sin embargo, los resultados sugieren un efecto mutagénico de la colchicina que podría implicar actividad recombinogénica en la producción de manchas de tamaño mayor a las de la serie testigo, ya que este efecto no se presentó en las moscas portadoras de inversiones (gráficas 3b y 4b). Es importante señalar que aunque en las moscas testigo libres de inversión se encontró una mancha en el intervalo de 129 a 256 células, el número de manchas formadas por más de 5 células en las series tratadas podría estar relacionado con la presencia de colchicina.

El número de manchas por mosca se modificó ligeramente en ambos tipos de moscas, siendo en apariencia más sensibles las portadoras de inversiones en las que se recobraron hasta 9

manchas por mosca (gráficas 3c y 4c).

Vincristina. Este compuesto incrementó la frecuencia de manchas simples chicas y la de manchas totales unicamente en las moscas libres de inversión tratadas con concentración más alta ( $P < 0.05$ ). En la concentración 0.1 mM para ambos tipos de moscas se observó esta misma tendencia, sin embargo, el incremento no alcanzó a ser significativo (Tabla III y gráficas 5a y 6a).

La distribución del número de células por mancha mostró que acorde con su genotipo, en las moscas libres de inversión el tamaño de mancha fue mayor que en las moscas portadoras de inversión, sin embargo, en las primeras se observaron manchas de 32 o más células también en el lote testigo por lo que no se puede adjudicar claramente el efecto a la administración de la vincristina (Gráficas 5b y 6b). El incremento en el número de manchas formadas por 1 ó 2 células fue notorio en los lotes de moscas portadoras del cromosoma balanceador tratados con 0.1 y 0.3 mM.

La distribución del número de manchas por mosca en las moscas libres de inversión cambió con respecto a las moscas del lote testigo ya que aunque el número de manchas se mantuvo similar (hasta 3 manchas por mosca), el número de organismos sin manchas disminuyó incrementándose la proporción de las que presentaron 2 o más manchas. En contraste, en las moscas portadoras de inversiones la presencia de la vincristina no modificó la distribución del número de manchas por mosca con respecto a su testigo correspondiente. Es interesante notar que también con este compuesto se observó al menos una mosca con hasta 5 manchas (Gráficas 5c y 6c).

Hidrato de cloral. Este compuesto fue particularmente interesante ya que incrementó, aunque no de manera significativa, la frecuencia de manchas sólo a 1.0 mM, sin embargo se observó una clara dispersión de la distribución del número de células por mancha en todas las concentraciones probadas aunque el número de manchas por mosca fue similar al de las moscas testigo, aunque se recobró una mosca con 12 manchas (Gráficas 7a-c). La presencia

de manchas de mayor tamaño indica que Drosophila sí fue sensible a la presencia de este compuesto y es muy probable que la respuesta dependa de recombinación mitótica, lo que concuerda con los hallazgos reportados por Zordan (1994) sobre la actividad recombinogénica del hidrato de cloral en este organismo. A su vez, la actividad recombinogénica podría resultar del efecto clastogénico encontrado por Vian et al (1995), más que por una actividad aneuploidogénica.

En las moscas portadoras del cromosoma balanceador el hidrato de cloral no incrementó de manera significativa la frecuencia de manchas aunque se observó una frecuencia ligeramente mayor a 2 mM. Por otra parte, la frecuencia de manchas a 0.25, 0.5 y 1 mM fue claramente menor a la de las moscas testigo. Estas fluctuaciones en la respuesta genotóxica que no guardan relación aparente con el incremento gradual en la concentración podrían adjudicarse a la participación del metabolismo en la biotransformación del hidrato de cloral a una forma reactiva (Onks et al, 1992) (Gráficas 8a-c). La distribución del número de células por mancha no mostró desviaciones relevantes con respecto a su testigo, no obstante la ausencia de manchas grandes en estas moscas refuerza la participación de la recombinación en respuesta a un posible efecto clastogénico observado en las moscas libres de inversión. Finalmente, la distribución del número de manchas por mosca fue similar a la del testigo correspondiente.

Por lo común las moscas no expuestas a genotóxicos no muestran manchas sobre sus alas, sin embargo, como en el resto de los seres vivos, ocasionalmente ocurren errores en procesos como la replicación del ADN. Aunque una parte de estos errores espontáneos son reparados, algunos permanecen contribuyendo a la denominada frecuencia basal de mutación. En el caso de la SMART, las manchas de las moscas de los lotes testigo y tratados pueden analizarse con respecto a su número, tamaño y origen, es decir, cuántas moscas de la muestra expuesta presentan estas manchas. Por lo común, el número de manchas por mosca es reducido, sin embargo, existen algunas moscas en las que parecen ocurrir estas alteraciones con mayor frecuencia que en otras. En los

tratamientos con los compuestos probados resultó evidente que la susceptibilidad de algunas de las moscas tratadas fue notoriamente diferente ante los diferentes aneuploidógenos. Siendo más acentuado el efecto en los tratamientos en los que la participación del metabolismo en la transformación química de los compuestos parece ser más importante, como se ha observado al comparar la distribución del número de manchas por mosca inducida por mutágenos y promutágenos en Drosophila (Ramos et al., 1996).

A partir de los resultados obtenidos puede proponerse una clasificación del tipo de efecto observado para los compuestos probados. La vinblastina mostró actividad mutagénica no dependiente de recombinación mitótica, mientras que la colchicina y la vincristina parecen tener una débil actividad mutagénica la cual además podría implicar la participación de recombinación y, finalmente el hidrato de cloral mostró actividad recombinogénica inducida por el efecto clastogénico. De estos compuestos, el efecto de los tres primeros ha sido relacionado con la interferencia en la polimerización y la despolimerización de las fibras del huso, mientras que en el caso del hidrato de cloral se ha señalado que interfiere con la citocinesis, aunque en realidad ha sido poco estudiado el detalle de su forma de acción. De los resultados obtenidos se desprende que este compuesto tiene una clara actividad recombinogénica lo que lo coloca como un carcinógeno potencial que debe ser estudiado con mayor detalle en sistemas de mamíferos ya que se ha determinado que los cambios en el arreglo de los genes puede traer como consecuencia la pérdida de control de éstos por las secuencias reguladoras (Buzard, 1996).

Obtención de la curva de tiempo de exposición-efecto para vinblastina y colchicina.

Con la finalidad de analizar con más detalle el efecto de dos de los aneuploidógenos: la vinblastina (probable actividad mutagénica no dependiente de recombinación mitótica) y colchicina (débil actividad mutagénica con posible participación de

recombinación mitótica) se procedió a obtener una curva del tiempo de exposición-efecto de estos compuestos, con lo que se esperaba obtener elementos adicionales que permitieran explicar la mayor proporción de moscas portadoras de inversión.

Se seleccionó la concentración de 0.125 mM que en los tratamientos subcrónicos mostró incrementar la frecuencia de manchas en ambos tipos de moscas, proficientes (libres de inversión) y deficientes (portadoras del cromosoma TM3, Scr) en reparación, cabe aclarar que aunque las moscas portadoras de inversiones no portan genes que interfieran con el proceso de recombinación, las múltiples inversiones mediante las que se construyen los cromosomas balanceadores evitan recobrar eventos de recombinación que pudieran producirse, tanto de manera espontánea como inducidos por el tratamiento, por lo que el efecto neto es la ausencia de recombinación. Otro aspecto interesante es que se ha determinado que en aquellos organismos en los que se interfiere con la recombinación meiótica se recobran niveles incrementados de no-disyunción, y que, al menos en células germinales de Drosophila, el reconocimiento de secuencias homólogas prelude una adecuada segregación de los cromosomas durante la formación de las células sexuales (Hawley et al., 1993). En células somáticas no se ha identificado la formación de una estructura que se relacione particularmente con el reconocimiento de homólogos, como es el complejo sinaptonémico en células sexuales, sin embargo, parece ser que la constitución genética de las moscas portadoras de inversiones múltiples interfiere de manera similar con el reconocimiento de homólogos y, en consecuencia con la adecuada segregación de éstos, lo que se manifiesta en general, por manchas formadas predominantemente por un número bajo de células, lo que apoyaría su baja capacidad proliferativa si es que ésta es el resultado de la segregación anormal de los cromosomas homólogos durante la mitosis.

Para este análisis, el protocolo consistió en exponer a larvas de tercer estadio a 0.125 mM de ambos compuestos por separado, la cual se incorporó en el alimento. Por intervalos de 6 h se fueron retirando las larvas, de manera que al final se tuvieran exposiciones de 6, 12, 18, 24, ... 48 h. Las larvas

retiradas en cada intervalo de tratamiento se transfirieron a frascos con medio de cultivo fresco y se esperó a que concluyeran su desarrollo.

Los resultados obtenidos en esta etapa mostraron varios aspectos interesantes:

En el tratamiento con vinblastina el número de moscas libres de inversión (con alas silvestres) se redujo conforme se incrementó el tiempo de exposición, de manera que a las 120 horas, sólo se recobraron 6 moscas silvestres. La frecuencia de manchas chicas se incrementó de manera significativa en las larvas expuestas durante 36 y 48 h al compuesto (larvas de 108 y 120 h de edad), mientras que la frecuencia de manchas totales se incrementó en las moscas tratadas durante 30 y 36 h (larvas de 102 y 108 h de edad) únicamente.

En este mismo tratamiento se recobró nuevamente una mayor proporción de moscas portadoras de inversiones (se distinguen por la muesca en el borde de las alas), aunque hacia el final de la exposición el número de moscas recobrado fue menor (6) (Tabla V y gráficas 9a y 10a). La frecuencia de manchas chicas se incrementó en las exposiciones de 12 a 24, 36 y 48 h (larvas de 84-96, 108 y 120 h de edad total); la frecuencia de manchas grandes se incrementó a las 12, 24, 36 y 42 h de exposición y la de manchas totales en todos los tiempos de exposición a partir de las primeras 12 h.

Con respecto a la distribución del número de células por mancha se observó dispersión en los diferentes tiempos de exposición aunque sin guardar relación con la duración de la exposición. Este efecto fue mucho más evidente en las moscas portadoras del cromosoma balanceador (Gráficas 9b y 10b). En relación con la distribución del número de manchas por mosca, la dispersión fue ligeramente mayor en las moscas portadoras de inversiones (Gráficas 9c y 10c).

En la curva obtenida para colchicina, se observó un comportamiento similar con respecto a una mayor proporción de moscas portadoras de muescas en las alas que de silvestres, llegando incluso a no recobrase progenie silvestre a partir de las 24 h de exposición (larvas de 96 h). A las 12 h de

tratamiento (larvas de 84 h) se incrementó la frecuencia de manchas chicas, sin embargo el resultado sólo fue significativo cuando se sumaron todas las manchas obtenidas en esta exposición ( $P < 0.05$ ).

En el mismo tratamiento, se observaron incrementos en las frecuencias de manchas chicas y totales a diferentes tiempos de exposición, sin embargo en ninguno de éstos el efecto resultó estadísticamente significativo (Tabla VI y Gráficas 11a y 12a). Al analizar la distribución del número de células por mancha se encontró una fuerte dispersión con respecto a la distribución testigo (larvas de 72 h de edad y 0 h de exposición), la cual resultó mucho mayor en las moscas portadoras de inversiones múltiples (Gráficas 11b y 2b). Lo mismo ocurrió en el caso de la distribución del número de machas por mosca (Gráficas 11c y 12c).

Los resultados obtenidos en la curva con vinblastina apoyan los reportados por Zordan (1994) para este compuesto en células somáticas de las alas de Drosophila, quien planteó la posibilidad de una respuesta diferencial a la genotoxicidad de este compuesto dependiente del genotipo de las moscas. Además, la respuesta obtenida en la curva con colchicina indican que el efecto observado no es producido únicamente por la vinblastina. Es probable entonces que la actividad genotóxica similar de ambos compuestos (venenos del huso) esté en relación con el efecto recobrado, por lo que sería importante obtener la curva de exposición-efecto para otros aneuploidógenos.

De manera colateral se observó que los tratamientos interrumpidos con vinblastina y colchicina produjeron, además de la respuesta genotóxica diferencial, gran cantidad de malformaciones en cabeza, ojos, proboscis, tórax y abdomen en un número significativo (los datos no se incluyeron porque se requiere un planteamiento metodológico particular para estimar adecuadamente la aparición de estos eventos y en este caso la metodología aplicada es válida sólo para cuantificar mutación y recombinación somáticas). El número de organismos afectados alcanzó un máximo alrededor de las 24-36 h de tratamiento y disminuyó en los tratamientos de 48 h, lo que sugiere que en los experimentos anteriores no se habían recobrado estos organismos

porque morían en la etapa de pupa, es decir, no completan su desarrollo (Tablas V y VI).

Estos datos confirman adicionalmente que Drosophila melanogaster sí es capaz de detectar aneuploidógenos y que estas sustancias son además fuertes teratógenos para la mosca.

La aparición de malformaciones se han descrito en asociación con el efecto de aneuploidógenos durante el desarrollo embrionario de mamíferos (Parry y Sors, 1993), por lo que los resultados del presente trabajo muestran que en Drosophila es probable que estos compuestos también alteren la diferenciación celular que ocurre durante la metamorfosis de este insecto.

Un aspecto que llama la atención es la mayor proporción de moscas portadoras de inversión que se recuperaron en todos los tratamientos. Es poco probable que un organismo en el que se ha alterado la capacidad de reconocimiento de homología y, en consecuencia, posiblemente la segregación adecuada de los homólogos tengan una mayor capacidad de respuesta ante la genotoxicidad de los compuestos probados, por lo que existe la posibilidad de que la disminución en el número recuperado de organismos silvestres, observada en los tratamientos previos (y en los reportados en la bibliografía) pudieran ser aparentes. Recientes reportes indican que en Drosophila, un efecto asociado con la exposición de aneuploidógenos es la formación de una muesca en las alas (atributo que convencionalmente permite distinguir a las moscas silvestres de las portadoras de múltiples inversiones ya que estas últimas presentan una muesca en el borde de las alas). Así, el mayor porcentaje de sobrevivencia de las moscas con inversiones podría ser un artefacto producto del efecto de este grupo de compuestos en el desarrollo de las moscas.

Para descartar la inducción de fenocopias y explicar la mayor sobrevivencia de organismos portadores de inversiones se decidió adicionalmente utilizar un sistema de cruce alternativo: hembras f1r'/In(3LR)TM3, r1 p<sup>+</sup> sep 1(3)89Ae bX<sup>12a</sup> e Bd<sup>+</sup> y machos mwh e / mwh e. De esta cruce se obtiene el mismo tipo de progenie que en la cruce estándar, pero el uso del marcador para color de cuerpo ebonny (e) en los machos mejora la clasificación fenotípica

de la progenie portadora de inversiones, ya que ahora, la presencia del marcador para color de cuerpo ébano se expresa sólo en las moscas portadoras del balanceador en las que estará en condición homocigótica, mientras que las moscas libres de inversión serán heterocigóticas y por lo tanto tendrán el color del cuerpo característico (pardo). De esta manera la progenie portadora del balanceador tendrá ahora la muesca característica en las alas y el color de cuerpo ébano.

Se realizó entonces un ensayo piloto en el que se obtuvo nuevamente la curva de tiempo de exposición-efecto para ambos compuestos utilizando la nueva cruz.

Los resultados del análisis morfológico para el color del cuerpo indicaron que efectivamente se tiene inducción de fenocopias, lo cual se hizo evidente obteniendo moscas silvestres para el color del cuerpo y muescas en los bordes de las alas (atributo que correspondería solamente a moscas con cuerpo color ébano y alas serrata).

En 1991, Lynch et al., proponen utilizar a Drosophila como modelo para evaluar teratógenos. Mediante la observación de organismos tratados con agentes inductores de malformaciones, cuantificaron las alteraciones morfológicas inducidas, las cuales consisten en modificación en la forma del ojo, de redondo a lobulado y de tamaño reducido; la presencia de cerdas tipo hent, alteración en la cual las cerdas humerales normalmente rectas y en número de 2, se doblan en un ángulo de 45 grados y puede aparecer 1 o 3 de éstas; abdomen abarquillado, alas tipo Notched, que provocan la formación de una muesca en el borde de las alas de manera similar a las producidas por el gen Serrata, alteraciones en el número de segmentos del cuerpo, ausencia de 1 o las 2 alas o los halteres y otras más, encontrando que la frecuencia de éstas se encuentra asociada con la concentración del teratógeno utilizada.

Los resultados de este estudio piloto sólo se revisaron de manera cualitativa, sin embargo, resulta evidente la necesidad de discriminar la proporción de fenocopias en los resultados reportados para compuestos con actividad aneuploidogénica, lo cual abre la posibilidad de utilizar a Drosophila formalmente en

el análisis del efecto in vivo de estos compuestos y otros que afectan la diferenciación celular.

#### CONCLUSIONES

1. Al comparar el potencial aneuploidógeno de compuestos citostáticos con diferente mecanismo de acción, se confirmó que Drosophila melanogaster sí es sensible al efecto de diversos compuestos citostáticos.
2. En Drosophila la vinblastina mostró actividad mutagénica no dependiente de recombinación mitótica, la colchicina y la vincristina parecen tener una débil actividad mutagénica la cual además podría implicar la participación de recombinación y el hidrato de cloral mostró actividad recombinogénica dependiente de actividad clastogénica.
3. En Drosophila, un efecto asociado con la exposición de aneuploidógenos es la formación de una muesca en las alas.
4. La disminución en la progenie + fir<sup>1</sup>/mwh + a tiempos de exposición prolongados podría explicarse por la inducción de efectos teratogénicos.
5. El uso del marcador ebony permite discriminar entre la progenie portadora de inversiones múltiples y las fenocopias inducidas.
6. Los resultados obtenidos indican que en Drosophila melanogaster la presencia de inversiones múltiples no parece conferir ventaja ante la genotoxicidad de los compuestos probados.

## REFERENCIAS

- Abraham RT; Acquarone M; Andersen A; Asensi A; Belle R; Berger F; Bergounioux C; Brunn G; Buquet-Fagot C; Fagot D et al (1995) Cellular effects of olomoucine, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. Biol Cell 83: 105-20.
- Ames B; W Durston; E Yamasaki y F Lee (1973) Carcinogens are mutagens: A simple test systema combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Nat., Acad. Sci. USA, 70(80): 2281-2285.
- Avila J (1990) Microtubule proteins. CRC Press, Inc. USA. 270 pp.
- Avila J; Serrano L and Maccioni RB (1987) Regulatory aspects of the colchicine interaction with tubulin. Mol Cell Biochem 73, 29.
- Baars A J; GH Blijleven; G Mohn; A T Natarajan y DD Brüner (1980) Preliminary studies on the ability of Drosophila melanogaster preparations to active mutagens and carcinogens. Mutation Res., 72: 257-264.
- Banerjee A; Barnes LD; Luduena RF (1987) The role of the B-ring of colchicine in the stability of the colchicine-tubulin complex. Biochim Biophys Acta 913: 138-44.
- Bendena WG; Garbe JC; Traverse KL; Lakhotia SC; Pardue ML (1989) Multiple inducers of the Drosophila heat shock locus 93D (hsr omega): inducer-specific patterns of the three transcripts. J Cell Biol 108: 2017-28.
- Brusick D (1988) Evolution of testing strategies for genetic toxicity. Mutation Res., 205: 69-78.
- Buzard SG (1996) Studies of oncogene activation and tumor suppressor gene inactivation in normal and neoplastic roden

tissue. Mutation Res., 365: 43-58.

Callaini G; Dallali R; Riparbelli MG (1989) Diazepam induces abnormal mitosis in the early Drosophila embryo. Biol Cell 67: 313-20.

Carmena M; Abad JP; Villasante A; González C (1993) The Drosophila melanogaster dodecasatellite sequence is closely linked to the centromere and can form connections between sister chromatids during mitosis. J Cell Sci 105 (Pt 1): 41-50.

Clark (1982) The use of larval stages of Drosophila in screening for some naturally occurring mutagens. Mutation Res., 2: 89-97.

Clayson D (1980) Comparison between in vitro and in vivo tests for carcinogenicity. Mutation Res., 75: 205-213.

De Serres FJ (1979) Evaluation of test for mutagenicity as indicators of environmental mutagens and carcinogens. Am. N. Y. Acad. Sci. 74-84.

Deinum J and Lincoln P (1986) Binding to tubulin of an alkylcolchicine spin probe: interaction with the essential SH groups and other active sites. Biochem Biophys Acta 870, 226.

Dellarco VL; PE Voytek y Hollaender A (Eds) Aneuploidy: Etiology and mechanisms, Basic Life Sciences, Vol. 6, Plenum, New York, pp. 279-289.

Dhamodharan R; Jordan MA; Thrower D; Wilson L; Wadsworth P (1995) Vinblastine suppresses dynamics of individual microtubules in living interphase cells. Mol Biol Cell 6: 1215-29.

Downes CS; Clarke DJ; Mullinger AM; Gimenez-Abian JF; Creighton

- AM; Johnson RT (1994) A topoisomerase II-dependent G2 cycle checkpoint in mammalian cells. Nature 372: 467-70.
- Eichenlaub-Ritter U; Betzendahl I (1995) Chloral hydrate induced spindle aberrations, metaphase I arrest and aneuploidy in mouse oocytes. Mutagenesis 10: 477-86.
- Endow SA; Chandra R; Komma DJ; Yamamoto AH; Salmon ED (1994) Mutants of the Drosophila ncd microtubule motor protein cause centrosomal and spindle pole defects in mitosis. J Cell Sci 107 (Pt 4): 859-67.
- Epifanova OI; Polunovsky VA (1986) Cell cycle controls in higher eukaryotic cells: resting state or a prolonged G1 period?. J Theor Biol 120: 467-77.
- Foureman PA (1988) The TX;Y test for the detection of nondisjunction and chromosome breakage in Drosophila melanogaster. II. Results of female exposures. Mutat Res 203: 309-16.
- Foureman PA (1986) A semiselective test for the detection of first-and second- division nondisjunction in Drosophila melanogaster. Environ Mutagen 8: 173-82.
- Frei H y FE Würgler (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from Drosophila assay indicate a positive, negative or inconclusive results. Mutation Res., 203: 297-308.
- Gard DL; Cha BJ and Roeder AD (1995) F-actin is required for spindle anchoring and rotation in Xenopus oocytes: a re-examination of the effects of cytochalasin B on oocyte maturation. Zygote 3(1): 17-26.
- Gatti M; Baker BS (1989) Genes controlling essential cell-cycle functions in Drosophila melanogaster. Genes Dev 3: 438-53.

- Golsteyn RM et al (1995) Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Pkl1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. *J Cell Biol* 129(6):1617-28.
- González C; Casal Jimenez J; Ripoll P; Sunkel CE (1991) The spindle is required for the process of sister chromatid separation in Drosophila neuroblasts. *Exp Cell Res* 192: 105.
- Graf U; F Würgler; A Katz; H Frei; H Juon; C Hall y P Kale (1984) Somatic mutation and recombination teste in Drosophila melanogaster, *Environ. Mutagen.* 6: 153-188.
- Hällstron I; J Magnusson y C Ramel (1982) Relation between the somatic toxicity of dimethylnitrosamine and a genetically determined variation in the level and induction of cytochrome P-450 in Drosophila. *Mutation Res.*, 92: 161-168.
- Hawley SR; Holly I; Anne Z; Deana H; Allan L; Christine N; Michelle W; Tamar A; Janet J; Kim M y Geoffrey C (1993) There are thw mechanisms of achiasmata segregation in Drosophila females, one of which requires heterochromatic homology. *Developmental Genetics* 13:440-467.
- Heck MM et al (1993) The kinesin-like protein KLP61F is essential form mitosis in Drosophila. *J Cell Biol* 123(3): 665-79.
- Jimenez M; Goday C (1993) A centrosome-associated antibody from Drosophila melanogaster reveals a new microtubule-dependent structure in the equatorial zone of Parascaris univalens embryos. *J Cell Sci* 106 (Pt 3): 719-30.
- Jordan MA; Himes RH; Wilson L (1985) Comparison of the effects of vinblastine, vincristine, vindesine, and vinepidine on microtubule dynamics and cell proliferation in vitro. *Cancer Res* 45: 2741-7.

- Jordan MA; Thrower D; Wilson L (1992) Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. J Cell Sci 102 (Pt 3): 401-16.
- Kallio M; Sjoblom T; Lahdetie J (1995) Effects of vinblastine and colchicine on male rat meiosis in vivo: disturbances in spindle dynamics causing micronuclei and metaphase arrest. Environ Mol Mutagen 25: 106-17.
- Kilbey BJ; DJ MacDonald; C Auerbach; FH Sobels y EW Vogel (1981) The use of Drosophila melanogaster in tests for environmental mutagens. Mutation Res., 85: 141-146.
- Kolmer M; Roos C; Tirronen M; Myohanen S; Alo H (1994) Tissue-specific expression of the diazepam-binding inhibitor in Drosophila melanogaster: cloning, structure and localization of the gene. Mol Cell Biol 14: 6983-95.
- Kubiak JZ; Weber M; de Pennart H; Winston NJ; Maro B (1993) The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. EMBO J 12: 3773-8.
- Lakhotia SC; Sharma A (1995) RNA metabolism in situ at the 93D heat shock locus in polytene nuclei of Drosophila melanogaster after various treatments. Chromosome Res 3: 151-61.
- Li R; Murray AW (1991) Feedback control of mitosis in budding yeast. Cell 66: 519-31.
- Lindsley DL y G Zimm (1992) The genome of Drosophila melanogaster. Academic, Press, Inc. U.S.A., 1133 pp.
- Little M y Ludueña RF (1985) Structural differences between brain 1 y 2 tubulins: implications for microtubule assembly and

colchicine binding. EMBO J, 4, 51.

Lobert S; Frankfurter A; Correia JJ (1995) Binding of vinblastine to phosphocellulose-purified and alpha beta-class II tubulin: the role of nucleotides and beta-tubulin isoatypes. Biochemistry 34: 8050-60.

Lynch DW, Ronald LS, Ronald DH y Davis DG (1991) Evaluation of Drosophila for screening developmental toxicants: Test results with eighteen chemicals and presentation of a new Drosophila bioassay. Terat. Carcinog. and Mutag. 11:147-173.

Mailhes JB; Aardema MJ y Marchetti F (1993) Investigation of aneuploidy induction in mouse oocytes following exposure to vinblastine-sulfate, pyrimethamine, diethylstilbestrol diphosphate, or chloral hydrate. Environ Mol Mutagen 22: 107-14.

Margolis RL; Wilson L (1977) Addition of colchicine-tubuline complex to microtubule ends: the mechanism of substoichiometric colchicine poisoning, Proc Natl Acad Sci U.S.A., 74, 3466.

McIntosh JR; Ross UP; Neighbors B and McDonald KL (1985) Architecture of the Microgubule componente of mitotic spindles from Dictyostelium discoideum. J Cell Sci 75:93-129.

Masuda H (1995) The formation and fuctioning of yeast mitotic spindles. Bioessays 17(1): 45-51.

Nöthinger (1970) Sucrose density separation: A method for collecting large number of Drosophila larvae. DIS 45: 177.

Onks DL; Robertson AF; Brodersen R (1992) The effect of chloral hydrate and its metabolites, trichloroethanol and

trichloroacetic acid, on bilirubin-albumin binding.  
Pharmacol Toxicol 71: 196-7.

Parry MJ y Andrew S (1993) The detection and assessment of the  
aneugenic potential of environmental chemicals: the  
European Community Aneuploidy Project. Mut Res 287: 3-15.

Parvinen LM; Soderstrom KO; Parvinen M (1978) Early effects of  
vinblastine and vincristine on the rat spermatogenesis:  
analyses by a new transillumination-phase contrast  
microscopic method. Exp Pathol (Jena) 15: 85-96.

Raff JW; Glover DM (1989) Centrosomes, and not nuclei, initiate  
pole cell formation in Drosophila embryos. Cell 57: 611-9.

Ramos-Morales P., MG Ordaz, J Maldonado, JA Muñoz, E González,  
HM Abundis, PA Campos, M Martínez, Y Páez, MJ Islas, JC  
Gaytán, PG Orozco, BR Hernández, AY Dorantes, H Rivas, A  
Muñoz, I Jiménez. (1996) Suceptibilidad diferencial de  
Drosophila melanogaster en la Prueba de Mutación y  
Recombinación Somática (SMART). Análisis de la distribución  
muestral. 4º Congreso conjunto de las Sociedades Mexicanas  
de Genética y Toxicología Genética, A.C., Aguascalientes,  
Aguascalientes.

Rouan SK; Otterness IG; Cunningham AC; Holden HE; Rhodes CT  
(1990) Reversal of colchicine-induced mitotic arrest in  
Chinese hamster cells with a colchicine-specific monoclonal  
antibody. Am J Pathol 137: 779-87.

Sackett DL (1995) Vinca site agents induce structural changes in  
tubulin different from and antagonistic to changes induced  
by colchicine site agents. Biochemistry 34: 7010-9.

Saltarelli D; Pantaloni D (1983) Copolymerization of tubulin-  
colchicine complex and unliganded tubulin in a  
nonmicrotubular polymer, Bioch 22, 1556.

- Schiff PB; Fant J; Horwitz SB (1979) Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. Nature 277, 665.
- Schuler RL; Hardin BD; Niemeier RW (1982) Drosophila as a tool for the rapid assessment of chemicals for teratogenicity, Teratogenesis Carcinog Mutagen 2:293-301.
- Sehgal A; Osgood C; Zimmering S (1990) Aneuploidy in Drosophila. III: Aneuploidogens inhibit in vitro assembly of taxol-purified Drosophila microtubules. Environ Mol Mutagen 16: 217-24.
- Serrano L (1985) Dominios estructurales y Funcionales del dímero de Tubulina: Implicaciones en la regulación de la polimerización y morfogénesis del microtúbulo, Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.
- Serrano L; Avila J and Maccioni RB (1984) Limited proteolysis of tubulin and the localization of the binding sites for colchicine. J Biol Chem 259, 6607.
- Sieber SM; Whang-Peng J; Botkin C; Knutsen T (1978) Teratogenic and cytogenetic effects of some plant-derived antitumor agents (vincristine, colchicine, maytansine, VP-16-213 and VM-26) in mice. Teratology 18: 31-47.
- Singer WD; Jordan MA; Wilson L; Himes RH (1989) Binding of vinblastine to stabilized microtubules. Mol Pharmacol 36: 366-70.
- Sobrier ML; Couderc JL; Chapel S; Dastugue B (1986) Expression of a new beta tubulin subunit is induced by 20-hydroxyecdysone in Drosophila cultured cells. Biochem Biophys Res Commun 134: 191-200.
- Skoufias AD y Wilson L (1992) Mechanism of inhibition of Microtubule polymerization by colchicine: Inhibitory

potencies of unliganded colchicine and tubulin-colchicine complexes. Biochemistry 31: 738-746.

- Sunkel CE et al (1995) Gamma-tubulina is required for the structure and function of the microtubule organizing centre in Drosophila neuroblasts. Embo-J. 14(1):28-36.
- Szabad J; Würgler FE (1987) A genetic assay to detect chromosome gain and/or loss in somatic cells of Drosophila melanogaster. Mutat Res 180: 201-6.
- Szabad J (1986) A genetic assay for the detection of aneuploidy in the germ-line cells of Drosophila melanogaster. Mutat Res 164: 305-26.
- Tateno H et al (1995) Induction of aneuploidy in Chinese hamster oocytes following in vivo treatments with trimethoxybenzoic compounds and their analogues. Mutat Res 327(1-2):237-46.
- Tood N; J Clements; P Zoeller y M Phillips (1983) Absence of a mutagenic effect afeter feeding 4 anti-cancer drugs to Drosophila melanogaster. Mutation Res., 120: 121-125.
- Uppuluri S; Knipling L; Sackett DL; Wolff J (1993) Localization of the colchicine-binding site of tubulin. Proc Natl Acad Sci USA, 90: 11598-602.
- Valencia R; S Abrahamson; W Von Halle; R Woodeuff; F E Würgler y S Zimmering (1984) Chromosome mutations test (SCLT) for mutagenesis in Drosophila melanogaster. Mutation Res., 134: 61-88.
- van Schaik N; Graf U (1993) Structure-activity relationships of tricyclic antidepressants and related compounds in the wing somatic mutation and recombination test of Drosophila melanogaster. Mutat Res 286: 155-63.

- Vian L; P. Van Hummelen; N. Bichet; D. Gouy y M. Krish-Volders (1995) Evaluation of hydroquinone and chloral hydrate on the in vitro micronucleus test on isolated lymphocytes. Mutation Research 334: 1-7.
- Vogel E y A Natarajan (1979a) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkylating agentes in eukaryotic sistemas. I. Recessive lethal mutations and translocations in Drosophila melanogaster. Mutation Res. 62: 51-100.
- Vogel E y A Natarajan (1979b) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkylating agents in eukaryotic sistemas. II. Total and partial sex chromosome loss in Drosophila. Mutation Res. 62: 101-123.
- Voguel E y F Sobels (1976) The function of Drosophila in genetic toxicology testing, Chemical Mutagens 4: 93-142. Weisenberg R (1972) Microbule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations, Sci 177, 1104.
- Weisenberg R; Borisy GG; Taylor EW (1968) The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. Bioch 7, 4466.
- Wendell KL; Wilson L; Jordan MA (1993) Mitotic block in HeLa cells by vinblastine: ultrastructural changes in kinetochore-microtubule attachment and in centrosomes. J Cell Sci 104 ( Pt 2): 261-74.
- WHO (1984) Principles for Evaluating Health Risks to Progeny Associated with Exposure to Chemicals During Pregnancy. World Health Organization, Geneva, 175 pp.
- William BC; Karr TL; Montgomery JM; Goldberg ML (1992) The Drosophila 1 (1)zw10 gene product, required for accurate mitotic chromosome segregation, is redistributed at

- anaphase onset. J Cell Biol 118: 759-73.
- Woodruff RC; Seeger MA (1991) Test of a semiselective screen for induced aneuploidy in germ cells of Drosophila melanogaster females with structurally normal chromosomes. Mutat Res 252: 61-82.
- Wu CT; Budding M; Griffin MS; Croop JM (1991) Isolation and characterization of Drosophila multidrug resistance gene homologs. Mol Cell Biol 11: 3940-8.
- Wügler F; H Juon y H Frei (1983) Promutagens detected by a rapid test with Drosophila somatic cells (Abstract) Experientia, 39: 686.
- Yamaguchi M; Nishimoto Y; Hirose F; Matsukage A (1995) Distribution of PCNA during postblastoderm cell division cycles in the Drosophila melanogaster embryo: effect of a string-mutation. Cell Struct Funct 20: 47-57.
- Zar H (1974) Biostatistic, Prentice Hall, 731 p.
- Zecca M; Basler K; Struhl G (1995) Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the Drosophila wing. Development 121: 2265-78.
- Zijlstra J y EW Vogel (1988) Metabolic inactivation of mutagens in Drosophila melanogaster. Mutation Res., 198: 73-83.
- Zijno A; Quaggia S; Pacchierotti F (1989) A cytogenetic approach to evaluate in vivo somatic aneuploidy. Effects of diethylstilboestrol on mouse bone marrow cells.
- Zimmering S (1987) Aneuploidy in Drosophila. Alan R Liss, Inc. 32 p.
- Zimmering S; Osgood C; Mason JM (1990) Aneuploidy in Drosophila,

I. Genetic test systems in the female Drosophila melanogaster for the rapid detection of chemically induced chromosome gain and chromosome loss. Mutat Res 234: 319-26.

Zordan M; Osti M; Pesce M; Costa R (1994) Chloral hydrate is recombinogenic in the wing spot test in Drosophila melanogaster. Mutat Res 322: 111-6.

Tabla I. Número y frecuencia de manchas/ala inducidas por vinblastina en *Drosophila*.

Com-puesto	Número de alas	Manchas por ala (Número de manchas)				Manchas <u>m/h</u>	Tamaño promedio de clon	Frec. de formación de clones X 10 <sup>3</sup>	
		Manchas sencillas chicas (1-2 células) m = 2	Manchas sencillas grandes (> 2 células) m = 5	Manchas Gemelas m = 5	Manchas Totales m = 2			obser-vada	control corregido

Moscas flr3/mwh

Testigo	80	0.21 (17)	0.05 ( 4)	0.00 ( 0)	0.26 (21)	21	2.14	1.1	
0.032	40	0.25 (10)	0.00 ( 0)	0.03 ( 1)	0.28 (11)	11	1.27	1.1	0.1
0.063	40	0.15 ( 6)	0.03 ( 1)	0.00 ( 0)	0.18 ( 7)	7	2.00	0.7	-0.4
0.125	52	0.40 (21)*	0.10 ( 5)	0.00 ( 0)	0.50 (26)*	25	1.80	2.0	0.9
0.25	42	0.40 (17)*	0.05 ( 2)	0.02 ( 1)	0.48 (20)*	18	1.83	1.8	0.7

Moscas TH3,Ser/mwh

Testigo	40	0.12 ( 5)	0.00 ( 0)	0.00 ( 0)	0.12 ( 5)	5	1.20	0.5	
0.032	40	0.35 (14)*	0.00 ( 0)	0.00 ( 0)	0.35 (14)*	14	1.07	1.4	0.9
0.063	26	0.15 ( 4)	0.00 ( 0)	0.00 ( 0)	0.15 ( 4)	4	1.00	0.6	0.1
0.125	40	0.25 (10)i	0.28 (11)*	0.00 ( 0)	0.52 (21)*	18	2.50	1.8	1.3
0.25	40	0.22 ( 9)	0.22 ( 9)*	0.00 ( 0)	0.45 (18)*	18	2.50	1.8	1.3

Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988). Niveles de probabilidad: alpha = beta = 0.05. +, positivo.

\* No se recuperó un número significativo de moscas flr3/mwh y TH3, Ser/mwh en la concentración de 0.5 mM.

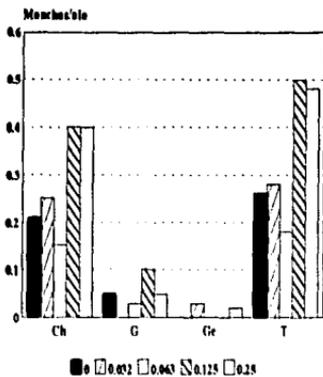


Fig. 1a Frecuencia de manchas ale inducidas por vincristina en moscas *Drosophila melanogaster*

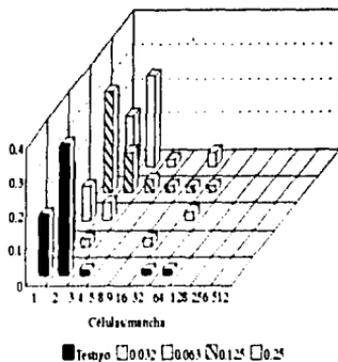


Fig. 1b Frecuencia de células mancha inducidas por vincristina en moscas *Drosophila melanogaster*

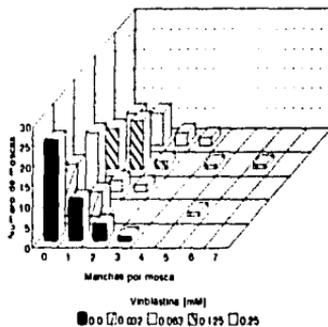


Fig. 1c Frecuencia de manchas/mosca inducidas por vincristina en moscas *Drosophila melanogaster*

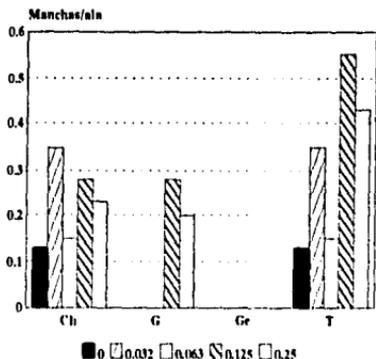


Fig. 2a Frecuencia de manchas/ala inducidas por vinclozolin en moscas TMS, Ser/mwh de *Drosophila melanogaster*

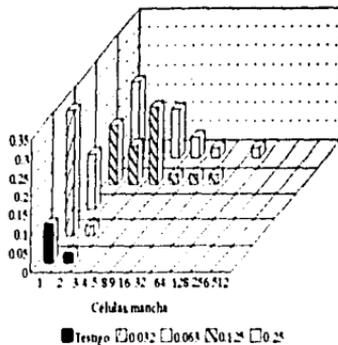


Fig. 2b Frecuencia de células mancha inducidas por vinclozolin en moscas TMS Ser/mwh de *Drosophila melanogaster*

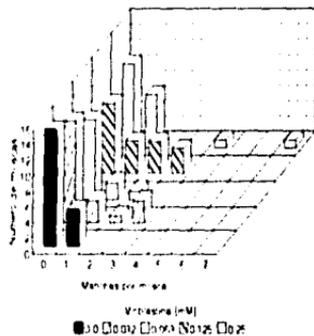


Fig. 2c Frecuencia de manchas/mosca inducidas por vinclozolin en moscas TMS, Ser/mwh de *Drosophila melanogaster*.

Tabla II. Número y frecuencia de manchas/ala inducidas por colchicina en *Drosophila*.

Con-puesto	Número de alas	Manchas por ala (Número de manchas)				Man-chas <u>mwh</u>	Tama-ño promedio de clon	Frec. de formación de clones $\times 10^3$	
		Manchas sencillas chicas (1-2 células) m = 2	Manchas sencillas grandes (> 2 células) m = 5	Manchas Gemelas m = 5	Manchas Totales m = 2			obser-vada	control corregi-do

Moscas flr3/mwh

Testigo	40	0.15 ( 6 )	0.05 ( 2 )	0.05 ( 2 )	0.25 (10)	10	2.90	1.0	
0.063	40	0.50 (20)*	0.00 ( 0 )	0.05 ( 2 )	0.55 (22)+	22	1.64	2.3	1.2
0.125	40	0.48 (18)*	0.10 ( 4 )	0.00 ( 0 )	0.55 (22)+	20	1.55	2.1	1.0
0.25	40	0.20 ( 8 )	0.03 ( 1 )	0.00 ( 0 )	0.22 ( 9 )	9	1.67	0.9	-0.1
0.5	80	0.16 (13)	0.01 ( 1 )	0.00 ( 0 )	0.17 (14)	14	1.79	0.7	-0.3
1.0	80	0.20 (16)	0.01 ( 1 )	0.01 ( 1 )	0.22 (18)	18	1.56	0.9	-0.1
2.0	14	0.64 ( 9 )*	0.07 ( 1 )	0.00 ( 0 )	0.71 (10)+	10	1.80	2.9	1.9

Moscas TH3,Ser/mwh

Testigo	40	0.08 ( 3 )	0.03 ( 1 )	0.00 ( 0 )	0.10 ( 4 )	4	1.50	0.4	
0.032	40	0.35 (14)*	0.00 ( 0 )	0.00 ( 0 )	0.35 (14)+	14	1.43	1.4	1.0
0.063	40	0.45 (18)*	0.00 ( 0 )	0.00 ( 0 )	0.45 (18)+	18	1.33	1.8	1.4
0.125	40	0.20 ( 8 )	0.03 ( 1 )	0.00 ( 0 )	0.22 ( 9 )	9	1.44	0.9	0.5
0.25	40	0.55 (22)*	0.03 ( 1 )	0.00 ( 0 )	0.57 (23)+	23	1.17	2.4	1.9
0.5	80	0.36 (29)*	0.01 ( 1 )	0.00 ( 0 )	0.37 (30)+	29	1.14	1.5	1.1
1.0	40	0.10 ( 4 )	0.03 ( 1 )	0.00 ( 0 )	0.12 ( 5 )	5	1.80	0.5	0.1

Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988). Niveles de probabilidad:  $\alpha = \beta = 0.05$ , positivo.

\* No se recobraron moscas flr3/mwh y TH3,Ser/mwh en las concentraciones de 0.032 y 2.0 nM respectivamente.

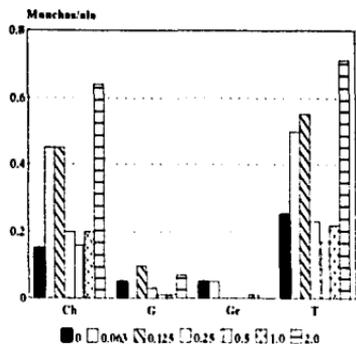


Fig. 3a Frecuencia de manchas/ala inducidas por colchicina en moscas (R) mach de *Drosophila melanogaster*.

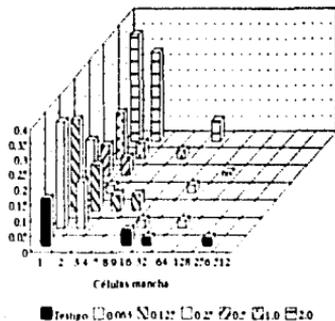


Fig. 3b Frecuencia de células/mancha inducidas por colchicina en moscas (R) mach de *Drosophila melanogaster*.

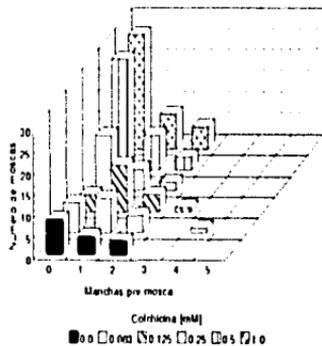


Fig. 3c Frecuencia de moscas/mosca inducidas por colchicina en moscas (R) mach de *Drosophila melanogaster*.

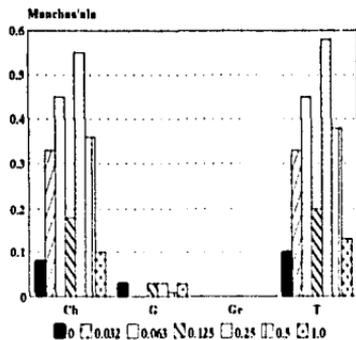


Fig. 4a Frecuencia de manchas ala inducidas por colchicina en moscas TM3, Ser/msh de *Drosophila melanogaster*.

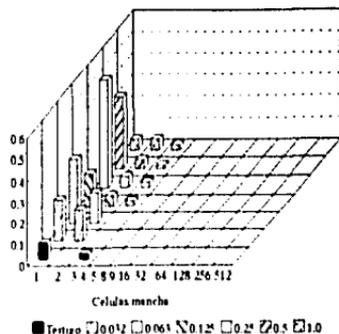


Fig. 4b Frecuencia de células mancha inducidas por colchicina en moscas TM3, Ser/msh de *Drosophila melanogaster*.

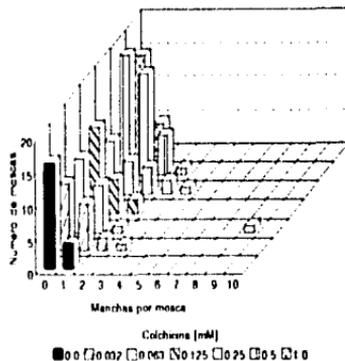


Fig. 4c Frecuencia de manchas/mosca inducidas por colchicina en moscas TM3, Ser/msh de *Drosophila melanogaster*.

Tabla III. Número y frecuencia de manchas/ala inducidas por vincristina en *Drosophila*.

Com-puesto	Número de alas	Manchas por ala (Número de manchas)				Manchas $\frac{m}{m/h}$	Tamaño promedio de clon	Frec. de formación de clones $\times 10^{-3}$	
		Manchas sencillas chicas (1-2 células) $n = 2$	Manchas sencillas grandes (> 2 células) $n = 5$	Manchas Gemelas $n = 5$	Manchas Totales $n = 2$			observada	control corregido

Moscas fir3/mwh

Testigo	80	0.21 (17)	0.05 (4)	0.00 (0)	0.26 (21)	21	2.14	1.1	
0.1	40	0.38 (15)	0.03 (1)	0.00 (0)	0.40 (16)	16	1.62	1.6	0.6
0.3	40	0.23 (9)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.23 (9)	9	1.11	0.9	-0.2
0.5	40	0.23 (9)	0.10 (4)	0.05 (2)	0.38 (15)	15	2.47	1.5	0.5
1.0	40	0.53 (21)+	0.08 (3)	0.03 (1)	0.63 (25)+	25	1.64	2.6	1.5

Moscas TH3,Ser/mwh

Testigo	40	0.13 (5)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.13 (5)	5	1.20	0.5	
0.1	40	0.30 (12)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.30 (12)	12	1.33	1.2	0.7
0.3	40	0.18 (7)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.18 (7)	7	1.00	0.7	0.2
0.5	40	0.08 (3)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.08 (3)	3	1.00	0.3	-0.2
1.0	40	0.18 (7)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.18 (7)	7	1.43	0.7	0.2

Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Mürgler (1988). Niveles de probabilidad:  $\alpha = \beta = 0.05$ +, positivo.

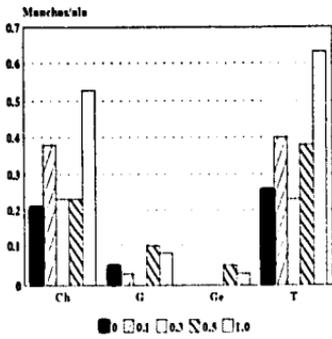


Fig. 5a Frecuencia de manchas/ala inducidas por tiazinona en moscas *Drosophila melanogaster*.

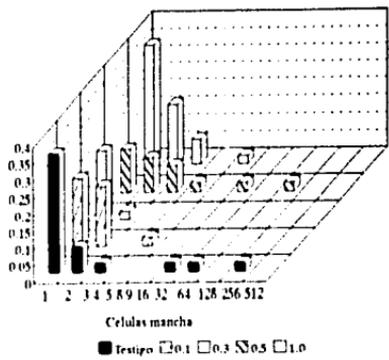


Fig. 5b Frecuencia de células/mancha inducidas por vincristina en moscas *Drosophila melanogaster*.

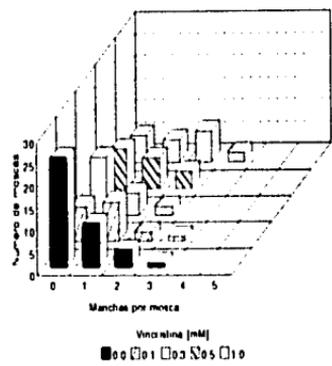


Fig. 5c Frecuencia de manchas/mancha inducidas por vincristina en moscas *Drosophila melanogaster*.

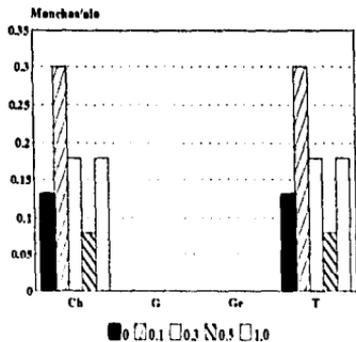


Fig. 6a Frecuencia de manchas en la abdomen por vincristina en moscas TM3.Ser/muh de *Drosophila melanogaster*.

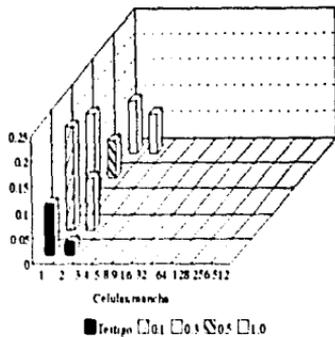


Fig. 6b Frecuencia de células mancha inducidas por vincristina en moscas TM3.Ser/muh de *Drosophila melanogaster*.

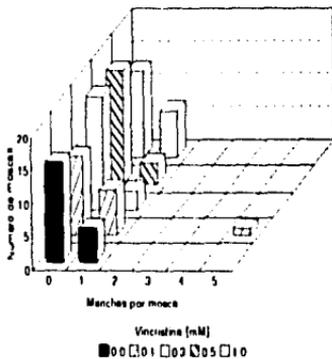


Fig. 6c Frecuencia de manchas/mosca inducidas por vincristina en moscas TM3.Ser/muh de *Drosophila melanogaster*.

Tabla IV. Número y frecuencia de manchas/ala inducidas por hidrato de cloral en *Drosophila*.

Com- puesto	Número de alas	Manchas por ala (Número de manchas)				Man- chas mwh	Tamaño pro- medio de clon	Frec. de formación de clones $\times 10^{-3}$	
		Manchas simples (1-2 células) m = 2	Manchas simples grandes (> 2 células) m = 5	Manchas Gemeles m = 5	Manchas Totales m = 2			obser- vada	control corregi- do

Moscas fir3/mwh

Testigo	40	0.40 (16)	0.08 (3)	0.00 (0)	0.47 (19)	19	1.63	1.9	
0.032	40	0.35 (14)	0.03 (1)	0.00 (0)	0.37 (15)	15	1.47	1.5	0.6
0.063	40	0.35 (14)	0.05 (2)	0.00 (0)	0.40 (16)	16	1.87	1.6	0.7
0.125	40	0.25 (10)	0.00 (0)	0.03 (1)	0.28 (11)	11	1.82	1.1	-0.7
0.25	40	0.47 (19)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.47 (19)	19	1.47	1.9	0.1
0.5	40	0.37 (15)	0.08 (3)	0.03 (1)	0.47 (19)	19	2.05	1.9	1.0
1.0	40	0.55 (22)	0.17 (7)	0.03 (1)	0.75 (30)	30	2.30	3.1	1.2
2.0	40	0.28 (11)	0.10 (4)	0.05 (2)	0.43 (17)	16	2.31	1.6	0.7

Moscas TH3, Ser/mwh

Control	40	0.25 (10)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.25 (10)	10	1.30	1.0	
0.032	40	0.20 (8)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.20 (8)	8	1.00	0.8	-0.2
0.063	40	0.28 (11)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.28 (11)	11	1.09	1.1	0.1
0.125	40	0.17 (7)	0.05 (2)	0.00 (0)	0.22 (9)	9	1.78	0.9	-0.1
0.25	40	0.08 (3)	0.03 (1)	0.00 (0)	0.10 (4)	4	1.50	0.4	-0.6
0.5	40	0.17 (5)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.12 (5)	5	1.00	0.5	-0.5
1.0	40	0.10 (4)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.10 (4)	4	1.00	0.4	-0.6
2.0	40	0.28 (11)	0.08 (3)	0.05 (2)	0.35 (14)	14	1.50	1.4	0.4

Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988). Niveles de probabilidad:  $\alpha = \beta = 0.05$ , positivo.

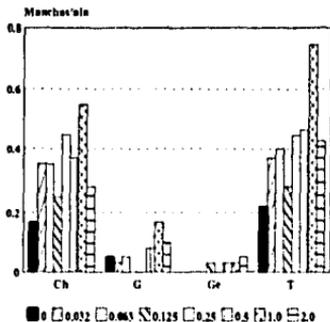


Fig. 7a Frecuencia de manchas de inducidas por hidrato de cloral en moscas *Drosophila melanogaster*.

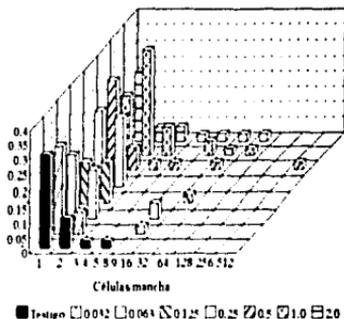


Fig. 7b Frecuencia de células mancha inducidas por hidrato de cloral en moscas *Drosophila melanogaster*.

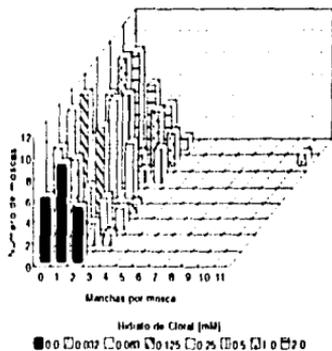


Fig. 7c Frecuencia de manchas/mosca inducidas por hidrato de cloral en moscas *Drosophila melanogaster*.

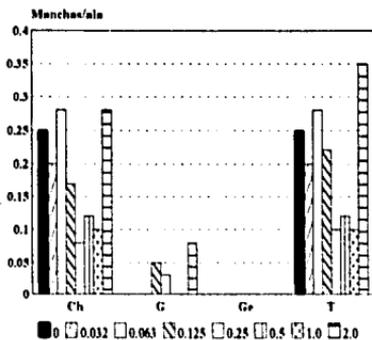


Fig. 8. Frecuencia de manchas/año inducida por hidrato de cloral en moscos TMS. Ser. anh. de *Drosophila melanogaster*.

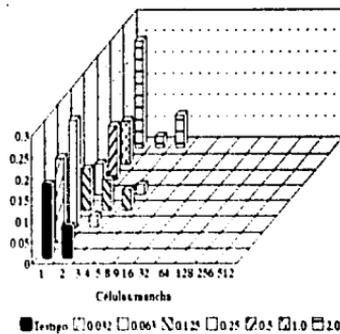


Fig. 9. Frecuencia de células mancha inducidas por hidrato de cloral en moscos TMS. Ser. anh. de *Drosophila melanogaster*.

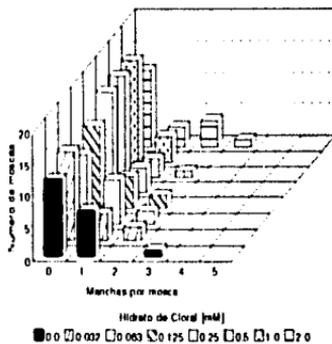


Fig. 10. Frecuencia de manchas/año inducidas por hidrato de cloral en moscos TMS. Ser. anh. de *Drosophila melanogaster*.

Tabla V. Número y frecuencia de manchas/ala inducidas por Vinblastina en larvas de *Drosophila*.

Edad al término del Trat.	Número de alas	Manchas por ala (Número de manchas)				Manchas <u>m</u>	Tamaño promedio de clon	Frec. de formación de clones $\times 10^3$	
		Manchas sencillas chicas (1-2 células) m = 2	Manchas sencillas grandes (> 2 células) m = 5	Manchas Gemelas m = 5	Manchas Totales m = 2			observada	control corregido

Moscas IIRJ/mwh

72	40	0.25 (10)	0.10 (4)	0.00 (0)	0.35 (14)	14	2.64	1.4	
84	40	0.43 (17)	0.15 (6)	0.05 (2)	0.62 (25)	25	2.20	2.6	1.1
90	26	0.31 (8)	0.08 (2)	0.04 (1)	0.42 (11)	11	2.18	1.7	0.3
96	40	0.22 (9)	0.17 (7)	0.00 (0)	0.40 (16)	16	2.69	1.6	0.2
102	14	0.57 (8)	0.21 (3)	0.00 (0)	0.79 (11)*	11	2.36	3.2	1.8
108	32	0.62 (20)*	0.28 (9)	0.03 (1)	0.94 (30)*	30	2.80	3.8	2.4
114	18	0.39 (7)	0.17 (3)	0.06 (1)	0.61 (11)	11	2.91	2.5	1.1
120	6	0.33 (2)*	0.17 (1)	0.00 (0)	0.50 (3)	3	2.33	2.1	0.6

Moscas TMJ, Ser/mwh

72	40	0.12 (5)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.12 (5)	5	1.20	0.5	
84	40	0.40 (16)*	0.15 (6)*	0.00 (0)	0.55 (22)*	22	2.14	2.3	1.7
90	20	0.25 (5)	0.45 (9)*	0.00 (0)	0.70 (14)*	14	4.43	2.9	2.4
96	40	0.32 (13)*	0.35 (14)*	0.00 (0)	0.68 (27)*	27	3.26	2.8	2.3
102	20	0.30 (6)	0.10 (2)	0.00 (0)	0.40 (8)*	8	2.62	1.6	1.1
108	40	0.35 (14)*	0.47 (19)*	0.00 (0)	0.82 (33)*	33	3.48	3.4	2.9
114	22	0.32 (7)	0.23 (5)*	0.00 (0)	0.55 (12)*	12	3.33	2.2	1.7
120	6	0.83 (5)*	0.00 (0)	0.00 (0)	0.83 (5)*	5	1.20	3.4	2.9

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



Fig. 9. Frecuencia de machos a las inducidas en la curva de respuesta a respuestas a *viablanina* (0.125) en moscas (R3) mach de *Drosophila melanogaster*.

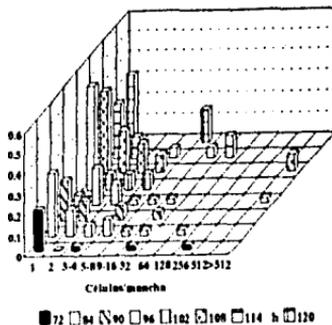


Fig. 9b. Frecuencia de machos a las inducidas en la curva de respuesta a respuestas a *viablanina* (0.125) en M en moscas (R3) mach de *Drosophila melanogaster*.

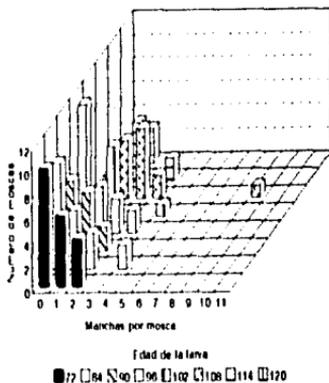


Fig. 9c. Frecuencia de machos a las inducidas en la curva de respuesta a respuestas a *viablanina* (0.125) en M en moscas (R3) mach de *Drosophila melanogaster*.

Marchas

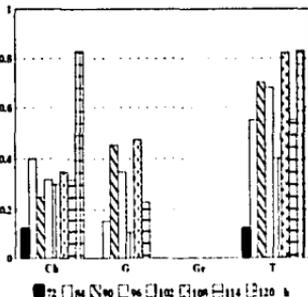


Fig. 10a Frecuencia de marchas al responder en la curva de exposición a vulvosten (0.125) mM en moscas TM3. Ser machó de *Drosophila melanogaster*.

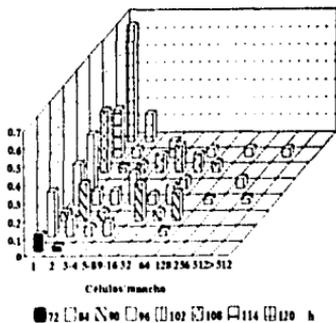


Fig. 10b Frecuencia de células macho medidas en la curva de exposición a vulvosten (0.125) mM en moscas TM3. Ser machó de *Drosophila melanogaster*.

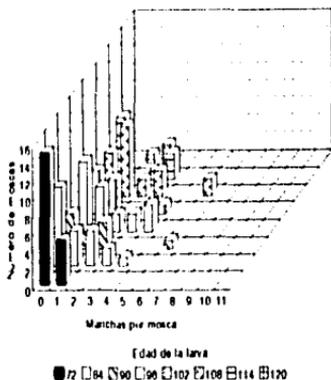


Fig. 10c Frecuencia de marchas mosca medidas en la curva de exposición a vulvosten (0.125) mM en moscas TM3. Ser machó de *Drosophila melanogaster*.

Tabla VI. Número y frecuencia de manchas/ala inducidas por Colchicina en larvas de Drosophila.

Edad al término del Trat.	Número de alas	Manchas por ala (Número de manchas)				Manchas <u>mwh</u>	Tamaño promedio de clon	Frec. de formación de clones X 10 <sup>3</sup>	
		Manchas sencillas chicas (1-2 células) m = 2	Manchas sencillas grandes (> 2 células) m = 5	Manchas Gemelas m = 5	Manchas Totales m = 2			obser-vada	control corregido

Moscas flr3/mwh

72	40	0.43 (17)	0.08 ( 3)	0.00 ( 0)	0.50 (20)	20	1.60	2.1	
78	40	0.40 (16)	0.03 ( 1)	0.03 ( 1)	0.45 (18)	18	1.56	1.8	-0.2
84	38	0.71 (27)1	0.16 ( 6)	0.00 ( 0)	0.87 (33)*	33	2.30	3.6	1.6
90	22	0.41 ( 9)	0.18 ( 4)	0.05 ( 1)	0.64 (14)	13	2.92	2.4	0.5

Moscas TH3, Ser/mwh

72	40	0.37 (15)	0.10 ( 4)	0.00 ( 0)	0.47 (19)	19	1.89	1.9	
84	40	0.45 (18)	0.10 ( 4)	0.00 ( 0)	0.55 (22)	22	1.59	2.3	0.3
90	40	0.28 (11)	0.25 (10)	0.00 ( 0)	0.52 (21)	21	2.81	2.2	0.2
96	40	0.37 (15)	0.25 (10)	0.00 ( 0)	0.62 (25)	25	2.80	2.6	0.6
102	22	0.36 ( 8)	0.23 ( 5)	0.00 ( 0)	0.59 (13)	13	3.38	2.4	0.5
108	32	0.22 ( 7)	0.12 ( 4)	0.00 ( 0)	0.34 (11)	11	2.45	1.4	-0.5
114	40	0.37 (15)	0.03 ( 1)	0.00 ( 0)	0.40 (16)	16	1.37	1.6	-0.3
120	24	0.71 (17)	0.08 ( 2)	0.00 ( 0)	0.79 (19)	19	1.79	3.2	1.3

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

\* No se recuperó número significativo de organismos flr3/mwh en los tiempos de exposición de 102, 108 y 120 h.

ESTA TESIS NO DEBE  
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

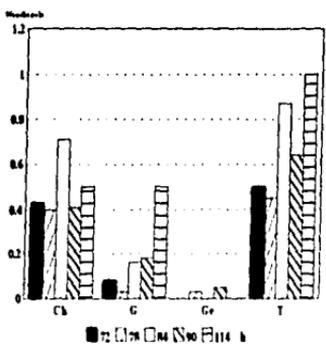


Fig. 11a Frecuencia de muecas als inducidas en la curva de exposición a mibicinas (0.125) en M en meses B3 msh de *Drosophila melanogaster*.

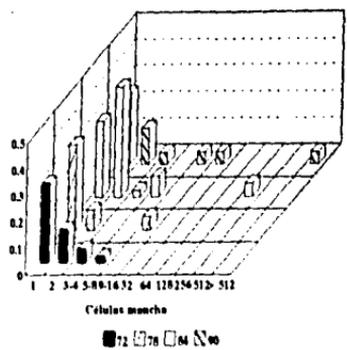


Fig. 11b Frecuencia de células masha inducidas en la curva de exposición a radicina (0.125) en M en meses B3 msh de *Drosophila melanogaster*.

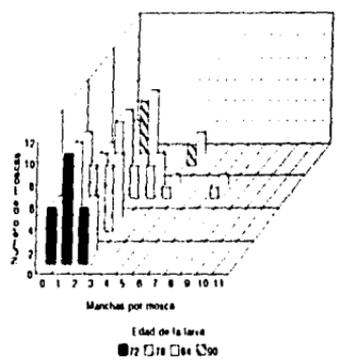


Fig. 11c Frecuencia de muecas masha inducidas en la curva de exposición a radicina (0.125) en meses B3 msh de *Drosophila melanogaster*.

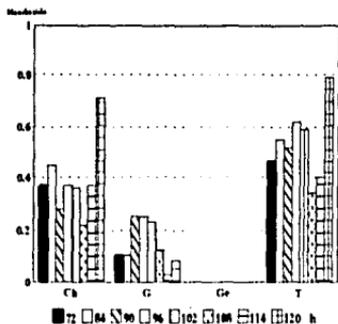


Fig. 12a Frecuencia de nematodos en la cauda de *Drosophila melanogaster* a diferentes [8.125] mM en masas TMS. See web de *Drosophila melanogaster*.

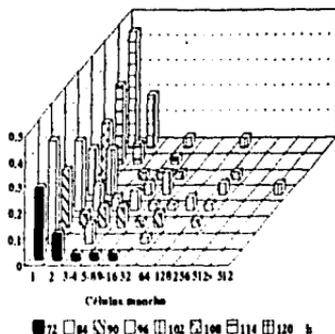


Fig. 12b Frecuencia de nematodos en la cauda de *Drosophila melanogaster* a diferentes [8.125] mM en masas TMS. See web de *Drosophila melanogaster*.

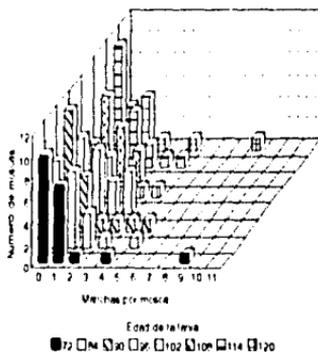


Fig. 12c Frecuencia de nematodos en la cauda de *Drosophila melanogaster* a diferentes [8.125] mM en masas TMS. See web de *Drosophila melanogaster*.