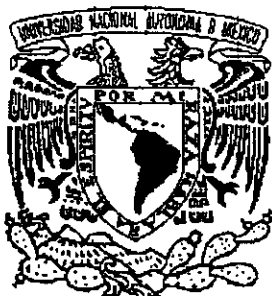


61
2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO**



**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES IZTACALA**

**Participación de la reparación en el daño
inducido por mutágenos con diferente
actividad química: N-nitrosodimetilamina
(DMN), Metil-metano-sulfonato (MMS),
Colchicina, Azida de sodio y Cloruro de
Plomo.**

T E S I S

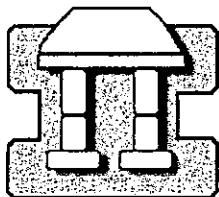
QUE PRESENTA:

HUGO RIVAS MARTÍNEZ

PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES



**LOS REYES IZTACALA
EDO. DE MÉXICO**

1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

278840



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.

*¿Porqué los hombres quieren conocer el universo,
cuando aún no descubren los secretos
que encierra una hoja de pasto?*

The Dark Knight Returns

SEÑOR:

En los momentos más difíciles de mi vida, me diste claridad en la oscuridad, me guiaste cuando más desorientado estaba, me confortaste cuando la desesperanza me invadía y todo esto quizá sin merecerlo; este trabajo te lo debo a ti, gracias Señor por escucharme y estar cerca de mi.

PAPÁ y MAMÁ:

Gracias por todos los consejos, ayuda, educación, valores y sobre todo del amor que me han dado, este trabajo y todo lo que haga en mi vida es por y para ustedes; Papá no se como agradecer la inmensa fortuna que Dios me dio, al haberme elegido para ser su hijo; Mamá, Dios me premio, pues me dio la gracia de que haya sido usted mi Reina.

HERMANAS:

Cecilia; me enseñaste a amar lo que hago.

Carmen; me apoyas cuando más lo necesito.

Laura; tu ayuda es invaluable.

Irma; me escuchas.

HERMANOS:

Pablo; la honestidad la aprendí de ti.

Daniel; me enseñaste a ser responsable.

CUÑADOS:

Agustín, Lucía y Javier; su apoyo incondicional y lo que me han enseñado han sido importantes y fundamentales para este logro.

SOBRINOS:

Alonso, Abigail, Ingrid, Alfonso, Diego y Alan; todas sus preguntas hicieron que me esforzara más para contestarlas, y sin saberlo me ayudaron a aprender más.

YADIRA:

Tú eres parte de este trabajo, sin tu ayuda, consejo y apoyo quizá no lo hubiera logrado, gracias por estar conmigo, gracias por ser tu, gracias por todo.

***A TODOS USTEDES LES DEDICO ESTE
TRABAJO.***

GABRIELA:

Gracias por enseñarme cosas de la vida que no conocía.

HÉCTOR:

Gracias, por ayudarme a poner los pies en la tierra cuando lo necesitaba,
a volar cuando lo merecía y ver a la Ciencia con respeto, esto sólo un
amigo lo hace.

MARIBEL:

Gracias, por mostrarme que aún en el lugar más pequeño hay esperanza.

BLANCA:

Gracias, por darme el placer de una agradable discusión.

HÉCTOR ABUNDIS:

Gracias por enseñarme el manejo de *Drosophila melanogaster*, no cabe
duda sin tu ayuda simplemente este trabajo no tendría la materia prima
que se requiere: moscas.

Doctora Patricia Ramos Morales, maestra gracias por la oportunidad, paciencia y confianza que me ha brindado, así como por su orientación y enseñanza en esta área de la investigación.

A los Sinodales:

Maestro en Ciencias Sergio Vaca Pacheco

Bióloga Irma Elena Dueñas García

Doctor Diego Arenas Aranda

Biólogo Elías Piedra Ibarra

Gracias por sus atenciones y valiosos comentarios.

A todos los miembros del Laboratorio de Genética, los que están y los que ya no están, les agradezco profundamente todo su apoyo, ayuda, consejo y la orientación que me brindaron, con los cuales este trabajo pudo ser posible.

Este trabajo no sería posible, si no hubiera hombres que dedicaron su vida a la investigación de los mecanismos de reparación del ADN en *Drosophila melanogaster*, de la manera más humilde agradezco y dedico a estos hombres este trabajo.

**Este trabajo fue realizado en su totalidad en el Laboratorio de Genética
"Theodosius Dobzhansky" de la Facultad de Ciencias de la Universidad
Nacional Autónoma de México.**

Con el apoyo otorgado por:

La Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)

Proyecto IN-207196-UNAM

*Rápidas moscas de blanco fuego,
animales pequeños, ¡pequeño fuego errante!
ven, pequeño ágil, nocturno y brillante.*

*Regálame la mágica luz de
tu llama blanca y clara,
de tu pequeña antorcha de estrellas.*

Xokonoschtletl, "Lo que nos susurra el viento"

"Entre la Biblia de Jerusalén y estas moscas que andan por ahí volando,

prefiero a estas moscas por tres razones:

Porque son pútridas y blancas con los ojos azules

y lo procrean todo en el aire como riendo.

Por ese velocísimo de su circunstancia

que ya lo sabe todo antes del Génesis.

Por, además, leer el mundo como hay que leerlo: de la putrefacción a

la ilusión."

Gonzalo Rojas, "Daimón del domingo"

*La luz de tu cuerpo son tus ojos,
si tus ojos son limpios,
todo tu cuerpo estará iluminado
pero si tus ojos son sucios
todo tu cuerpo será obscuro.*

Mateo VI, 22-23.

ÍNDICE

| | |
|----------------------------------------------------------------|----|
| ● RESUMEN..... | i |
| ● INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| * TOXICOLOGÍA GENÉTICA..... | 1 |
| * SISTEMAS DE PRUEBA..... | 2 |
| * <i>Drosophila melanogaster</i> COMO SISTEMA DE PRUEBA..... | 3 |
| * PRUEBA DE REPARACIÓN DEL ADN DE <i>D. melanogaster</i> ... 5 | |
| * REPARACIÓN DEL ADN EN <i>Drosophila melanogaster</i> | 11 |
| ♦ REPARACIÓN POR ESCISIÓN..... | 12 |
| ♦ REPARACIÓN POSTREPLICATIVA..... | 14 |
| ♦ GENES MEIÓTICOS..... | 16 |
| ▪ <i>mei 9^a</i> | 16 |
| ▪ <i>mei 41^{DS}</i> | 19 |
| ● OBJETIVO..... | 22 |
| ● MATERIALES Y MÉTODOS..... | 22 |
| * COMPUESTOS..... | 22 |
| ♦ N-NITROSODIMETILAMINA (DMN)..... | 22 |
| ♦ METIL METANOSULFONATO (MMS)..... | 24 |
| ♦ COLCHICINA..... | 25 |
| ♦ AZIDA DE SODIO | 26 |
| ♦ CLORURO DE PLOMO..... | 26 |
| * LÍNEAS DE <i>Drosophila melanogaster</i> | 28 |
| * OBTENCIÓN DE LARVAS..... | 31 |
| * TRATAMIENTOS..... | 31 |
| * ANÁLISIS DE RESULTADOS..... | 32 |
| ● RESULTADOS..... | 34 |
| ● DISCUSIÓN..... | 38 |
| ● CONCLUSIONES..... | 52 |
| ● BIBLIOGRAFÍA..... | 53 |

RESUMEN

En el área de la toxicología genética, la implementación de nuevas metodologías incluye dos aspectos principales: la comprobación de la eficiencia de la metodología con base en las condiciones del laboratorio, el siguiente paso es alcanzar la reproducibilidad en los resultados obtenidos con respecto a los de otros laboratorios. Mediante este proceso, la información obtenida es considerada válida por parte de organizaciones ambientales que regulan la calidad de la información reportada. En la prueba de reparación del ADN de *Drosophila melanogaster* se utilizan moscas portadoras de dos genes recesivos ligados al sexo que les confiere deficiencia en los mecanismos de reparación por escisión (*mei 9^o*) y reparación postreplicativa (*mei 41^{PJ}*). La presencia de estos genes no se manifiesta en una expresión fenotípica distinguible por lo que se recurre al empleo de un cromosoma balanceador (*FM7*). La progenie derivada de esta cruce es de 4 tipos: hembras homocigótas para las dos mutaciones, deficientes en reparación; hembras heterocigótas, proficientes en reparación; machos hemicigótos portadores de las dos mutaciones, deficientes en reparación; machos portadores del cromosoma balanceador, proficientes en reparación. La ventaja de este sistema *in vivo* es que el daño que un compuesto pueda ocasionar al ADN puede ser registrado independientemente del sexo, comparando la supervivencia de las moscas deficientes con las proficientes, todas recuperadas de un mismo frasco de tratamiento, bajo las mismas condiciones de experimentación.

En este trabajo se comparó el efecto de compuestos con diferente actividad química con respecto a la inducción de daño al ADN: N-nitrosodimetilamina (DMN), promutágeno alquilante; Metil-metanosulfonato (MMS), mutágeno alquilante; Colchicina, aneuploidógeno, al inductor de recombinación, Azida de sodio (NaN₃) y Cloruro de plomo, genotóxico.

Los resultados mostraron que, en comparación con Metil-metanosulfonato, la N-nitrosodimetilamina induce una mayor proporción de alteraciones en las que se requiere la participación de la reparación por escisión y de la reparación postreplicativa, al disminuir significativamente la sobrevivencia de los organismos deficientes en reparación, en tanto que los tratados con colchicina y azida de sodio no presentaron diferencias significativas en la sobrevivencia entre las moscas proficientes y las deficientes en reparación, ambos compuestos fueron altamente tóxicos para las moscas tratadas; el cloruro de plomo no afectó la sobrevivencia de ninguno de los tipos de moscas tratadas.

La prueba de reparación del ADN de *Drosophila melanogaster*, detectó la actividad de compuestos que alteran directamente al ADN (MMS y DMN), esto se ve reflejado en el menor índice de sobrevivencia de los organismos deficientes en reparación en relación con los proficientes. La colchicina y la azida de sodio, son dos compuestos que provocan alteraciones a otros niveles, ambos compuestos disminuyeron en igual forma, la sobrevivencia de las moscas pro y deficientes en reparación, por lo que la respuesta obtenida se considera negativa para esta prueba y concuerda con lo esperado para estas substancias. Los resultados obtenidos con los compuestos alquilantes así como con colchicina, coinciden con los publicados para la misma prueba por Fujikawa (1988) y Negishi (1991). Se ha sugerido que en *E. coli* y *S. typhimurium* la azida de sodio podría interferir en la reparación por escisión (Kleinhofs 1976), los resultados obtenidos apoyan parcialmente lo anterior, ya que este compuesto disminuyó por igual la sobrevivencia de todas las moscas tratadas. La actividad de la azida de sodio que se manifiesta *in vivo* como recombinogénico mitótico (lo cual incluye rompimiento y reunión del ADN) implica un tipo de interacción con el ADN esto implica un tipo de interacción con el ADN que ha sido reportado por González y Ramos (1997), quienes han

mostrado que la actividad recombinogénica está limitada a las moscas libres de inversión, mientras que en las hembras y machos portadores de un cromosoma balanceador, o en los machos hemicigotos (Ramos-Morales y Ordaz, 1999), no se observa efecto genotóxico, pero sí se aprecia pérdida por letalidad de una fracción de los organismos tratados; así, dada la presencia del cromosoma *FM7* en las moscas proficientes en reparación y de la doble mutación en las deficientes en reparación, no se esperaba diferencia en el efecto de la azida en los dos tipos de moscas, por lo que la respuesta obtenida se considera negativa para esta prueba y concuerda parcialmente con lo esperado para esta substancia. La genotoxicidad del plomo, no pudo ser detectada mediante esta prueba, los resultados obtenidos son negativos en el análisis de este metal, tampoco provoca alteraciones a otros niveles celulares, ya que la sobrevivencia de todas las moscas tratadas no se altero y no fue diferente a la de su testigo concurrente.

La prueba de reparación del ADN de *Drosophila melanogaster* es una metodología que permite discriminar la actividad de los compuestos ensayados; es una prueba *in vivo* de fácil manejo, los resultados se obtienen en menos de una generación (<10 días), es económica, confiable y sensible. Esta prueba es una alternativa que complementa a otras metodologías de *Drosophila melanogaster*, lo que enriquece la comprensión de los distintos mecanismos de acción de genotóxicos.

La prueba utilizada en este estudio mostró una serie de ventajas: es una alternativa importante en estudios de mutagénesis ya que se recobran resultados a partir de concentraciones menores a las utilizadas en otras metodologías, es una metodología *in vivo*, lo que la hace sumamente valiosa ya que existen muy pocos sistemas de prueba que detecten este tipo de efecto *in vivo* y que reúnan la complejidad de este eucarionte; es una metodología económica que proporciona resultados en un tiempo relativamente breve y es de fácil ejecución.

Una desventaja importante es la construcción del sistema de cruza, ya que debido a las características de los marcadores, se requiere utilizar cromosomas compuestos y balanceadores, lo que limita la capacidad de detección de la prueba. Una alternativa para mejorar la detección de la inducción de daño al ADN es correr paralelamente experimentos con moscas de tipo silvestre, las cuales son proficientes en reparación y no portan cromosomas balanceadores ni cromosomas compuestos, así, la comparación entre la sobrevivencia de las moscas silvestres podría ser útil para determinar el efecto del cromosoma balanceador en el sistema de cruza y se podría discriminar más confiablemente la participación de la recombinación entre cromosomas homólogos como una estrategia para reparar el daño inducido por compuestos recombinogénicos como la azida de sodio.

INTRODUCCIÓN

• TOXICOLOGÍA GENÉTICA

La rápida industrialización y urbanización, ha elevado los niveles de contaminantes en el ambiente y con ello, el riesgo que implica para los seres vivos (Chakravarty, 1992). Un agente genotóxico es aquel que produce alteraciones en los ácidos nucleicos, lo que provoca modificaciones en las características hereditarias. Algunas sustancias genotóxicas comparten propiedades fisicoquímicas que facilitan la interacción con el ADN y que se han asociado a la presencia de grupos químicos particulares. La toxicología genética es el estudio del efecto de la toxicidad de estos contaminantes en los procesos genéticos, dichos estudios pueden ser usados para medir el potencial de inducción de efectos mutagénicos, carcinogénicos o teratogénicos (Winder, 1993). La toxicología genética tiene como objetivos: la implementación de pruebas y métodos de evaluación para definir el impacto de agentes genotóxicos encontrados en el ambiente y cuya presencia pueda implicar un riesgo a la integridad del genoma humano, así como la determinación de sus mecanismos de acción (Casarett, 1975).

Entre las diversas herramientas de la toxicología genética están los sistemas de prueba.

• SISTEMAS DE PRUEBA

Varias son las características de un sistema de prueba ideal: bajo costo, corta duración, que permita detectar un amplio rango de eventos genéticos, reproducibilidad en la respuesta, que detecte compuestos que requieren activación metabólica y que sea capaz de producir una descendencia numerosa. Estos sistemas van desde bacterias hasta mamíferos (Rubin, 1988).

El uso de metodologías experimentales para estudiar genotoxicidad contribuye a la identificación de compuestos con actividad potencialmente peligrosa para los seres vivos. Los diferentes eventos terminales se estudian tanto en células germinales y somáticas, así como *in vivo* e *in vitro*. En la genotoxicidad de un compuesto participan factores como metabolismo, edad, sexo y la constitución genética de los organismos; además de aspectos relacionados con la naturaleza química de los compuestos, su estabilidad, permanencia y persistencia en el ambiente, así como el tipo de interacción que se establezca entre el compuesto o sus metabolitos con el ADN o la maquinaria celular; en consecuencia, la capacidad de los organismos para reparar el daño genético es una función primordial en su sobrevivencia, ya que la correcta expresión del genoma celular y la fiel transmisión de la información a la siguiente generación depende en gran medida de la eficiencia de los mecanismos de reparación del ADN (Dusenbery, 1996).

• *Drosophila melanogaster* COMO SISTEMA DE PRUEBA

Por muchos años la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* a sido un organismo prominente en la investigación genética (Russell, 1998), esto ha permitido que numerosos genes que se expresan fenotípica o genotípicamente, estén perfectamente mapeados en sus cuatro cromosomas, además de contar con distintos arreglos cromosomicos (Fig. 1) (Mitchell, 1984), su ciclo de vida es corto de 10–12 días (Fig. 2) (Graf, 1992), además que cuenta con el sistema enzimático dependiente del citocromo P-450 y el sistema del citocromo oxidasa, los cuales permiten activar metabólicamente promutagenos (aminas aromáticas, hidrocarburos policíclicos aromáticos, entre otros) a su forma mutagenica, este tipo de activación es similar a la que ocurre en mamíferos (Fig. 3) (Mitchell 1984).

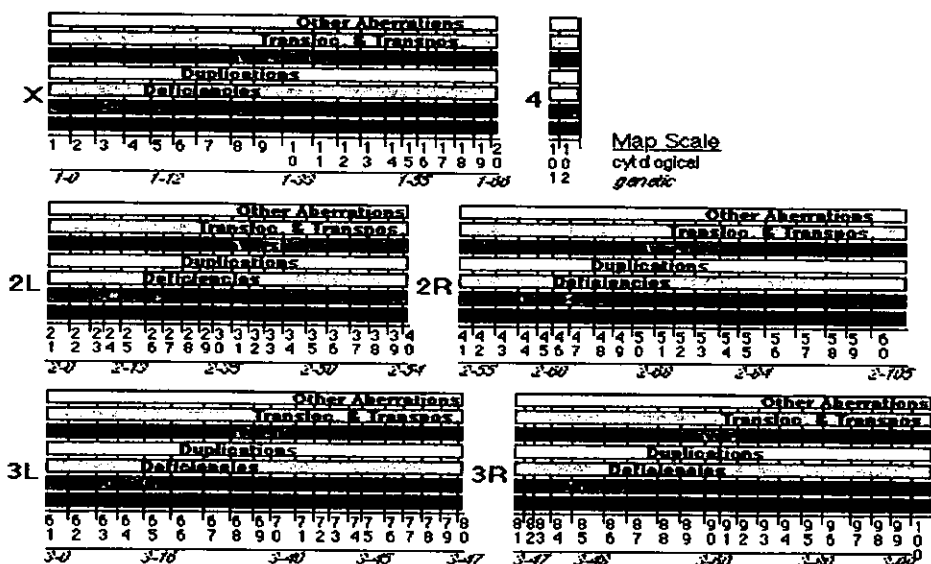


Fig. 1 Cromosomas de *Drosophila melanogaster*, mapa genético y arreglos

cromosomicos. Tomado de Fly Database, 1998.

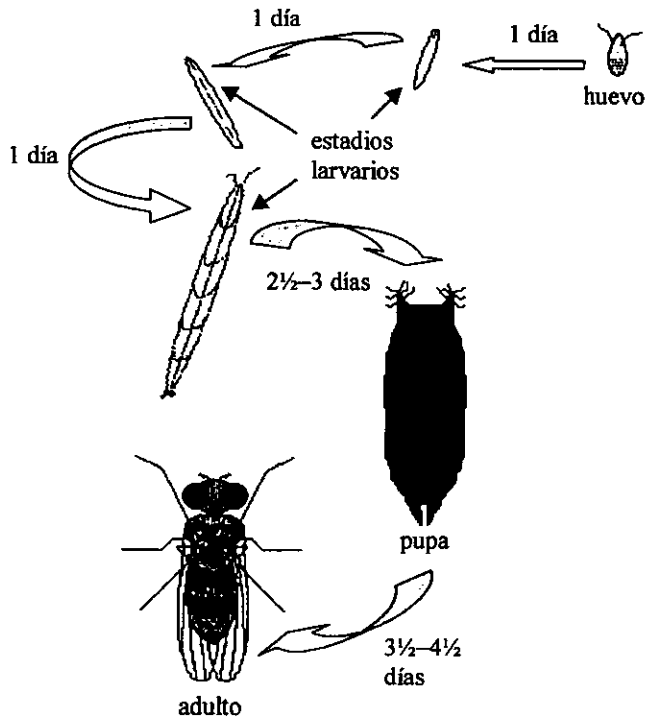


Fig. 2 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. Tomado de Russell, 1998.

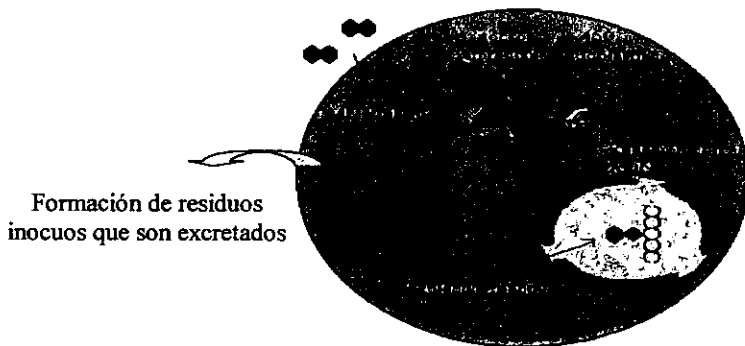


Fig. 3 Esquema de la activación metabólica de compuestos químicos, por el citocromo P-450. Tomado de Friedberg, 1984.

Estas características además de su fácil manejo y costo de mantenimiento relativamente bajo, han permitido que *Drosophila melanogaster* sea considerado un organismo ideal como sistema de prueba en la toxicología genética (Rubin, 1988). Se han implementado metodologías para detectar genotoxicidad en: células germinales, prueba de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo (SLRLT y DLT), prueba de pérdida cromosómica y no disyunción (SCLT); en células somáticas, la prueba de mutación y recombinación somática en ala y ojo (SMART) y la prueba de reparación del ADN (DNART) (Mitchell, 1984).

• PRUEBA DE REPARACIÓN DEL ADN DE *Drosophila melanogaster*.

El uso de diferentes metodologías experimentales para estudiar genotoxicidad, que involucran organismos con deficiencias en los sistemas de reparación, contribuye a identificar a aquellos compuestos con actividad potencialmente peligrosa, ya que intervienen directamente con la estructura del ADN (Wood, 1995). Las pruebas de reparación del ADN involucran bacterias (*E. Coli*) (William, 1988), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*) (McAthey, 1996), células animales (ratón y rata) (Williams, 1989), células humanas (linfocitos y hepatocitos) (Mubasher, 1997) e insectos (*Drosophila melanogaster*) (Nguyen, 1979).

Estas metodologías han sido combinadas con el estudio de mutantes metabólicos y mutantes deficientes en uno o varios procesos de reparación del daño al ADN. El sistema de

prueba de reparación del ADN en células somáticas de *Drosophila melanogaster* detecta daño directo al ADN. Es una prueba *in vivo*, de corta duración y específica; que permite aplicar tratamientos agudos o crónicos, la exposición al posible mutágeno puede ser por alimentación, inhalación, inyección, etc. En esta prueba se utilizan genes recesivos ligados al cromosoma *X*, que afectan la reparación por escisión (*mei 9^o*) y la reparación postreplicativa (*mei 41^{D5}*) (Negishi 1991). Por el sistema de cruce empleado, en la progenie se obtienen organismos proficientes y deficientes en reparación (Inoue 1995).

En 1988, Fujikawa propone la prueba de reparación del ADN para *Drosophila melanogaster* utilizando las mutaciones recesivas *mei 9^o* y *mei 41^{D5}*, sin embargo dado que ambas mutaciones están ligadas al cromosoma *X* y *mei 41^{D5}* en homocigosis produce esterilidad, se incluyó el arreglo de cromosomas compuestos, reversos acrocéntricos, *C(1)DX* para balancear el sistema de cruces, en las moscas que portan este arreglo se generan gametos *XX* y gametos *O*, por lo que el cromosoma *X* del macho (que porta la deficiencia en reparación) se hereda en forma patroclina y las hembras heredan de sus padres el cromosoma *Y*, lo que da como resultado que en la progenie los machos sean deficientes en reparación por escisión y reparación postreplicativa, mientras que todas las hembras serán proficientes en estos mecanismos de reparación (Fig. 4) (Negishi, 1991).

Esta prueba permite detectar agentes genotóxicos que provoquen daño directo al ADN, al establecer una relación entre el número de machos deficientes y el número de hembras proficientes, después de haber sido tratados con el posible agente genotóxico durante el desarrollo larvario (Negishi, 1991).

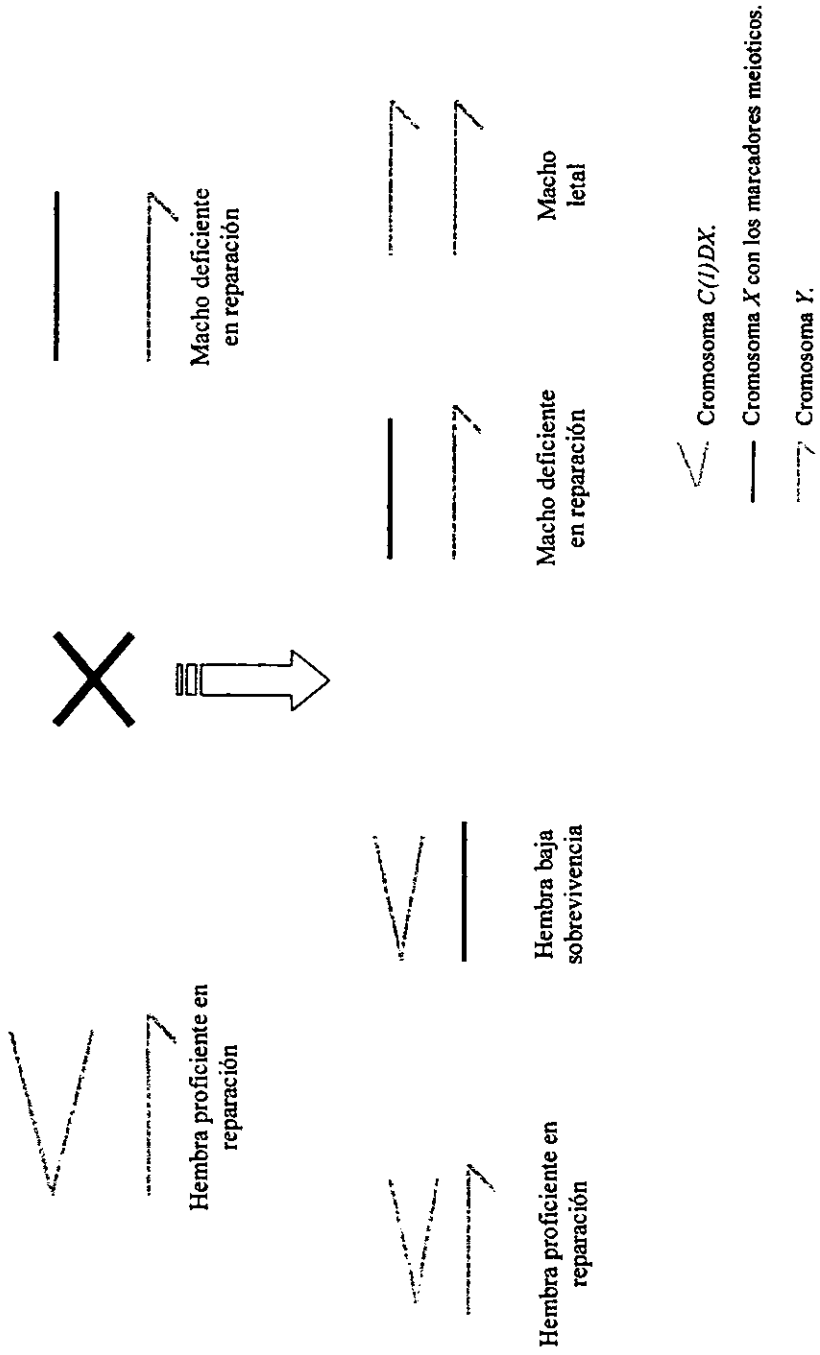


Fig. 4 Cruza utilizada en la prueba de reparación del ADN, propuesta por Fujikawa, 1988. (Negishi, 1991).

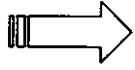
Sin embargo, por el tipo de cruce empleado, un problema de esta prueba ha sido que únicamente los machos muestran deficiencias en reparación. En 1995, Inoue propone utilizar un nuevo sistema de cruces, ahora balanceado con un cromosoma *FM7*, en el cual las hembras portan un cromosoma con secuencia normal y uno con numerosas inversiones que impiden la obtención de progenie recombinante y con ello se mantienen los genes recesivos responsables de la deficiencia, con esto logra obtener una progenie en la cual se tienen machos proficientes y deficientes en reparación, así como hembras proficientes y deficientes en reparación, distinguiendo fenotípicamente cada tipo de condición con una mutación dominante ligada también al cromosoma *X*, el cual modifica la forma del ojo a *Barra* (*Bar*, *B*), la ventaja de este sistema es que el daño que un compuesto pueda ocasionar al ADN puede ser registrado independientemente del sexo, comparando la supervivencia de las moscas deficientes con las proficientes, todas recuperadas de un mismo vial de tratamiento, bajo las mismas condiciones de experimentación (Fig. 5) (Inoue, 1995). Los resultados obtenidos con esta prueba se presentan en la tabla 1, con ella se han realizado no solo análisis de mutágenos, también de antimutagenesis con buenos resultados (Negishi, 1994) y los resultados obtenidos con esta prueba han sido corroborados con otras metodologías de *Drosophila melanogaster* (Negishi, 1991).



Mosca hembra, heterocigota para la doble mutación $mei\ 41^{D5}$, proficiente en reparación.



Mosca macho, hemicigoto para la doble mutación $mei\ 41^{D5}$, deficiente en reparación.



Mosca hembra, homocigota para la doble mutación $mei\ 41^{D5}$, deficiente en reparación.



Mosca hembra, heterocigota para la doble mutación $mei\ 41^{D5}$, proficiente en reparación.



Mosca macho, hemicigoto para la doble mutación $mei\ 41^{D5}$, deficiente en reparación.



Mosca macho, hemicigoto del cromosoma $FM7$, no porta la doble mutación, proficiente en reparación.

- Cromosoma X con los marcadores meioticos.
- Cromosoma Y.
- Cromosoma $FM7$.

Fig. 5 Cruza modificada de la prueba de reparación del ADN, propuesta por Inoue, 1995. (Inoue, 1995).

Tabla 1. Resultados obtenidos con la prueba de reparación del ADN.

| Mutágeno | Resultado | Autor | Año |
|---------------------------------------|-----------|-----------|------|
| Radiación Ultravioleta | + | Fujikawa | 1988 |
| Rayos X | + | Fujikawa | 1988 |
| Metil metano sulfonato | + | Fujikawa | 1988 |
| 2-Acetil amino fluorano | + | Fujikawa | 1988 |
| Bincristina | - | Fujikawa | 1988 |
| Colchicina | - | Fujikawa | 1988 |
| Caféina | - | Lamm | 1989 |
| Sacarina | - | Lamm | 1989 |
| Té | - | Lamm | 1989 |
| Helecho | + | Lamm | 1989 |
| Ciclofosfamida | + | Lamm | 1989 |
| N-nitroso dimetil amina | + | Negishi | 1991 |
| N-nitroso dietil amina | + | Negishi | 1991 |
| 8- Methoxypsoralen | + | Negishi | 1992 |
| Etil metano sulfonato | + | Nivard | 1993 |
| Hidrocarburos aromaticos policiclicos | + | Fujikawa | 1993 |
| Aflatoxina B1 | + | Obana | 1994 |
| Aflatoxina M1 | + | Shibahara | 1995 |
| Griseofulvina | + | Inoue | 1995 |
| Radicales libres | + | Watanabe | 1996 |
| Fenazinas | - | Watanabe | 1996 |
| Aminofenazinas | i | Watanabe | 1996 |
| Di-(2-etilhexil)talato | + | Kawai | 1998 |

Claves: +, positivo; -, negativo; i, inconcluyente.

• REPARACIÓN DEL ADN EN *Drosophila melanogaster*

La vida de un organismo y su continuidad dependen de la estabilidad de la información genética almacenada en el ADN, esta molécula es sensible al daño producido por agentes físicos (radiaciones ionizantes, luz ultravioleta), químicos (algunos provocados por el mismo hombre y otros de origen natural) y biológicos presentes en el ambiente (Howard, 1982), y si además se suma a esto la propia constitución de la molécula que está sujeta a daño espontáneo, como pérdida de bases, alteración química y cambios en la secuencia del material debido a infidelidad en la replicación y/o recombinación, entonces la célula se enfrenta a grandes dificultades para mantener la integridad de la información, aunque en su mayoría estas alteraciones no provocan problemas, gracias al constante monitoreo celular y a la reparación de estos defectos (Friedberg, 1980). En los últimos años se ha reconocido la importancia del estudio de estos mecanismos, no solo por mantener la integridad de la molécula, sino que se ha establecido una relación directa, entre las lesiones que no son reparadas por algún mal funcionamiento en los procesos de reparación, con la aparición de cáncer (Hanawalt, 1986).

En *Drosophila melanogaster* estos procesos de reparación, no están completamente entendidos, aunque se sabe que presenta reparación fotoreactiva, principalmente en huevo y los primeros estadios larvarios, reparación por escisión, reparación de hebra doble y reparación postreplicativa (Dusenbery, 1996); los procesos de reparación que se cree existen en *Drosophila melanogaster* son: por alquil transferasas y reparación por AP endonucleasas; no se tienen reportes acerca de que haya DNA glicosilasas en *Drosophila melanogaster* (Dusenbery, 1996 y Deutsch, 1987).

•REPARACIÓN POR ESCISIÓN

La reparación por escisión es el mecanismo más común en todos los seres vivos, eucariotes y procariotes (Lewin, 1994), en *Drosophila melanogaster* se han encontrado distintos genes que sintetizan proteínas que participan en este mecanismo de reparación y que son homologas con las de otros organismos, incluyendo al ser humano, con base en esto la reparación por escisión en *Drosophila melanogaster*, podría ser controlada por: DmXPA, proteína que reconoce el sitio de la lesión, se ha mapeado en la región 3F6-8 del cromosoma X, no se han reportado líneas deficientes en este gen (Dusenbery et al, 1996); DmXPB, helicasa 3'-5', que es sintetizada por el gen *hayware* ubicado en el cromosoma 3 en las bandas 67E3-E4; DmXPD, recientemente identificada, es homologa con la subunidad XPD de la proteína TFIIH, esta proteína es una helicasa 5'-3', su ubicación aún esta en estudio (Dusenbery et al, 1996); DmXPF o Mei 9, sintetizada por el gen *mei 9*, ubicado en el cromosoma X, esta proteína endonucleasa corta la región 5' de la lesión; no se han reportado proteínas que participen en la incisión 3' de la lesión (Dusenbery et al, 1996). El fragmento de ADN que contiene la lesión es escisado por las polimerasas δ y ϵ que funcionan como una exonucleasa 3'-5' (Grigoriú, 1998) y la resíntesis del ADN se lleva a cabo por un complejo enzimático, compuesto por las polimerasas α y β que controlan la síntesis del ADN y las proteínas: DmPCNA, sintetizada por el gen *mus 209* ubicado en el cromosoma 2, DmRP-A que es homologa con las de otras especies, no ha sido mapeada, ni clonado su gen, así como tampoco se han reportado líneas deficientes (Dusenbery et al, 1996); DmRPC, el gen que sintetiza esta proteína esta ubicado en el cromosoma 4 en las bandas A10-11, este gen tiene el nombre provisional de Rfc40; estas tres proteínas forman un templado para las polimerasas

(Dusenbery et al, 1996). Aunque se ha reportado actividad de ligasas en *Drosophila melanogaster* los estudios no son concluyentes (Dusenbery et al, 1996); el mecanismo de reparación por escisión de *Drosophila melanogaster* se muestra en la figura 6.

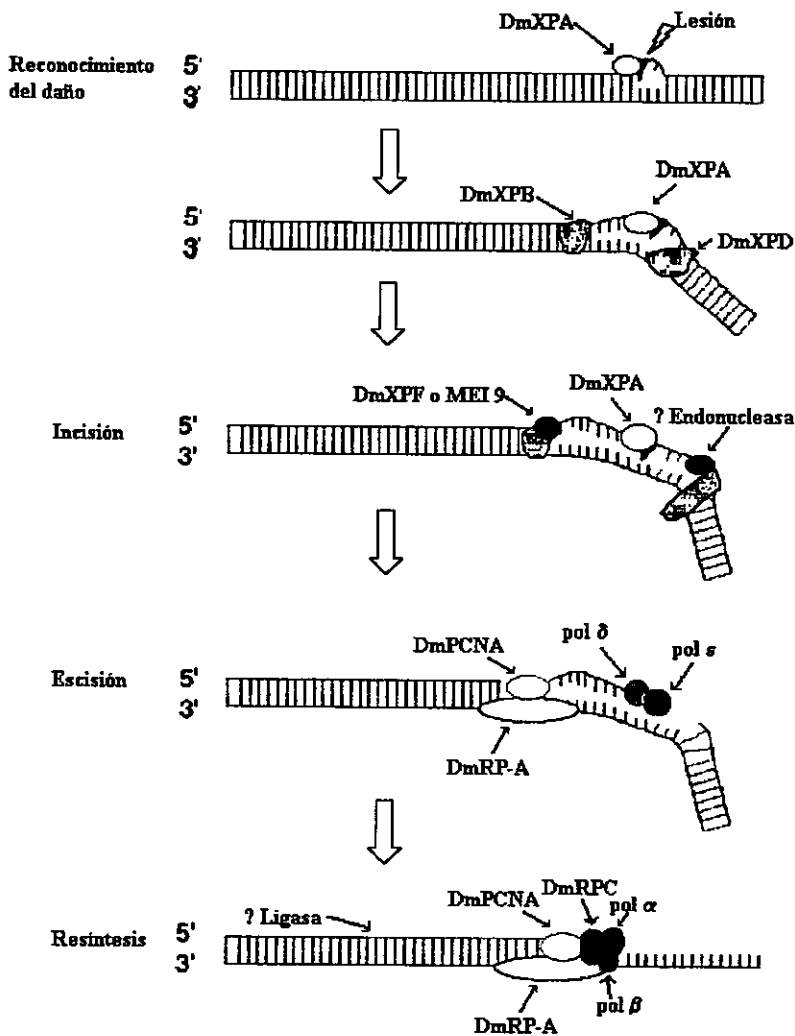


Fig. 6 Reparación por escisión en *Drosophila melanogaster*. Según Dusenbery, 1996

• REPARACIÓN POSTREPLICATIVA

La reparación postreplicativa no está completamente entendida en *Drosophila melanogaster* (Boyd, 1976), aunque se cree que es similar al de *Saccharomyces cerevisiae* (Grigoriú, 1998), se ha reportado que este tipo de reparación está asociado con proteínas ““checkpoint”” que regulan el paso de G2 a M en el ciclo celular de *Drosophila melanogaster*, estas proteínas sirven como sensores de daño al ADN, en caso de haber alteraciones en el ADN, las ““checkpoint”” se pegan a esta zona, desatando la reparación postreplicativa, y si el daño es severo la célula entra en apoptosis (Hari, 1995). Genes como *mus 101*, *mus 310*, *mus 205*, *mei 41*, *mus 302*, entre otros están asociados a la síntesis de estas proteínas (Brown, 1981).

Este mecanismo de reparación involucra la replicación y la recombinación, aunque los detalles exactos de este tipo de reparación son inciertos, el mecanismo puede consistir en lo siguiente: cuando una molécula de ADN se replica y existe una lesión que no fue reparada, las ADN polimerasas no pueden tomar como molde esta zona, interrumpiendo la replicación y reiniciándola delante de la lesión, dejando un hueco; el resultado es que de las cromátidas hermanas resultantes, una estará intacta, mientras que en la otra cromátida una de las cadenas tendrá un hueco y en la otra cadena habrá una región dañada (Lewin, 1994). Al no pasar del punto G2 al de Mitosis en el ciclo celular, las proteínas ““checkpoint”” se unen al hueco y/o a la región dañada, posteriormente otra ““checkpoint”” sirve como intermediario entre esta señal y el inicio de la reparación, en *Saccharomyces cerevisiae* este proceso se lleva a cabo con dos proteínas Mec1 y Mec3 (Weinert, 1998), en *Drosophila melanogaster* esta doble función es

aparentemente hecha por la proteína Mei 41, que tiene regiones homologas con ambas proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* (Hari, 1995 y Keith, 1995).

La función de Mei 41 como proteína sensor de daño e intermediaria va mas allá, en *Saccharomyces cerevisiae* Mec3 sirve también como sustrato para iniciar la reparación por recombinación de la región dañada, misma función que podría realizar Mei 41; sin embargo estos procesos de reparación no se han determinado en *Drosophila melanogaster* (Fig. 7) (Weinert, 1998).

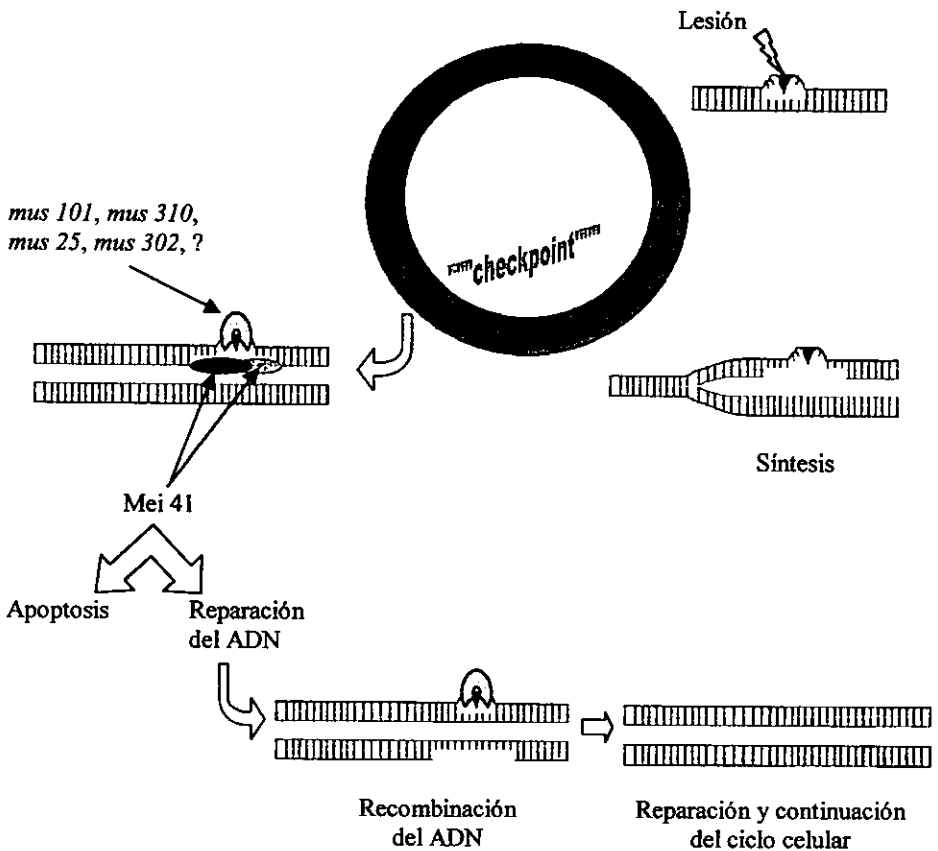


Fig. 7 Función de las proteínas "checkpoint" del ciclo celular, en relación con la reparación postreplicativa.

• GENES MEIÓTICOS.

Desde que en 1968, Sandler describió mutaciones que afectan la recombinación y la reparación del ADN en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, se abrió el campo de estudio de estos mecanismos celulares (Boyd, 1974). *Drosophila melanogaster* ofrecía ventajas inigualables en comparación con otros organismos de estudio utilizados en ese tiempo, ya que existía la posibilidad de utilizar un modelo *in vivo*, que además permitía realizar observaciones *in vitro* (Boyd, 1974).

Estos análisis en los mecanismos de reparación de *Drosophila melanogaster* impulsaron el desarrollo de líneas de moscas mutantes en dichos procesos (Nguyen, 1979) que permitieron el desarrollo de la prueba de reparación del ADN de *Drosophila melanogaster*.

• *mei 9^a*

Este gen meiotico, fue inicialmente identificado por reducir la recombinación meiotica en hembras, provocar la segregación postmeiotica, recombinación mitotica y no disyunción (Araj, 1996), además de incrementar la sensibilidad a agentes alquilantes (MMS), radiación ultravioleta, rayos X, mostaza de nitrógeno, acetilaminofluorano (Boyd, 1976). El gen *mei 9* esta localizado en las bandas 4B-4B6 del cromosoma X en 1-6.5 um (Fig. 8) (Araj, 1996).

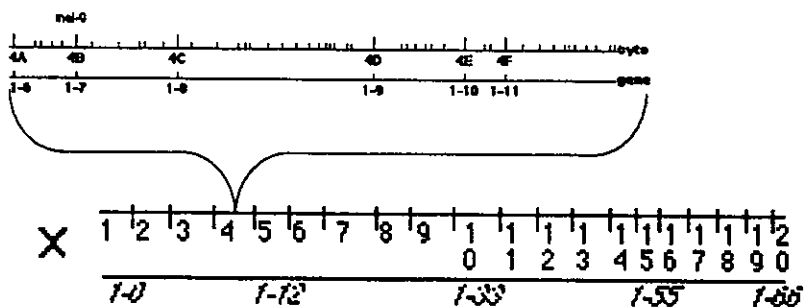


Fig. 8 Posición cromosómica y citogenética del gen *mei 9^a*

Las líneas portadoras de esta mutación presentaron una reducción de entre el 30–40% de actividad de endonucleasas en relación con las líneas silvestres (Osgood, 1982). El gen *mei 9^a* codifica para una proteína endonucleasa de 946 residuos de aminoácidos homologa en 51% con la proteína RAD1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 9), estas proteínas son homologas con la ERCC4 de la enzima de reparación por escisión de mamíferos y de la XPF de humanos (Sekelsky, 1995).

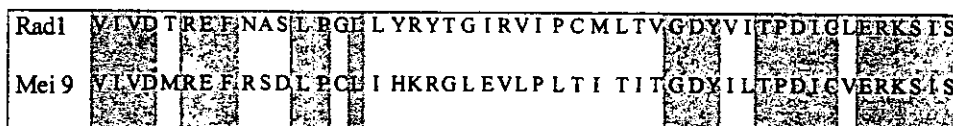


Fig. 9 En gris resaltan las homologías en aminoácidos de las proteínas endonucleasas RAD1 y

MEI 9. Tomado de Araj, 1996.

Estas proteínas participan en la reparación por escisión al cortar la región 5' de la lesión (Osgood, 1982), la mutación recesiva de este gen bloquea la reparación por escisión al interrumpir el paso de incisión en el mecanismo de este tipo de reparación, esto provoca que la lesión no sea escisada y permanezca en la cadena de ADN (Fig. 10) (Dusenbery, 1996).

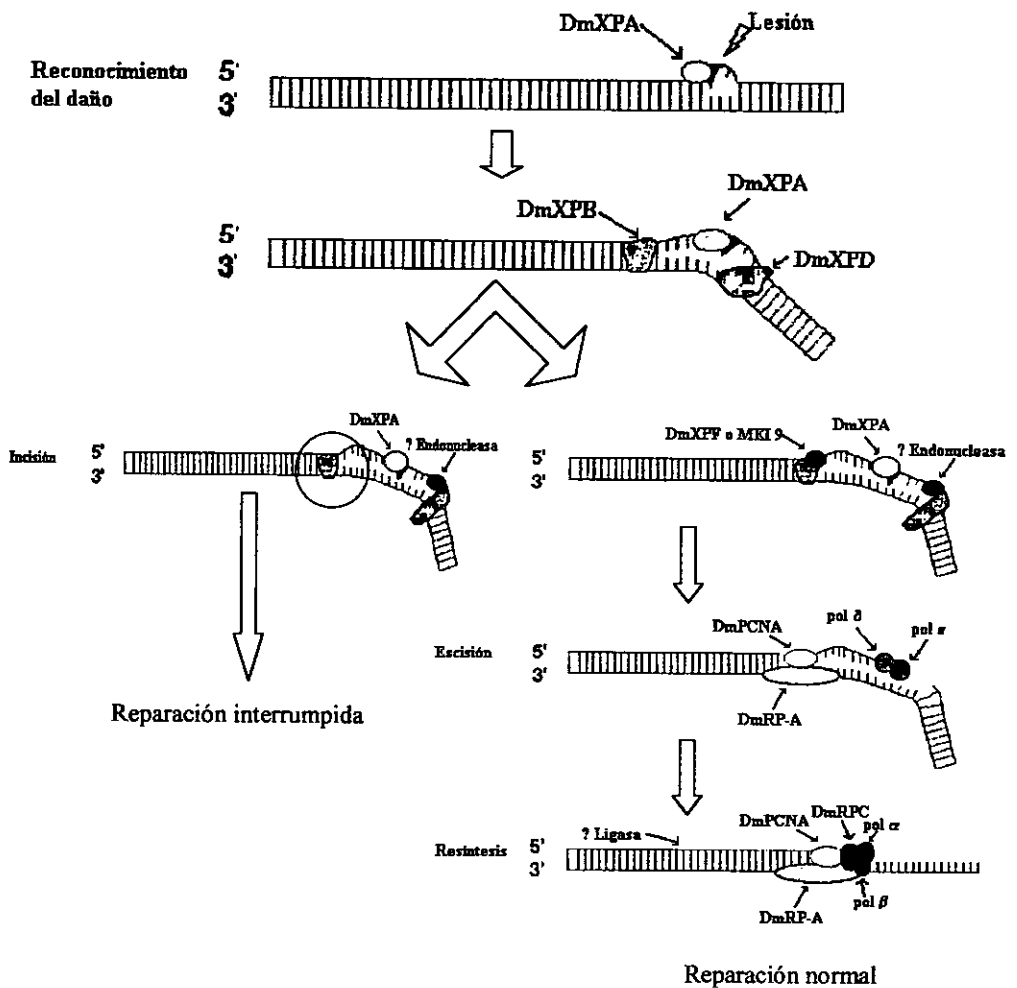


Fig. 10 Disfunción de la reparación por escisión provocada por la mutación recesiva *mei 9*.

• *mei 41*^{D5}

El gen *mei 41* tiene una función esencial en la meiosis y en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica (Banga, 1995); se localiza en el cromosoma X en las bandas politénicas 14C4–14C6, a 1–52.4 um (Linsley y Zimm, 1992) (Fig. 11). Se caracteriza por provocar esterilidad en hembras, una alta frecuencia de no disyunción, alterar la recombinación meiótica e inducir recombinación mitótica (Banga, 1995).

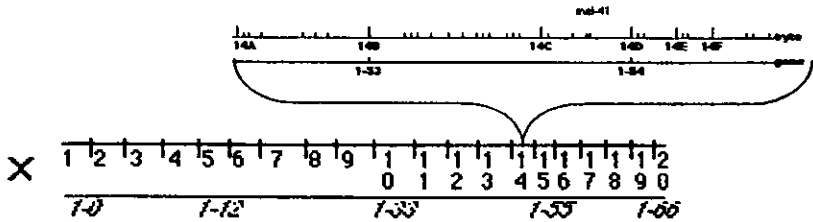


Fig. 11 Posición cromosómica y citogenética del gen *mei 41*

En 1976, Boyd analiza el locus *mei 41*^{D5} y sugiere que participa en la reparación postreplicativa, aunque su vía de acción no fue determinada, las líneas portadoras de este gen mostraron sensibilidad a agentes alquilantes (MMS, EMS), radiación ionizante y ultravioleta, mostaza de nitrógeno, acetilaminofluorano (Boyd, 1976), hidroxihurea, rayos X, entre otros (Hari, 1995).

Este gen sintetiza una proteína de 270 kd perteneciente a la familia fosfatidil inositol 3-cinasa (Dusenbery, 1996), que es homóloga en la región carboxilo terminal de la proteína AT7-9 sintetizada por el gen ATM de humanos en un 60%, también es homóloga en esa región de la proteína RAD3 de *Saccharomyces cerevisiae* en un 66% (Hari, 1995), Mec1 y

Mec3 de *Saccharomyces cerevisiae*, entre otras proteínas “checkpoint” (Fig. 12) (Keith, 1995).

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| AT7-9 | V | L | S | V | G | G | Q | V | N | L | L | I | Q | Q | A | I | D | P | K | N | L | S | R | L | F | P | G | W |
| MEC1 | G | L | S | V | E | S | S | V | Q | D | L | I | Q | Q | A | T | D | P | S | N | L | S | V | I | Y | M | G | W |
| ME41 | P | L | S | T | E | G | Q | V | N | F | L | I | N | E | A | T | K | V | D | N | L | A | S | M | Y | I | G | W |

Fig. 12 Región carboxilo terminal de proteínas “checkpoint”, en gris resaltan las homologías en aminoácidos. Tomado de Keith, 1995.

Esta familia de proteínas homologas están implicadas en el control del ciclo celular, como “checkpoint” entre G2 y M, retrasando o arretando el ciclo celular, de acuerdo a la fidelidad de la síntesis del ADN (Hari, 1995), aunque los procesos de reparación postreplicativa en *Drosophila melanogaster* no están totalmente descritos, se considera que pueden tener similitud con los de *Saccharomyces cerevisiae* (Grigoriú, 1998), de esta manera la proteína que sintetiza *mei 41^{D5}* checa la integridad del ADN después de la fase de síntesis retrasando el ciclo celular, en caso de anomalías como huecos en las cromatidas hermanas o incluso alteraciones en la estructura de la cadena de ADN, arresta a la célula (Hari, 1995), permitiendo con esto que inicie la reparación postreplicativa. En el caso de la mutación de *mei 41^{D5}* la lesión no sería detectada ni reparada, pasando a mitosis la célula, con la integridad del ADN alterada (Fig. 13) (Dusenbery, 1995).

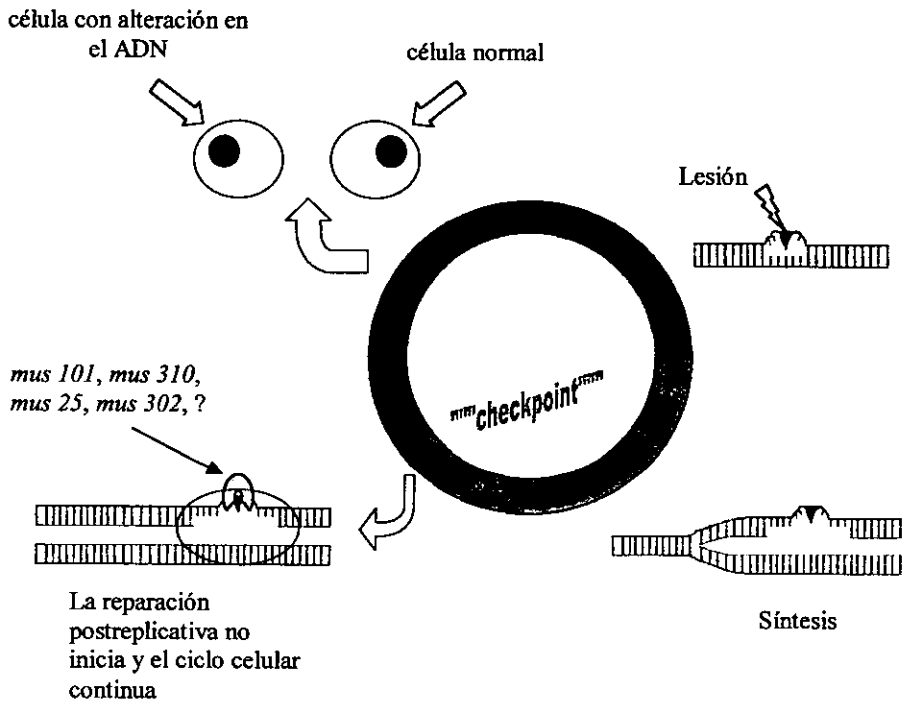


Fig. 13 Alteración en el ciclo celular y la reparación, provocado por la mutación recesiva *mei 41*.

OBJETIVO

En este trabajo se analizó la inducción de daño directo al ADN por mutágenos con diferente actividad química: N-nitrosodimetilamina (DMN), Metil-metano-sulfonato (MMS), Colchicina, Azida de sodio y Cloruro de plomo.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Compuestos**

- **N-Nitrosodimetilamina (DMN)**

Las N-nitrosaminas son compuestos que han sido detectados en el ambiente, en alimentos, bebidas alcohólicas, productos cosméticos, humo de cigarro, desechos industriales, etc. Muchos de éstos son potentes carcinógenos cuando se han probado en experimentos con animales y se ha demostrado también que pueden tener efectos similares en el ser humano, por esto se ha considerado que estos compuestos pueden tener una función importante en la inducción de cáncer (Friedberg, 1984).

La N-nitrosodimetilamina (DMN), es una N-nitrosamina altamente mutagénica y carcinogénica en un amplio intervalo de especies animales (Williams, 1989), es un agente

OBJETIVO

En este trabajo se analizó la inducción de daño directo al ADN por mutágenos con diferente actividad química: N-nitrosodimetilamina (DMN), Metil-metano-sulfonato (MMS), Colchicina, Azida de sodio y Cloruro de plomo.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Compuestos**

- **N-Nitrosodimetilamina (DMN)**

Las N-nitrosaminas son compuestos que han sido detectados en el ambiente, en alimentos, bebidas alcohólicas, productos cosméticos, humo de cigarro, desechos industriales, etc. Muchos de éstos son potentes carcinógenos cuando se han probado en experimentos con animales y se ha demostrado también que pueden tener efectos similares en el ser humano, por esto se ha considerado que estos compuestos pueden tener una función importante en la inducción de cáncer (Friedberg, 1984).

La N-nitrosodimetilamina (DMN), es una N-nitrosamina altamente mutagénica y carcinogénica en un amplio intervalo de especies animales (Williams, 1989), es un agente

alquilante que metila a los oxígenos de la citosina y guanina del ADN (Friedberg, 1984). La mutagenicidad de este compuesto es difícil de estudiar debido a que necesita ser biotransformado y activado. Esta N-nitrosamina sufre una desmetilación oxidativa que la biotransforma a hidroxidimetil-nitrosamina inestable, esta molécula origina un ion alquidiazonium y un ion metildiazohidróxido que es la molécula reactiva (Williams, 1989) (Fig. 14).

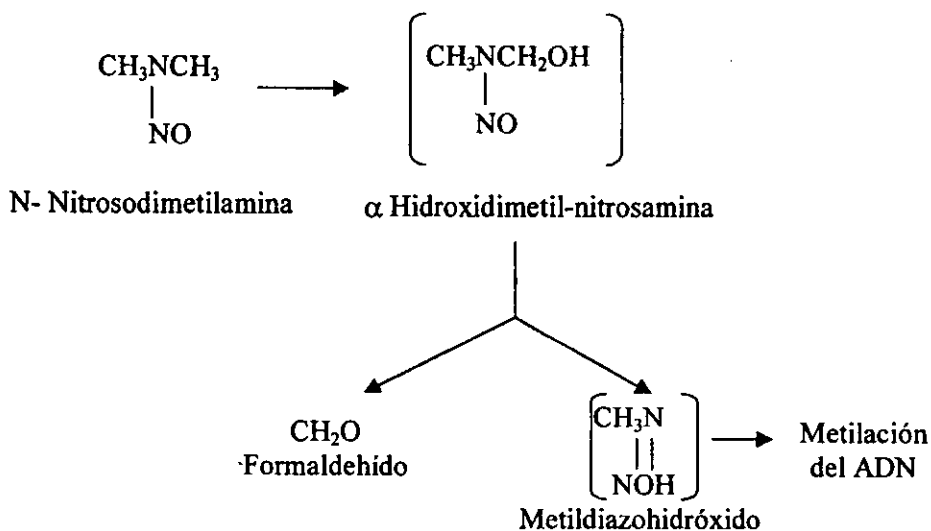


Fig.14 Activación de la N-Nitrosodimetilamina. Tomado de Williams, 1989.

• **Metil Metano Sulfonato (MMS)**

Conocido también como ácido metanosulfónico, desde 1909 es considerado como potente carcinógeno, agente alquilante de acción directa soluble en agua, se utiliza como catalizador en reacciones de polimerización y como disolvente (The Merck Index, 1989), pertenece al grupo de los alquiloalcanosulfuros. Es un compuesto altamente mutagénico que se considera O-alquilante y N-alquilante, principalmente de adeninas y guaninas del ADN (Friedberg, 1984), este agente introduce grupos alquil ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$), con lo que además cambia las propiedades de apareamiento de las bases (Fig.15) (Russell, 1998).

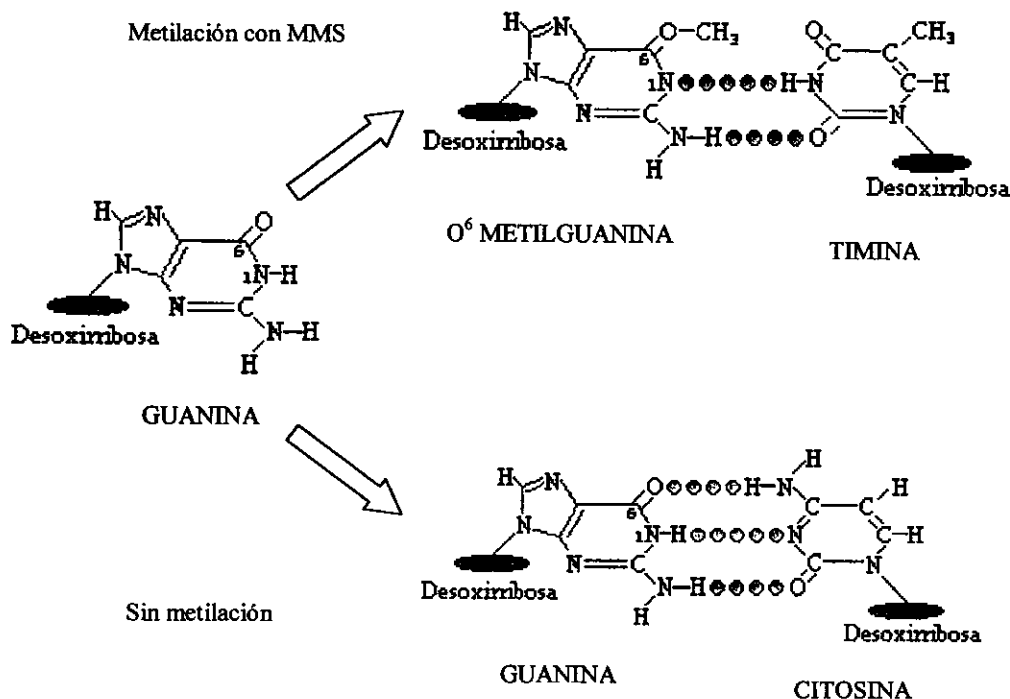


Fig. 15 Metilación de la Guanina por acción de MMS. Tomado de Russell, 1998.

• Colchicina

Es un alcaloide extraído de plantas del genero *Colchicum*, utilizada para el tratamiento de gota y como veneno (Fig. 16).

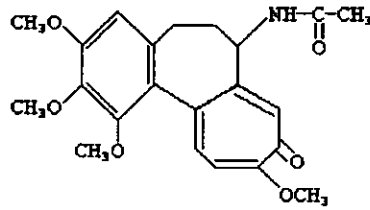


Fig. 16 Molécula de Colchicina. Tomado de Wolfe, 1995.

La colchicina se une específicamente con los heterodímeros de la tubulina provocando un desensamble en la mayoría de los tipos de tubulina, incluyendo el huso y el citoesqueleto (Wolfe, 1995). Aunque las bases moleculares de la acción de la colchicina aun no son totalmente claras, se ha encontrado que aparentemente inhibe la unión de las α tubulinas con la β tubulinas, lo que provoca una mala polimerización de los microtubulos (Fig. 17) (Wolfe, 1995), y el arresto celular en metafase, también puede inducir hipoploidía, hiperploidía y aneuploidía tanto en células somáticas como germinales *in vivo* e *in vitro* de distintos linajes celulares (Kallio, 1995).

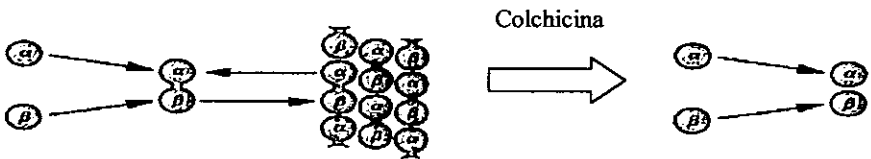


Fig. 17 Acción de la colchicina en la polimerización de la tubulina. Tomado de Wolfe, 1995.

- **Azida de sodio**

Es una sal altamente soluble en agua caliente o fría, ligeramente soluble en alcohol, este compuesto tiene múltiples usos como potente vaso-dilatador, usado en el control terapéutico de la presión arterial; fungicida para la conservación de vinos, estimulante de la germinación, nematicida, bactericida, previene la oxidación del acero, materia prima en la producción de caucho, se utiliza para inflar las bolsas de aire de automóviles, es considerado mutagénico en bacterias, plantas y en cultivos celulares de mamíferos (Owais, 1988), recombinogénico en *Drosophila melanogaster* y carcinógeno potencial (González y Ramos, 1997), sin embargo su mecanismo de acción no ha sido aún determinado (Owais, 1988)

- **Cloruro de plomo**

En la naturaleza esta sal de plomo esta presente en el mineral cotunita, es soluble en agua, en la industria se le utiliza para fabricar "plomo blanco", colorantes, oxiclurato de plomo y soldadura fundente (The Merck Index, 1989). El cloruro de plomo provoca infidelidad en la transcripción de distintas polimerasas (Friedberg, 1984). En general, el plomo es un compuesto considerado altamente peligroso para el ser humano, es un contaminante ambiental, utilizado como detonante de algunas gasolinas (Roy, 1992); aunque de probada toxicidad, los estudios sobre su genotoxicidad son contradictorios en la mayoría de los sistemas en los que se ha ensayado (Winder, 1993). Se han establecido distintos mecanismos de acción genotóxica del plomo, desde su posible interferencia con la

polimerasa β que participa en la reparación por escisión o con ligasas que participan en este mecanismo de reparación (Winder, 1993), también se le considera un veneno mitótico provocando aneuploidias y aberraciones cromosómicas (Chakravarty, 1992), se ha reportado que podría interferir con la fidelidad de la síntesis del ADN al alterar la incorporación de bases en el ADN recién sintetizado (Johnson, 1998), considerado como comutageno al tomar parte en la reacción de Fenton, esta reacción aumenta la cantidad de radicales H_2O_2 e OH , estas moléculas si interaccionan directamente con el ADN (Roy, 1992). Los radicales libres se forman de manera natural en las distintas reacciones metabólicas y de respiración de la célula, sin embargo son eliminados por distintos mecanismos, si el número de radicales libres se incrementa estos pueden romper la cadena del ADN, formar aductos, pueden modificar la conformación estructural de guaninas y adeninas, oxidar el azúcar de la base y formar un sitio AP (Newcomb, 1998). El Plomo es una molécula muy grande aún estando disuelto en agua y acompañado por alguna sal, la célula al fagocitar esta molécula formaría una gran cantidad de radicales libres en su interior, independientemente de que el plomo participe en la reacción de Fenton, habría un exceso de H_2O_2 e OH en el interior de la célula, lo que incrementa el riesgo de alteraciones en el ADN (Fig. 18) (Roy, 1992).

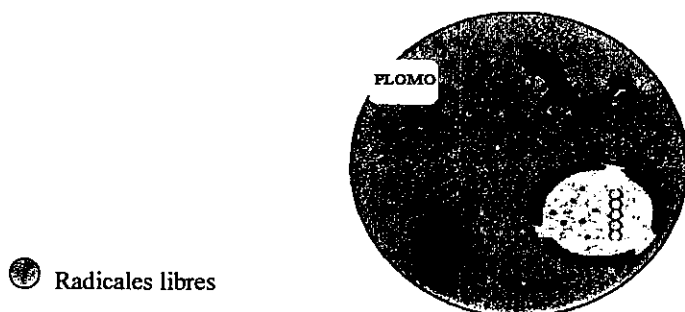


Fig. 18 Formación de radicales libres al fagocitar la célula moléculas de plomo. Roy, 1992.

• Líneas de *Drosophila melanogaster*

El balanceador $FM7, y^{31D} sc^8 w^a sn^{X2} v^{Of} g^4 B^1$, es un cromosoma X construido con múltiples inversiones, estable, que evita la recombinación; en su constitución hay diferentes mutantes, de los cuales en la prueba se utilizan: w^a , g^4 , sn^{X2} y B^1 , como marcadores fenotípicos.

w^a (*white apricot*), alelo recesivo ligado al cromosoma X , ojos de color durazno, en presencia del gen g^4 , los ojos son de color blanco.

g^4 (*garnet*), alelo recesivo ligado al cromosoma X , ojos color café oscuro, en presencia del gen w^a , los ojos son de color blanco.

sn^{X2} (*signed*), alelo recesivo ligado al cromosoma X , provoca que los pelos del cuerpo se deformen y adopten una apariencia ondulada, corta y rugosa.

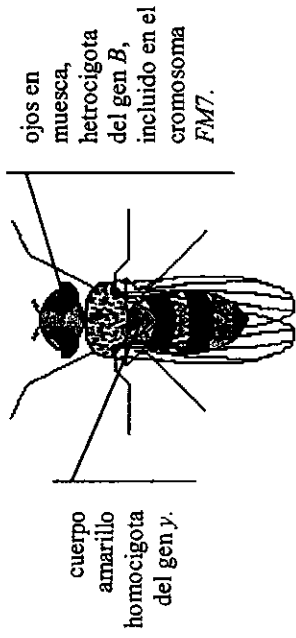
B^1 (*Bar*), gen dominante ligado al cromosoma X , en homocigosis modifica la forma de los ojos a una barra y en heterocigosis los ojos tienen forma de muesca.

Se realizó una cruce de hembras $FM7, y^{31D} sc^8 w^a sn^{X2} v^{Of} g^4 B^1 / y^1 mei^9 mei 41^{D5}$ (brevemente $FM7 / mei^9 mei 41^{D5}$, las moscas tienen los ojos en muesca y de color rojo y los pelos del cuerpo normales) con machos $y^1 mei^9 mei 41^{D5} / Y$ (brevemente $mei^9 mei 41^{D5} / Y$, presentan los ojos redondos y de color rojo y los pelos del cuerpo normales). En cada generación se recobran 4 genotipos distintos de moscas, que se distinguen de acuerdo a su fenotipo

1. $FM7 / mei^9 mei 41^{D5}$ hembras, proficientes en reparación, con los ojos en forma de muesca y de color rojo, los pelos del cuerpo son normales.

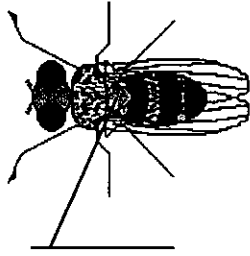
2. $mei^9 mei 41^{D5} / mei^9 mei 41^{D5}$ hembras, deficientes en reparación, ojos redondos y de color rojo, los pelos del cuerpo normales.
3. $FM7 / Y$ machos, proficientes en reparación, ojos en barra y de color blanco, los pelos del cuerpo son ondulados, cortos y rugosos.
4. $mei^9 mei 41^{D5} / Y$ machos, deficientes en reparación, ojos redondos y de color rojo, los pelos del cuerpo son normales.

Los fenotipos de la cruce y la progenie se muestran en la figura 19.



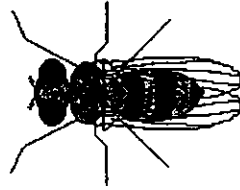
X

ojos en muesa, heterocigota del gen *B*, incluido en el cromosoma *FM7*.

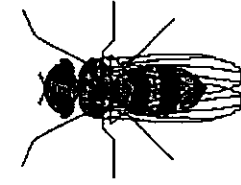


Mosca hembra, heterocigota para la doble mutación *mei 41^{D5}*, proficiente en reparación.

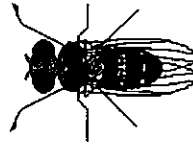
Mosca macho, hemicigoto para la doble mutación *mei 41^{D5}*, deficiente en reparación.



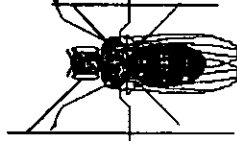
Mosca hembra, homocigota para la doble mutación *mei 41^{D5}*, deficiente en reparación.



Mosca hembra, heterocigota para la doble mutación *mei 41^{D5}*, proficiente en reparación.



Mosca macho, hemicigoto para la doble mutación *mei 41^{D5}*, deficiente en reparación.



ojos en barra por hemicigosis del gen *B*, y blancos por los genes *w^a* y *g^a*

tricomas en rizo por hemicigosis del gen *st^{x2}*

— Cromosoma *X* con los marcadores meioticos.

— Cromosoma *Y*.

— Cromosoma *FM7*.

Fig. 19 Cruza empleada.

• Obtención de larvas

Para obtener larvas con una edad semejante, a los tres días de realizada la cruce progenitora se transfirió a los progenitores a frascos con medio de cultivo fresco por un período de 8 h., retirándolos posteriormente. A partir de los huevos colectados se obtuvieron larvas de 72 ± 4 h. que fueron asignadas al azar a las series testigo y experimentales.

• Tratamientos

Los compuestos se disolvieron en agua destilada, que se tomó como testigo negativo, todos los compuestos fueron de Sigma Chemical Company, las concentraciones de cada uno se especifican en la tabla 2. Después de las diluciones, se tomaron 5ml. de la solución correspondiente a cada compuesto, mezclándola en 1 gr. de medio instantáneo (Carolina Biological Supply, NC, USA) en viales de 2.7 cm. de diámetro x 11.3 cm. de altura. Los tratamientos fueron crónicos y se aplicaron a larvas de tercer estadio (72 ± 4 h. de edad), que se separaron del medio de cultivo utilizando una solución de glucosa al 20 %, colocando en cada vial de 150 a 200 larvas aproximadamente, dejándolas en el tratamiento hasta que concluyeron su desarrollo, a una temperatura de $25 \pm 1^\circ$ C. Se realizaron cuatro experimentos por cada compuesto con tres repeticiones cada uno. Una vez que emergieron los adultos se cuantificaron el número de hembras y machos deficientes y proficientes en reparación obtenidos de cada lote.

Tabla 2. Concentraciones de los compuestos utilizados.

| Compuesto | Peso molecular | Concentraciones [mM] |
|-----------------------------|----------------|----------------------|
| N-nitrosodimetilamina (DMN) | 74.08 | 0.007—1 |
| Metil-metanosulfonato (MMS) | 110.13 | 0.001—1 |
| Colchicina | 399.43 | 0.002—0.125 |
| Azida de sodio | 65.02 | 0.06—1 |
| Cloruro de Plomo | 278.1 | 0.002—0.71 |

• Análisis de resultados

Se registraron el número de hembras y machos proficientes y deficientes en reparación obtenidos de cada lote. El efecto de los compuestos que dañan al ADN se manifiesta en la pérdida gradual de los organismos deficientes en reparación, este efecto se estima con base en curvas de sobrevivencia, considerando un compuesto como positivo para esta prueba, cuando la sobrevivencia de las moscas deficientes en reparación, en relación con la concentración del compuesto, sea menor, en comparación con la respuesta de las moscas proficientes en reparación, un compuesto será negativo para la inducción de daño al ADN cuando no existan diferencias en la sobrevivencia de ambos tipos de moscas, en relación con la concentración del compuesto (Inoue, 1995).

La esquematización de la metodología se muestra en la figura 20.

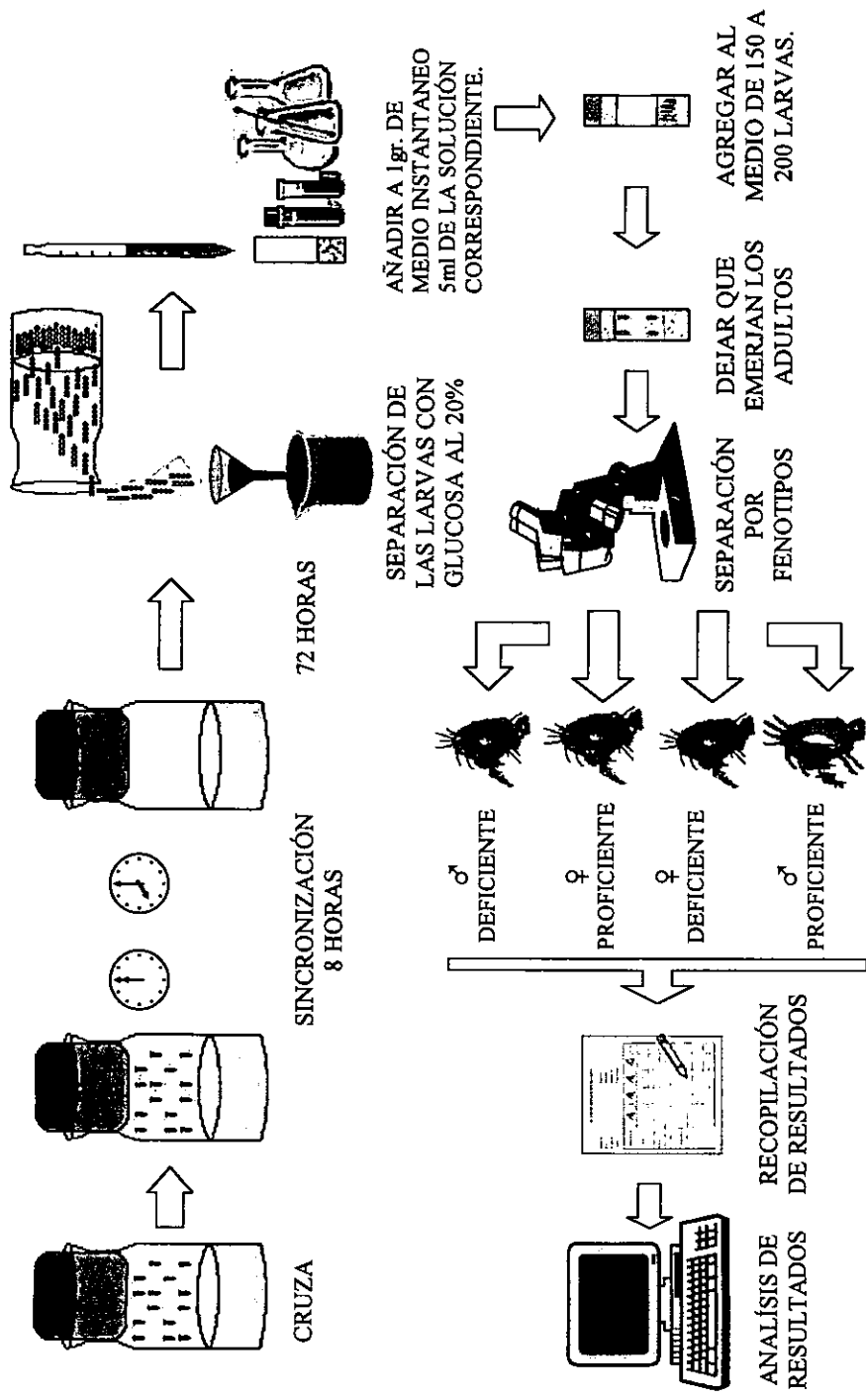


Fig. 20 Esquematación de la metodología

RESULTADOS

- **N-Nitrosodimetilamina (DMN)**

La exposición a esta nitrosamina mostró que induce daño al ADN desde concentraciones tan bajas como 0.007 mM en la que la sobrevivencia de las moscas deficientes en reparación se redujo hasta el 36 % en hembras y el 20 % en machos; en comparación con las moscas proficientes en reparación en las que fue del 100 %. Las siguientes concentraciones resultaron letales para las moscas deficientes en reparación, mientras que sólo a partir de 0.031 mM se observó reducción en la sobrevivencia de las moscas proficientes en reparación en un 72 % para las hembras y un 70 % para machos. Las concentraciones superiores redujeron paulatinamente la sobrevivencia de ambos sexos, siendo siempre más sensibles los machos. En la concentración más alta, sobrevive el 16 % de las hembras y el 1 % de los machos proficientes en reparación (Fig. 21).

- **Metil Metano Sulfonato (MMS)**

El tratamiento con este alquilante de acción directa provocó reducción en la sobrevivencia a partir de 0.005 mM en hembras (55 %) y machos (46 %) deficientes en reparación; en comparación con las moscas proficientes en las que la sobrevivencia fue del 84 % para hembras y 98 % para machos. El incremento en las concentraciones redujo

paulatinamente la sobrevivencia, de manera que a 0.1 mM sólo se recobró un 0.4 % de hembras deficientes en reparación y ningún macho, comparado con 39 % de hembras y un 45 % de machos proficientes en reparación. En la concentración más alta probada, 1 mM sólo se recobró el 2 % de hembras y el 1 % de machos proficientes en reparación (Fig. 22).

- **Colchicina**

Este aneuploidógeno tuvo un efecto similar en los cuatro tipos de progenie. Sólo en la concentración más baja, 0.002 mM se redujo la sobrevivencia de las moscas deficientes en reparación al 76 % en hembras y el 72 % en machos, mientras que en las proficientes esta fue del 91 % para hembras y 100 % para machos. A partir de la siguiente concentración, 0.004 mM, el efecto observado fue similar sin importar el genotipo de las moscas tratadas, quedando una sobrevivencia de 63 y 69 % para hembras y machos deficientes en reparación y del 68 y el 52 % para hembras y machos proficientes en reparación. En las concentraciones mayores el efecto se acentuó, reduciéndose la sobrevivencia al 7 y 9 % para hembras y machos deficientes en reparación y al 7 y 8 % para hembras y machos proficientes en reparación. Las concentraciones siguientes no permitieron recobrar algún tipo de mosca, independiente del genotipo (Fig. 23).

- **Azida de sodio**

La azida de sodio permitió recobrar moscas adultas en todas las concentraciones. Se observaron pequeñas variaciones en las concentraciones más bajas, en las que se recobraron menos moscas proficientes en reparación, 84 y 88 % para hembras y machos a 0.13 mM, en comparación con el 100 % de sobrevivencia para las deficientes en reparación. Este efecto no se considera real ya que en la siguiente concentración, 0.19 mM la sobrevivencia fue del 100 y 93 % para hembras y machos proficientes en reparación y del 100 % para las deficientes. A partir de las siguientes concentraciones, la reducción en la sobrevivencia fue similar sin importar el genotipo de las moscas tratadas, de manera que en la concentración más alta, 1 mM se recobró un 4 y 5 % de hembras y machos deficientes en reparación en comparación con un 5 y 1 % de las hembras y machos proficientes en reparación, respectivamente (Fig. 24).

- **Cloruro de plomo**

Con esta sal de plomo se observó un comportamiento peculiar en las moscas tratadas. Hasta 0.08 mM, el tratamiento no afectó la sobrevivencia de las moscas deficientes en reparación y de las hembras proficientes en reparación, sin embargo, en los machos proficientes en reparación se obtuvo una pequeña reducción en la sobrevivencia con 0.002 y 0.005 mM, la que no fue consistente, ya que a 0.01 y 0.02 mM se recuperó nuevamente el 100 % de sobrevivencia. La reducción en la sobrevivencia (77 %) se registró nuevamente en el intervalo de 0.04 a 0.17 mM y recuperándose el 100 % de sobrevivencia en las concentraciones mayores. En las moscas deficientes en reparación se

observó una pequeña reducción en 0.17 mM, con 97 y 86 % para hembras y machos, respectivamente. Con 0.71 mM, la concentración más alta probada se redujo únicamente la sobrevivencia de hembras deficientes en reparación (Figura 25).

Los resultados mostraron que, en comparación con Metil-metanosulfonato, la N-nitrosodimetilamina induce una mayor proporción de alteraciones en las que se requiere la participación de la reparación por escisión y de la reparación postreplicativa, al disminuir significativamente la sobrevivencia de los organismos deficientes en reparación, en tanto que los tratados con Colchicina y Azida de sodio no presentaron diferencias significativas en la sobrevivencia entre las moscas proficientes y las deficientes en reparación, ambos compuestos fueron altamente tóxicos para las moscas tratadas, el plomo no mostró tener ningún efecto en la sobrevivencia de las moscas pro y deficientes en reparación, tampoco mostró ser tóxico para estas moscas.

La inducción de alteraciones al ADN de los compuestos utilizados se presenta de la siguiente manera: DMN>MMS>colchicina>azida de sodio>cloruro de plomo (Fig. 26).

DISCUSIÓN

En el área de la toxicología genética, la implementación de nuevas metodologías incluye dos aspectos principales: la comprobación de la eficiencia de la metodología con base en las condiciones del laboratorio, es decir la validez interna. El siguiente paso es alcanzar la reproducibilidad en los resultados obtenidos con respecto a los de otros laboratorios, o validez externa. Mediante este proceso, la información obtenida es considerada válida por parte de organizaciones ambientales que regulan la calidad de la información reportada (Campbell, 1973; Méndez, et al., 1990).

La prueba de reparación del ADN de *Drosophila melanogaster*, detectó la actividad de compuestos que alteran directamente al ADN (MMS y DMN), esto se reflejó en el menor índice de sobrevivencia de los organismos deficientes en reparación en relación con los proficientes, por lo que se consideran compuestos positivos en esta prueba. Ambos agentes son mutágenos y carcinógenos probados (The Merck Index, 1989), la respuesta obtenida concuerda con el comportamiento esperado para estos compuestos. La mayor inducción de alteraciones de la DMN se debió, posiblemente, al hecho de que este compuesto se metaboliza en el citocromo P-450, este paquete enzimático genera radicales libres al metabolizar aminas o hidrocarburos, estos radicales libres son altamente reactivos con el ADN y provocan múltiples alteraciones en la estructura de esta molécula (Newcomb, 1998), si bien el MMS es un alquilante directo, el hecho de que la biotransformación de la DMN forme radicales libres, además de la molécula alquilante metildiazohidróxido, incrementa el espectro de alteraciones que este compuesto provoca *per se*. Ambos alquilantes ya han sido probados con esta metodología con resultados similares

a los obtenidos (Fujikawa, 1993 y Negishi, 1991), en el caso de la DMN, incluso dentro del grupo de las nitrosaminas fue el compuesto mas genotóxico con esta misma prueba (Negishi, 1991); así mismo estos resultados concuerdan con los que se han obtenido en distintos sistemas de prueba tanto en eucariotes como procariotes, *in vivo* como *in vitro* (The Merck Index, 1989). Las figuras 27 y 28 muestran comparativamente el efecto de los compuestos probados en las moscas proficientes y deficientes en reparación, respectivamente. En las moscas proficientes en reparación, la curva del MMS muestra que este compuesto resulta menos tolerable, ya que la pendiente cae más rápidamente, mientras que en el tratamiento con la DMN en esta concentración y mayores se obtuvo un mayor porcentaje de sobrevivencia. En las moscas deficientes en reparación, el efecto es contrario, siendo más enérgico el efecto del tratamiento con la DMN en el que a partir de 0.031 mM ya no se tiene sobrevivencia, mientras que con el MMS lo anterior ocurre a partir de 0.5 mM. Al comparar el efecto obtenido con estos compuestos utilizando otras metodologías de *Drosophila*, se encontró que las concentraciones a las que se obtiene efecto son al menos un orden de magnitud menores que con otras líneas de *Drosophila*. En el caso de la DMN, puede utilizarse una concentración de 10 mM sin observar efecto en la sobrevivencia de moscas libres de inversión (Muñoz, 1994), sin embargo, también en estos estudios se ha observado reducción en la aparición de moscas portadoras de inversiones. Como ha sido mostrado por González y Ramos (1995), la presencia de un cromosoma balanceador con gran cantidad de inversiones que evitan la recuperación de organismos recombinantes tiene un efecto de selección en las moscas portadoras. Lo anterior sugiere que se requiere de ambos cromosomas homólogos para la reparación de parte de las alteraciones inducidas por este compuesto. En este contexto, cabe recordar que por el diseño de la cruce, las moscas consideradas proficientes en reparación llevan al

cromosoma balanceador *FM7*, lo que ayudaría a explicar la rápida caída en la sobrevivencia en las moscas proficientes en comparación con lo observado con otras líneas no portadoras para las cuales estas concentraciones no provocan efecto aparente en la sobrevivencia.

La colchicina es un veneno del huso estándar, utilizado frecuentemente en estudios de aneuploidia y aberraciones cromosómicas (Bond, 1987), dado su mecanismo de acción los resultados en esta prueba de reparación, son los esperados, incluso la disminución en índice de sobrevivencia de las moscas proficientes y deficientes en reparación, indicaría que la acción de este compuesto ocurre en otro nivel celular ya que afecta a ambos tipos de moscas por igual, sin importar el genotipo de las moscas tratadas (Figs. 27 y 28). Por el tipo de alteraciones que provoca este veneno no puede ser detectado con esta prueba y concuerdan con los de Fujikawa, quien obtuvo resultados negativos en esta prueba de reparación del ADN *in vivo* (Inoue, 1995).

La azida de sodio en líneas deficientes en reparación de *S. typhimurium* (TA1975, TA1530 y TA1535) indujo alteraciones al ADN (Kleinhofs, 1976); se ha sugerido que estas alteraciones que podrían ser similares a las que provoca el etil-metanosulfonato y la N-metil-N-nitrosoguanidina (Owais, 1988), los resultados obtenidos en la prueba de reparación de *Drosophila melanogaster* apoyan parcialmente lo anterior, ya que este compuesto disminuyó por igual la sobrevivencia de todas las moscas tratadas; la azida de sodio es un compuesto, que se manifiesta *in vivo* como recombinogénico mitótico (lo cual incluye rompimiento y reunión del ADN) esto implica un tipo de interacción con el ADN que ha sido reportado por González y Ramos (1997), quienes han mostrado que la actividad recombinogénica está limitada a las moscas libres de inversión, mientras que en las hembras y machos portadores de un cromosoma balanceador, o en los machos

hemicigóticos (Ramos-Morales y Ordaz, 1999), no se observa efecto genotóxico, pero sí se aprecia pérdida por letalidad de una fracción de los organismos tratados; así, dada la presencia del cromosoma *FM7* en las moscas proficientes en reparación y de la doble mutación en las deficientes en reparación, no se esperaba diferencia en el efecto de la azida en los dos tipos de moscas, por lo que la respuesta obtenida se considera negativa para esta prueba y concuerda parcialmente con lo esperado para esta sustancia, aunque a concentraciones mayores a 0.25 mM reduce la sobrevivencia de los organismos tratados, lo que implica que a estas concentraciones la azida provoca alteraciones que no pueden ser reparados por ambos tipos de moscas. Es importante señalar que cuando se dan tratamientos similares con la azida de sodio a moscas proficientes en reparación y libres de cromosomas balanceadores, el compuesto sólo empieza a tener efecto en la sobrevivencia a partir de 0.88 mM (Ramos-Morales y Ordaz, 1999), lo que apoya que la presencia del cromosoma balanceador es un factor de selección ante la exposición a estos compuestos.

La genotoxicidad del plomo, no pudo ser detectada mediante esta prueba, los resultados obtenidos son negativos en el análisis de este metal, tampoco provoca alteraciones a otros niveles celulares, ya que la sobrevivencia de todas las moscas tratadas no se altero y no fue diferente a la de su testigo concurrente. Dado que el plomo se reporta como veneno mitótico se podría esperar un comportamiento similar al de colchicina, sin embargo los resultados son diferentes, incluso estos resultados hacen suponer que a estas concentraciones el plomo es inocuo en *Drosophila melanogaster*. Esta metodología puede detectar el daño inducido al ADN por los radicales libres (Watanabe, 1996). Resultados obtenidos en la prueba de mutación y recombinación somática (Ramos-Morales, 1995) con el cloruro de plomo han revelado que esta sal no induce alteraciones somáticas, lo que apoya los resultados obtenidos en este estudio, por lo que podría sugerirse que el

mecanismo de acción del cloruro de plomo no implica alteraciones importantes a la integridad del ADN que deban ser reparados por los mecanismos detectados en la prueba de reparación del ADN y más bien apoyan que esta sal interfiere con la función de diversas enzimas que participan en el proceso de desintoxicación (Newcomb, 1998).

En general, la prueba de reparación *in vivo* del ADN de *Drosophila melanogaster* logró detectar como positivos a compuestos inductores de daño como la DMN y el MMS; no detectó la actividad del veneno del huso, colchicina; de igual manera fue negativo el efecto de la azida de sodio, un compuesto que requiere de homología en los cromosomas homólogos para la recuperación de recombinación y mostró que en las concentraciones probadas, el cloruro de plomo sólo tuvo un ligero efecto en las moscas deficientes en reparación.

La prueba utilizada en este estudio mostró una serie de ventajas: es una alternativa importante en estudios de mutagénesis ya que se recobran resultados a partir de concentraciones menores a las utilizadas en otras metodologías, es una metodología *in vivo*, lo que la hace sumamente valiosa ya que existen muy pocos sistemas de prueba que detecten este tipo de efecto *in vivo* y que reúnan la complejidad de este eucarionte; es una metodología económica que proporciona resultados en un tiempo relativamente breve y es de fácil ejecución.

Una desventaja importante es la construcción del sistema de cruza, ya que debido a las características de los marcadores, se requiere utilizar cromosomas compuestos y balanceadores, lo que limita la capacidad de detección de la prueba. Una alternativa para mejorar la detección de la inducción de daño al ADN es correr paralelamente experimentos con moscas de tipo silvestre, las cuales son proficientes en reparación y no portan cromosomas balanceadores ni cromosomas compuestos, así, la comparación entre la

sobrevivencia de las moscas silvestres podría ser útil para determinar el efecto del cromosoma balanceador en el sistema de cruza y se podría discriminar más confiablemente la participación de la recombinación entre cromosomas homólogos como una estrategia para reparar el daño inducido por compuestos recombinogénicos como la azida de sodio.

Fig. 21 Curvas de sobrevivencia en moscas tratadas con DMN

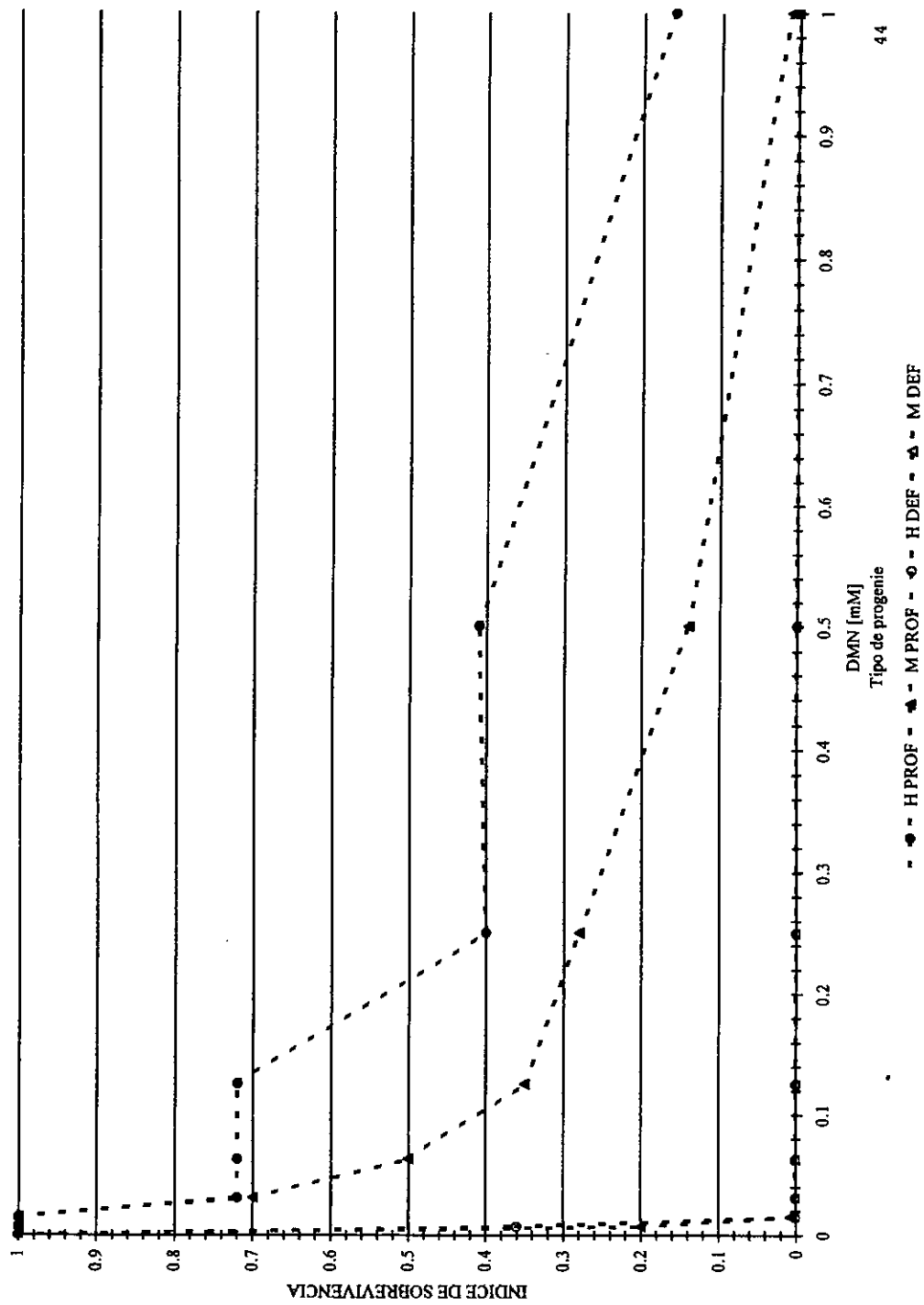


Fig. 22 Curvas de sobrevivencia en moscas tratadas con MMS

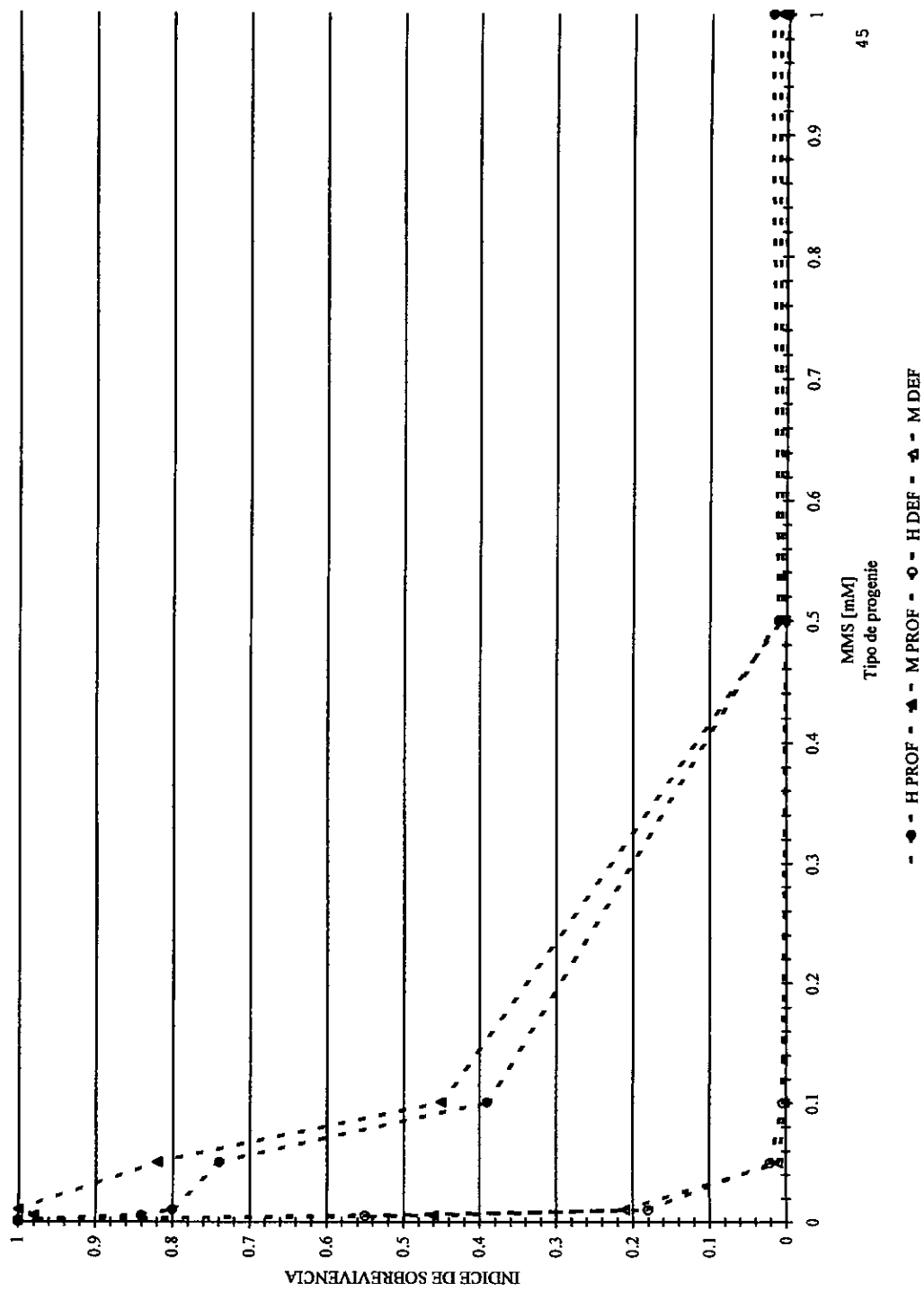


Fig. 23 Curvas de sobrevivencia en moscas tratadas con colchicina

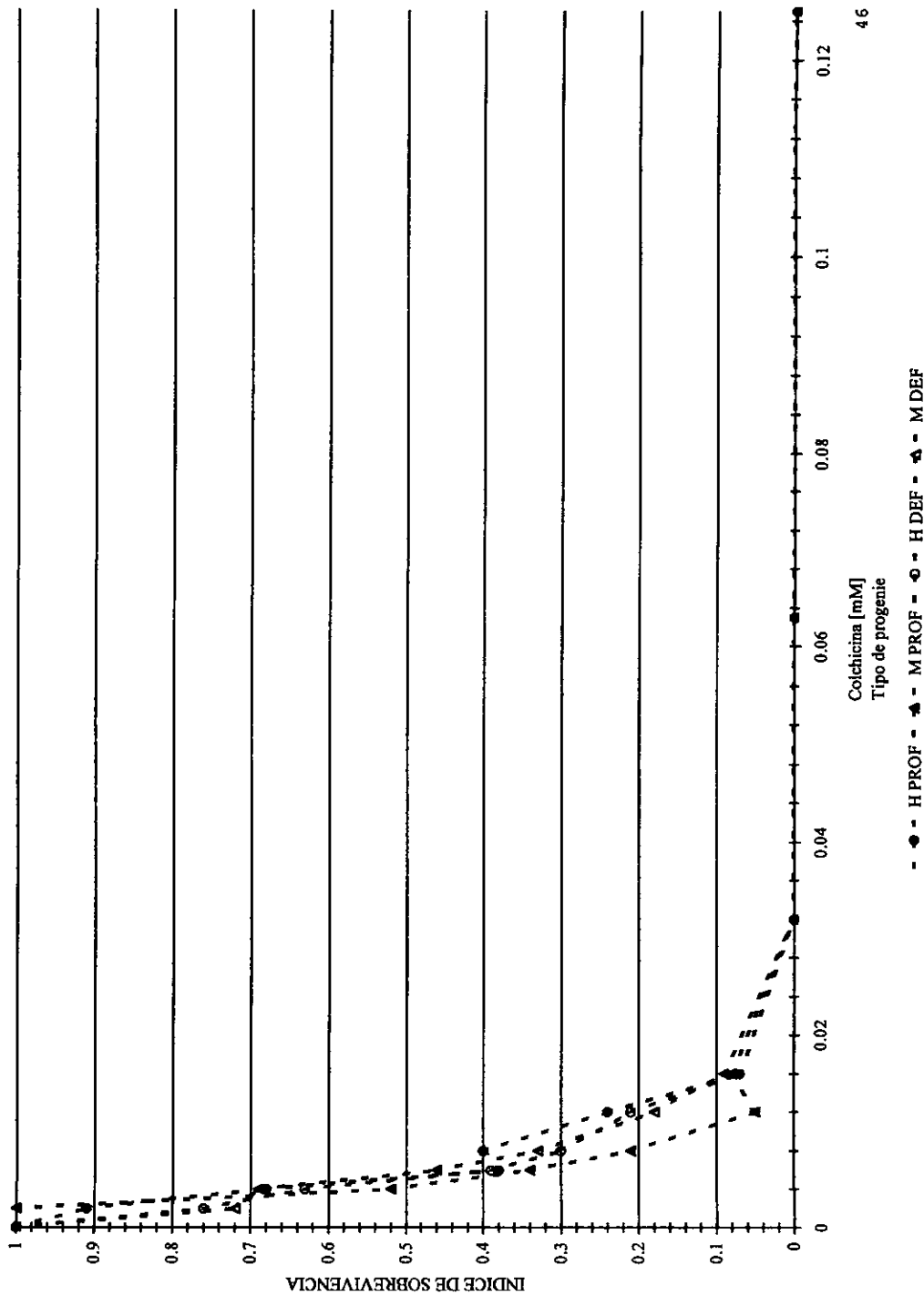


Fig. 24 Curvas de sobrevivencia en moscas tratadas con azida de sodio

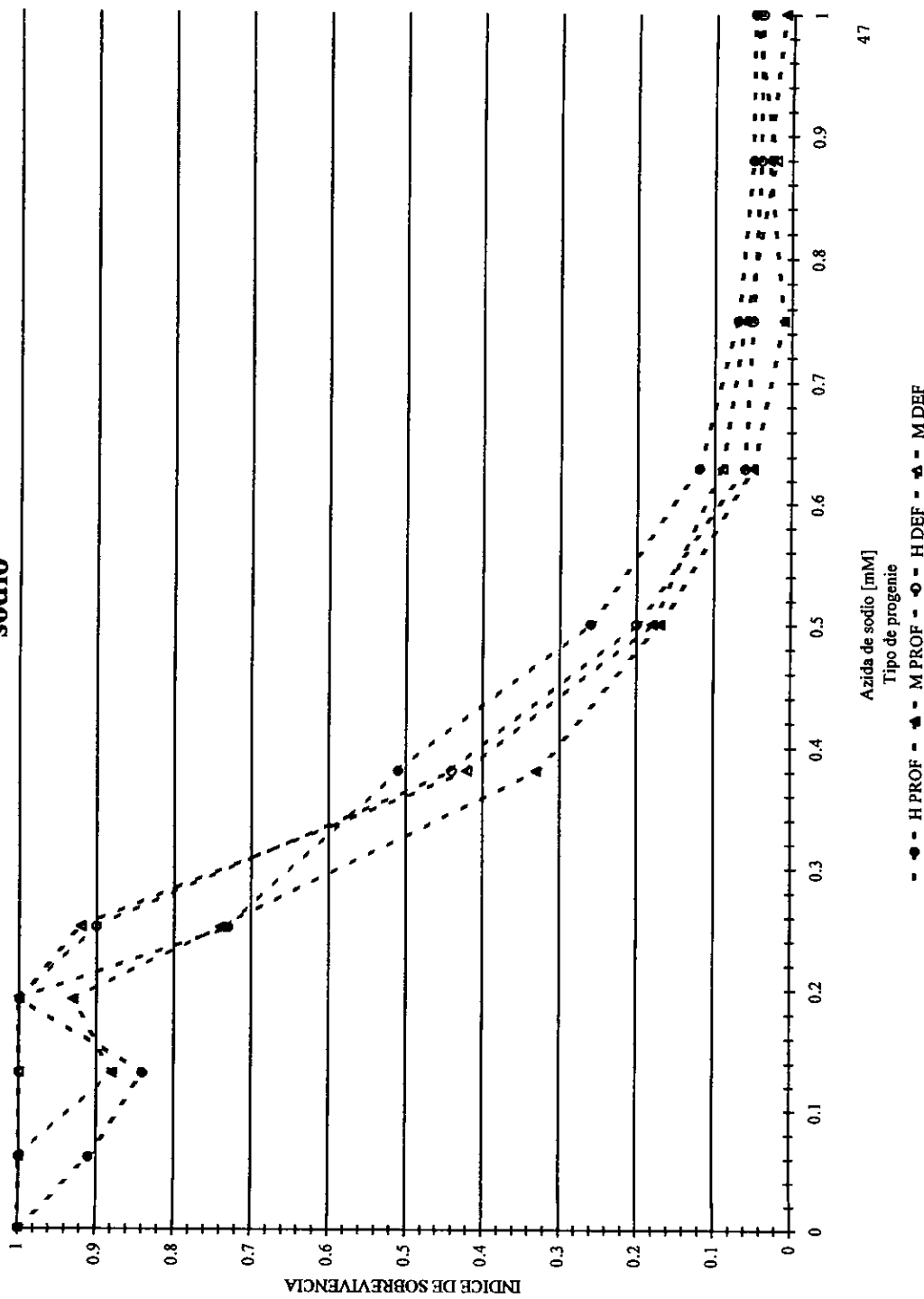


Fig. 25 Curvas de sobrevivencia en moscas tratadas con cloruro de plomo

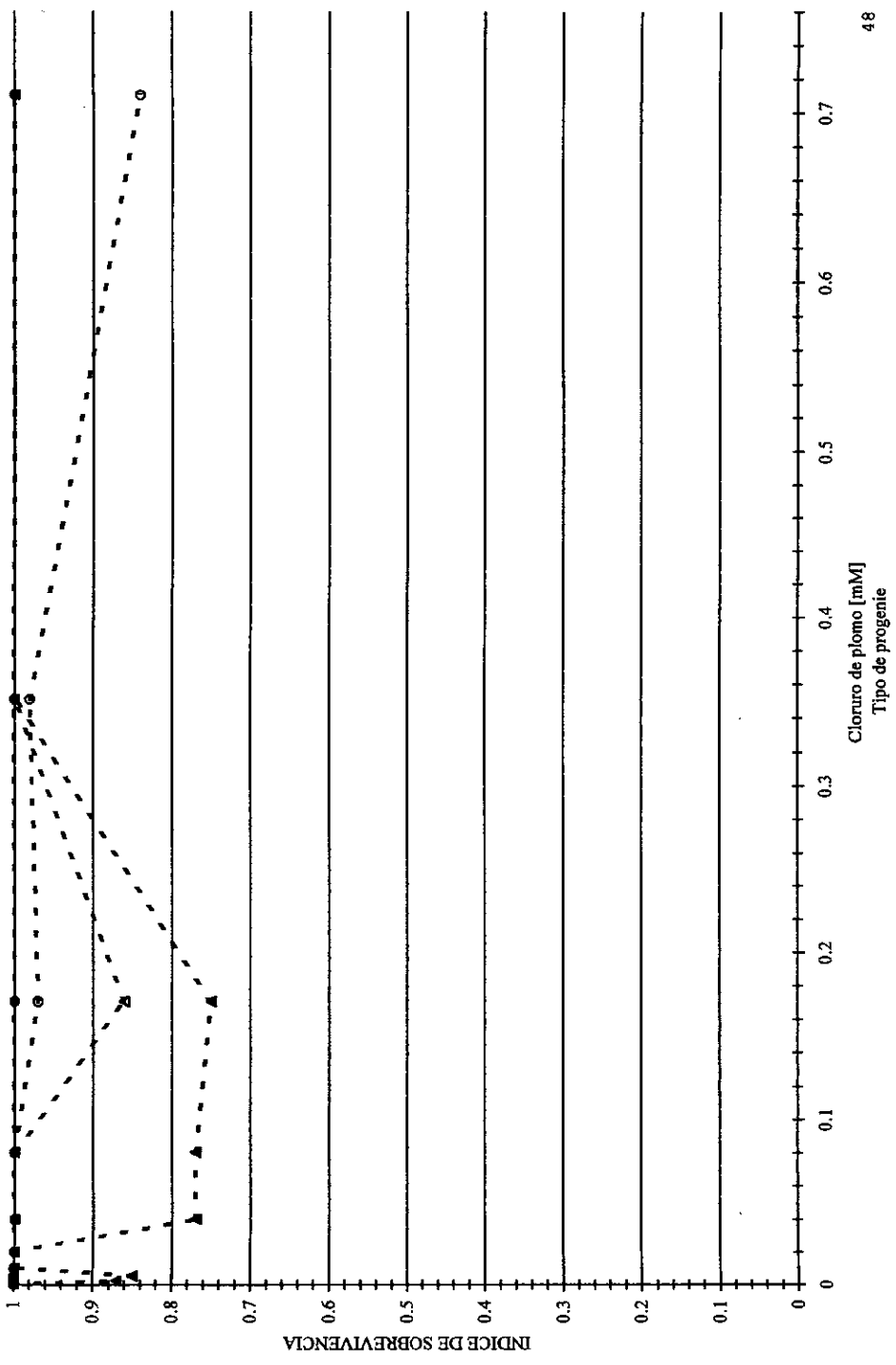


Fig. 26 Curvas de sobrevivencia en moscas proficientes (—) y deficientes (----) en reparación

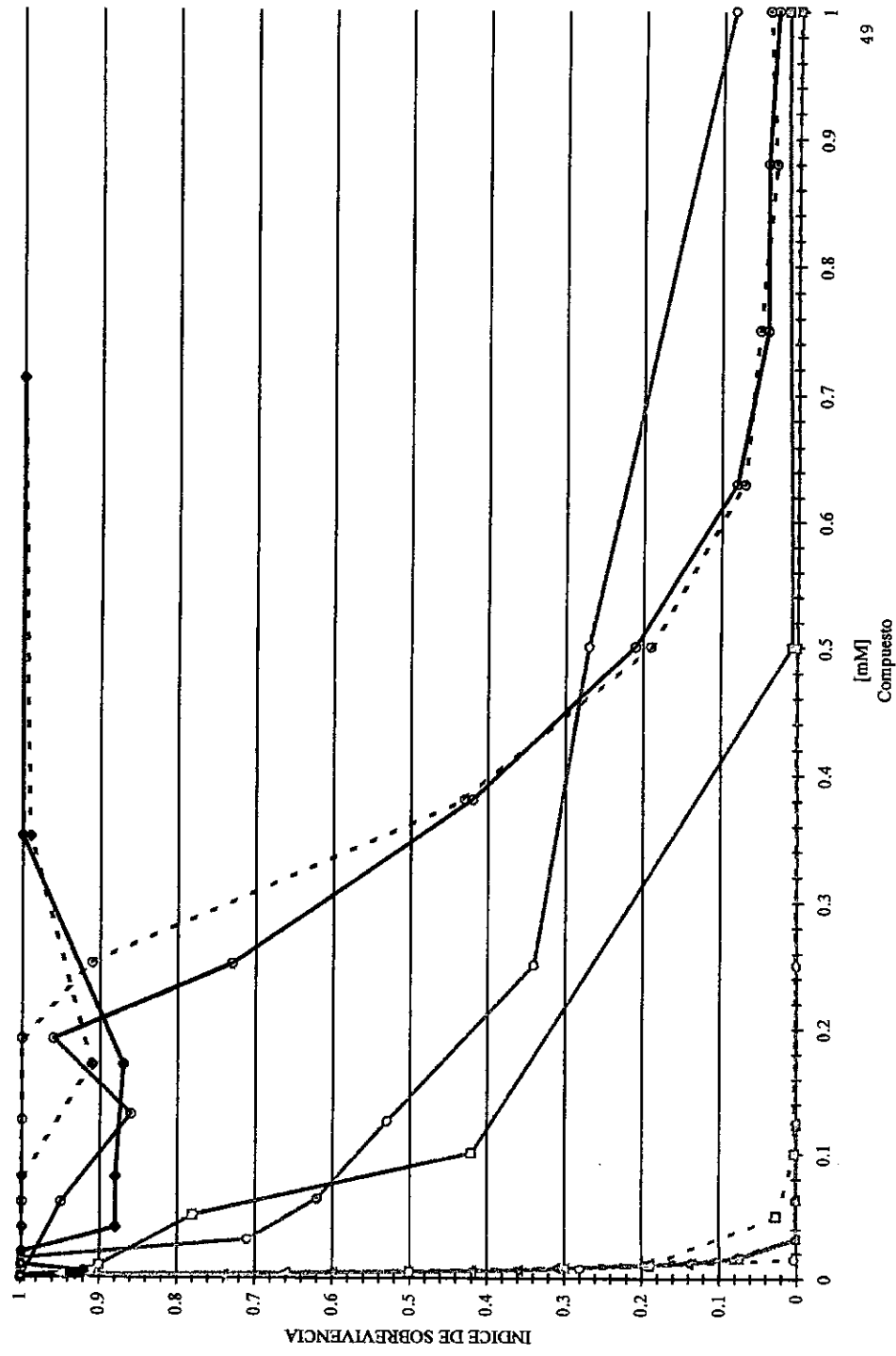


Fig. 27 Curvas de sobrevivencia en moscas proficientes en reparación

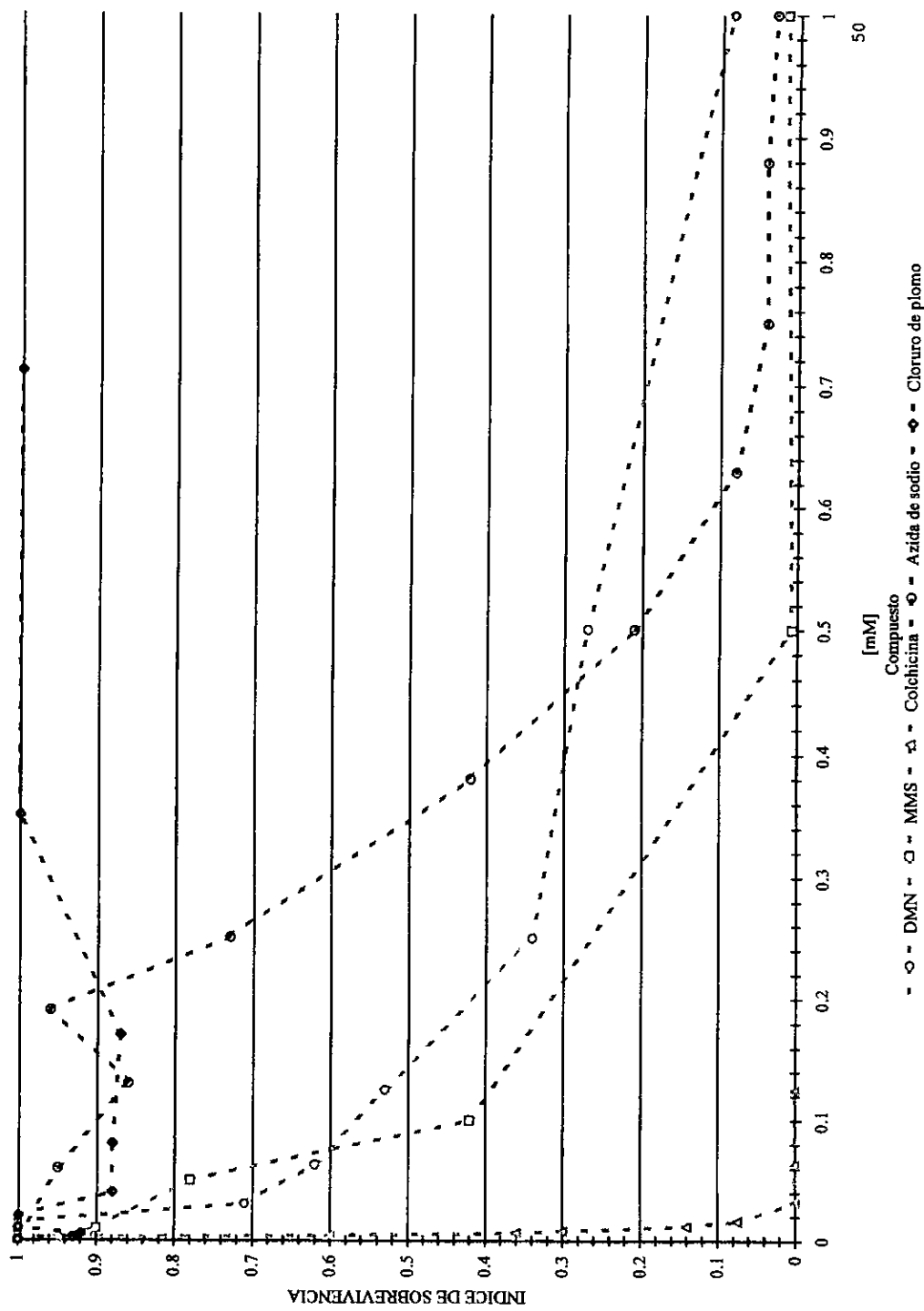
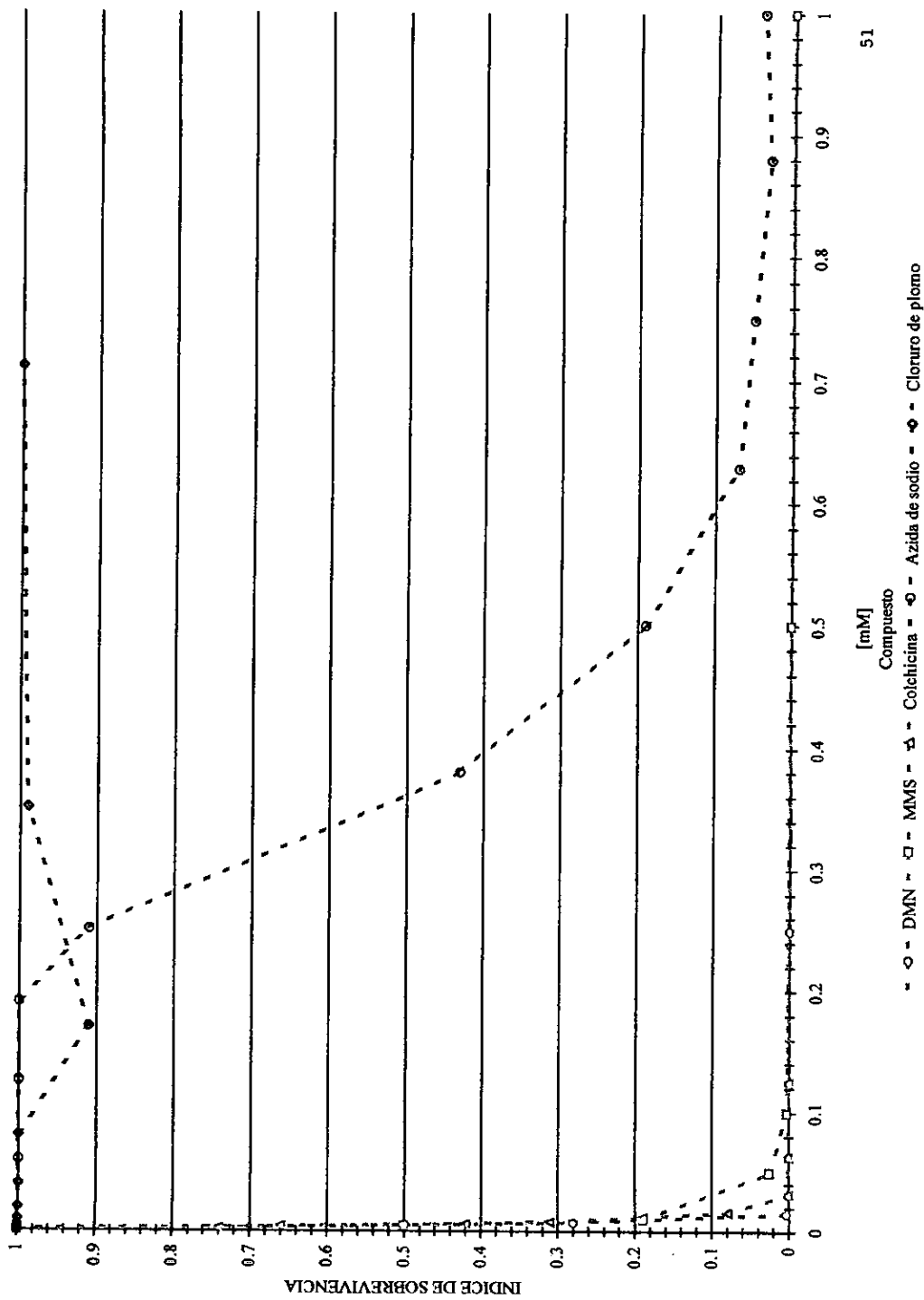


Fig. 28 Curvas de sobrevivencia en moscas deficientes en reparación



CONCLUSIONES

- ❖ La prueba de reparación del ADN de *Drosophila melanogaster* es una metodología que permite discriminar la actividad de los compuestos ensayados; es una prueba *in vivo* de fácil manejo, los resultados se obtienen en menos de una generación (<10 días), es económica, confiable y sensible.
- ❖ El manejo de esta metodología dentro del laboratorio, ha permitido tener resultados similares a los obtenidos por otros grupos de trabajo, empleando la misma prueba.
- ❖ Esta prueba es una alternativa que complementa a otras metodologías de *Drosophila melanogaster*, lo que enriquece la comprensión de los distintos mecanismos de acción de genotóxicos.
- ❖ Se propone correr paralelamente experimentos con moscas de tipo silvestre, las cuales, son proficientes en reparación y no portan cromosomas balanceadores ni cromosomas compuestos, la comparación entre la sobrevivencia de las moscas silvestres podría ser útil para determinar el efecto del cromosoma balanceador en el sistema de cruza, esto permitiría discriminar más confiablemente la participación de la recombinación entre cromosomas homólogos como una estrategia para reparar el daño inducido por compuestos recombinogénicos como la azida de sodio, esta sería una alternativa para mejorar la detección de la inducción de daño al ADN mediante esta prueba.

BIBLIOGRAFÍA

Araj, H. (1996) Positional cloning of the *Drosophila melanogaster mei 9* gene, the putative homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD1 gene, Mut. Res., 364:209-215.

Banga, S. S. (1995) Molecular cloning of *mei-41*, a gene that influences both somatic and germline chromosome metabolism of *Drosophila melanogaster*, Mol. Gen. Genet., 246:148-155.

Bond, D. J. (1987) Mechanisms of aneuploid induction, Mut. Res., 181:257-266.

Boyd, J.B. and J.M. Presley (1974) Repair, replication and photorepair of DNA in larvae of *Drosophila melanogaster*, Genetics, 77:687-700.

Boyd, J.B., M.D. Golino and R.B. Setlow (1976) The *mei 9^o* mutant of *Drosophila melanogaster* increase mutagen sensitivity and decrease excision repair, Genetics, 84:527-544.

Boyd, J.B. and R.B. Setlow (1976) Characterization of postreplication repair in mutagen sensitive strains of *Drosophila melanogaster*, Genetics 84:507-526.

Brown, T. C. (1981) Postreplication repair-defective mutants of *Drosophila melanogaster* fall into two classes, Mol. Gen. Genet. 183:356-362.

Campbell, D. y J. Stanley (1973) Diseños experimentales y cuasiexperimentales en la investigación social, Amorrortu editores, Argentina, 165 pp.

Casarett, L. (1975) Toxicology, The basic science of poisons, Macmillan Publishing Co., Inc., USA, 654 pp.

Chakravarty, B. and S. Srivastava (1992) Toxicity of some heavy metals *in vivo* and *in vitro* in *Helianthus annuus*, Mut. Res. 283:287-294.

Cooper, S.F. and S. Zimmering (1981) Genetic study on the effects of the repair-deficient mutant females *mei 9^a*, *mei 41^{D3}*, *mus 101^{D1}*, *mus 104^{D1}* and *mus 302^{D1}* of *Drosophila* on spontaneous and X ray induced chromosome loss in the paternal genome, Mut. Res., 81:345-356.

Deutsch, W. A. (1987) Enzymatic studies of DNA repair in *Drosophila melanogaster*, Mut. Res., 184:209-215.

Dusenbery, R.L. (1996) Cellular responses to DNA damage in *Drosophila melanogaster*, Mut. Res., 364:133-145.

Ecken, J.C. and F.H. Sobels (1985) Studies on mutagen-sensitive strains of *Drosophila melanogaster*. VI. The effect of DNA repair deficiencies in spermatids, spermatocytes and spermatogonia irradiated in N₂ or O₂, Mut. Res., 149:409-414.

Friedberg, E.C. (1980) DNA repair, WH Freeman and Co. New York, USA, 840 pp.

Friedberg, E. (1984) DNA Repair, Ron Newcomer & Associates, USA, 614 pp.

Fujikawa (1993) Genotoxic potency in *Drosophila melanogaster* of selected aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons as assayed in DNA repair test, Mut. Res., 290:175-182.

González, E. and P. Ramos-Morales (1997) Sodium azide induces mitotic recombination in *Drosophila melanogaster* larvae, Mut. Res., 389:157-165.

Graf, U. (1992) *Drosophila* genetics a practical course, Springer-Verlag, Ger., 239 pp.

Grigoriú, P. de B. (1998) Search for DNA repair pathways in *Drosophila melanogaster*, Mut. Res., 407:67-84.

Hanawalt, P.C. (1990) Role of gene expression in the fine structure of DNA damage processing, Inluido en: Biotechnology and Human genetics predisposition to disease, Wiley-Liss Inc.,USA, 200 pp.

Hanawalt, P. C. (1998) Overview, Inluido en: DNA damage and repair, Volume I: DNA repair in prokaryotes and lower eukaryotes, Edited by Jac A. Nickloff and Merl F. Hoekstra, Humana Press, USA, pp. 1-8.

Hari, K. L. (1995) The *mei 41* gene of *Drosophila melanogaster* is a structural and functional homolog of the human Ataxia Telangiectasia gene, *Cell*, 82:815-821.

Howard, P. (1982) Reparación inducible del ADN, *Investigación y Ciencia*, 1:28-34.

Inoue, H. (1995) Genotoxic effect of giseofulvin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*, *Mut. Res.*, 343:229-234.

Johnson, F. M. (1998) The genetic effects of environmental lead, *Mut. Res.* 410:123-140.

Kawai, K. (1998) Enhancement of DNA damaging activity of N-nitrosodimethylamina by di-(2-ethylhexyl)phthalate in somatic cells *in vivo* of *Drosophila melanogaster*, *Biol. Pharm. Bull.*, 6:579-582.

Kallio, M. (1995) Effects of vinblastine and colchicine on male rat meiosis *in vivo*: Disturbances in spindle dynamics causing micronuclei and metaphase arrest, *Env. and Mol. Mut.*, 25:106-117.

Keith, C. T. (1995) PIK-Related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints, *Science*, 270:50-51.

Kleinhofs, A. (1976) Effect of excision repair on azide-induced mutagenesis, *Mut. Res.*, 41:233-240.

Lamm, L. M. (1989) Rapid screening of potential human bladder carcinogens: genotoxicity in meiosis repair deficient *Drosophila melanogaster*, *The Journal of Urology*, 142:1356-1358.

Lewin, B. (1994) *Genes V*, Oxford University Press and Cell Press, USA, 1272 pp.

Linsley, L. and G. Zimm (1992) *The genome of Drosophila melanogaster*, Academic Press, Inc., U.K., 1142 pp.

McAthey, P. (1996) Genotoxicity testing in *Schizosaccharomyces pombe*, Incluido en: *Methods in molecular biology: yeast protocols*, Humana Press, USA, vol. 53, 433 pp.

Méndez, I. (1990) *El protocolo de investigación. Lineamientos para su elaboración y análisis*, Editorial Trillas, 2a. Edición, México, 212 pp.

Mitchell I. de G. (1984) Mutation test with the fruit fly *Drosophila melanogaster*, Incluido en: *Mutagenicity testing a practical approach*, Edited by S. Venitt & J. M. Parry, IRL Press, U.K., pp. 149-155:

Mubasher, E. (1997) Identification of defective illegitimate recombinational repair of oxidatively - induced DNA double - strand breaks in Ataxia telangiectasia cells, *Mut. Res.* 384: 169-179.

Muñoz, M. A. (1994) Caracterización del potencial genotóxico y protector de *Ipomea orizabensis* en células somáticas de *Drosophila melanogaster*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias U.N.A.M., México, 65 pp.

Negishi, T, K Fujikawa and H. Hayatsu (1991) The genotoxicities of N-nitrosamines in *Drosophila melanogaster in vivo*: the correlation of mutagenicity in the wing spot test with the DNA damages detected in the DNA-repair test, *Mut. Res.*, 252:119-128.

Negishi, T. (1994) Inhibitory activity of chlorophyllin on the genotoxicity of carcinogens in *Drosophila*, *Cancer Letters*, 83:157-164.

Newcomb G. T. (1998) Oxidative DNA damage and mutagenesis, Incluido en: DNA damage and repair, Volume I: DNA repair in prokaryotes and lower eukaryotes, Edited by Jac A. Nickloff and Merl F. Hoekstra, Humana Press, USA, pp. 65-84.

Nguyen, T.D., J.B. Boyd and M.M. Green (1979) Sensitivity of *Drosophila* mutants to chemical carcinogens, *Mut. Res.*, 63:67-77.

Osgood, C. J. (1982) Apurinic endonuclease from *Drosophila melanogaster*: reduced enzymatic activity in excision-deficient mutants of the *mei 9* and *mus(2)201* loci.

Owais, W. M. (1988) Metabolic activation of the mutagen azide in biological systems, Mut. Res., 197:313 - 323.

Ramos-Morales, P., A. Dorantes, A. Campos, H. Rivas, M. Martínez y B. Hernández, (1995) Efecto de tres sales inorganicas de plomo en células de las alas de *Drosophila melanogaster*, Incluido en: Memorias del VI Congreso Nacional de Genética, Sociedad Mexicana de Genética, Xalapa, Veracruz, México; paginas 178-179.

Ramos-Morales, P. y M. G. Ordaz (1999) Sodium azide genotoxicity *Drosophila's* sex differences ?, Mut. Res. (En prensa).

Roy, N. K. (1992) Mutagenesis and comutagenesis by lead compounds, Mut. Res. 298:97-103.

Rubin, G. (1988) *Drosophila melanogaster* as an experimental organism, Science, 240: 1453-1459.

Russell, P. J. (1998) Genetics, The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc., Fifth Edition, U.S.A., 894 pp.

Sekelsky, J. J. (1995) The *Drosophila* meiotic recombination gene *mei 9* encodes a homologue of the yeast excision repair protein Rad 1, Genetics, 141:619-627.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

The Merck Index (1989) An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals, 11 ed., Merck & Co. Inc., USA.

Watanabe, T. (1996) Genotoxicity *in vivo* of phenazine and aminophenazines assayed in the wing spot test and DNA repair test with *Drosophila melanogaster*, Mut. Res., 369:75-80.

Weinert, T. (1998) Pathways and puzzles in DNA replication and damage checkpoints in yeast, Includo en: DNA damage and repair, Volume I: DNA repair in prokaryotes and lower eukaryotes, Edited by Jac A. Nickloff and Merl F. Hoekstra, Humana Press, USA, pp. 363-382.

William, R. (1988) Expression of *Escherichia coli* DNA alkylation repair genes and human cells, Includo en: DNA replications and mutagenesis, American Society for Microbiology, USA, 193 pp.

Williams, G. (1989) Structure-activity relationships in the rat hepatocyte DNA repair test for 300 chemicals, Mut. Res. 221:263-286.

Winder, C. (1993) The genotoxicity of lead, Mut. Res., 285:117-124.

Wolfe, S. L. (1995) An introduction to cell and molecular biology, Wadsworth Publishing Company, U.S.A., 820 pp.

Wood, R. (1995) Proteins participate in nucleotide excision repair of DNA in mammalian cells, Includo en: DNA repair and recombination, Chapman & Hall, UK, 102 pp.

*Por estas asperezas se camina
de la inmortalidad al alto asiento,
mas nunca arriba quien de aquí declina.*

Cervantes, "El Ingenioso Hidalgo Don Quijote de la Mancha"