

80
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DEL CIANATO DE SODIO (NaOCN) SOBRE
LA ACTIVIDAD GENOTOXICA DEL SULFATO DE
NIQUEL (NiSO_4) EVALUADO MEDIANTE LA
PRUEBA DE MUTACION Y RECOMBINACION
SOMATICA (SMART) EN ALAS DE *Drosophila*
melanogaster.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

IRMA JIMENEZ MONDRAGON

DIRECTORA DE TESIS M^{TE} EN C. PATRICIA GPE. OROZCO SOTO



MEXICO, D. F.

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

1998

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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: " Efecto del Cianato de Sodio (NaOCN) sobre la actividad genotóxica del Sulfato de Niquel (NiSO_4) evaluado mediante la prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en alas de Drosophila melanogaster ".

realizado por Irma Jiménez Mondragón

con número de cuenta 8130998-6 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

N. en C. Patricia Guadalupe Orozco Soto.

Propietario

Dra. Patricia Ramos Norales.

Propietario

Dra. Genoveva González Morán.

Suplente

Dr. René Cárdenas Vázquez.

Suplente

N. en C. Héctor Martín Abundis Manzano.

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

P. A.
Consejo Departamental de Biología



ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO
DE GENÉTICA

"THEODOSIUS DOBZHANSKY"

DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Porque el momento
apropiado es cualquier momento
que uno aún tiene la suerte de
tener... ¡Vive!**

DEDICATORIAS

A mis padres:

José e Irma con amor y profunda gratitud, por la confianza que me brindan y por creer en mi para lograr mis metas y ser lo que soy.

A mis hermanos:

Dolores, Guadalupe, José A., Jorge e Isabel por su amistad, cariño, apoyo y unión en todos y cada uno de los momentos agradables y difíciles que compartimos y los que aún faltan.

A mis sobrinos:

Beto, Lilf, Coquis y Yoyita a los cuales quiero y adoro por representar la inocencia, ternura y esperanza de un futuro mejor y por ser parte importante de mi vida.

A Victor:

Con gran amor, por ser lo más importante en mi vida por brindarme tu amor, apoyo, confianza y amistad, porque a tu lado no hay imposibles y el futuro es más prometedor.

A mis tios:

Felix, Victoria, Aida y Nohemi con cariño por su amor, confianza y constante apoyo hoy y siempre.

A:

Chio, Quique, Gabriel y José Luis, por su amistad y cariño.

A Vicky:

Por su gran amistad y cariño en todo momento, y por ser una verdadera amiga.

AGRADECIMIENTOS:

A mi directora de tesis:

M. en C. Patricia Gpe. Orozco Soto, con profundo cariño, agradecimiento y admiración por creer en mí y haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo, por brindarme su amistad, conocimiento y comprensión en todo momento y por su gran calidad humana.

A los sinodales:

Dra. Patricia Ramos Morales.
Dra. Genoveva González Morán.
Dr. René Cárdenas Vázquez.
M. en C. Héctor M. Abundis Manzano.

Por la revisión de este trabajo, sus valiosos comentarios, sugerencias, tiempo y disposición.

Al personal del Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias, y muy en especial a Héctor M. Abundis Manzano, por su amistad, compañerismo, ayuda y apoyo constante en las labores de computación de este trabajo

A la Dra. Patricia Ramos Morales por su atención, apoyo y por compartirme sus conocimientos durante el desarrollo del trabajo.

A mis compañeros de trabajo del colegio "Instituto Isabel Grasseteau" y a mis alumnas por su apoyo constante en mi superación académica y su entusiasmo de siempre.

A toda la gente que de alguna manera ha contribuido a la realización de este proyecto.

GRACIAS

INDICE

RESUMEN	ii
INTRODUCCIÓN	1
Sulfato de níquel	13
Cianato de sodio	15
<i>Drosophila melanogaster</i>	18
Objetivo	25
MATERIAL Y MÉTODOS	25
Compuestos químicos	27
Procedimiento experimental	27
Tratamientos:	27-28
- sulfato de níquel	
- cianato de sodio	
- combinado (NiSO ₄ -NaOCN)	
Diseño experimental	29
RESULTADOS	32
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	51
REFERENCIAS	52

RESUMEN

En la actualidad el conocimiento de agentes carcinógenos y anticarcinógenos es variado.

Dado que la incidencia de cáncer en la población se incrementa día a día, es importante evaluar los efectos que tienen diferentes anticarcinógenos sobre sustancias que inducen cáncer.

Entre esas sustancias antineoplásicas se encuentra el cianato de sodio (NaOCN), el cual se utiliza en el tratamiento de mielomas, hepatomas y diversas alteraciones eritrocíticas. Esto último gracias a la capacidad de carbamilar de forma irreversible los residuos NH₂-terminales de las globulinas α y β . Se ha demostrado además que inhibe la acción del benzo(a)pireno y del 7,12 dimetilbenzo(a)antraceno.

La presencia de cianato de sodio impide la incorporación de aminoácidos en las proteínas tanto citoplásmicas como nucleares, vía su biotransformación, lo cual ocurre de forma selectiva a nivel de síntesis de proteínas en las células tumorales, lo que implica que actúa específicamente en células dañadas, aunque su mecanismo de acción aún no se conoce.

El sulfato de níquel (NiSO₄) está reportado como un carcinógeno principalmente vía exposición ocupacional, es altamente absorbido por piel y tracto gastrointestinal, induce ICH en cricetos chinos y en cultivo de linfocitos humanos, representando por lo tanto un riesgo para la salud humana, el mecanismo de acción por el cual ejerce tales efectos hoy en día es desconocido.

En el presente trabajo se evaluó el efecto del cianato de sodio (NaOCN) sobre la actividad genotóxica del sulfato de níquel (NiSO₄) mediante la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en alas de *Drosophila melanogaster*.

Larvas transheterocigóticas (lr¹ +/+ mwh, de 72 h de edad, obtenidas de la cruz entre \overline{w}^w lr¹/TM), Ser y $\overline{d}\overline{d}$ homocigóticas mwh/mwh, fueron sometidas a tres diferentes tratamientos:

- 1) Tratamiento con sulfato de níquel: después de 72 h de realizada la cruz, se colectaron huevecillos durante 8 h en medio fresco conteniendo el compuesto a las concentraciones de 100, 150 y 200 ppm; una vez que se tenían larvas de 72 \pm 4 h, se colocaron en frascos con medio fresco hasta completar su desarrollo.
- 2) Tratamiento con cianato de sodio: la cruz fue sincronizada durante 8 h en medio fresco, posteriormente las larvas de 72 \pm 4 h se colectaron y se pasaron a frascos conteniendo medio preparado con el compuesto a las concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm dejándose ahí hasta llegar a adultos.
- 3) Tratamiento de sulfato de níquel-cianato de sodio: en este caso se sincronizó la cruz en medio que contenía sulfato de níquel a las concentraciones ya mencionadas durante tres días, posteriormente las larvas de 72 \pm 4 h, se pasaron a frascos que contenían medio con cianato de sodio a las concentraciones de 10 y 100 ppm por separado.

Una vez emergidos los adultos se procedió a montar laminillas con las alas de las moscas transheterocigóticas, se analizaron al

microscopio a 40X, registrando el tipo (flr', mwh o gemela) y tamaño (chicas y grandes) de las manchas inducidas, se efectuó el análisis estadístico con el programa de cómputo SMART a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

Los resultados obtenidos mostraron que el sulfato de níquel a las concentraciones probadas, tuvo un efecto genotóxico administrado vía alimentación en larvas de *Drosophila melanogaster* de 72 ± 4 h, en tratamiento subcrónico.

En cuanto al cianato de sodio, no resultó genotóxico en ninguna de las concentraciones probadas.

En el tratamiento sulfato de níquel-cianato de sodio, se mostró que el cianato de sodio reduce el efecto genotóxico del sulfato de níquel en las concentraciones empleadas.

Este trabajo pone de manifiesto que la Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART) en células de las alas de *Drosophila melanogaster* es una metodología con muchas ventajas, entre ellas: económica, sensible y versátil para estudios de mutagénesis en células somáticas en cuanto a la valoración de diversos compuestos, tanto de manera individual como en combinación.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente el ambiente contiene una gran cantidad de sustancias químicas capaces de producir daño genético con efectos a corto, mediano y largo plazo a los cuales se encuentran expuestos los organismos (Albert, 1988).

A partir de los sesentas se iniciaron estudios sobre aspectos de mutagénesis química, empleando para ello un gran número de organismos en diversos experimentos en los que se aplicaron diferentes agentes químicos tales como, aditivos de alimentos, cosméticos, medicamentos y contaminantes ambientales (De Serres, 1979).

El impacto que estos compuestos tienen en el medio es importante dado el peligro genético que representan, ya que el daño que se puede ocasionar a un individuo por medio de la inducción de mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas en las células somáticas; podría causar el desarrollo de un cáncer o si son afectadas las células germinales, dañarse a futuras generaciones dado que serían heredables (Loprieno, 1980; De Flora y Ramel, 1988).

Se conocen millones de compuestos químicos los cuales son de uso común, tomando en cuenta que constantemente salen al mercado una gran cantidad de compuestos tóxicos, mutagénicos y/o carcinogénicos éstos probablemente se incrementarán de manera importante en los próximos años como consecuencia del acelerado desarrollo científico y tecnológico de nuestros tiempos, y dada, la alta correlación encontrada en la actividad mutagénica y carcinogénica (Ames et al., 1973; De Serres, 1979; Ames, 1979; Maron y Ames, 1983), el hombre se ha preocupado por conocer los efectos que podrían resultar de la exposición a estos agentes, con el fin no únicamente de poder reducir la inducción de daño sino también para prevenir, controlar y regular el tiempo de exposición y la cantidad del agente al que pueda estar expuesto un organismo sin que resulte dañado.

Se ha reportado incluso que los alimentos que se consumen diariamente contienen una gran cantidad de estas sustancias, las cuales pueden actuar mediante la generación de radicales libres pudiendo funcionar como iniciadores endógenos de procesos degenerativos, tales como daños al ADN, mutación y promoción los cuales están relacionados con el cáncer, enfermedades del corazón y el envejecimiento (Ames, 1983; Carr, 1985). En la (Fig.1) se muestran algunas de las posibles interacciones que se pueden dar con la molécula del ADN.

El análisis de todos estos aspectos, es uno de los objetivos de la genética toxicológica, la cual se encarga de estudiar los efectos provocados por diferentes fuentes contaminantes, ya sean físicas o químicas. Entre sus principales funciones se encuentran la de implementar pruebas y métodos para la evaluación del riesgo así como también del impacto que pueden causar diversos agentes genotóxicos que se encuentran en el ambiente, y de establecer relaciones entre genotoxicidad y la iniciación de neoplasias (inducción de tumores o cáncer) (Vogel, 1992).

El daño genético que puede originarse a causa de estas sustancias (xenobióticos) (Fig.2), puede verse reflejado en las células somáticas (carcinogénesis) o en las germinales (mutagénesis) y depende de diferentes factores como son:

La ruta o vía de administración, forma de aplicación, biotransformación (activación o desactivación metabólica), tipo de interacción con el ADN, interacción con enzimas, etc. Además de otros aspectos como: solubilidad, lipofiliidad así como si son mono o multifuncionales (Waters et al., 1990; Zijlstra, 1987).

Los organismos poseen diversos mecanismos de defensa para protegerse contra mutágenos, carcinógenos y otras sustancias tóxicas, entre ellos se encuentran:

- 1) Eliminación sin cambios (aire expirado, orina, heces, sudor, vómito, uñas, pelo y leche).
- 2) Cambios en su estructura para su desintoxicación.
- 3) Modificación de la estructura haciéndola más soluble en agua para facilitar su excreción vía urinaria o biliar.

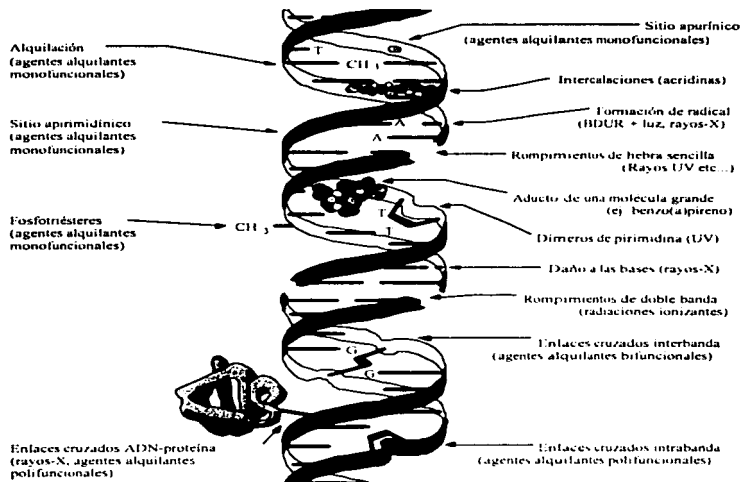


Fig. 1. Principales lesiones en el ADN (Modificado de Vogel, 1992)

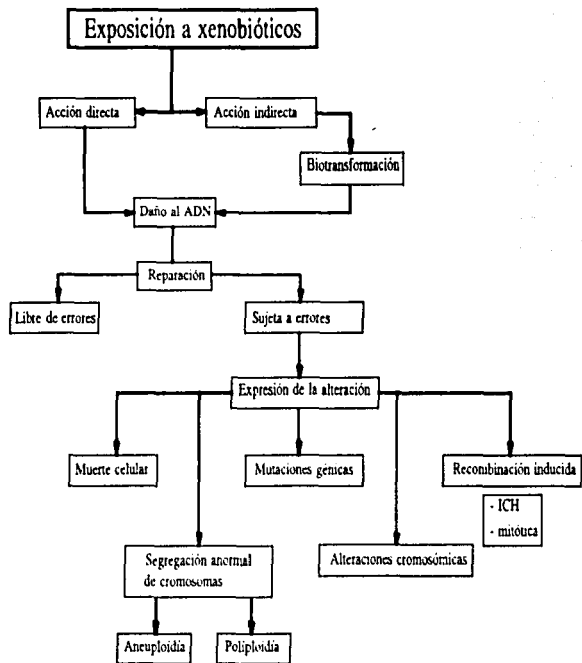


Fig. 2 . Daño genético inducido en células somáticas y germinales por exposición a agentes xenobióticos (Modificado de Brusik, 1987)

4) Descamación de las capas superiores de la piel, estómago, córnea, intestinos y colon (Norton, 1975) (Fig.3).

La alta incidencia de cáncer en los últimos tiempos ha motivado a investigar más acerca de los agentes que podrían combatirlo, de tal forma que se emplean gran variedad de sustancias en la quimioterapia del mismo, incluyendo entre ellas antimutágenos y anticarcinógenos naturales (Ames, 1983; Carr, 1985).

El cáncer es una enfermedad que produce cambios celulares debido a alteraciones bioquímicas e inmunológicas durante el procesamiento del material genético, haciendo que las células se multipliquen de manera no controlada, afectando a las células vecinas por su interacción o relación directa generando tumores.

Las células cancerosas presentan diferencias con respecto a las normales, entre las principales se encuentran: producción de hormonas ectópicas es decir aquellas que no son producidas por las células que les dieron origen; (ejem., las hormonas placentarias producidas por carcinomas pulmonares), así como la presencia de grupos químicos específicos en la membrana celular, etc. Este tipo de expresión diferente denota que en las células cancerosas, se activan genes que deberían estar inactivos y viceversa, por lo tanto la desorganización en la expresión génica es característica de la célula cancerosa (Vega, 1985; Gilman, 1992).

Así como existen diferentes tipos de células también hay diferentes tipos de cáncer según el tejido u órgano que afecten, sin embargo con fines prácticos se consideran tres tipos en general:

1) **Carcinomas:** Cáncer de las células epiteliales, los cuales recubren las superficies externas de distintos órganos como piel, tracto respiratorio, gastrointestinal y las superficies internas de varias glándulas como la mamaria, páncreas, tiroides y otras.

2) **Sarcomas:** Cáncer de los tejidos conectivos o tejidos de soporte como son los cartílagos, huesos y músculos.

3) **Grupo heterogéneo:** Se incluye el cáncer de los tejidos productores de células sanguíneas como son las leucemias por la sobreproducción de leucocitos, las eritroleucemias, sobreproducción

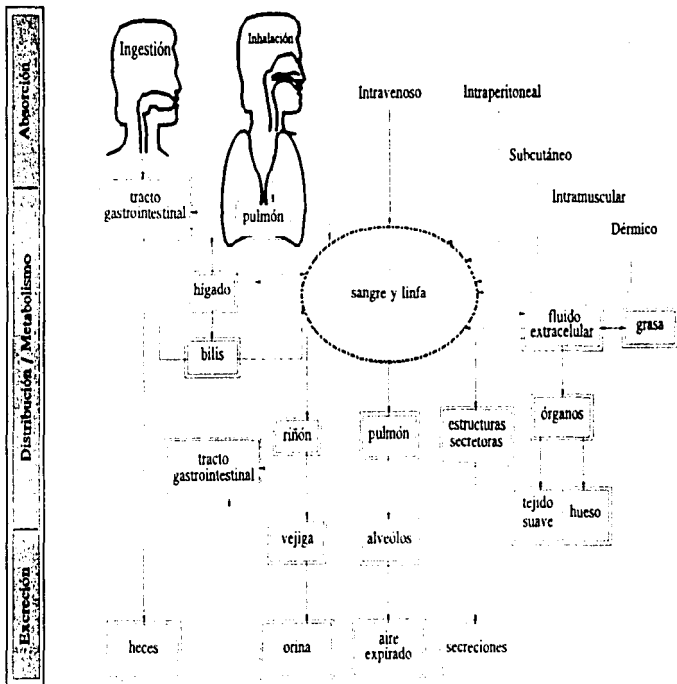


Fig. 3 Rutas metabólicas de los compuestos tóxicos en el cuerpo humano (Modificado de Cassarett y Doull, 1975).

de eritrocitos y la trombocitosis que es un aumento de plaquetas, al igual que los linfomas (cáncer del tejido linfático, nódulos linfáticos, bazo, timo e hígado) (Vega, 1985).

Aproximadamente el 90% de los cánceres humanos se enmarcan en el primer grupo, mientras que el 10% restante se distribuye en los otros dos.

El cáncer es una enfermedad que ocupa un lugar importante en América, y en México es la segunda causa de muertes por año (Archivo Estadístico del Instituto Nacional de Cancerología, 1990).

En el intervalo de la primera y segunda guerra mundial, se efectuaron estudios intensivos sobre la actividad biológica y química de la mostaza nitrogenada, su importante acción citotóxica sobre el tejido linfoides impulsó a Gilman y Dougherty en el año de 1942 a estudiar directamente el efecto de ésta sobre linfomas trasplantados en ratones. Esto constituyó el inicio de la era de la quimioterapia moderna contra el cáncer (Gilman, 1992).

Los compuestos que se considera que pueden tener actividad anticancerígena son evaluados en pruebas *in vivo* en mamíferos (principalmente rata y ratón) e *in vitro* en células derivadas del cáncer humano (Carter y Livingston, 1976).

Entre los diferentes agentes antitumorales se encuentran:

a) **Agentes alquilantes:** Tienen la capacidad de actuar a temperatura corporal y en condiciones acuosas neutras, su acción es mediante la interacción con la información genética de la célula ya que alquilan al ADN, la actividad biológica de los agentes alquilantes está determinada por su actividad química, naturaleza y vías de transporte (aminoácidos, péptidos, carbohidratos, esteroides y compuestos heterocíclicos) (Stock, 1970; Kupchan, 1974; Sainsbury, 1979; Ames, 1983; Carr, 1985 y Gilman, 1992).

Algunos compuestos de este tipo pueden reaccionar directamente después de que han sido introducidos en el cuerpo o bien, ser inicialmente inactivos y posteriormente activados de manera selectiva dentro del tumor (Stock, 1970; Pratt y Ruddon, 1979 y Gilman, 1992).

b) **Antimetabolitos:** Se designa así a los compuestos con estructura molecular semejante a los metabolitos celulares, pero que interfieren con las funciones de estos últimos (Stock, 1970).

c) **Hormonas:** Se sabe acerca de tumores que brotan en otros sitios y que tienden a responder al tratamiento con hormonas, principalmente en etapas tempranas del desarrollo del tumor por ejemplo, en cáncer de mama, endométrio y próstata. Se sabe que en mujeres premenopáusicas con cáncer de mama diseminado se han empleado los andrógenos (propionato de testosterona) que comúnmente es administrado por su acción antiestrogénica (Stock, 1970).

d) **Enzimas:** Como la L-asparaginasa, la cual se extrajo de suero de cuyos por Kidd en 1953 e inhibe ciertos tipos de linfomas de rata y ratón, en la actualidad es producida por fuentes bacterianas como *Echerichia coli*, es útil en el tratamiento de la leucemia aguda; su actividad aparentemente se debe a la destrucción de la asparagina, en laboratorio se ha demostrado que es poco tóxica, selectiva e inocua, más sin embargo, se ha observado cierta resistencia a la enzima (Stock, 1970; Hellman, 1972; Pratt y Ruddon, 1979).

e) **Antibióticos:** La actinomicina D empleada por Faber en 1954, es un antibiótico citotóxico aislado de *Streptomyces sp.* En el tratamiento del tumor de Wilm en niños, demostró su efectividad originando así el desarrollo de una gran cantidad de antibióticos con actividad anticarcinógena para roedores y humanos.

Entre los antibióticos clínicamente efectivos se encuentran, entre otros:

- La mitomicina C, contra la leucemia mieloide y tumores testiculares.
- La bleomicina, contra tumores escamosos y linfomas.
- La daunorubicina, contra leucemias y una gran variedad de tumores sólidos, incluyendo carcinomas y sarcomas.

Los antibióticos actúan en un punto específico del ciclo celular y muestran efectos bioquímicos múltiples que incluyen la interferencia con la síntesis de ADN y ARN (Stock, 1970; Pratt y Ruddon, 1979).

f) **Productos extraídos de plantas:** Fracciones extraídas de plantas como alcaloides del mirto *Vinca rosea* muestran una actividad antileucémica en el ratón (Pratt y Ruddon, 1979). La vinblastina y vincristina juegan un papel importante en el tratamiento de leucemias, linfomas, cáncer de mama y mieloma maligno (Carter y Livingston, 1976).

Por otra parte, en la industria así como en diversas actividades que realiza el hombre, se producen y utilizan compuestos químicos que, dada su cantidad y diversidad, por lo general no se procesan adecuadamente lo que implica que al ser liberados al medio, representan un riesgo potencial para todas las formas de vida (Abundis, 1994).

De esos compuestos a los que se encuentra expuesto el hombre, una gran cantidad son metales o bien compuestos derivados, éstos representan 80 de los 109 elementos que contiene la tabla periódica de los elementos.

Los metales, por sus diversas propiedades tanto físicas como químicas pueden formar un número considerable de compuestos como sales, complejos metálicos o coordinados y complejos organometálicos (Altamirano, 1992).

Entre los muchos metales que se vierten al medio se encuentra el níquel, que es un metal de color blanco, maleable y dúctil y un excelente catalizador en procesos de hidrogenación, se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre, encontrándose en un nivel promedio de 80 ppm, siendo más abundante en el centro de la tierra (Tabla I).

El níquel fue descubierto por Vancronstedt, en 1751 y descrito por Bergman en 1775, su nombre significa duende. Mucho del níquel industrial es el producto de la mezcla de sulfuros entre los que se encuentran la pentlandita (FeNi_3S_4), y la calcopirita (CuFeS_2).

El níquel, es usado principalmente en la industria metalúrgica, más del 50% de todo el níquel producido se encuentra aleado con hierro para producir acero inoxidable, el 28% formando aleaciones con cobre y cromo y alrededor del 25% es usado direc-

I. Propiedades físicas y químicas del níquel (Merck, 1992).

- Símbolo: Ni.
- Color blanco.
- Densidad 8.9 g/cm³
- Punto de ebullición 3075°C.
- Punto de fusión 1455°C.
- Masa atómica 58.71 g/mol.
- Metal maleable y dúctil.
- Es el más duro de los metales de uso corriente.
- Excelente catalizador en procesos de hidrogenación.
- Abundancia del 30% en meteoritos y en aleaciones con hierro.
- Un metal raro en la corteza terrestre y en el magma.
- Es un polvo fino que absorbe grandes cantidades de hidrógeno.

tamente como metal puro o como revestimiento protector de baterías y almacenamiento de las mismas.

El níquel además es utilizado para la decoración de cerámicas de vidrio, y para la elaboración de polvos especiales de níquel; finalmente este elemento sirve como catalizador en la hidrogenación de grasas y aceites (Leonard et al., 1981) (Tabla II).

La emisión de níquel y hierro en el aire por plantas de acerado es relativamente pequeña si se considera la gran cantidad de níquel que se absorbe durante este proceso.

Los compuestos solubles de níquel que se absorben no se encuentran concentrados en gran cantidad en algún órgano, sin embargo las concentraciones son altas en sistema óseo, hígado, riñón y glándula pituitaria (ICRP, 1974; IARC, 1976). En la sangre el níquel se une a las macroglobulinas tales como la niqueloplasmína y la albúmina; la concentración de níquel en el cuerpo humano se encuentra en un orden de 20 mg (ICRP, 1974), representando

II. Principales usos del níquel. (Leonard et al., 1981)

- En la industria metalúrgica.
- Formando aleaciones con hierro para la producción de acero inoxidable, así como con cobre y cromo.
- En la decoración de cerámicas y vidrio.
- En joyería y almacenaje de baterías.
- Como catalizador en la hidrogenación de grasas y aceites.

alrededor del 5% de todo el volumen en el hombre (70 kg) (Tabla III).

El níquel tiene una vida media de menos de una semana en el organismo, un tiempo relativamente corto comparado con la de otros metales pesados, y es excretado principalmente en la orina (alrededor de 11 ng/día).

Las sales de níquel que se encuentran de manera natural en algunos alimentos son relativamente inofensivas así como también pobremente absorbidas, a altos niveles pueden causar malestar local e interferir con los alimentos debido a sus propiedades astringentes (Nielsen, 1977). Se ha reportado que el acetato de níquel (5 ppm) puede causar daños sobre la fertilidad en ratas (Schroeder y Mitchener, 1971). La administración parenteral de compuestos de níquel puede causar síntomas severos de shock, parálisis, convulsiones y coma (LD₅₀ de 60 a 600 mg/kg dependiendo del organismo empleado) (Nielsen, 1977; Sunderman y Mastromatteo, 1975). El riesgo principal ocasionado por níquel en el hombre radica en su carcinogenicidad y en su capacidad de provocar reacciones de sensibilidad. El níquel causa dermatitis por contacto, por ejemplo: en joyas que se desgastan en el cuerpo o bien laboralmente en

III. Concentraciones del níquel en el aire, agua y cuerpo humano. (Rondia, 1979).

- Exposición ocupacional (aire)	0.4 mg/m ³
- Zona urbana (aire)	80 ng/m ³
- Zona rural (aire)	70 ng/m ³
- Fuentes próximas (aire)	200 ng/m ³
- Agua para beber	0.3 µg/l
- Aguas superficiales en el desierto	400 mg/l
- Cuerpo humano (originado por alimentos)*	250 µg/día
* solo el 50% de los 250 µg se absorben.	

industrias como la de electroplateado. En aproximadamente un 10% de las pruebas realizadas en la población expuesta, se establecieron alergias potenciales por níquel (Baer et al., 1973; Sunderman y Mastromatteo, 1975; Nielsen, 1977).

Estudios experimentales indican que la mutagenicidad producida por compuestos de níquel no es dependiente del tipo de administración, pero sí está relacionada de manera directa con su solubilidad en agua (Lau et al., 1972).

Se ha observado un marcado incremento de cáncer de pulmón y de senos nasales en trabajadores de refinerías de níquel, (Doll, 1958 y Morgan, 1958), los tumores son principalmente de tipo epitelial, anaplásicos y pleomórficos, y algunos otros más raros (Sunderman, 1973). De igual manera se ha reportado la aparición de cáncer en otros sitios como la laringe (Pedersen et al., 1973) estómago (Saknyn y Shabynina, 1970, 1973) y riñón (Sutherland, 1959) así como sarcomas en tejidos blandos (Saknyn y Shabynina, 1970).

El mecanismo por el cual actúa el níquel es aún desconocido, sin embargo existen referencias de que en altas concentraciones, puede desnaturalizar proteínas (Shamberger, 1979 y Sunderman, 1977a).

Investigaciones epidemiológicas y estudios experimentales han demostrado que ciertos compuestos del níquel son potentes carcinógenos después de su inhalación (Leonard *et al.*, 1981). Estudios bioquímicos han demostrado que las sales de níquel II reaccionan fácilmente con el ADN alterando la fidelidad de la síntesis del mismo (Miyaky *et al.*, 1977; Sirover y Loeb, 1976), además observaron cambios en el ADN transcrito por la ARN polimerasa del virus de la mieloblastosis en aves, en presencia de sales de níquel.

Durante el periodo de gestación el níquel puede atravesar la barrera materno fetal y llegar al feto. Schroeder y colaboradores en 1964, detectaron níquel en el cuerpo de ratones cuyas madres lo habían tomado durante toda su vida en el agua. Los tejidos fetales humanos tienen aproximadamente la misma concentración de níquel que la de los adultos sugiriendo que puede cruzar también la placenta humana. En embriones de pollo el níquel provoca durante el desarrollo varias anomalías e inclusive la muerte (Ridgway y Karnofsky, 1952; Gilani y Marano, 1980).

Además se ha visto que en ratones produce exencefalia probablemente como resultado de una transferencia tardía vía la placenta; un efecto similar se ha observado en cricetos con respecto a la malformación de ojos (anoftalmia y microftalmia) la cual ocurre cuando el níquel es inhalado durante los días 7 y 8 de preñez (Sunderman *et al.*, 1980).

Entre las principales sales que forma el níquel se encuentra el sulfato de níquel (NiSO₄) cuyas propiedades fisicoquímicas son entre otras: estado físico en formas de cristales los cuales son estables a 40°C, es de color azul a azul verdoso, la LD₅₀ en cerdos de guinea es de 63 mg/Kg (Tabla IV).

El sulfato de níquel se encuentra presente en el medio aunque no se libera extensamente a la atmósfera sin embargo, representa un peligro para la salud humana debido a su alta absorción por piel y por tracto gastrointestinal.

En la prueba de proliferación linfocítica (LPT) para el diagnóstico de sensibilidad al contacto con níquel en humanos, se

IV. Propiedades físicas y químicas del sulfato de níquel (NiSO₄) (Merck, 1992).

- Fórmula: NiSO₄.
- Peso molecular 154.77 g/mol.
- Cristales tetragonales estables a 40° C.
- Color azul a azul verdoso a 53° C, puede cambiar a azul opaco a mayor temperatura.
- Soluble en agua a 20° C y poco soluble en alcohol.
- Se descompone a altas temperaturas (más de 280° C).
- Punto de fusión de 53° C.
- pH en solución acuosa de 4.5 aproximadamente.
- LD en cerdos de guinea es de 63 mg/kg.
- LD₅₀ oral en ratas es de 275 mg/kg.

presentaron resultados positivos en concentraciones menores de 10 µg/ml (Rasanen y Tuomi, 1992).

El sulfato de níquel es muy empleado en la industria metalúrgica y su efecto carcinogénico se limita básicamente a la exposición ocupacional en las industrias del cromado, niquelado y galvanizado (Leonard et al., 1981).

Es una sal soluble no carcinogénica en ratas (Kazarantzis y Lilly, 1979), pero induce intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en células de crickets chinos, y en cultivo de linfocitos humanos (Onho et al., 1982).

En *Saccharomyces cerevisiae* el sulfato de níquel no induce mutaciones reversas y tiene una respuesta débil positiva en la prueba de conversión génica (Singh, 1984). En células de embriones de crickets sirios, Rivedal y Sanner (1980) observaron sinergismo mutagénico entre el NiSO₄ y el benzo(a)pireno. En *Drosophila melanogaster* en las pruebas de Letales Recesivos Ligados al Sexo (SLRL) y Pérdida de Cromosomas Sexuales (SCLT) vía inyección, se encontró que el sulfato de níquel es mutagénico en la primera y tiene una respuesta débil positiva para la segunda (Rodríguez-

Arnaiz y Ramos, 1986). También se ha observado sensibilidad al contacto con sulfato de níquel en cobayos mediante aplicación epicutánea, obteniendo como resultado alergia y sensibilidad positiva (Nielsen et al., 1992), además se ha detectado actividad carcinogénica en osteoblastos humanos (Ranis et al., 1993).

Pruebas realizadas en procariontes han mostrado una aparente inhabilidad de las sales de níquel (NiCl_2) en la inducción de mutaciones génicas en microorganismos, esta observación es sostenida por Corbett y colaboradores (1970), quienes han encontrado inactivación pero no mutaciones en fagos T4 tratados con sulfato de níquel; Waksvik et al., 1980 utilizando otras pruebas en eucariontes, han indicado que este compuesto produce ICH en células de mamífero *in vitro*, lo cual no ocurrió en un pequeño grupo de trabajadores expuestos, aunque sí manifestaron incremento de huecos cromosómicos. No obstante, no se puede excluir la posibilidad de que las sales de níquel pertenezcan al grupo de agentes que son activos en mamíferos pero no en microorganismos.

Las sales de níquel como nitratos, cloruros y sulfatos producen *in vitro* alteraciones en la estructura nuclear de *Vicia faba* como: arreglos anormales de la cromatina de células en división, micronúcleos supernumerarios, tamaño pequeño de los gránulos de cromatina nuclear en el citoplasma, deformación celular total y aberraciones cromosómicas.

Como ya se mencionó, existe gran cantidad de compuestos que se emplean como anticarcinógenos, entre éstos se encuentran algunas sales que contienen metales como el cianato de sodio (NaOCN), del cual algunas propiedades fisicoquímicas son: polvo en forma de cristales de color blanco, soluble en agua, que se descompone en soluciones acuosas formando carbonato sódico y urea (Tabla V).

Algunos compuestos químicos con función anticarcinógena actúan de diversas maneras, dependiendo de si se administran primero y/o simultáneamente a la exposición de un carcinógeno, otros actúan durante la fase de promoción del proceso neoplásico e incluso otros suprimen la formación de neoplasmas cuando se dan subsecuentemente a la administración de los agentes oncogénicos (Matsushima et al.,

V. Propiedades físicas y químicas del cianato de sodio (NaOCN).
(Merck, 1992).

- Fórmula química: NaOCN.
- Peso molecular de 65.01 g/mol.
- Polvo en forma de cristales de color blanco.
- Soluble en agua a 20°C.
- Punto de fusión de 550°C.
- Se descompone en agua formando carbonato sódico y urea.
- LD₅₀ en ratas es de 250 mg/kg, e ip. de 260 mg.

1976; Sporn, 1977; Sporn et al., 1979; Viaje et al., 1977; Wattenberg, 1979).

Se conoce del efecto inhibitor que tiene el cianato de sodio sobre el Benzo(a)pireno y el 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno, con respecto a la inducción de neoplasias en roedores, además en estudios previos se ha demostrado que compuestos similares en cuanto a la actividad química del cianato de sodio, como el benzil-isotiocianato y fenetil-isotiocianato, inhiben la aparición de neoplasias inducidas por la formación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Wattenberg, 1974 y 1977), lo cual incluye la capacidad de reaccionar con grupos sulfhidrilos y con algunas aminas (Stark y Smyth, 1963).

El cianato de sodio ha mostrado tener un efecto inhibitor en cierta variedades de tumores en roedores, tanto en la incorporación de aminoácidos a las proteínas citoplásmicas y nucleares (Boffa y Allfrey, 1973), como en la entrada de fosfatos en hepatomas trasplantados en donde también inhibe la síntesis de proteínas (Lea et al., 1975).

Otras investigaciones muestran que en ratas es capaz de inhibir la síntesis de proteínas sobre todo en neoplasias de intestino grueso (Lea et al., 1975 y Wattenberg, 1974 y 1980).

Dicha supresión parece ser resultado de la inhibición de la iniciación de la cadena protéica (Allfrey et al., 1977). Se han obtenido evidencias de que la inhibición selectiva de síntesis protéica en células tumorales por el cianato de sodio, requiere la activación metabólica de esta sal, la cual ha sido obtenida *in vitro* por adición de la fracción S-9 del hígado de rata (Boffa y Allfrey, 1978), necesitando por lo tanto la función de oxidasas mixtas localizadas en el hígado.

Existen reportes sobre el empleo del cianato de sodio en el tratamiento de la anemia de células falciformes en perros y changos los cuales demostraron además un incremento en la afinidad de la sangre por el oxígeno al utilizar dicho compuesto (Cerami y Manning, 1971), incluso se ha visto que ratas tratadas con cianato de sodio tienen una hemoglobina con mayor afinidad por el oxígeno, presentando además mayor resistencia al calor que los animales control (Kogo et al., 1992).

Otros estudios han mostrado el papel potenciador del cianato de sodio en cuanto a la actividad antitumoral del melfalán en ratones con mieloma, lo cual es apoyado por otros resultados que sugieren que la actividad antitumoral del melfalán se incrementa mediante la administración intraperitoneal de cianato de sodio en ratones con tumores transplantados (Shenouda et al., 1993).

Tomando en cuenta lo antes mencionado, se requiere de un sistema de prueba que permita valorar el daño genético que puedan estar ocasionando estos compuestos, los cuales no pueden ser probados directamente en el humano.

Uno de los organismos que se emplea en algunas pruebas desarrolladas en la genética toxicológica es *Drosophila melanogaster*, conocida comúnmente como la mosca de la fruta o mosca del vinagre, la cual permite analizar un amplio espectro de alteraciones genéticas inducidas por agentes ambientales, tanto en células somáticas como en células germinales (Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992), además de ofrecer numerosas características y/o ventajas que la hacen el sistema de prueba animal más rápido, versátil y eficiente (Zimering, 1975).

Características de *Drosophila melanogaster*.

- Es el eucarionte mejor conocido genéticamente.
- Se pueden realizar estudios *in vivo* e *in vitro*.
- El ciclo de vida es corto, aproximadamente 9 a 10 días a 25°C con una humedad relativa de 60%, involucra un periodo de embriogénesis completo dentro del huevo, y una secuencia de estadios que derivan en una metamorfosis completa de la que finalmente surge un imago o adulto (Fig.4).
- Tiene cuatro cromosomas perfectamente mapeados.
- Contiene un paquete enzimático dependiente del citocromo P-450 similar a la fracción S-9 del hígado de mamíferos, lo que permite la biotransformación *in vivo* de los compuestos (Baars et al., 1980).
- Se conoce el tiempo de su gametogénesis permitiendo tratar estados pre y postmeióticos para evaluar la respuesta en cada una de las etapas de ésta (Chandley y Bateman, 1962).
- Se mantienen en espacios reducidos a un costo de moderado a bajo.
- Se obtienen poblaciones numerosas, aproximadamente 500 organismos por pareja.
- El dimorfismo sexual es positivo hacia la hembra.
- La duración de la exposición puede ser de aguda a crónica lo cual permite realizar una gran variedad de protocolos.
- Se pueden realizar estudios tanto en células somáticas como germinales.
- Los agentes a probar pueden administrarse por alimentación, inyección o en forma gaseosa, ésto depende de las propiedades físico-químicas del compuesto y de los objetivos del trabajo a realizar.

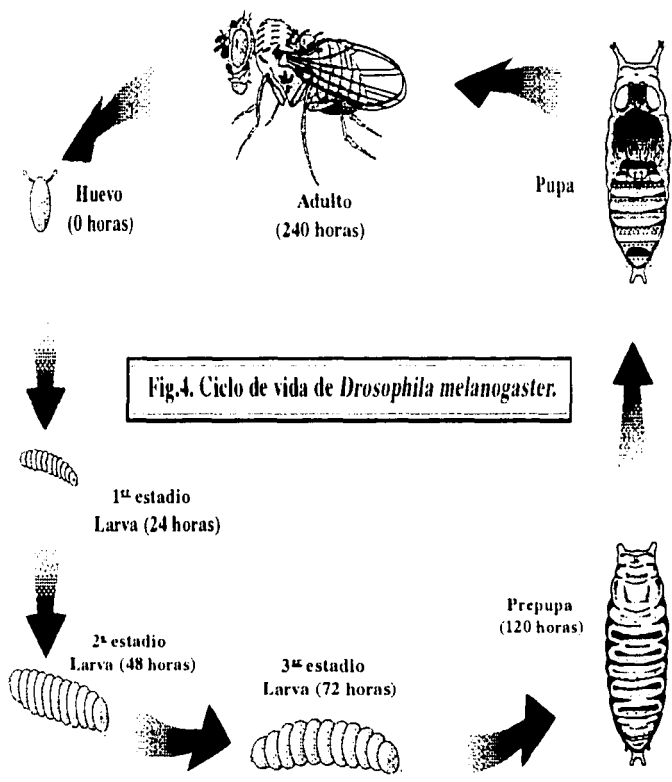


Fig.4. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

- Existe una gran cantidad de líneas con marcadores genéticos que permiten la evaluación de gran variedad de efectos génicos y cromosómicos.

(Vogel, 1974; Kilbey et al., 1981; Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992).

En las larvas de *Drosophila* se presentan dos tipos de linajes celulares diferentes:

- 1.- **Células larvarias:** Están determinadas genéticamente y forman el cuerpo de la larva, estas células crecen principalmente en tamaño pues han perdido su capacidad de división.
- 2.- **Células de los discos imaginales:** Estas células se presentan en las larvas en forma de pequeños sacos y constituirán casi todas las estructuras externas del adulto, así como parte de las internas, estas células no están involucradas en la formación del cuerpo de la larva (Wilkins, 1986).

Los discos imaginales crecen por divisiones mitóticas sucesivas durante los tres estadios por los que pasa la larva hasta llegar a la condición de prepupa, momento en el que se tienen las últimas divisiones mitóticas; el siguiente paso es la diferenciación celular (metamorfosis) que dará origen a las estructuras del imago o adulto (García-Bellido y Merriam, 1971), (Fig. 5).

Actualmente existen varios tipos de sistemas o pruebas para la valoración de diversos compuestos, con respecto a su capacidad para producir alteraciones, una de ellas es la prueba de mutación y recombinación somática (SMART), la cual involucra en una de sus versiones a las células somáticas de las alas de *Drosophila melanogaster* y puede discriminar entre compuestos mutagénicos, promutagénicos y recombinogénicos (Graf et al., 1984), así como antimutagénicos (Orozco, 1993). Es capaz de detectar deleciones, mutaciones puntuales, recombinación y no disyunción (Frölich, 1989) (Fig. 6 a y b), además de presentar una amplia versatilidad en cuanto a la aplicación de tratamientos.

Los ensayos de mutación y recombinación somática se basan en la generación de moscas con un genotipo tal que un evento mutagénico

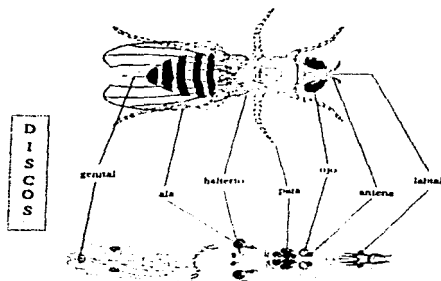


Fig. 5. Discos imagales en la larva de *Drosophila melanogaster* estructuras que origina en el adulto.

nico en una célula somática, conduce a un cambio genotípico manifestado fenotípicamente en todas las células que se derivan de la célula madre mutante, lo que lleva a la formación de un clon (Vogel y Szakmary, 1990).

Al inducir una alteración heredable durante este proceso en cualquiera de las células imagales, ésta originará una estirpe celular con la misma característica alterada dando lugar a la formación de un clon que será observado como una mancha en la estructura imagal correspondiente, si se emplean los marcadores fenotípicos adecuados. (Fig.7).

El tamaño del clon puede estar influido por la edad a la cual fue tratada la larva ya que entre más joven sea, el número de células que conforman el disco imagal es reducido y si una de ellas es afectada pasará por varios ciclos de divisiones mitóticas originándose así **manchas grandes**, de otra manera si la edad de la larva es mayor o si el compuesto requiere ser bioactivado y sus

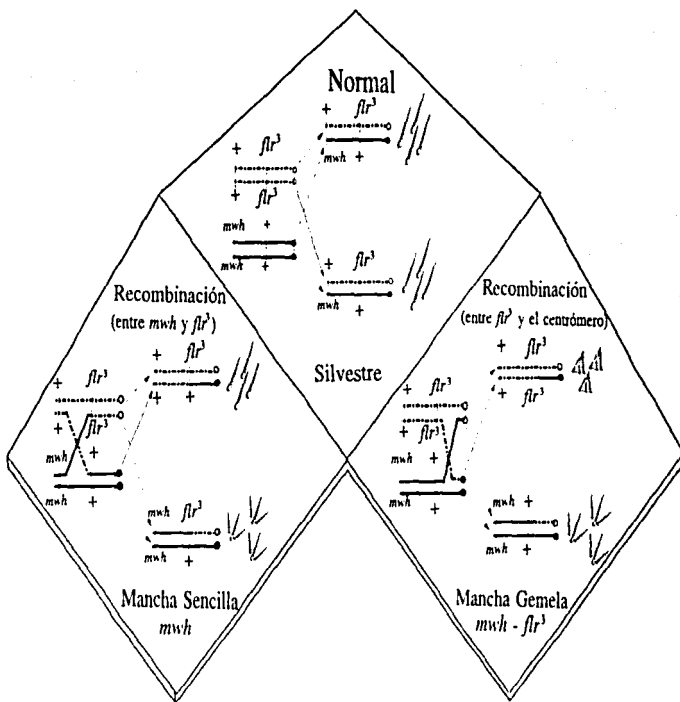


Fig. 6a. Eventos genéticos que detecta SMART.

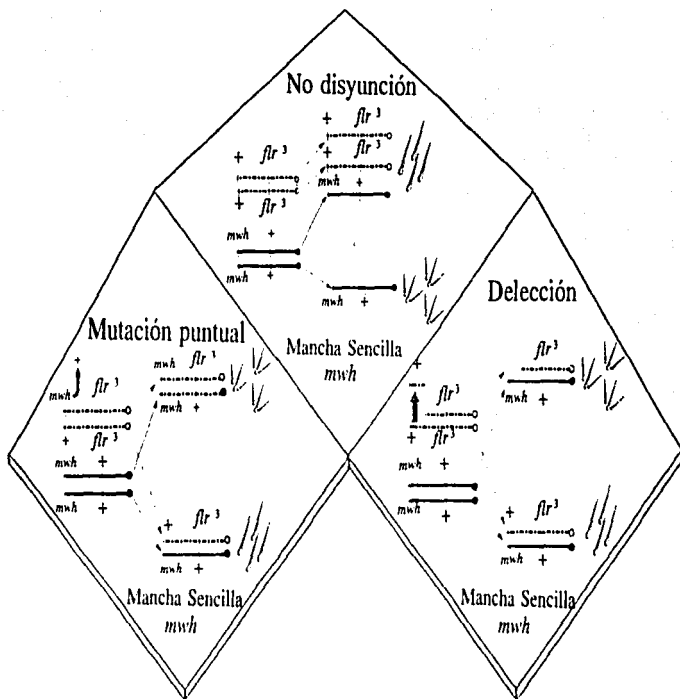


Fig. 6b. Eventos genéticos que detecta SMART.

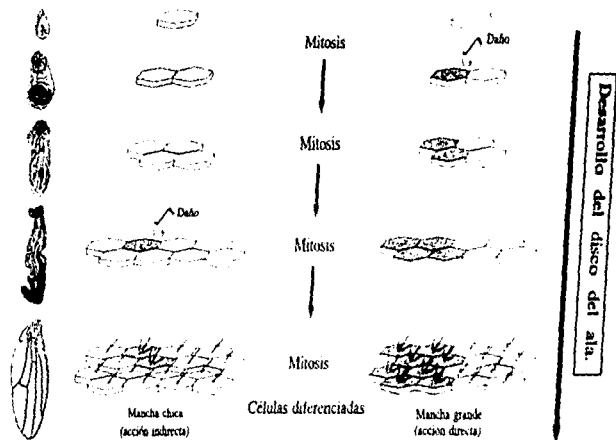


Fig. 7. Formación de clones durante el desarrollo del ala (Modificado de Maldonado, 1994)

metabolitos fueran los causantes de la alteración, se obtendrán manchas de menor tamaño, aunque cabe aclarar que ésto no es una regla general (Graf et al., 1983).

El tipo de daño inducido en las larvas por la exposición a los compuestos se expresa como un fenotipo indicador en las células del ala; de esta forma un mosaico de células *mwh* o *flr'* se originará por la inducción de una mutación puntual, una delección, no disyunción o bien por recombinación entre los marcadores implicados; una mancha gemela (con los fenotipos *mwh-flr'*), se origina de la recombinación entre el marcador *flr'* y el centrómero (Szabad et al., 1983 y Graf et al., 1984).

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue valorar el efecto del Cianato de Sodio (NaOCN) sobre la actividad genotóxica del Sulfato de Níquel (NiSO₄), mediante la prueba de Mutación y Recombinación Somática en las alas de *Drosophila melanogaster*.

I. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron dos líneas de moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*) con marcadores fenotípicamente reconocibles que son *flr'* y *mwh*.

La cruce progenitora se realizó con hembras heterocigóticas *flr'/TM3*. Ser de 72 ± 4 h y machos homocigóticos *mwh/mwh*, de 48 horas (Fig. 8).

La línea *flr'/TM3*. Ser posee dos marcadores fenotípicos: "flama" (*flr'* 3-38.8) que es recesivo y provoca un fenotipo en las células del ala con tricomas amorfos, algunos semejantes a una flama con forma abultada en el ala y en forma de roseta en el abdomen. Este gen cuando se presenta en condición homocigótica es letal (García-Bellido y Dapena, 1974) por lo que para mantener la línea se utiliza el cromosoma balanceador *TM3*, el cual posee múltiples inversiones que impiden recobrar eventos de recombinación, la presencia del balanceador es indicada por el gen marcador

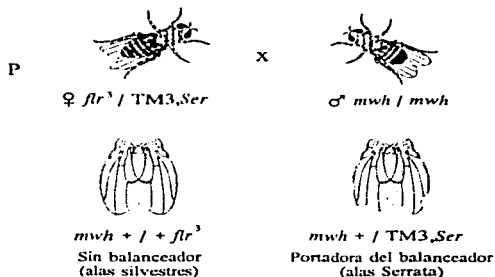


Fig. 8. Cruza progenitora y fenotipos que se recobran en las moscas tratadas.

Serrata (*Ser*), el cual se manifiesta fenotípicamente mediante la aparición de muescas en el borde de las alas; *Ser/Ser* es letal, por lo que en esta cruce sólo se recobran organismos heterocigóticos *flr³/TM3, Ser* en cada generación (Graf et al., 1983).

La línea *mwh* "pelos múltiples en el ala" (*multiple wing hair*, 3-0.2) produce un fenotipo en el cual las células del ala contienen dos o más tricomas en lugar de uno solo, que es el característico del fenotipo silvestre (Lindsley y Grell, 1968; Lindsley y Zimm, 1990).

Las larvas que se recobran de la cruce son de dos tipos: unas libres de inversión con los dos marcadores recesivos *mwh* y *flr³* en posición trans y otras portadoras de inversión *mwh+/TM3, Ser*; en estado larvario no se pueden distinguir unas de otras, por lo que ambas son tratadas pero cuando son adultas las moscas libres de inversión presentan alas de tipo silvestre, en contraste con las portadoras del cromosoma balanceador.

mwh/TM3, Ser en las que las alas presentan muescas características.

Compuestos químicos

- Cianato de Sodio (NaOCN) Janssen Química. CAS 917-61-3.
- Sulfato de Níquel (NiSO₄) Janssen Química. CAS 10101-97-0.

Procedimiento experimental

1) **Tratamiento con sulfato de níquel:** Las concentraciones para el sulfato de níquel se determinaron con base en las empleadas por (Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1986), tres días después de que se realizó la cruce se colectaron huevecillos (sincronización de cultivos) durante 8 horas en medio con sulfato de níquel en las diferentes concentraciones (100, 150 y 200 ppm), posteriormente las larvas de 72 ± 4 h se colectaron mediante el método de Nöthiger (1970), que consiste en separar las larvas por medio de un gradiente de concentración, utilizando una solución de sacarosa al 20%, posteriormente se colocaron en un embudo de separación colectándose en una tela de nylon de donde se transfirieron a frascos con medio fresco hasta completar su desarrollo.

2) **Tratamiento con cianato de sodio:** Para el NaOCN las concentraciones empleadas se tomaron de acuerdo a los datos reportados con anterioridad (Paez, 1996). 72 horas después de la cruce se colectaron los huevecillos durante 8 horas sobre medio fresco, tres días después se obtuvieron las larvas de 72 ± 4 h de edad por el mismo procedimiento que el anterior, colocando a éstas en frascos con medio que contenían las diferentes concentraciones de cianato de sodio 10, 100 y 1000 ppm (95 ml de medio líquido más 5 ml de la solución a probar), permitiendo que las larvas completaran su desarrollo.

3) **Tratamiento con sulfato de níquel-cianato de sodio:** se realizó de la forma indicada sincronizando primero los huevecillos

en medio que contenía sulfato de níquel a las concentraciones ya mencionadas durante tres días, posteriormente se pasaron las larvas de 72 ± 4 h a frascos que contenían medio fresco con cianato de sodio a 10 y 100 ppm respectivamente, permitiendo que estas completaran su desarrollo (Fig.9).

Análisis de las alas: Una vez que los adultos emergieron, se fijaron en etanol al 70%, posteriormente se procedió a disectar las alas de las moscas libres de inversión, colocándolas en solución

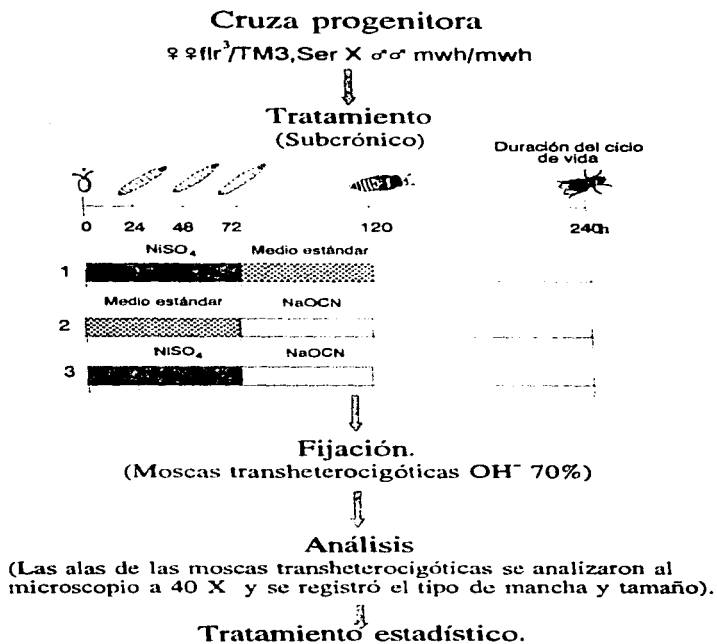


Fig. 9. Resumen del diseño utilizado.

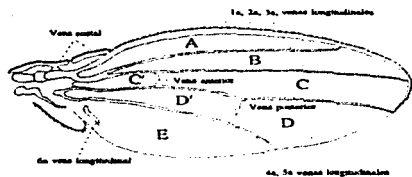
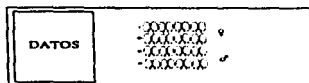


Fig. 10. Montaje de alas y divisiones para el registro de manchas.

Faure 20 pares en un portaobjetos, 10 de hembras y 10 de machos (Graf et al., 1984). Las alas se analizaron en el microscopio óptico a 40X, y se registró el tipo de mancha: mwh, flr' o gemela (mwh y flr') (Fig. 10 y 11), así como su tamaño.

El análisis estadístico se llevó al cabo mediante el programa de cómputo SMART (Würgler 1988 no publicado) y el procedimiento de decisión múltiple (Frei y Würgler, 1988) (Tabla VI).

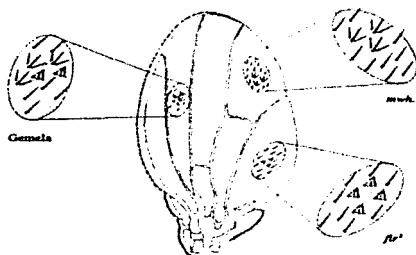


Fig. 11. Diferentes tipos de manchas que se observan en la superficie de las alas.

VI. Resultados posibles en SMART.

H_0 / H_A	Se acepta H_A	Se rechaza H_A
Se acepta H_0	Indeterminado (i)	Negativo (-)
Se rechaza H_0	Positivo (+)	Débil positivo (d+)

H_0 = hipótesis nula, H_A = hipótesis alternativa.
(Según Frei y Würigler 1988)

III. RESULTADOS

Se realizaron un experimento y una repetición para cada serie, experimentales y testigo, al comparar los resultados obtenidos en cada uno, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) por lo que se procedió a sumar los resultados de ambas repeticiones, con el propósito de obtener el tamaño de muestra adecuado.

Tanto el sulfato de níquel (NiSO_4), como el cianato de sodio (NaOCN) se probaron por separado de manera subcrónica, así como combinados primero el sulfato de níquel y posteriormente el cianato de sodio.

En la Tabla VII y la Fig. 12 se muestran los resultados obtenidos en la exposición de 24 X 48 h con el sulfato de níquel (NiSO_4) donde se observa que el compuesto resultó positivo para la inducción de manchas simples chicas y para manchas totales en las tres concentraciones probadas de 100, 150 y 200 ppm; para manchas grandes y gemelas resultó negativo en todas las concentraciones.

En lo que respecta al tratamiento de cianato de sodio (NaOCN) a una exposición de 72 X 48 h los resultados muestran que este compuesto no es genotóxico para las larvas en ninguna de las concentraciones probadas (10, 100 y 1000 ppm), dado que resultó negativo en cuanto a la inducción de manchas simples pequeñas, grandes, gemelas y totales (Tabla VIII y Fig. 13).

La Tabla IX y la Fig. 14 muestran los resultados obtenidos en el tratamiento a larvas de 24 h con sulfato de níquel y posteriormente estas mismas al cumplir 72 h se trataron con cianato de sodio hasta llegar a adultos, se puede observar en este tratamiento combinado, sulfato de níquel (NiSO_4)-cianato de sodio (NaOCN) a las concentraciones de 0, 100, 150 y 200 ppm más 10 y 100 ppm respectivamente que hay una reducción estadísticamente significativa de las frecuencias para todo tipo de manchas así como también en las totales del sulfato de níquel por el cianato de sodio.

En lo referente a la estimación de frecuencias de clones inducidas por 10^3 células (frecuencia observada y frecuencia corregida) la cual se muestra en las dos últimas columnas de cada

Tabla (VII,VIII y IX), la mayor inducción de clones fue para el tratamiento de sulfato de níquel (150 ppm).

En las figuras 15 a 18 se muestra la distribución de las manchas por su tamaño en cada uno de los tratamientos realizados.

TABLA VII. Frecuencia de manchas inducida por sulfato de níquel (NiSO₄). Exposición 24 x 48 h. en células del ala de *Drosophila melanogaster*.

Concentr. NiSO ₄ [ppm]	Número de alas analizadas	Manchas Simples Pequeñas (1-2 cel.) m=2		Manchas Simples Grandes (≥ 2 cel.) m=5		Manchas Gemelas tambor fenetipos m=5		Manchas Totales m=2		Clones con células m=8	Promedio del numero de divisiones de división celular	Frecuencia de formación de clones X 10 ⁶	
		Frec.		Frec.		Frec.		Frec.				Observado	Control errgado
		No.	No.	No.	No.	No.	No.						
Testigo	182	0.20	36	0.08	14	0.01	2	0.29	52	52	2.18	1.1	
100	130	0.37	50+	0.09	12-	0.01	2-	0.46	64+	64	2.00	1.9	0.8
150	160	0.45	72+	0.10	16*	0.02	4-	0.57	92+	92	1.78	2.4	1.2
200	192	0.34	65+	0.11	22-	0.02	5-	0.48	92+	92	2.12	2.0	0.8

Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988). + = positivo; - = negativo;
i = indeterminado, m = factor de multiplicación, P < 0.05.

Figura 12. Frecuencia de manchas por ala inducida por sulfato de níquel. (NiSO_4) en tratamiento suberónico.

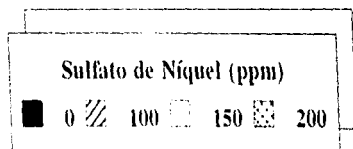
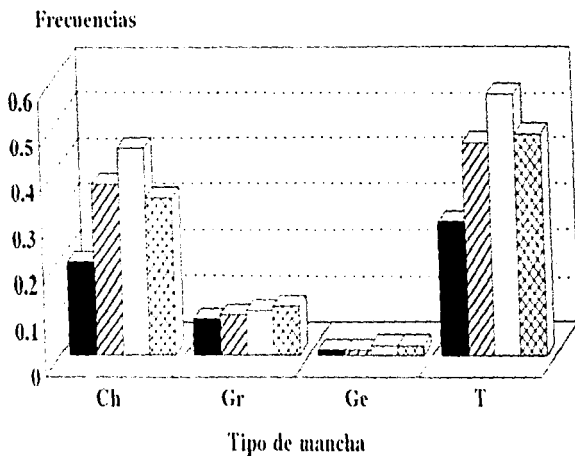


TABLA VIII . Frecuencia de manchas inducida por cianato de sodio (NaOCN). Exposición 72 x 48 h. en células del ala de *Drosophila melanogaster*.

Compuesto NaOCN (ppm)	Número de alas analizadas	Manchas Simples Pequeñas (1-2 cel.) m=2		Manchas Simples Grandes (>2 cel.) m=5		Manchas Grueelas ambos fenotipos m=5		Manchas Totales m=2		Clones con células m=b	Promedio del numero de ciclos de división celular	Frecuencia de formación de clones X 10 ²	
		Frec.	No.	Frec.	No.	Frec.	No.	Frec.	No.			Observado	Control corregido
		Testigo	156	0.28	43	0.08	12	0.01	2			0.37	57
10	98	0.24	24	0.04	4	0.00	0	0.29	28	28	1.71	1.2	-0.3
100	114	0.17	19	0.04	4	0.02	2	0.22	25	25	1.80	0.9	-0.6
1000	116	0.23	27	0.06	7	0.02	2	0.31	36	36	1.97	1.3	-0.2

Análisis estadístico de acuerdo a Frel y Würigler (1988). +=positivo; -=negativo;
i=Indeterminado, m=factor de multiplicación, P<0.05.

Figura 13. Frecuencia de manchas por ala inducida por Cianato de Sodio. (NaOCN) en tratamiento subcrónico.

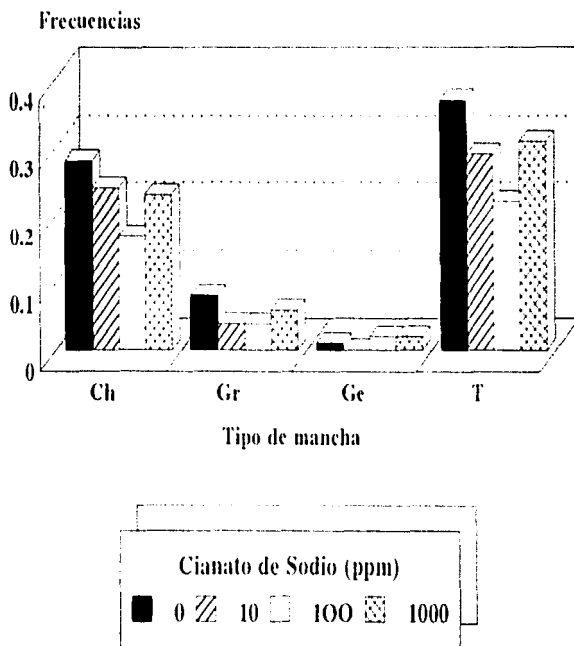
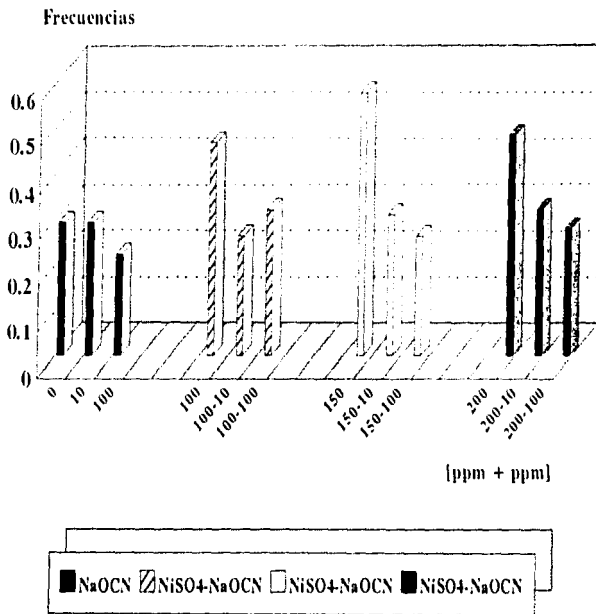


TABLA IX. Frecuencia de manchas inducida después de tratamiento con sulfato de níquel-cianato de sodio (NiSO₄·NaOCN). Exposición 24 x 48 x 48 h. en células del ala de *Drosophila melanogaster*:

Compuesto NiSO ₄ [ppm]	Compuesto NaOCN [ppm]	Número de alas analizadas	Manchas Simples Pequeñas (1-2 ed.) m=2		Manchas Simples Grandes (>2 ed.) m=5		Manchas Gemelas (tambes fenotipos) m=5		Manchas Totales		Clones con células mwb	Promedio del numero de clones de cada de división celular	Frecuencia de formación de clones X 10 ⁴	
			Fre.	No.	Fre.	No.	Fre.	No.	Fre.	No.			Observado	Control corregido.
0	10	98	0.24	24+	0.04	4	0.00	0	0.29	28	28	1.71	1.2	
100		120	0.22	27-	0.03	3-	0.01	1-	0.26	31-	31	1.68	1.1	0.1
150		120	0.26	31-	0.05	6-	0.00	0	0.31	37-	37	1.54	1.3	- 0.1
200		120	0.26	31-	0.04	5-	0.02	2-	0.32	38-	38	1.76	1.3	0.1
0	100	114	0.17	19-	0.04	4-	0.02	2-	0.22	25-	25	1.80	0.9	- 0.3
100		120	0.28	34+	0.03	4-	0.00	0	0.32	38-	38	1.68	1.3	0.1
150		120	0.22	26-	0.02	2-	0.03	3-	0.26	31-	31	1.71	1.1	- 0.1
200		120	0.24	29-	0.04	5-	0.00	0	0.28	34-	34	1.74	1.2	0.0

Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988). + = positivo; - = negativo;
i = indeterminado, m = factor de multiplicación, P < 0.05.

Figura 14. Frecuencia de manchas totales por ala inducidas por sulfato de níquel-cianato de sodio ($\text{NiSO}_4 \cdot \text{NaOCN}$). Exposición de 24 X 48 X 48 h.



En el caso del sulfato de níquel (Fig. 15) se observa un mayor número de células por mancha en las concentraciones probadas de 100, 150 y 200 ppm con respecto al testigo, teniendo mayor número de clones para manchas chicas.

En el tratamiento con cianato de sodio (Fig. 16) el número de células por mancha tiende a ser menor en todas las concentraciones probadas de 10, 100 y 1000 ppm con respecto al testigo, en el caso de 10 ppm el número de manchas chicas es mayor que el de grandes y gemelas, las cuales son nulas.

En los tratamientos combinados sulfato de níquel-cianato de sodio 10 (Fig. 17) el número de células por mancha se reduce en el caso de 10-100 ppm para manchas chicas con respecto al control, mientras que para las concentraciones de 10-150 y 10-200 ppm el número de células por manchas chicas es mayor con respecto al testigo, así como también para manchas grandes.

En el caso del sulfato de níquel-cianato de sodio 100 (Fig. 18) se observa disminución del número de células por mancha con respecto al testigo para manchas grandes.

En lo referente a la frecuencia de clones inducidos por 10⁵ células (frecuencia observada y frecuencia corregida), no se detectó inducción de clones ni por el sulfato de níquel ni por el cianato de sodio solos cuando se administraron por separado, así como en ninguna de las combinaciones.

Figura 15. Células por mancha inducidas por sulfato de níquel (NiSO_4).

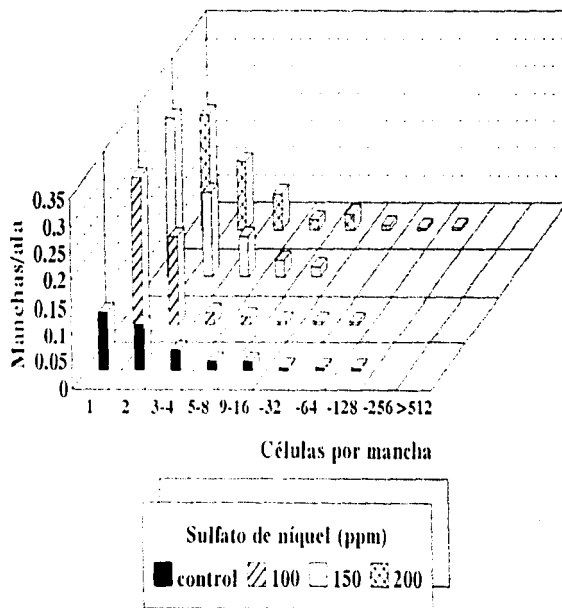


Figura 16. Células por mancha inducidas por cianato de sodio (NaOCN).

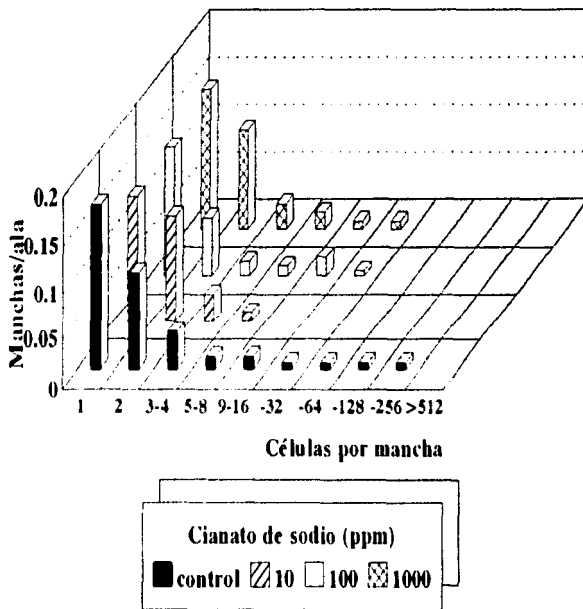


Figura 17. Células por mancha inducidas por cianato de sodio 10-sulfato de níquel (NaOCN-NiSO₄)

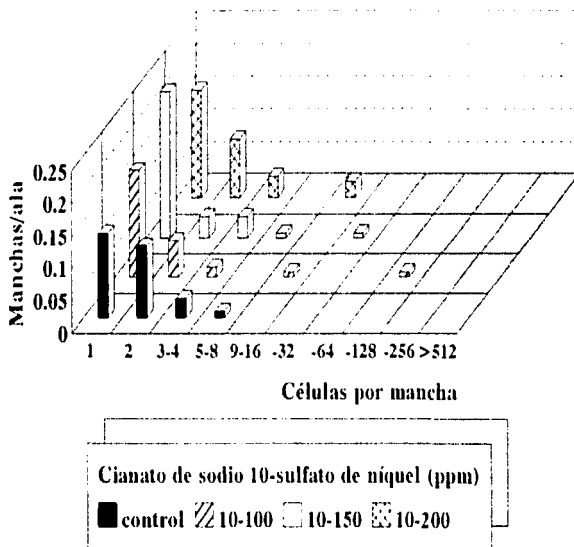
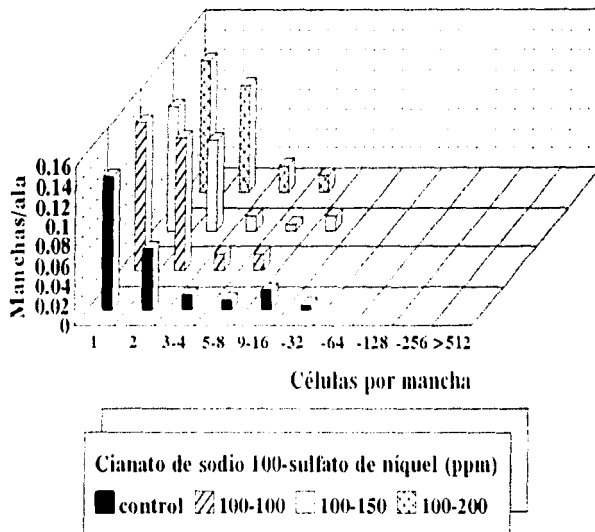


Figura 18. Células por mancha inducidas por cianato de sodio 100-sulfato de níquel (NaOCN-NiSO_4)



IV. DISCUSIÓN

El proceso de inducción de mutaciones por agentes químicos considera una serie de eventos como, la biotransformación mediada por enzimas que generan en algunos casos productos electrofílicos capaces de interactuar con el ADN. Las lesiones premutagénicas o aductos, producto de estas interacciones son con frecuencia reparadas enzimáticamente ya sea por mecanismos libres de error, en este caso la alteración no se manifiesta o bien sujeta a mecanismos que promueven y fijan mutaciones (Ramel et al., 1986 ; Waters et al., 1990).

Se considera que aproximadamente el 80% de los compuestos carcinogénicos son mutágenos activos (Cairns, 1981), ésto, aunado a la gran capacidad de inducir recombinación que tienen algunos de ellos, es otro evento importante de tomar en cuenta relacionado con la carcinogénesis.

Actualmente se han identificado un gran número de compuestos capaces de inhibir procesos carcinogénicos o mutagénicos, algunos de estos inhibidores actúan cuando se administran antes y/o simultáneamente con la exposición a los carcinógenos químicos, otros lo hacen durante la fase de promoción del proceso neoplásico e incluso algunos suprimen la formación de éste cuando la administración de los mismos se da posteriormente a la de los agentes oncogénicos (Wattenberg, 1980 y 1983).

La determinación de un mecanismo de acción de estas sustancias resulta en ocasiones complicado, no obstante puede estar relacionado con diferentes circunstancias experimentales como pueden ser: el tiempo de exposición al mutágeno o carcinógeno, el tipo de ésta y la dosis, así como las combinaciones que se pueden dar entre los agentes químicos (Orozco, 1993).

Sin embargo el propósito de las investigaciones sobre el cáncer se enfocan a encontrar compuestos menos tóxicos y más efectivos que puedan combatirlo o prevenirlo.

Las pruebas de corto plazo que han mostrado ser efectivas para la detección de mutágenos deben en principio ser capaces de

identificar antimutágenos (Clarke y Shankel, 1975; Jacobs et al., 1977; Kada e Ivone, 1978).

La Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART), fue propuesta inicialmente como una opción para estudiar la actividad genotóxica de los diversos compuestos sobre las células somáticas (Graf et al., 1984). La información acumulada hasta hoy en día con respecto a la sensibilidad y reproducibilidad de este sistema de prueba, permite afirmar que con esta metodología se puede determinar de forma preliminar el efecto genotóxico de sustancias pertenecientes a compuestos químicos de diferente grupos.

Este bioensayo además es económico y versátil dado que permite estudiar sustancias de manera individual e independiente o en combinación, además se ha probado que la SMART detecta carcinógenos mediante la asociación entre la actividad carcinogénica y la recombinogénica, pudiendo ser empleada como un filtro preliminar en la identificación de posibles anticarcinógenos a bajo costo y tiempo reducido (Muñoz, 1994).

El cianato de sodio (NaOCN) se utilizó con el propósito de valorar su efecto sobre la actividad genotóxica del sulfato de níquel (NiSO₄), el cual ha sido reportado como mutagénico en la prueba de letales recesivos ligados al sexo en *Drosophila melanogaster* (Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1986) y como un carcinógeno humano (Doll et al., 1970; Saknyn y Shabynina, 1970; Sunderman, 1977a; Hogetveit y Barton, 1977).

Los compuestos involucrados, fueron administrados tanto de manera individual como en combinación.

Para el cianato de sodio, se encontró que no hubo efecto significativo en la inducción de manchas totales con las concentraciones utilizadas (10, 100 y 1000 ppm), de tal manera que no resultó genotóxico para *Drosophila melanogaster*.

En lo referente al sulfato de níquel se incrementó de manera significativa la frecuencia de manchas totales siendo el incremento significativo también para manchas simples chicas.

En cuanto al tratamiento combinado se puede observar que la frecuencia de manchas totales no es diferente del testigo negativo

correspondiente en ninguna de las combinaciones, manteniéndose incluso frecuencias similares entre el tratamiento con cianato de sodio (10, 100 ppm) y el tratamiento combinado con el sulfato de níquel a (100, 150 y 200 ppm). Sin embargo es importante mencionar que la mayor reducción de la frecuencia de manchas correspondieron a manchas grandes y gemelas.

Allfrey et al., 1977 y Boffa, 1978, sugieren que el cianato de sodio requiere la conversión a un metabolito activo, es decir, requiere ser biotransformado para ser reactivo, por lo cual se le consideraría un compuesto de acción indirecta. La forma en la que tal activación se realiza, es desconocida, sin embargo se ha determinado que ocurre principalmente en células dañadas, lo que puede estar relacionado con una actividad diferencial de las células tumorales, en especial con relación a los niveles de proteínas sintetizadas (Cerami et al., 1973 ; Kohzuki et al., 1993; Boffa y Allfrey, 1978) y con algunos factores del microambiente en que se encuentran estas células como lo es el pH (Hu et al., 1988), dado que se han reportado diferencias en las respuestas de células tumorales al cianato de sodio tanto *in vivo* como *in vitro* con respecto al pH al que son expuestas, dando resultados más efectivos a pH ácidos, es decir un pH intersticial más bajo en los tumores que en los tejidos normales podría causar una sensibilidad mayor hacia los efectos inhibidores del cianato de sodio sobre la síntesis macromolecular.

En el presente trabajo el propósito de exponer primero a los organismos al sulfato de níquel, fue el de promover como primer evento la inducción de daño para después analizar la actividad del cianato de sodio.

Las manchas en las moscas adultas constituyen la expresión fenotípica de alteraciones al genotipo en las células precursoras de las alas (células del disco imagal del ala). Se ha estimado que las divisiones celulares requeridas para alcanzar el número de células que constituyen cada ala son 15.6, considerando que el ciclo celular de las células precursoras tiene una duración estimada de 8 horas (García-Bellido y Merriam, 1971; Szabad et al.,

1983), ello permite estimar cuántos ciclos celulares se llevaron al cabo desde que se originó el cambio en la información genética de la célula precursora, lo cual entonces determinará el tamaño de la mancha en la mosca adulta, este parámetro se denomina con el nombre de clase clonal promedio.

No obstante el tamaño de la mancha no siempre coincide con el valor esperado, dado que intervienen diversos factores como: edad de la larva al momento del tratamiento, mecanismo de acción del compuesto a probar (mutágeno o promutágeno), de ahí que variaciones en la clase clonal promedio pueden indicar interferencias en la proliferación celular.

Con el propósito de realizar un análisis completo de los efectos producidos por los compuestos, es importante tomar en cuenta no solo la clase clonal promedio, sino la distribución completa de las células por mancha para entender mejor el efecto que tienen los compuestos a las diferentes concentraciones probadas.

En el experimento con el sulfato de níquel se aprecia que la frecuencia de manchas totales aumenta significativamente, es decir hay un incremento en la formación de clones y una tendencia de éstos a ser mayores (Fig. 15). La frecuencia de células por mancha se ve incrementada en todas las concentraciones probadas con respecto al testigo negativo lo cual sugeriría un efecto promutagénico del sulfato de níquel, ya que se ve incrementada la frecuencia de manchas por ala sobre todo para manchas chicas.

En cuanto al cianato de sodio (72 X 48 h) (Fig. 16) se observó que en las tres concentraciones probadas, el tamaño de las manchas recobradas tendió a disminuir con respecto al testigo, lo cual implica que el tamaño de los clones tiende a ser menor ya que existe una mayor proporción de manchas chicas.

La frecuencia de inducción por 10^6 muestra que el cianato de sodio no induce la formación de clones extras a los originados espontáneamente.

En el tratamiento combinado, sulfato de níquel-cianato de sodio (10 ppm) se observó reducción en el número de células por

mancha por el cianato de sodio con respecto a las inducidas por el sulfato de níquel, sobre todo para manchas grandes y gemelas, obteniéndose una reducción en el número de clones con respecto al control (Fig. 15 y 17)

Para el tratamiento de sulfato de níquel-cianato de sodio (100 ppm) a las diferentes concentraciones probadas se observa una mayor reducción de células por mancha con respecto al control y comparado con los efectos producidos por el sulfato de níquel de manera individual (Fig. 15 y 18)

Los resultados obtenidos parecen indicar que el cianato de sodio actúa aparentemente como un anticarcinógeno sobre todo a 100 ppm en donde se observa un mayor efecto protector del cianato de sodio sobre el sulfato de níquel (Fig. 14) (Jiménez *et al.*, 1995).

Aunque no hay datos claros sobre el mecanismo de acción del cianato de sodio como un anticarcinógeno, no se puede excluir la posibilidad de que actúe induciendo mecanismos enzimáticos de desintoxicación como puede ser el dependiente del citocromo P-450 entre otros, o bien, dado que ambos compuestos son de acción indirecta, el cianato de sodio actúe compitiendo por sitios activos del mismo con respecto al sulfato de níquel, o bien, captando metabolitos reactivos haciendo a éstos más fácilmente excretables e impidiendo la acumulación del sulfato de níquel, o que el sulfato de níquel requiera ser acumulado para causar un mayor efecto.

Es importante mencionar que en las sustancias que incluyen metales en su composición, influyen en su forma de acción, diversas características intracelulares, lo que hace que puedan reaccionar de múltiples maneras, por ejemplo: formando iones con diferentes valencias, de lo que depende su unión a moléculas orgánicas e interferir en su función (Robinson, 1981).

Resulta evidente que hasta el momento se desconoce mucho sobre los mecanismos de acción de anticarcinógenos, sobre todo de aquellos que contienen metales, pero que sin embargo están siendo ampliamente empleados en la terapéutica contra el cáncer, mostrando, en algunos casos su efectividad y de ahí la importancia de su estudio.

La prueba de mutación y recombinación somáticas sigue siendo una vía valiosa en estudios de mutagénesis de células somáticas, además de que facilita discriminar entre la genotoxicidad de los compuestos *per se* o bien la producida por la interacción entre ellos, es necesario seguir llevando al cabo protocolos en los cuales se consideren combinaciones de las sustancias a evaluar.

V. CONCLUSIONES

De lo anterior se puede concluir que:

- 1) El sulfato de níquel (NiSO_4), administrado vía alimentación de manera subcrónica es genotóxico en células de las alas de *Drosophila melanogaster*.
- 2) El cianato de sodio (NaOCN), administrado vía oral a larvas de tercer estadio de manera subcrónica no es mutagénico.
- 3) El cianato de sodio en tratamiento subcrónico disminuye la genotoxicidad del sulfato de níquel.
- 4) La SMART permite estudiar la interacción entre dos o más compuestos.

VI. REFERENCIAS

- Abundis, M. H. M. (1994) Valoración de la genotoxicidad del Pentóxido de vanadio en células de las alas de *Drosophila melanogaster*. Comparación de tres protocolos. Tesis de Licenciatura (Biología). UNAM. México. 66 p.
- Albert, L.A. (1988) Curso básico de toxicología ambiental. 2ed. Limusa, México. 311 p.
- Allfrey, V.G., L. C. Boffa y G. Vidali (1977) Selective inhibition with sodium cyanate of protein synthesis in colon cancer cells. *Cancer (Phila)*, 40: 2692-2698.
- Altamirano, M.A. (1992) Efectos mutagénicos y alteraciones del ciclo reproductivo del ratón producidos por pentóxido de vanadio. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, UNAM, 84 p.
- Ames, B.N., W.E. Durston., E. Yamasaki y F.D. Lee (1973) Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liverhomogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 70: 2281-2285.
- Ames, B.N. (1979) Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* 204: 587-593.
- Ames, B.N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* 221: 1256-1262.
- Archivo Estadístico del Instituto Nacional de Cancerología. Datos Registrados hasta 1990.
- Baars, A.J., W.G.H. Bliejeven., G.R. Monh., A.T. Nataranjan y D.D.Breimer (1980) Preliminar studies on the ability of

Drosophila microsomal preparations to activate mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.* 72: 257-264.

Baer, R.L., D.L. Ramsey y E. Biondi (1973) The most common contact allergens. 1968-1970, *Arch. Dermatol.* 108: 74-78.

Boffa, L.D. y V.G. Allfrey (1978) Selective inhibition by sodium cyanate of protein synthesis in tumor cells. *J. Cell. Biol.* 79: 362 (A).

Brusick, D. (1987) *Principles of genetic Toxicology.* Plenum Press. Nueva York, 284 p.

Cairns, J. (1981) The origin of human cancers. *Nature*, 289: 353-357.

Carr, B.J. (1985) Chemical carcinogens and inhibitors of carcinogenesis in the human diet. *Cancer* 55: 218-224.

Carter, S.K. y R.B. Livingston (1976) Plant products in cancer chemotherapy. *Cancer, Treat. Rep.* 60 (8): 1141-1156.

Casarett, L.J. y J. Doull (1975) *Toxicology the basic science of poisons.* Mcmillan Publishing Co; Inc. 654 p.

Cerami, A. y J.M. Manning (1971) Potassium cyanate as an inhibitor of the sickling of erythrocytes *in vitro.* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68: 1180-1183.

Cerami, A., J.M. Manning., P.N. Gillette., F.G. deFuria., D.R. Miller., J.H. Graziano y C. Peterson (1973) The effect of cyanate on red blood cell sickling. *Fed. Proc.* in press.

Chandley, A.C. y A.J. Bateman (1962) Timing of spermatogenesis in *Drosophila* using tritiated thymidine. *Nature* 20: 229-300.

- Clarke, C.H. y D.M. Shankel (1975) Antimutagenesis in microbial systems. *Bacteriol. Rev.* 39: 33-53.
- Corbett, T.H., C. Heidelberger y W.F. Dove (1970) Determination of the mutagenic activity to bacteriophage T4 of carcinogenic and noncarcinogenic compounds. *Mol. Pharmacol.* 6: 667-679.
- De Flora, S. y C. Ramel (1988) Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. *Mutat. Res.* 202: 285-306.
- De Serres, F.J. (1979) Evaluation of test for mutagenicity as indicators of environmental mutagens and carcinogens. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 84: 75-84.
- Doll, R. (1958) Cancer of the lung and nose in nickel workers. *Br. J. Indust. Med.* 15: 217-223.
- Doll, R., L.G. Morgan y F.E. Speizer (1970) Cancer of the lung and nasal sinuses in nickel workers. *Br. J. Cancer.* 24: 623-632.
- Frei, H. y F.E. Würigler (1988) Statistical methods to decide whether mutagen test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203: 297-308.
- Frölich, A. (1989) Genotoxizitätsprüfung mit *Drosophila melanogaster*: Neue testerstämme mit erhöhter metabolischer Kapazität, Tesis No. 8850. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland.
- García-Bellido, A. y J.R. Merriam (1971) Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Dev.*

Biol. 24: 61-87.

García-Bellido, A. y J. Dapena (1974) Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila*. *Molec. Gen. Genet.* 128: 117-130.

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

Gilman, G.A. (1992) *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 9ed. Panamericana, México. 1751 p.

Graf, U., H. Juon., A.J. Katz., H.J. Frei y F.E. Würgler (1983) A pilot study on a new *Drosophila* spot test. *Mutat. Res.* 120: 233-239.

Graf, U., F.E. Würgler., A.J. Katz., H.J. Frei., H. Juon., C.B. Hall y P.G. Kale (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6: 153-188.

Hellman, K. (1972) Anticancer drugs. *Chem. Brit.* 8 (2): 69-72.

Hogetveit, A.C. y R.T. Barton (1977) Monitoring nickel exposures in refinery workers, in: E. Brown (Ed.), *Clinical Chemistry and Chemical Toxicology of Metals*, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

Hu, J.J., A. Luke., M. Chellani., K.A. Zirvi y M.A. Lea (1988) pH-related effects of sodium cyanate on macromolecular synthesis and tumor cell division. *Biochem. Pharmacol.* 37: 2259-2266.

IARC (1976) *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man*, Vol II Cadmium, Nickel, Some Epoxydes,

Miscellaneous Industrial Chemical and General Considerations on Volatile Anesthetics, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 34-74.

ICRP (1974) Report of the Task Group on Reference Man, International Commission on Radiological Protection, Publ. 23. Pergamon, Oxford.

Index Merck (1992) Encyclopedia of chemical and drugs. Published by Merck and Co; Inc. Rahway. Nueva York. 13 ed. 1611 pp.

Jacobs, M.M., B. Jansson y A.C. Griffin (1977) Inhibitory effects of selenium on 1,2 dimethylhydrazine and methylazoxymethanol acetate induction of colon tumors. *Cancer. Lett.* 2: 133-138.

Jiménez, M. I., P. G. S. Orozco., P. M. Ramos (1995) Efecto del cianato de sodio (CNNaO) sobre la genotoxicidad del sulfato de níquel (NiSO₄) en la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en alas de *Drosophila melanogaster*. Memorias del VI Congreso Nacional de Genética., Xalapa, Ver. México. pp. 106-103.

Kada, T., y T. Ivone (1978) Antimutagenic actions of vegetable factors on mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutat. Res.* 53: 351-353.

Kazarantzis, G. y L. Lilly (1979) Mutagenic and carcinogenic effects of metals, in : L. Friberg, G.F. Nordberg and U.B. Vouk (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, Amsterdam, pp. 237-272.

Kilbey, B. J., D. J. MacDonald., F. S. Sobels y E. W. Vogel (1981) The use of *Drosophila melanogaster* in test for environmental mutagens. *Mutat. Res.* 85: 141-146.

- Kogo, M., T. Kurimoto., H. Koisumi., J. Nishio., T. Matsuya (1992) Respiratory activities in relation to palatal muscle contraction. *Cleft.Palate.Craniofact.J.* 29(2): 174-178.
- Kohzuki, H., Y. Enoki., S. Shimizu y S. Sakata (1993) High blood O₂ affinity and relationship of O₂ uptake and delivery in resting muscle. *Respir-Physiol* 92 (2): 197-208.
- Kupchan. S.M. (1974) Novel natural products with antitumor activity. *Fed. Prod.* 33: 2288- 2295.
- Lau, T.J., R.L. Hackett y F.W. Sunderman Jr. (1972) The carcinogenicity of intravenous nickel carbonyl in rats. *Cancer Res.* 32: 2253-2258.
- Lea, M.A., M.R. Koch y H.P. Morris (1975) Tumor selective inhibition of incorporation of ³H-labeled amino acids into protein by cyanate. *Cancer Res.* 35: 2321-2326.
- Leonard, G. B., Gerber y P. Jacquet (1981) Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of Nickel. *Mutat. Res.* 87: 1-15.
- Lindsley, D.L. y R. Grell (1968) *Genetic variations of Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington, Publication. Washington. 472 p.
- Lindsley, D.L. y G. Zimm (1990) *The genome of Drosophila melanogaster*. Parte 4: Genes L-2, Balancers, transposable elements. *Dros. Inf. Serv.* 68: 382 p.
- Loprieno, N. (1980) General principles of genetic Toxicology and methods for mutagenesis assesment. En: *The principles and methods in modern toxicology*. (C.L. Galli., S.D. Murphy y R. Paoletti, Eds.), Elsevier, Holanda.

- Maldonado, L. J. (1994) Comparación entre la estructura química y la actividad mutagénica de cinco compuestos orgánicos en células del ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura (Biología). UNAM. México 60 p.
- Maron, D.M. y B.N. Ames (1983) Revised methods for *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113: 173-215.
- Matsushima, T., T. Kakizoe., T. Kawachi., K. Hara., T. Sugimura., T. Takuchi y H. Umezawa (1976) Effects of protease inhibitors of microbial origin on experimental carcinogenesis. *Fundamentals in Cancer Prevention.* 57-68.
- Miyaky, M., I. Murata., M. Osabe y T. Ono (1977) Effect of metal cations on misincorporation by *E. coli* DNA polimerases. *Biophys. Res. Commun.* 77: 854-860.
- Morgan, J.C. (1958) Some observations on the incidence of respiratory cancer in nickel workers. *Br. J. Indust. Med.* 15: 224-234.
- Muñoz, M. J. A. (1994) Caracterización del Potencial Genotóxico y protector de *Ipomea orizabensis* en Células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura (Biología). UNAM. México. 65 p.
- Nielsen, F.H. (1977) Nickel toxicity in: R.A. Goyer and M.A. Mehlman (Eds.), *Advances in modern Toxicology*, Vol. 2, *Toxicology of Trace elements, Hemisphere.* Washington, D.C; 129-146 p.
- Nielsen, G.D., A.E. Rohol., K.E. Andersen (1992) Nickel contact sensitivity in the guinea pig. An efficient open application test method. *Acta-Derm-Venereol-stock.* 72(1): 45-48.

TESIS NO DEBE
LA BIBLIOTECA

Norton, T.R. (1975) Metabolism of Toxic substances. En: Toxicology, the basic science of poisons. (L.J. Casaret y J. Doull, Eds.), Macmillan, Pub.Co. Nueva York, pp. 45-132.

Nöthiger, R. (1970) Sucrose density separation: a method for collecting large numbers of *Drosophila* larvae. *Dros. Inf. Serv.* 45: 177.

Onho, H., F. Hanaoka y M. Yamada (1982) Inducibility of sister chromatid exchanges by heavy metals ions. *Mutat. Res.* 104: 141-145.

Orozco, S.P.G. (1993) Efecto protector de la vitamina E y de los β -carotenos en contra de la mutagenicidad de la mitomicina-C (MMC) en la prueba somática de ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología). UNAM México. 109 p.

Paez, S.Y. (1996) Calibración del protocolo para evaluar anti-mutágenos en la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en alas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura (Biología) UNAM. México. 66 p.

Pedersen, E., A.C. Hogetveit y A. Andersen (1973) Cancer of respiratory organs among workers ata nickel refinery in Norway. *Int. J. Cancer.* 12: 32-41.

Pratt, W. y M.D. Ruddon (1979) *The anticancer drugs*. Nueva York, Oxford University Press. Nueva York, 323 p.

Ramel, C., U. K. Alekperov., B. N. Ames., T. Kada y L. W. Wättenberg (1986) Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. Report by ICPEMC expert group on antimutagens and desmutagens. *Mutat. Res.* 168: 47-65.

- Ranis, A.S., D.Q. Qu., M.K. Sidhu., F. Panagakos., V. Shah., K.M. Klein., N. Brown., S. Pathak y S. Kumar (1993) Transformation of immortal; non-tumorigenic osteoblast-like human osteosarcoma cells to the tumorigenic phenotype by nickel sulfate. *Carcinogenesis*. 14(5): 947-953.
- Rasanen, L. y M.L. Tuomi (1992) Diagnostic value of the lymphocyte proliferation test in nickel contact allergy and provocation in occupational coin dermatitis. *Contact Dermatitis*. 27(4): 250-254.
- Ridgway, L.P. y D.A. Karnofsky (1952) The effects of metals on the chick embryo: Toxicity and production of abnormalities in the development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 55: 203-215.
- Rivedal, E. y T. Sanner (1980) Synergistic effect on morphological and benzo(a)pyrene. *Cancer Lett.* 8: 203.
- Robinson, K.A (1981) Concerning the form of biochemically active vanadium. *Proc. R. Soc. London Ser. B*212: 65-84.
- Rodríguez-Arnaiz, R. y M.P. Ramos (1986) Mutagenicity of nickel sulphate in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 170: 115-117.
- Rodríguez-Arnaiz, R. y M.P. Ramos (1992) *Drosophila* como sistema para detectar agentes genotóxicos. Serie de Genética: los pequeños manuales. Prensa de Ciencias. Facultad de Ciencias UNAM. 50 p.
- Rondia, D. (1979) Sources, modes and levels of human exposure to nickel and chromium. in: E. Di Ferrante (Ed.), *Trace metals, Exposure and Health Effects*, Pergamon, Oxford, pp. 117-134.
- Sainsbury, M. (1979) Natural products in the fight against cancer. *Chem. Brit.* 15: 127-130.

- Saknyn, A.V. y N.K. Shabynina (1970) Some statistical data on carcinogenous hazards for workers engaged in the production of nickel from oxidized ores. *Gig.Trud.Prof.Zabd.* 14: 10-13.
- Saknyn, A.V. y N.K. Shabynina (1973) Epidemiology of malignant neoplasms in nickel plants. *Gig.Trud.Prof.Zabd.* 17: 25-28.
- Schroeder, H.A., J.J. Balassa y W.H. Vinton Jr. (1964) Chromium, nickel and titanium in mice: Effect on mortality, tumors and tissue levels, *J. Nutr.* 83, 239-250.
- Schroeder, H.A., M. Mitchener (1971) Toxic effects of trace elements on the reproduction of mice and rats, *Arch. Environ. Health.* 23, 102-106.
- Shamberger, R.J. (1979) Beneficial effects of trace elements, in: Oehme (Ed.), *Toxicity of Heavy Metals in the Environmental*, Part.2 Marcel Dekker. New York. pp. 689-796.
- Shenouda, G., M. Hutchinson, A. Noe, L. Panasci (1993) Alteration of the systemic antitumor activity of melphalan by sodium cyanate in MOPC-460D myeloma bearing BALB/C mice. *J. Surg. Oncol.* 52(2): 110-114.
- Singh, I. (1984) Induction of gene conversion and reverse mutation by manganese sulphate and nickel sulphate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 137: 47-49.
- Sirover, M.A. y L.A. Loeb (1976) Infidelity de DNA synthesis *in vitro*, screening for potential metal mutagens or carcinogens. *Cience.* 194: 1434-1436.
- Sporn, M.B. (1977) Prevention of epithelial cancer by vitamine A and its synthetic analogus (retinoids). In: H.H. Hiatt, J.D. Watson y J.A. winsten (eds), *Origins of Human Cancer*. N.Y.

Cold Spring Harbor Publications. pp. 801-807.

- Sporn, M.B., D.L. Newton., J.M. Smith., N. Acton., R.E. Jacobson y A. Brossi (1979) Retinoids and cancer prevention: The importance of the terminal group of the retinoid molecule in modifying activity and toxicity. In: A.C. Griffin and C.R. Shaw (eds), **Carcinogens: Identification and Mechanisms of action**. New York: Raven Press. pp. 441-453.
- Stark, G.R. y D.G. Smyth (1963) The use of cyanate for the determination of NH₂-terminal residues in proteins. *S. Biol. Chem.* 238: 214-226.
- Stock, J.A. (1970) Chemotherapy of cancer. *Chem.Brit.* 6(1): 11-16.
- Sunderman Jr. F.W. (1973) The current status of nickel carcinogenesis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 3: 156-180.
- Sunderman Jr. F.W. y E. Mastromatteo (1975) Nickel carcinogenesis, in F.W. Sunderman Jr., F. Coulston., G.L. Eichhorn., J.W. Fellows., E.Mastromatteo., H.T. Reno y M.H. Samitz. (eds), **Nickel, National Academy of Science**. Washington, D.C. 97-143 p.
- Sunderman Jr. F.W. (1977a) Metal carcinogenesis in: R.A. Goyer and M.A. Mehlman (eds). **Advances in Modern Toxicology, Vol.2, Toxicology of Trace Elements**, Hemisphere. Washington, D.C. 257-295 p.
- Sunderman Jr. F.W., S.K. Shem., M.C. Reid, y P.R. Allpass (1980) Teratogenicity and embriotoxicity of nickel carbonyl in Syrian Hamsters, in: M. Anke, H.J., Schneider y Chr. Bruecker (eds), **3. Spurenelement-symposium Nickel**, Karl Marx Universität, Leipzig, Friedrich. Schiller Universität.

Jena. pp. 301-307.

Sutherland, R.B. (1959) Summary report on respiratory cancer mortality at the INCO Port. Colborne Refinery, Department of Health. Toronto. 153 p.

Szabad, J., I.Sos., G. Polgar y G. Hejja (1983) Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal test. *Mutat. Res.* 113: 117-133.

Vega, S.G. (1985) Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. *Toxicología IV. Carcinogénesis Química* Centro Panamericano de Ecología Humana y de Salud, Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud. 59 p.

Viaje, A., T.J. Staga., M. Wigler y B. Weinstein (1977) Effects of anti-inflammatory agents on mouse skin tumor promotion, epidermal DNA synthesis phorbol ester-induced cellular proliferation and production of plasminogen activator. *Cancer Res.* 37: 1530-1536.

Vogel, E. W. (1974) Some aspect of detection of potential mutagens in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 29: 241-250.

Vogel, E.W. y A. Szakmary (1990) Basic principles and evaluation of results of assays measuring genotoxic damage in somatic cells of *Drosophila*. In: *Mutation and the environment, part.B.* pp. 149-158.

Vogel, E.W. (1992) Genotoxic chemicals an introduction into the basic principles of genetic toxicology. *Laboratorium voor Stralengenetica en Chemische Mutagenese, RU Leiden, Sylvius Laboratoria.* (Curso).

- Waksvik, H., M. Boyseen., A. Broegger., H. Saxholm y A. Reith (1980) *In vivo* and *in vitro* studies of mutagenicity and carcinogenicity of nickel compounds in man. Tenth Annual Meeting EEMS. Athens, Poster. 32 p.
- Waters, M.D., A.L. Brady., H.F. Stack y H.E. Brockman (1990) Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutat. Res.* 238: 57-85.
- Wattenberg, L.W. (1974) Inhibition of carcinogenic and toxic effects of polycyclic hydrocarbons by several sulfur-containing compounds. *J. Natl. Cancer. Inst.* 52: 1583-1587.
- Wattenberg, L.W. (1977) Inhibition of carcinogenic effects of polycyclic hydrocarbons by benzyl isothiocyanate and related compounds. *J. Natl. Cancer Inst.* 58: 395-398.
- Wattenberg, L.W. (1979) Inhibitors of carcinogenesis. In: A.C. Griffin and C.R. Shaw (eds.), *Carcinogens: Identification and Mechanisms of Action*. New York: Raven Press. pp. 219-316.
- Wattenberg, L.W. (1980) Inhibitors of carcinogenesis in the rats. colon. *Adv. Cancer Res.* 27: 13-21.
- Wattenberg, L.W. (1983) Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Res. Suppl.* 43: 2448-2453.
- Wilkins, A.J. (1986) *Genetic analysis of animal development*. Wiley. Nueva York. 546 p.
- Zijlstra, J.A. (1987) Pharmacological and mechanistic aspects of chemically induced mutagenesis in *Drosophila melanogaster* Druk:krips Repro Meppel. pp. 7-20.

Zimering, S. (1975) Utility of *Drosophila* for detection of potential environmental chemical mutagens. Ann. N.Y. Acad. Sci. 269: 26-33.