



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

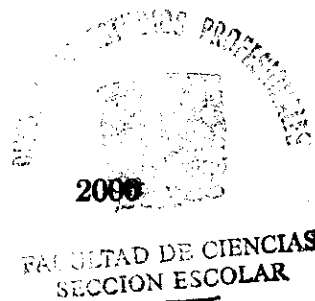
COMPARACION DE LA GENOTOXICIDAD DE
CUATRO COMPUESTOS DE CROMO (VI) EN
CELULAS SOMATICAS DE *Drosophila melanogaster*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
HERNANDEZ BERNAL BLANCA ROSA

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. PATRICIA RAMOS MORALES



285951



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO


MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

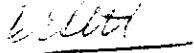
Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Comparación de la genotoxicidad de cuatro compuestos de Cromo (VI) en células somáticas de *Drosophila melanogaster* realizado por Hernández Bernal Blanca Rosa


con número de cuenta 6906521-5 , pasante de la carrera de Biología

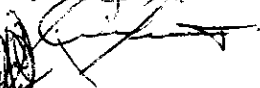
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.


Atentamente

Director de Tesis Propietario Dra. Patricia Ramos Morales 

Propietario Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte 

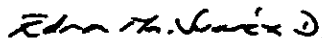
Propietario Dra. Regina Dorinda Montero Montoya 

Suplente M en C Adriana Muñoz Hernández 

Suplente Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre 

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología



Dra. Edna Marfa Suárez Díaz
DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA



**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.**

A mis padres con todo mi cariño y respeto.

Gracias por su amor, por su apoyo y por lo que con su ejemplo me han enseñado.

Con amor a Javier.

Porque hemos soñado juntos y juntos hemos hecho realidad nuestros sueños, éste es uno mas.

A Canek y Ayari.

A ustedes pequeños que son mi sueño mas hermoso convertido en una maravillosa realidad.

A mis hermanos: Carmen, Martha, Toño, Mine, Paty, Edy y Manolo.

Gracias por su apoyo y cariño

Agradecimientos

Hugo.

Gracias por compartir conmigo tus hallazgos con las mosca, por las eternas discusiones , pero sobre todo por tu apoyo y paciencia cuando de computadoras se trata. Gracias por brindarme tu amistad.

Yadira.

Gracias por tu confianza, por tus atenciones, tu apoyo y sobre todo por tu amistad.

Adriana.

Te agradezco el apoyo que me brindaste en mis primeros pasos por el mundo de la enseñanza y también por los valiosos comentarios y observaciones para la conclusión de este trabajo.

Lupita

Gracias por compartir conmigo tus conocimientos, por tu apoyo y sobre todo por tu amistad.

A los compañeros del laboratorio: Maju, Yola, Adriana R. Chuy, Armando, Omar.

A los que ya no están: Edna, Pati O, Héctor, Julián, Pati chiquita, Moy y Juan Carlos.

A todos gracias por su amistad y por su disposición a compartir sus conocimientos.

Quiero agradecer a la Dra. Patricia Ramos por su confianza, paciencia, apoyo y por la oportunidad de compartir con ella y con los compañeros del laboratorio el amor por la genética y por las moscas

A los sinodales:

Dra. María Eugenia Gonsebatt

Dra. Regina Montero Montoya

M en C Adriana Muñoz Hernández

Dr. Javier Espinosa

Que amablemente accedieron a ser parte de este jurado , por sus atenciones y comentarios, gracias.

Índice General

Introducción	1
Antecedentes.....	4
<i>Drosophila melanogaster</i> como sistema de prueba.....	7
Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas.....	8
Cromo.....	11
Plomo.....	16
Objetivos.....	18
Metodología.....	19
□ Cruza y marcadores.....	19
□ Procedimiento experimental.....	20
□ Análisis estadístico.....	22
Resultados.....	25
□ Dicromato de potasio.....	25
□ Cromato de potasio.....	26
□ Cromato de sodio.....	27
□ Cromato de plomo.....	27
Discusión.....	54
Conclusiones.....	62
Referencias.....	63

INTRODUCCIÓN

Los seres vivos están expuestos de manera continua a una gran variedad de compuestos, que van desde metales y otros químicos inorgánicos, hasta moléculas orgánicas complejas y agentes físicos, todos ellos potencialmente dañinos. La toxicología se encarga de evaluar y cuantificar el riesgo de la exposición a estos agentes, haciendo uso de datos y metodologías de disciplinas como: química, farmacología, embriología, fisiología, genética y estadística, entre otras; así como de la predicción de los efectos que podrían causar en los organismos de una especie, con base en los resultados de pruebas realizadas en los organismos de otra especie (OMS, 1980)

Para evaluar el peligro potencial que representan los agentes tóxicos sobre los sistemas biológicos, la toxicología utiliza modelos animales y vegetales en bioensayos que involucran el uso de especies, que por sus características, estimen la respuesta que tendría el hombre bajo condiciones de exposición similares (Brusick, 1987). Los modelos animales empleados van desde procariontes hasta organismos más complejos, como artrópodos y mamíferos, evaluando su eficacia por su sensibilidad para detectar al agente tóxico y su capacidad para discriminar entre los diferentes tipos de eventos producidos sobre el sistema biológico.

Una rama de la toxicología es la toxicología genética, la cual agrupa estudios enfocados a identificar y analizar la acción de agentes con toxicidad directa sobre el material genético. Uno de los principales objetivos de esta disciplina es detectar y entender las propiedades de un pequeño grupo de agentes (mutágenos) que son altamente específicos para los ácidos nucleicos, en particular para el ADN y producen efectos deletéreos para los organismos (Vogel, 1992).

Los compuestos que en concentraciones subtóxicas producen alteraciones en los ácidos nucleicos que modifican el contenido o la integridad del ADN, son clasificados como

genotóxicos. Así, los genotóxicos son sustancias que tienen propiedades químicas y físicas que facilitan su interacción con los ácidos nucleicos.

La toxicología genética tiene un doble objetivo: el primero es la implementación de pruebas y métodos de evaluación de riesgo para definir el impacto de agentes genotóxicos (físicos y químicos) que se encuentran en el medio ambiente y cuya presencia puede alterar la integridad del material genético humano (células germinales). El segundo se refiere al estudio de los efectos provocados sobre las células somáticas, así como de los mecanismos que pueden estar implicados en la formación de procesos cancerosos (Casarett, 1975; Vogel, 1992).

Debido a que los efectos de los mutágenos pueden variar entre especies e individuos, así como en diferentes tipos y estados celulares en los mismos organismos, la evaluación del daño que un agente genotóxico puede causar sobre el material genético debe estar basada en estrategias que involucren el uso de diferentes organismos, siguiendo una serie de etapas y cubriendo un amplio espectro de tipos de daño genético (Tabla 1) (Brusick, 1987).

Tabla 1. Sistemas de prueba usados con mayor frecuencia en protocolos de mutagénesis.

<i>Salmonella typhimurium</i>	Ensayos de reversión bacteriana
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Squizosaccharomyces pombe</i> <i>Neurospora crasa</i>	Ensayos de genotoxicidad en eucariontes inferiores. Recombinación
Fibroblastos Células HeLa	Síntesis no programada de ADN
Células de criceto (CHO) Células de humanos	Citogenética <i>in vitro</i> e Intercambio de cromátidas hermanas
Médula ósea de ratón	Citogenética <i>in vivo</i> . Análisis de metafases Prueba de micronúcleos
<i>Tradescantia</i> <i>Vicia faba</i>	Mutación somática Aberraciones cromosómicas; ICH
<i>Drosophila melanogaster</i> Letales dominantes en ratón	Mutaciones letales recesivas ligadas al sexo. Mutaciones letales dominantes
Humanos Sangre (linfocitos) Espermatozoides Orina	Aberraciones cromosómicas ICH Micronúcleos en linfocitos y epitelios de descamación

Aunque la información derivada de estos estudios representa una valiosa ayuda para la evaluación de compuestos, debe tomarse con reserva, ya que la confiabilidad de los resultados

dependerá del acierto que se tenga al seleccionar los bioensayos que formarán parte de las baterías de prueba.

ANTECEDENTES

Entre los tipos de pruebas incluidas en el campo de la toxicología genética, existe un alto nivel de redundancia, por lo que se ha hecho necesario intentar agruparlas en clases de acuerdo a diferentes criterios, aquí se proponen cuatro grupos. Dos de éstos miden cambios genéticos producidos por mutación de locus específico y aberraciones cromosómicas. Un tercer grupo, mide daño primario al ADN, o la inducción de aductos o rompimientos y la respuesta celular producida durante la reparación del daño. Esta respuesta incluye, estimulación de la reparación del ADN, formación de aductos-ADN, recombinación somática entre homólogos o cromátidas hermanas y rompimientos de hebra de ADN. El cuarto grupo incluye metodologías, que aunque no identifican directamente el tipo de daño, exploran la capacidad de la sustancia probada para transformar células "normales" de mamíferos a células con propiedades neoplásicas (Brusick, 1987).

Para diseñar una batería de prueba es necesario, además de la clasificación de las pruebas, definir cuáles y/o cuántas pruebas deberán incluirse de acuerdo con el tipo de evento que se pretenda medir, es decir, algunas baterías se construyen para predicción de carcinogénesis; otras, están enfocadas a la predicción de riesgo genético con énfasis en la mutagénesis de células germinales. Pretender alcanzar ambos objetivos con una sola batería de prueba resulta poco eficiente, ya que los eventos que conducen a alteraciones en células de la línea germinal y en células somáticas implican diferentes mecanismos y deben ser determinados de manera específica

dependerá del acierto que se tenga al seleccionar los bioensayos que formarán parte de las baterías de prueba.

ANTECEDENTES

Entre los tipos de pruebas incluidas en el campo de la toxicología genética, existe un alto nivel de redundancia, por lo que se ha hecho necesario intentar agruparlas en clases de acuerdo a diferentes criterios, aquí se proponen cuatro grupos. Dos de éstos miden cambios genéticos producidos por mutación de locus específico y aberraciones cromosómicas. Un tercer grupo, mide daño primario al ADN, o la inducción de aductos o rompimientos y la respuesta celular producida durante la reparación del daño. Esta respuesta incluye, estimulación de la reparación del ADN, formación de aductos-ADN, recombinación somática entre homólogos o cromátidas hermanas y rompimientos de hebra de ADN. El cuarto grupo incluye metodologías, que aunque no identifican directamente el tipo de daño, exploran la capacidad de la sustancia probada para transformar células "normales" de mamíferos a células con propiedades neoplásicas (Brusick, 1987).

Para diseñar una batería de prueba es necesario, además de la clasificación de las pruebas, definir cuáles y/o cuántas pruebas deberán incluirse de acuerdo con el tipo de evento que se pretenda medir, es decir, algunas baterías se construyen para predicción de carcinogénesis; otras, están enfocadas a la predicción de riesgo genético con énfasis en la mutagénesis de células germinales. Pretender alcanzar ambos objetivos con una sola batería de prueba resulta poco eficiente, ya que los eventos que conducen a alteraciones en células de la línea germinal y en células somáticas implican diferentes mecanismos y deben ser determinados de manera específica

(Brusick, 1987).

Debido a la disponibilidad de una gran variedad de pruebas que incluyen organismos con diferente nivel de complejidad y a que no existen criterios de exclusión para pruebas específicas, el monitoreo puede iniciarse con una valoración preliminar en pruebas de submamíferos y pruebas *in vitro*, para posteriormente realizar pruebas análogas *in vivo*, o bien utilizar organismos más complejos y costosos, como los mamíferos. Para que un bioensayo sea candidato como prueba de monitoreo rutinario, debe:

- Identificar sustancias con afinidad al ADN o con toxicidad específica para macromoléculas. Estos eventos deben ser identificados como efectos primarios al ADN, mutaciones puntuales o alteraciones cromosómicas.
- Tener capacidad metabólica adecuada para la biotransformación de promutágenos y/o procarcinógenos.
- Los resultados de la prueba deben ser reproducibles. El diseño del estudio debe garantizar tamaños de muestra apropiados para la determinación reproducible de respuestas positivas o negativas.
- La trasferibilidad de las metodologías entre laboratorios debe ser documentada. Las pruebas que puedan ser realizadas en sólo un laboratorio no son adecuadas para monitoreo rutinario (Brusick, 1987).

El único bioensayo en insectos que se practica de manera rutinaria para mutación génica determina la inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo (Sex Linked Recessive

Lethal Test, SLRLT) en *Drosophila melanogaster* (IARC, 1990). Sin embargo, debido a las grandes ventajas que presenta este organismo, se han desarrollado otras metodologías, que ofrecen información relevante en la evaluación de genotóxicos. Un ejemplo de ellas es la Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART).

Aunque esta prueba no está incluida como prueba rutinaria y no ha sido clasificada dentro de ninguno de los criterios antes mencionados, la Agencia Internacional para la Investigación del Cancer (IARC, 1999) la menciona como un buen modelo para detectar pérdida de heterocigosidad por recombinación, mutación, delección y no disyunción.

Con esta prueba se han evaluado más de 400 químicos y de 24 carcinógenos que dieron resultados negativos o no concluyentes en la prueba de SLRL, 22 de estos mostraron efectos positivos en la SMART (Vogel *et al.*, 1999).

El uso de células somáticas de *Drosophila* para pruebas de mutagénesis se sugirió bajo la premisa de que, en organismos heterocigóticos con un alelo recesivo alterado, ciertos eventos mutagénicos pueden inducir la pérdida del alelo dominante de tipo silvestre, con la subsecuente expresión del alelo recesivo mutante en el clon de células resultantes. La pérdida del alelo dominante puede ocurrir por mecanismos como: intercambios mitóticos entre homólogos o mutación del alelo dominante silvestre al recesivo mutante, lo que conduce a la formación de clones de células euploides (Graf *et al.*, 1984).

Existe un interés continuo en la actividad de genotóxicos en las células somáticas debido a la correlación que existe entre la exposición a estas sustancias y la inducción de mutagénesis y carcinogénesis. En *Drosophila* alrededor del 85% de los carcinógenos probados, son mutagénicos en células germinales (Vogel *et al.*, 1980). Mas aún, también la actividad recombinogénica de sustancias se discute por su conexión con la carcinogénesis (Cairns, 1981; Willers H. *et al.*, 2000)

***Drosophila melanogaster* COMO SISTEMA DE PRUEBA.**

La "mosca de la fruta", *Drosophila melanogaster* fue introducida en la investigación genética por T.H. Morgan en 1909, siendo usada desde entonces como modelo biológico en diferentes disciplinas científicas. *Drosophila* es, probablemente, el eucarionte más estudiado y el mejor conocido desde el punto de vista genético.

Entre las ventajas que ofrece, destacan la facilidad para realizar cultivos experimentales, la corta duración de su ciclo de vida (10 a 12 días a 25°C y 60 % de humedad relativa), la clara distinción de cada una de las fases de su ciclo de vida, la numerosa descendencia que produce, además del espacio reducido y bajo costo que se requiere para su mantenimiento. *D. melanogaster* tiene un número cromosómico bajo ($2n = 8$) y las larvas presentan cromosomas gigantes en las glándulas salivales, los cuales han sido de gran utilidad para hacer estudios de morfología cromosómica y evolución cariotípica.

Drosophila posee complejos enzimáticos semejantes a los que se presentan en la fracción S9 del hígado de mamíferos (Negishi *et al.*, 1991; Graf *et al.*, 1992b; Shibahara *et al.*, 1995), por lo que resulta ser un buen modelo experimental en mutagénesis, ya que es capaz de activar promutágenos de una manera similar a los sistemas de mamíferos, por lo que se dispone de numerosos mutantes metabólicos, además de otros con diferente capacidad para reparar el daño genético (Ramos *et al.*, 1993).

El uso de *Drosophila* como monitor de daño genético producido por sustancias diversas tiene una tradición de más de 50 años y ha sido usada de manera intensiva para investigar mutaciones y también en pruebas a corto plazo para identificar carcinógenos. Durante los últimos 10 años se han realizado experimentos con *Drosophila* para evaluar la relación estructura-actividad de agentes genotóxicos (Vogel *et al.*, 1999).

D. melanogaster ha permitido detectar el potencial genotóxico de compuestos que representan un riesgo potencial para los seres vivos, muchos de los cuales no se habían probado en sistemas de prueba *in vivo*.

PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS (SMART)

La prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART), fue propuesta por Graf *et al.* en 1983 y utiliza las células de los discos imagales de las alas de *D. melanogaster* (fig 1).

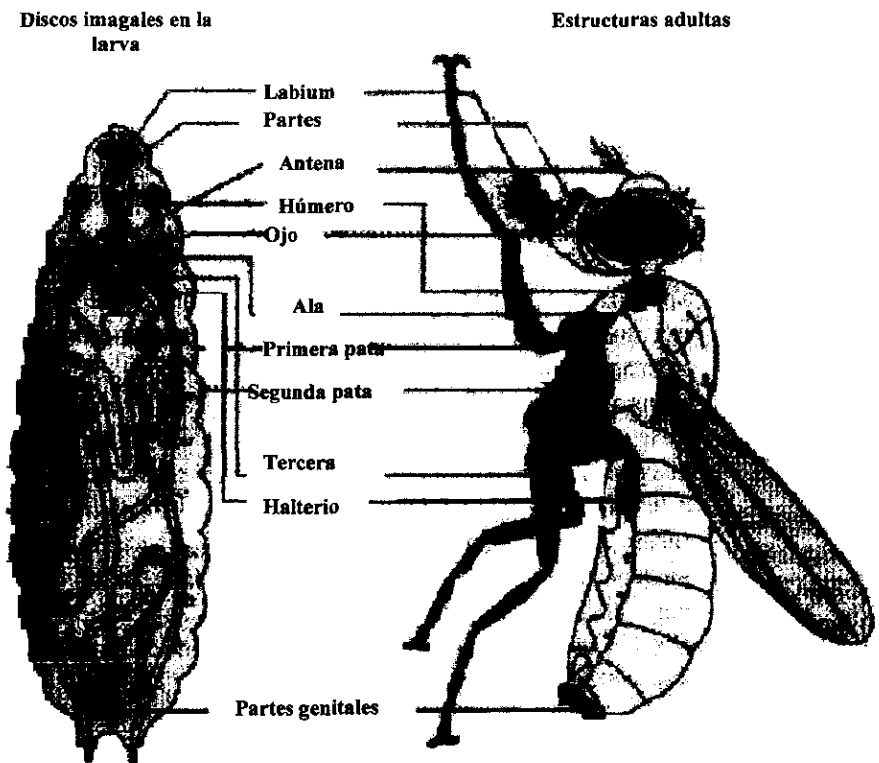


Fig. 1 Localización de los discos imagales en una larva de *Drosophila* y las estructuras adultas producidas por cada disco. Tomado de Russell 1998 .

D. melanogaster ha permitido detectar el potencial genotóxico de compuestos que representan un riesgo potencial para los seres vivos, muchos de los cuales no se habían probado en sistemas de prueba *in vivo*.

PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS (SMART)

La prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART), fue propuesta por Graf *et al.* en 1983 y utiliza las células de los discos imagales de las alas de *D. melanogaster* (fig 1).

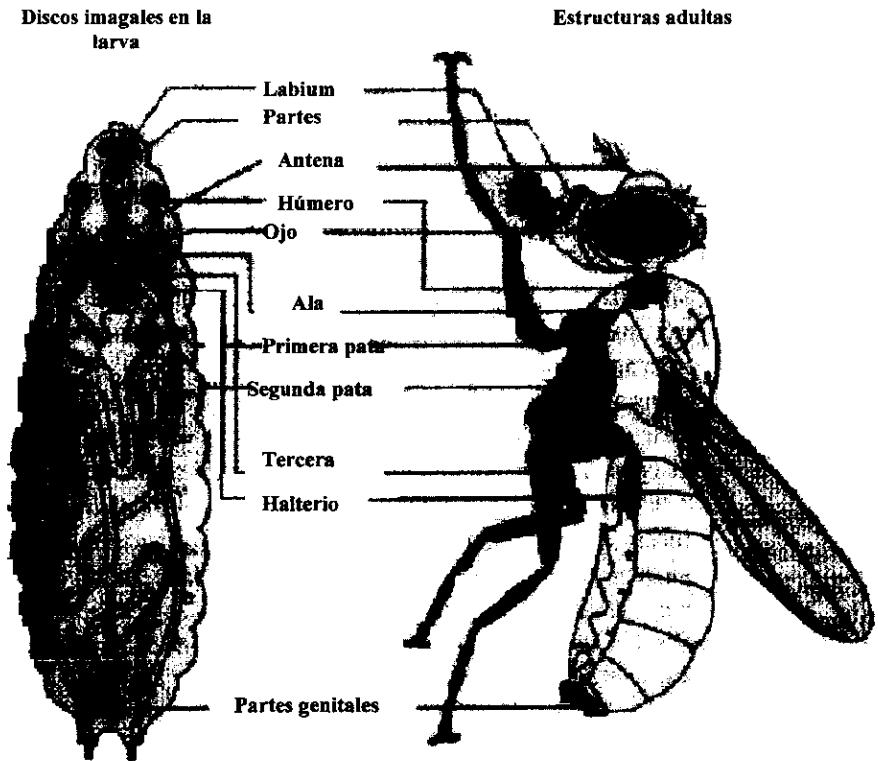


Fig. 1 Localización de los discos imagales en una larva de *Drosophila* y las estructuras adultas producidas por cada disco. Tomado de Russell 1998 .

Esta prueba permite valorar diferentes tipos de eventos genéticos mediante la cuantificación de manchas mutantes formadas por los tricomas o pelos mutantes en el contexto silvestre de la superficie de las alas de la mosca adulta. Los discos imagales están formados por tejidos que crecen por mitosis continuas durante todo el desarrollo larvario. Los discos de las alas contienen aproximadamente de 50 a 100 células al momento de la eclosión de la larva (primer estadio) y alrededor de 30,000 células en la pupa temprana, cuando comienza la diferenciación del ala, en la que cada célula de la hoja del ala da origen a un proceso unicelular, un tricoma o pelo que formará parte de la superficie dorsal o ventral de las alas. De estas células, 24,400 son analizadas para evaluar la inducción de manchas en cada mosca (Graf, 1995).

Los eventos como mutación, defeción, no disyunción y recombinación entre los marcadores utilizados originan manchas simples en las que las células afectadas expresarán sólo uno de los dos marcadores involucrados. Por otro lado, la recombinación entre el centrómero y el marcador proximal originará manchas gemelas, es decir, manchas en las que se expresan los dos marcadores de manera independiente. Por su origen, las manchas gemelas son indicadoras de recombinación, por tanto, mediante esta prueba puede estimarse el potencial recombinogénico de un compuesto; útil ventaja si se considera que el 80% de los compuestos que inducen recombinación en bacterias han resultado ser cancerígenos cuando se prueban en sistemas de mamíferos (Vogel *et al.*, 1990).

Este sistema presenta varias ventajas:

- Versatilidad de elección de protocolos en cuanto a la edad de las larvas y al tipo de administración, lo que permite suministrar diferentes tratamientos con base en las características de los compuestos a probar (Graf *et al.*, 1984).
- El tiempo del ensayo es de una generación (10 a 12 días).

- El material biológico puede almacenarse para análisis posterior o para verificación de resultados.
- En un tamaño de muestra de 40 alas se analizan aproximadamente 1,000, 000 de células (García-Bellido y Dapena 1974, Graf *et al.*, 1983).
- El uso de un cromosoma balanceador que evita recuperar eventos de recombinación viables, permite comparar el efecto de un tratamiento en las moscas portadoras con las libres de inversión (que sí detectan eventos de recombinación). La diferencia entre la frecuencia de alteraciones somáticas en ambos tipos de moscas constituye un estimador de la recombinación inducida (Graf *et al.*, 1984).

Otro aspecto importante para esta prueba es la relación entre el tiempo de inducción de una alteración en una célula del disco imagal y el tamaño de la mancha generada en el ala.

Durante el desarrollo de la larva, la continua proliferación celular incrementa el número de células blanco en el disco imagal, conforme se incrementa la edad de la larva. Debido a lo anterior, en edades larvarias tempranas se inducen pocos clones de gran tamaño, mientras que en las larvas de mayor edad, que tienen un mayor número de células blanco, se obtendrá una mayor cantidad de clones, pero de menor tamaño. Esta relación inversa entre el tamaño de clon y la frecuencia de inducción de manchas en función de la edad de la larva fue demostrada con radiaciones ionizantes por García - Bellido y Merriam (1971).

Mediante esta prueba ha sido posible analizar compuestos como la azida de sodio (González y Ramos-Morales 1997), acaricidas (Maldonado, 1994), metales pesados como plomo (Ramos *et al.*, no publicado), vanadio (Abundis, 1996) y metaloides como arsénico (Ramos-Morales y Rodríguez- Arnaiz, 1995). Variaciones en el protocolo original han permitido determinar el riesgo que implica el uso de algunas plantas en la medicina tradicional mexicana,

así como los posibles efectos sinérgicos o antagónicos de los mismos al ser administrados en conjunto con mutágenos conocidos (Muñoz, 1994) y más recientemente se está evaluando el potencial de la prueba como biomonitor para la detección de contaminantes ambientales (Ramos *et al.*, 2000).

CROMO

De los más de cien elementos químicos que se conocen, unas tres cuartas partes son de naturaleza metálica. Debido a las propiedades que los caracterizan; dureza, ductilidad, maleabilidad, conductividad calorífica y eléctrica, entre otras, los metales han sido de vital importancia en el desarrollo del hombre y hoy en día no se podría pensar en el progreso tecnológico sin asociarlo al uso de los metales.

Las fuentes de emisión de los metales al ambiente pueden ser tanto naturales (erupciones volcánicas, erosión de depósitos minerales) como antropogénicas (uso de combustibles fósiles, producción industrial). Muchos de ellos tienen una función importante en los seres vivos como elementos esenciales, formando parte de moléculas estructurales o como enzimas en diversas rutas metabólicas, sin embargo pueden representar riesgo para la salud cuando la concentración que ingresa a un organismo es mayor que aquella que los mecanismos homeostáticos pueden eliminar, implicando un peligro adicional los metales que tienden a acumularse en el organismo.

Entre los metales pesados el cromo y sus derivados han sido ampliamente utilizados en la industria para la manufactura de un gran número de productos como, acero inoxidable, curtido de pieles, tintas para impresión, material fotográfico, materiales anticorrosivos, sistemas de refrigeración, calentadores, refractarios y otros más. La ocupacional representa la principal

así como los posibles efectos sinérgicos o antagónicos de los mismos al ser administrados en conjunto con mutágenos conocidos (Muñoz, 1994) y más recientemente se está evaluando el potencial de la prueba como biomonitor para la detección de contaminantes ambientales (Ramos *et al.*, 2000).

CROMO

De los más de cien elementos químicos que se conocen, unas tres cuartas partes son de naturaleza metálica. Debido a las propiedades que los caracterizan; dureza, ductilidad, maleabilidad, conductividad calorífica y eléctrica, entre otras, los metales han sido de vital importancia en el desarrollo del hombre y hoy en día no se podría pensar en el progreso tecnológico sin asociarlo al uso de los metales.

Las fuentes de emisión de los metales al ambiente pueden ser tanto naturales (erupciones volcánicas, erosión de depósitos minerales) como antropogénicas (uso de combustibles fósiles, producción industrial). Muchos de ellos tienen una función importante en los seres vivos como elementos esenciales, formando parte de moléculas estructurales o como enzimas en diversas rutas metabólicas, sin embargo pueden representar riesgo para la salud cuando la concentración que ingresa a un organismo es mayor que aquella que los mecanismos homeostáticos pueden eliminar, implicando un peligro adicional los metales que tienden a acumularse en el organismo.

Entre los metales pesados el cromo y sus derivados han sido ampliamente utilizados en la industria para la manufactura de un gran número de productos como, acero inoxidable, curtido de pieles, tintas para impresión, material fotográfico, materiales anticorrosivos, sistemas de refrigeración, calentadores, refractarios y otros más. La ocupacional representa la principal

forma de exposición humana al cromo. La mayor exposición no ocupacional ocurre como consecuencia de su presencia en los alimentos y pinturas (Léonard y Lauwerys, 1980). En algunas áreas urbanas, alrededor de las dos terceras partes del cromo en el aire resultan de la emisión de cromo hexavalente por la combustión de combustible fósiles y la producción de acero. El tiempo de permanencia de cromo en el aire es de menos de 10 días, dependiendo del tamaño de las partículas (Barceloux, 1999). Otra fuente de exposición son las descargas de los desechos de fábricas que utilizan materias primas a base de cromo y las refinerías que contaminan el suelo, aire y agua en las zonas habitacionales cercanas trayendo como consecuencia efectos adversos sobre la salud de los organismos que habitan cerca de ellas (Galvão *et al.*, 1987).

El cromo no se encuentra en estado libre. Está presente en bajas concentraciones en muchos minerales, siendo la cromita la principal fuente para la obtención de este metal, el cual puede presentarse en diferentes estados de oxidación y con un amplio rango de solubilidad (Frey, 1977).

Las especies de cromo que tienen una mayor relevancia en la exposición de los seres vivos son los compuestos trivalentes (Cromo III) y hexavalentes (Cromo VI). De éstos, los compuestos de cromo hexavalente: cromatos y dicromatos muestran una mayor relevancia toxicológica ya que se han mostrado consistentemente como carcinogénicos y mutagénicos, tanto en estudios epidemiológicos como en una gran variedad de bioensayos (desde bacterias hasta mamíferos) (Bianchi *et al.*, 1983). Esto es debido a que los compuestos de cromo hexavalente, tanto solubles como insolubles, son capaces de atravesar la membrana celular, aunque por diferentes mecanismos. Los compuestos solubles ingresan a la célula a través de canales generales de anión proteína; el mecanismo de entrada de los compuestos insolubles no es conocido, pero puede incluir internalización de partículas intactas por la célula (De Flora *et al.*, 1990).

Una vez que el Cr (VI) atraviesa la membrana celular es reducido rápidamente a su forma

trivalente, la cual es probablemente, la única forma en que se ha encontrado en el material biológico (Léonard y Lauweris, 1980), a través de especies intermedias como cromo (V) y cromo (IV). Dependiendo del sitio intracelular y especialmente de la distancia del sitio de acción, los procesos reductores pueden conducir a la activación o desintoxicación del cromo (De Flora *et al.*, 1990). En estudios *in vitro* se han identificado algunos organelos celulares, sistemas enzimáticos y pequeñas moléculas solubles en el citoplasma que son capaces de reducir cromatos (Kortenkamp *et al.*, 1988), entre los que se encuentran microsomas de hígado de rata, enzimas dependientes de citocromo P-450 y tioles como glutatión, cisteína y ácido ascórbico (Fig 2). Se ha sugerido que la reducción intracelular de los compuestos metálicos es crucial para la inducción de lesiones al ADN (Kortenkamp *et al.*, 1988).

Existe abundante información sobre la actividad genotóxica y carcinogénica de compuestos de cromo en diferentes sistemas de prueba (tabla 2). Los datos disponibles para genotoxicidad han sido revisados por De Flora *et al.* (1990), mientras que su carcinogenicidad ha sido tratada en una monografía de la IARC (1990).

Extracelular

(Dosis farmacocinética)

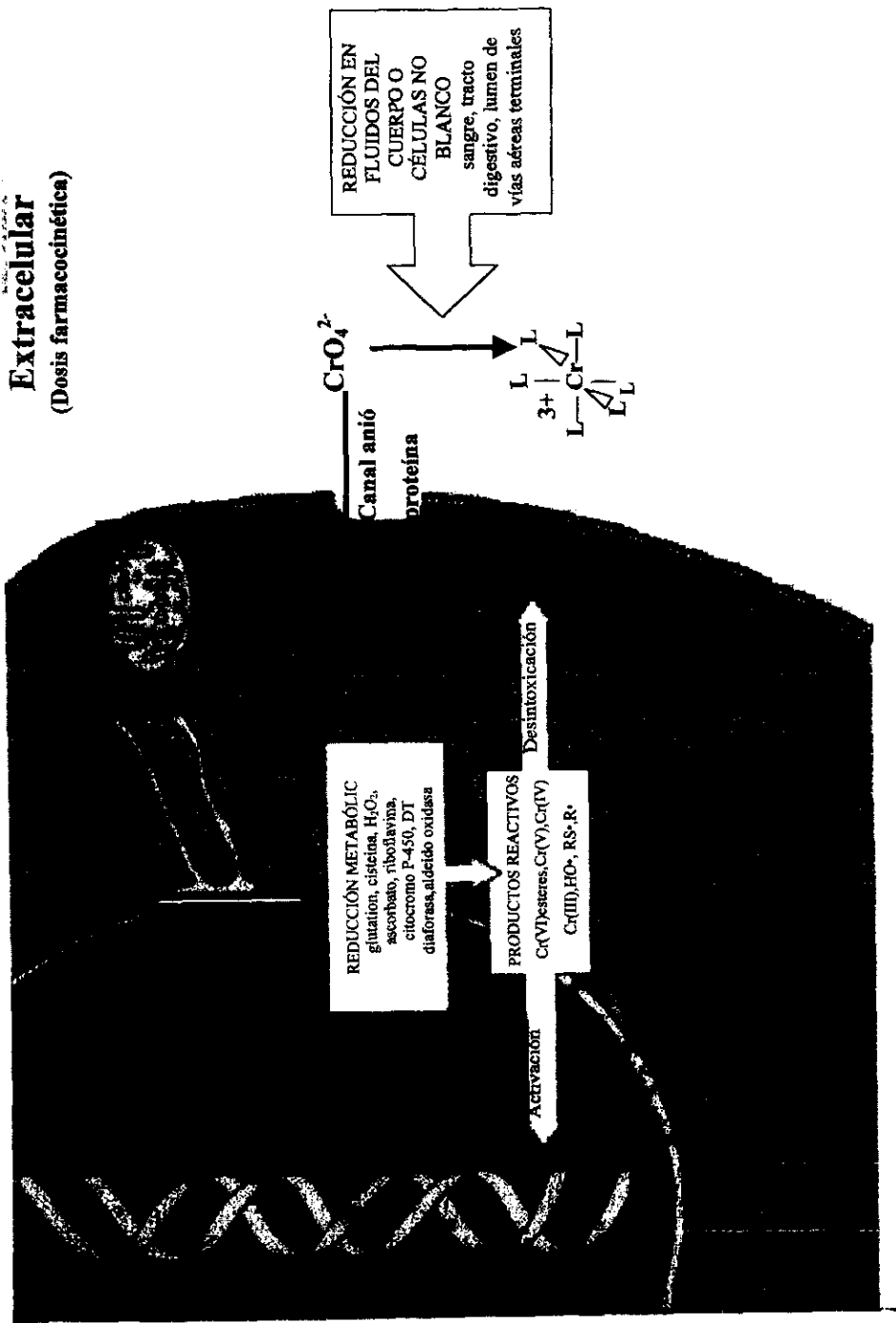


Fig.2. Modelo propuesto por De Flora y Watterhahn para explicar el mecanismo del metabolismo y genotoxicidad del cromo intracelular (De Flora *et al.* 1989).

Tabla 2. Resumen de pruebas a corto plazo realizadas con compuestos de Cromo (VI)

Dicromato de potasio	Inducción de respuesta SOS en <i>S. typhimurium</i>	+	Nakamura <i>et al.</i> (1987)
	Mutaciones Letales recesivas ligadas al sexo en <i>D. melanogaster</i>	+	Gava <i>et al.</i> (1989)
	Inhibición de reparación de ADN en ratas Wistar	+	Rudnikh y Saichenko (1985)
Cromato de potasio	Reversión his ⁻ →his ⁺ en <i>S. typhimurium</i>	+	Tamaro <i>et al.</i> (1975)
	Pérdida de cromosomas sexuales en <i>D. melanogaster</i>	+	Rodríguez-Arnaiz y Molina Martínez (1986)
	Micronúcleos en células de médula ósea de Hamster chino	+	Kaths (1981)
Cromato de sodio	Fragmentación de ADN en hepatocitos de embriones de pollo	+	Cupo y Wetterhan (1984, 1985 a)
	Aberraciones cromosómicas en Células CHO	+	Bianchi <i>et al.</i> (1980)
	Aneuploidía en fibroblastos de piel humana (modificaciones del huso)	+	Nijs y Kirsch-volders (1986)
Cromato de plomo	Recombinación mitótica en <i>S. cerevisiae</i>	(+)* * HCL 1N	Nestmann <i>et al.</i> (1979)
	Letales recesivos ligados al sexo en <i>D. melanogaster</i>	(-) (+)* * NTA	Costa <i>et al.</i> (1988)
	Intercambio de cromátidas hermanas en células CHO	(+) ↑ en NaOH	Levis y Majone (1981)

PLOMO

El plomo, comparado con otros metales pesados muestra el índice de emisión antropogénica más alto, se utiliza en:

- Las gasolinas, como antidetonante.
- La producción de pigmentos, esmaltes y cristal.
- El revestimiento de cables y superficies expuestas a la corrosión.
- Soldaduras.
- Blindaje contra radiaciones etc.

Los compuestos de plomo muestran un amplio rango de solubilidad. Algunos son solubles en agua, como el nitrato y clorato de plomo; otros son poco solubles, como el acetato de plomo, el cual forma un precipitado insoluble en agua; y aún otros son insolubles, como el cromato de plomo.

Los efectos tóxicos de los compuestos de plomo se han estudiado por muchos años, sin embargo, no se tienen resultados concluyentes acerca de sus propiedades carcinogénicas en humanos y tampoco muestran un espectro mutagénico definido (Tabla 3 y 4).

Tabla 3. Algunos efectos genotóxicos producidos por compuestos de plomo en diferentes organismos (Winder C. *et al.*, 1993)

Plomo	Mutación reversa en <i>S. typhimurium</i>	-	Dunkel, et al, (1984)
	Aneuploidía en <i>D. melanogaster</i>	-	Ramel y Magnussen, (1979)
	Prueba de micronúcleos en rata	+/-	Tachi et al., 1985
	Aberraciones cromosómicas en leucocitos de mono <i>in vivo</i>	+/-	Jacquet y Tachon, (1981)

Tabla 4. Resumen de resultados de efectos genotóxicos en humanos. (Winder C. *et al.*, 1993).

Laboral (óxido de plomo)	Incremento de daño cromosómico y cromatídico relacionado con la exposición	Schwanitz <i>et al.</i> , 1970
Laboral (producción de baterías)	Anormalidades en la morfología y motilidad de espermatozoides	Lancranjan <i>et al.</i> , 1975
Laboral (producción de plomo)	No se reportaron efectos	Schmid <i>et al.</i> , 1972
Voluntarios que ingirieron plomo durante 49 días	No se reportaron efectos	Bijlsma y de France, 1976

La poca consistencia entre los resultados obtenidos puede deberse en parte, a la solubilidad de muchos compuestos de plomo, a las interferencias químicas que resultan en observaciones dudosas, a que la genotoxicidad de los compuestos de plomo puede ocurrir a través de mecanismos indirectos, o bien, a que los ensayos usados no sean los adecuados, (Winder *et al.*, 1993).

Ya que no hay evidencias de que el plomo tenga toxicidad directa en los procesos genéticos o cromosómicos, se ha propuesto que el plomo (II) puede actuar como comutágeno y posible cocarcinógeno (Nirmal *et al.*, 1992).

OBJETIVOS

Tomando en cuenta que si bien los diferentes compuestos de cromo usados tienen un radical en común, presentan diferentes asociaciones que les confieren características distintas, las que repercuten directamente en su potencial genotóxico; que es importante el análisis de diferentes compuestos derivados del mismo elemento con el propósito de contribuir a la regulación de su uso; que la prueba de Mutación y Recombinación Somáticas discrimina entre eventos de mutación y recombinación somáticas; que los compuestos de cromo (VI) se han reportado consistentemente como mutagénicos y/o carcinogénicos, mostrando una amplia gama de eventos genotóxicos, tales como, fragmentación del ADN, intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas (De Flora *et al.*, 1990); se plantearon los siguientes objetivos para este trabajo:

- Obtener información sobre la eficacia y sensibilidad de la prueba de Mutación y Recombinación Somáticas de *D. melanogaster* para discriminar entre eventos de

La poca consistencia entre los resultados obtenidos puede deberse en parte, a la solubilidad de muchos compuestos de plomo, a las interferencias químicas que resultan en observaciones dudosas, a que la genotoxicidad de los compuestos de plomo puede ocurrir a través de mecanismos indirectos, o bien, a que los ensayos usados no sean los adecuados, (Winder *et al.*, 1993).

Ya que no hay evidencias de que el plomo tenga toxicidad directa en los procesos genéticos o cromosómicos, se ha propuesto que el plomo (II) puede actuar como comutágeno y posible cocarcinógeno (Nirmal *et al.*, 1992).

OBJETIVOS

Tomando en cuenta que si bien los diferentes compuestos de cromo usados tienen un radical en común, presentan diferentes asociaciones que les confieren características distintas, las que repercuten directamente en su potencial genotóxico; que es importante el análisis de diferentes compuestos derivados del mismo elemento con el propósito de contribuir a la regulación de su uso; que la prueba de Mutación y Recombinación Somáticas discrimina entre eventos de mutación y recombinación somáticas; que los compuestos de cromo (VI) se han reportado consistentemente como mutagénicos y/o carcinogénicos, mostrando una amplia gama de eventos genotóxicos, tales como, fragmentación del ADN, intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas (De Flora *et al.*, 1990); se plantearon los siguientes objetivos para este trabajo:

- Obtener información sobre la eficacia y sensibilidad de la prueba de Mutación y Recombinación Somáticas de *D. melanogaster* para discriminar entre eventos de

recombinación y de mutación somática producidos por bajas concentraciones de compuestos de cromo.

- Comparar la inducción de mutación y recombinación somáticas de cuatro compuestos de cromo VI.

METODOLOGÍA

Compuestos químicos:

Se utilizaron cuatro compuestos de cromo hexavalente (cromo VI), dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) CAS [7778-50-9], Baker Analyzed; cromato de potasio (K_2CrO_4) CAS [7789-00-6], Técnica Química S.A.; cromato de sodio (Na_2CrO_4) CAS [7775-11-3], Mallinckrodt; y cromato de plomo ($PbCrO_4$) CAS [7758-97-6], Baker Analyzed.

Cruza y marcadores.

Para la craza progenitora se utilizaron dos líneas mutantes de *D. melanogaster*: hembras vírgenes *flr³ / TM3, Ser X* machos *mwh/mwh*.

flr³, es un marcador fenotípico recesivo localizado a 39.0 unidades de mapa en el brazo izquierdo del cromosoma 3, se reconoce porque produce tricomas en forma de flama (García Bellido y Dapena 1974), en condición homocigótica es letal, por lo que para su mantenimiento

recombinación y de mutación somática producidos por bajas concentraciones de compuestos de cromo.

- Comparar la inducción de mutación y recombinación somáticas de cuatro compuestos de cromo VI.

METODOLOGÍA

Compuestos químicos:

Se utilizaron cuatro compuestos de cromo hexavalente (cromo VI), dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) CAS [7778-50-9], Baker Analyzed; cromato de potasio (K_2CrO_4) CAS [7789-00-6], Técnica Química S.A.; cromato de sodio (Na_2CrO_4) CAS [7775-11-3], Mallinckrodt; y cromato de plomo ($PbCrO_4$) CAS [7758-97-6], Baker Analyzed.

Cruza y marcadores.

Para la crusa progenitora se utilizaron dos líneas mutantes de *D. melanogaster*: hembras vírgenes *flr³ / TM3, Ser X* machos *mwh/mwh*.

flr³, es un marcador fenotípico recesivo localizado a 39.0 unidades de mapa en el brazo izquierdo del cromosoma 3, se reconoce porque produce tricomas en forma de flama (García Bellido y Dapena 1974), en condición homocigótica es letal, por lo que para su mantenimiento

se requiere de un sistema de letales balanceados. Se utiliza un cromosoma balanceador, *TM3*, el cual tiene una gran cantidad de inversiones que impiden recobrar eventos viables de recombinación, con lo que se mantienen intactos el cromosoma que porta la mutación *flr3* y el cromosoma balanceador. *TM3* tiene como marcador fenotípico al gen letal dominante *Ser*, el cual se expresa en forma de muescas en el borde de las alas y su expresividad es variable. De esta forma, en este sistema de letales balanceados sólo se recobran organismos heterocigóticos tanto para *Ser* como para *flr3*.

mwh se localiza a 0.0 unidades de mapa en el cromosoma 3, también es recesivo y tiene expresividad variable; en condición homocigótica codifica para la producción de dos o más pelos por célula, a diferencia de la condición de tipo silvestre en la que cada célula forma un solo pelo o tricoma (Lindsley y Zimm, 1992).

Los organismos adultos recobrados de esta cruce son de dos tipos: moscas heterocigóticas, libres de inversión, que fenotípicamente se reconocen por tener alas de tipo silvestre y, moscas portadoras del cromosoma balanceador *TM3*, *Ser*, con muescas en las alas.

Procedimiento experimental.

Al tercer día de realizada la cruce, se transfieren los progenitores a frascos con medio de cultivo nuevo y se colectan huevos por un período de 8 hrs.

Los organismos que se obtienen de la cruce presentan cada uno de los fenotipos mencionados anteriormente, teniendo una proporción de 50% de la población para cada uno de ellos. En estado larvario no es posible distinguirlos por lo que se les aplica el mismo tratamiento a ambos.

Las larvas de 72 ± 4 hrs se extraen por el método de Nöthinger (1970). Este método

consiste en la formación de un gradiente de densidad que hace que las larvas floten separándolas del medio de cultivo, se enjuagan con agua corriente y se colocan entre 100 y 200 larvas en tubos homeopáticos, los cuales contienen 1 gr de medio instantáneo para *Drosophila* (Carolina Biological Supply) y 5 ml de solución de cada uno de los compuestos a probar, donde permanecen hasta la emergencia del imago (Fig.3), esto corresponde a un período de alimentación de 48 h (tratamiento subcrónico: 72 X 48 h). Se probaron concentraciones de 3.2 a 200 ppm para dicromato de K, cromato de K, y cromato de Na, y de 1.6 a 200 ppm para cromato de Pb. Como disolvente y testigo negativo se utilizó agua destilada para los tres primeros compuestos y ácido nítrico al 1% para el último. Para cada concentración se realizaron al menos tres repeticiones.

Los organismos en estado adulto se separaron por sexo y tipo de ala (silvestre y *Serrate*), se sacrificaron con una sobredosis de éter y se fijaron en alcohol al 70 %.

Se elaboraron laminillas tanto para las moscas libres de inversión (*flr³/mwh* -ala de tipo silvestre) como para las moscas portadoras del balanceador (*mwh/TM3,Ser*-ala *Serrate*) con 40 alas por laminilla, 20 de hembras y 20 de machos. Las laminillas se examinaron con un microscopio óptico a 400 X.

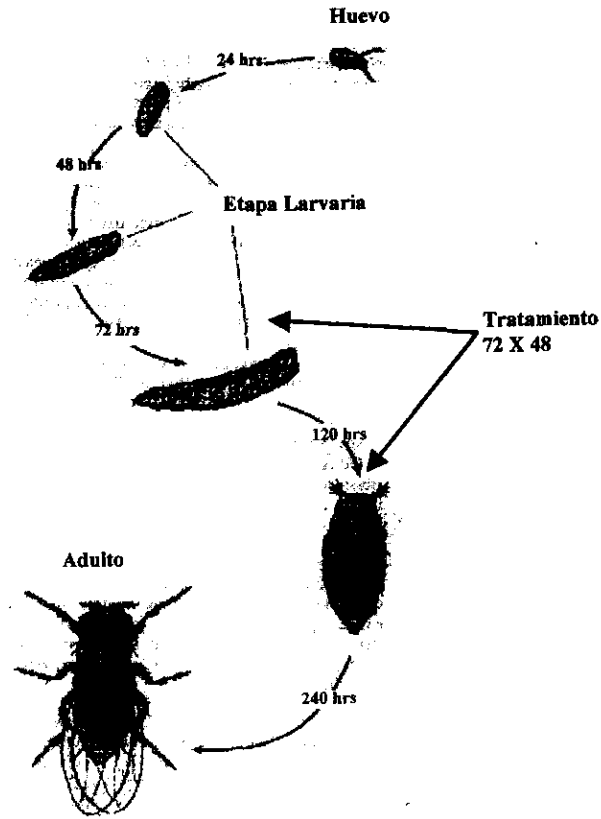


Fig. 3 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. El tratamiento se aplica a larvas de 72 ± 4 h. Tomado de Russell 1998.

Análisis estadístico

Para cada compuesto y para cada fenotipo de moscas (libres de inversión y portadoras del cromosoma balanceador) se analizaron 120 alas por concentración. Las manchas se clasificaron por su tamaño en: chicas (1 a 2 células) y grandes (>2 células), y por su fenotipo en: manchas simples *mwh*, manchas simples *flr*³ y manchas gemelas, que presentan los dos fenotipos anteriores (Graf *et al.*, 1984). Se comparó la frecuencia de manchas mediante el procedimiento de decisión múltiple descrito por Frei y Würigler (1988) basado en la prueba de

X^2 para proporciones y el programa de cómputo SMART (Würgler, no publicado) con un $\alpha=0.05$. Este procedimiento consiste en comparar las frecuencias de los lotes testigo y experimental para determinar si el compuesto bajo prueba es positivo, negativo, débil positivo o indeterminado, mediante la contrastación de las siguientes hipótesis:

H_0 : la frecuencia de mutación espontánea e inducida no es significativamente mayor a la frecuencia del testigo negativo.

H_a : la frecuencia de mutación experimental es igual a m veces la frecuencia de mutación del testigo negativo (Frei y Würgler, 1988).

El factor de multiplicación m usado en este análisis estadístico indica cuántas veces debe incrementarse la frecuencia de mutación de los lotes experimentales con respecto a la frecuencia del lote testigo, para considerar una respuesta positiva y se asignó tomando en cuenta que:

- Debido a que las manchas chicas (1 - 2 células) aparecen con mayor frecuencia en el testigo negativo, una duplicación de ellas ($m = 2$) en el tratamiento experimental indica que el compuesto analizado es positivo, esta consideración también se aplica para manchas totales.
- Las manchas grandes (> 2 Células) y las manchas gemelas aparecen con menos frecuencia, por lo que el valor de m asignado es de 5, es decir que la frecuencia de este tipo de manchas debe ser 5 veces mayor en los tratamientos experimentales con respecto al testigo negativo para considerar un efecto positivo.

El análisis de la distribución de manchas por mosca se realizó con base en el número total

de manchas inducidas en ambas alas de una sola mosca, bajo la consideración de que, las manchas mostradas en las alas de cada mosca no son necesariamente eventos completamente independientes (Frei, *et al.*, 1994), usando para este fin la prueba de Kruskal-Wallis.

Esta es una prueba no paramétrica que permite comparar tres o más grupos no pareados y tiene la ventaja de que no requiere de un tipo específico de distribución de probabilidad. Las suposiciones para la aplicación de esta prueba son:

- Las t muestras son muestras aleatorias de sus respectivas poblaciones y además, son independientes entre sí.
- La escala de medición supone un arreglo ordinal.

La hipótesis que se prueba es:

H_0 : Los efectos de los t tratamientos son iguales.

H_a : Al menos el efecto de un tratamiento es distinto.

La lógica de la prueba se basa en el ordenamiento de los datos de menor a mayor, asignando rangos para cada categoría. Si dos o más valores están empatados para un mismo rango, se asigna a cada miembro del grupo empatado el promedio de los rangos que se hubieran asignado a estas observaciones. Se suman las categorías en cada grupo y si las sumas de las categorías son muy diferentes el valor de p será muy pequeño, se combinan las discrepancias de estas sumas para crear un valor llamado estadístico de Kruskal- Wallis (KW). Un valor muy grande de KW corresponde a una gran diferencia entre las sumas de las categorías. De esta forma si el resultado es un valor de p pequeño y un valor de KW grande,

entonces se rechaza la H_0 ya que estos resultados indican que sí existen diferencias significativas entre las muestras. Para saber las diferencias entre dos muestras se aplica una post-prueba basada en χ^2 , la cual reporta valores de p para cada par de muestras.

También se realizó un análisis cualitativo de la distribución de células por mancha donde se toma en cuenta la frecuencia de moscas que presentan manchas de 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, -32, -64, -128, -256 y >512 células, lo que permitirá hacer un análisis del tamaño de mancha producido con respecto a la edad de la larva.

RESULTADOS

Para evaluar el potencial genotóxico de los compuestos de cromo, en este trabajo se utilizó la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) y los resultados obtenidos, sobre todo para los compuestos que son altamente solubles, están en concordancia con los publicados para los mismos compuestos en otros sistemas de prueba (De Flora *et al.*, 1990; Bianchi *et al.*, 1983, Leonard y Lauwerys, 1980) y en *Drosophila m.* (Graf *et al.*, 1992; Amrani *et al.*, 1999).

• Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

Se obtuvieron resultados significativos para manchas chicas y totales ($m=2$) en todas las concentraciones, para manchas grandes ($m=5$) en 100 y 200 ppm y para manchas gemelas a partir de 50 ppm ($p < 0.05$) en moscas libres de inversión (tabla 5.1); mientras que en las moscas portadoras del cromosoma balanceador (tabla 5.2) el incremento en la frecuencia fue significativo para manchas chicas en 6.3, 50 y 200 ppm; para manchas grandes en 200 ppm y en

entonces se rechaza la H_0 ya que estos resultados indican que sí existen diferencias significativas entre las muestras. Para saber las diferencias entre dos muestras se aplica una post-prueba basada en χ^2 , la cual reporta valores de p para cada par de muestras.

También se realizó un análisis cualitativo de la distribución de células por mancha donde se toma en cuenta la frecuencia de moscas que presentan manchas de 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, -32, -64, -128, -256 y >512 células, lo que permitirá hacer un análisis del tamaño de mancha producido con respecto a la edad de la larva.

RESULTADOS

Para evaluar el potencial genotóxico de los compuestos de cromo, en este trabajo se utilizó la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) y los resultados obtenidos, sobre todo para los compuestos que son altamente solubles, están en concordancia con los publicados para los mismos compuestos en otros sistemas de prueba (De Flora *et al.*, 1990; Bianchi *et al.*, 1983, Leonard y Lauwerys, 1980) y en *Drosophila m.* (Graf *et al.*, 1992; Amrani *et al.*, 1999).

• Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

Se obtuvieron resultados significativos para manchas chicas y totales ($m=2$) en todas las concentraciones, para manchas grandes ($m=5$) en 100 y 200 ppm y para manchas gemelas a partir de 50 ppm ($p < 0.05$) en moscas libres de inversión (tabla 5.1); mientras que en las moscas portadoras del cromosoma balanceador (tabla 5.2) el incremento en la frecuencia fue significativo para manchas chicas en 6.3, 50 y 200 ppm; para manchas grandes en 200 ppm y en

manchas totales en las concentraciones 6.3, 50, 100 y 200 ppm ($p < 0.05$). Al comparar la distribución de manchas por mosca en moscas libres de inversión (tabla 5.3 y Fig. 4.1a) del lote testigo y de los lotes experimentales, tres grupos fueron identificados: el primero está formado por el lote testigo y los experimentales hasta 25 ppm; la distribución de moscas tratadas con 50 ppm resultó diferente a la del lote testigo ($p < 0.05$); 100 ppm ($p < 0.01$) y 200 ppm ($p < 0.001$); las distribuciones de las moscas expuestas a 100 y 200 ppm resultaron diferentes a todas las demás distribuciones ($p < 0.001$) y entre sí ($p < 0.05$). Para las moscas portadoras del cromosoma balanceador no se encontraron diferencias significativas entre las distribuciones (Fig.4.1b).

• Cromato de potasio (K_2CrO_4)

Los datos mostraron incrementos significativos en la frecuencia de manchas simples chicas en 12.5, 25 y 100 ppm; para manchas sencillas grandes a partir de 12.5 ppm; para manchas gemelas a partir de 50 ppm y para manchas totales a partir de 12.5 ppm ($p < 0.05$) en moscas libres de inversión (tabla 6.1). En las moscas portadoras del cromosoma balanceador (tabla 6.2) se incrementó la frecuencia de manchas simples chicas y manchas totales sólo en 6.3 ppm ($p < 0.05$).

En la prueba de manchas por mosca (Kruskal-Wallis) no se encontraron diferencias en las distribuciones de manchas por mosca del lote testigo y los experimentales hasta 25 ppm (Fig. 4.2a). La distribución de moscas tratadas con 50 ppm mostró diferencia con respecto a la del testigo ($p < 0.001$), 3.2 ppm ($p < 0.01$) y 6.3 ppm ($p < 0.05$); la distribución de moscas tratadas con 100 ppm fue diferente de la testigo, 3.2 y 6.3 ppm ($p < 0.001$) y, finalmente, la de 200 ppm fue diferente de la testigo, 3.2 ($p < 0.001$) y 6.3 ppm ($p < 0.05$) (tabla 6.3); la distribución de manchas por mosca a partir de moscas portadoras del cromosoma balanceador

tratadas y no tratadas fueron similares entre sí (Fig.4.2 b).

• Cromato de sodio (Na_2CrO_4)

La frecuencia de manchas por ala en moscas libres de inversión se incrementó significativamente para manchas chicas y manchas totales a partir de 6.3 ppm; para manchas grandes en 3.2 y de 25 a 200 ppm y para manchas gemelas en 100 y 200 ppm ($p < 0.05$) (tabla 7.1); en cuanto a las moscas portadoras del balanceador, no se encontraron resultados significativos (tabla 7.2).

En el análisis de manchas por mosca en moscas libres de inversión las diferencias (tabla 7.3 y Fig. 4.3a) en la distribución de moscas tratadas con 50 ppm fueron significativas sólo con respecto a la distribución testigo y a 200 ppm ($p < 0.05$); la distribución de manchas con 100 ppm fue diferente a la testigo, 3.2 ppm ($p < 0.001$), 6.3, 12.5 ($p < 0.01$) y 25 ppm ($p < 0.05$); mientras que la de moscas tratadas con 200 ppm fue diferente a la del grupo formado por las distribuciones testigo y hasta 25 ppm ($p < 0.001$) y con 50 ppm ($p < 0.05$); en tanto que para las moscas portadoras del cromosoma balanceador no se encontraron diferencias significativas (Fig. 4.3b).

• Cromato de plomo (PbCrO_4)

El incremento en la frecuencia de manchas fue significativo para manchas chicas y totales en 1.6, 3.2, 6.3, 50 y 200 ppm; para manchas grandes en 3.2 y 50 ppm ($p < 0.05$) en moscas libres de inversión (tabla 8.1); en las moscas portadoras del cromosoma balanceador (tabla 8.2) sólo se encontraron resultados significativos para manchas grandes en 25 ppm ($p < 0.05$).

En cuanto al análisis de manchas por mosca, no se encontraron diferencias significativas para ninguna de las distribuciones de los dos tipos de moscas (Fig.4.4ab).

De acuerdo con el análisis realizado por medio de la prueba de χ^2 para proporciones, en el que se comparó la frecuencia de manchas totales por ala (Frei y Würgler, 1988) para los cuatro compuestos y para los dos tipos de progenie (moscas libres de inversión y moscas portadoras del cromosoma balanceador), al comparar el efecto obtenido en la concentración más baja probada para los cuatro compuestos en moscas libres de inversión se encontró el siguiente orden: CPb (0.62) > DK (0.48) > CK (0.32) = CNa (0.36), siendo el efecto significativo para los primeros dos compuestos. No obstante, al hacer la misma comparación utilizando las concentraciones más altas probadas se encontró el orden: DK (3.93) > CK (1.14) \geq CNa (1.09) > CPb (0.57).

Al comparar la inducción de manchas gemelas se encontró el siguiente orden, con base en la concentración más alta probada para los cuatro compuestos: DK (1.14) > CK (0.42) > CNa (0.26) \gg CPb (0.02).

Con respecto al efecto obtenido en las moscas portadoras del cromosoma balanceador, la comparación de la frecuencia de manchas en la concentración significativa mínima (6.3 ppm) dio la relación: DK (0.36) = CK (0.34), aunque en la concentración más alta sólo se encontró efecto significativo para el DK (0.40).

Con respecto a la magnitud del efecto obtenido en los dos tipos de progenie, el DK indujo una respuesta casi 10 veces mayor en las moscas libres de inversión, esta magnitud fue de casi 5 veces para el CK, de 4 veces para el CNa y del doble para el CPb, también en moscas libres de inversión.

El diagnóstico obtenido con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis indicó que con respecto a la susceptibilidad diferencial, las diferencias entre los organismos de los lotes

experimentales y el testigo, son significativas a partir de 50 ppm (moscas libres de inversión) para dicromato de potasio (Fig. 4.1 a), cromato de potasio (Fig. 4.2 a) y cromato de sodio (Fig. 4.3 a), no así para cromato de plomo (Fig. 4.4a) que no presentó diferencias significativas en ninguna de las concentraciones probadas. Para las moscas portadoras del cromosoma balanceador no se reportaron diferencias significativas entre los diferentes lotes (Figs. (4.1b a 4.4b)).

El análisis del número de células por mancha permite estimar el tiempo de inducción de las manchas con respecto al tiempo en el que se administró el tratamiento, bajo la suposición de que no hay retraso ni muerte celular. Lo anterior, ocurre con poca frecuencia, especialmente para aquellos compuestos que inducen recombinación, como es el caso de los derivados del cromo. Las figuras 5.1 a 5.4 muestran la distribución del número de pelos (células) por mancha para moscas libres (a) y portadoras (b) de inversiones expuestas a los cuatro compuestos probados. En todos los casos, se recobraron manchas de mayor tamaño en las moscas libres que en las portadoras de inversiones, siendo el DK el compuesto que indujo una mayor frecuencia de manchas. El CPb indujo manchas grandes en todas las concentraciones probadas, pero con una frecuencia similar. El efecto de los cuatro compuestos en las moscas portadoras de inversiones fue similar, lo que confirma que la principal actividad de estos compuestos se asocia con eventos de recombinación mitótica.

En moscas libres de inversión, la actividad recombinogénica de estos compuestos se hizo evidente en la inducción de manchas gemelas por todos los compuestos (Figs. 6.1 a 6.4). En el caso del CPb, sólo se observó una ligera inducción de manchas gemelas a 3.2 ppm, aunque no alcanzó a ser significativa.

Como en las moscas portadoras del balanceador no se producen este tipo de manchas, se comparó la frecuencia corregida de manchas totales de los dos tipos de moscas para establecer la participación de la recombinación somática en los eventos recobrados.

Para el DK (Fig. 7.1a) se observó una gran diferencia en la frecuencia corregida de manchas totales en los dos tipos de moscas, sobre todo a partir de 50 ppm. El CK y el CNa (Figs. 7.1b y 7.2a) mostraron un comportamiento similar entre ellos, presentando también una marcada diferencia entre las moscas libres de inversión y las portadoras del cromosoma balanceador. El CPb (Fig. 7.4) mostró tres picos de actividad importantes (se observaron incrementos y caídas) en la frecuencia corregida de manchas totales para las moscas libres de inversión, esto podría estar relacionado con la activación de mecanismos de desintoxicación de los organismos, los cuales al saturarse permiten un nuevo incremento en la inducción de manchas, de tal forma que al compararse la distribución de los dos tipos de moscas no es claro el aporte de eventos de recombinación, sin embargo el hecho de que en las moscas libres de inversión se presenten manchas gemelas sugiere que, aunque en menor proporción, los eventos de recombinación también juegan un papel importante en la generación de daño genotóxico por este compuesto. En las moscas portadoras de inversiones fue notorio que a bajas concentraciones se recobraron mayores frecuencias de manchas, aunque no llegaron a ser significativas, las frecuencias recobradas fueron menores conforme se incrementó la concentración.

Finalmente en la figura 7.3a se muestra la frecuencia corregida de manchas totales para los cuatro compuestos probados, se observa claramente la relación de genotoxicidad que se encontró en este trabajo, es interesante notar que los cuatro compuestos presentan una tendencia muy similar hasta 50 ppm, lo que indica que hay un efecto reproducible en este rango de concentración para los cuatro compuestos, por otro lado la Fig. 7.3b muestra la relación encontrada para la frecuencia corregida de manchas totales en las moscas portadoras del cromosoma balanceador, en la que se observa la baja frecuencia de manchas obtenidas en estas moscas.

Tabla 5.1 Número y frecuencia de manchas inducido por dicromato de potasio en moscas libres de inversión.
Tratamiento 72 x 48 hrs.

0.00	120	17	0.14	11	0.09	0	0.00	28	0.23	27	2.77	1.9
3.2	120	53	0.44+	5	0.04-	0	0.00-	59	0.48+	57	1.86	1.9
6.3	120	46	0.38+	5	0.04-	2	0.02-	53	0.44+	52	1.63	1.8
12.5	120	49	0.41+	7	0.06-	0	0.00	56	0.47+	55	1.55	1.9
25	120	52	0.43+	2	0.02-	4	0.03-	58	0.48+	58	1.55	2.0
50	120	43	0.36+	18	0.15-	11	0.09+	72	0.60+	70	2.27	2.4
100	120	89	0.74+	61	0.51+	33	0.28+	183	1.52+	177	2.69	6.1
200	120	164	1.37+	171	1.42+	137	1.14+	472	3.93+	441	2.85	15.1

Testigo negativo agua destilada

+ = positivo; - = negativo; I = indeterminado;

m = factor de multiplicación

Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$

Tabla 5.2 Número y frecuencia de manchas inducido por dicromato de potasio en moscas portadoras del balanceador.
Tratamiento 72 x 48 hrs.

0.00	120	24	0.20	3	0.03	0	0.00	27	0.22	27	1.59	0.9
3.2	120	37	0.311	3	0.031	0	0.001	40	0.331	40	1.55	1.4
6.3	120	41	0.341	2	0.02	0	0.001	43	0.36	43	1.23	1.5
12.5	120	50	0.251	2	0.02	0	0.001	32	0.27	39	1.20	1.0
25	120	33	0.281	1	0.01	0	0.001	34	0.28	33	1.18	1.1
50	120	39	0.32+	3	0.031	0	0.001	42	0.35+	40	1.37	1.4
100	120	36	0.301	6	0.051	0	0.001	42	0.35+	42	1.50	1.4
200	120	38	0.32+	10	0.08+	0	0.001	48	0.40+	46	1.91	1.6

Testigo negativo, agua destilada

+ = positivo; - = negativo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación

Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$

Tabla 6.1 Número y frecuencia de manchas inducido por cromato de potasio en moscas libres de inversión.
Tratamiento 72 x 48 hrs.

0.00	120	30	0.25	5	0.03	4	0.03	37	0.31	36	1.03	12
3.2	120	30	0.25	9	0.98	0	0.00	39	0.32	37	1.86	1.3
6.3	120	42	0.35	5	0.04	1	0.01	48	0.40	48	1.58	1.6
12.5	120	52	0.43	10	0.08	1	0.01	63	0.52	62	1.65	2.1
25	120	52	0.43	12	0.10	4	0.03	68	0.57	68	1.96	2.3
50	120	41	0.34	39	0.32	20	0.17	100	0.83	91	3.14	3.1
100	120	69	0.57	42	0.35	30	0.25	141	1.47	132	2.98	4.5
200	120	28	0.23	59	0.49	50	0.42	137	1.14	128	3.81	4.4

Testigo negativo agua destilada

+ = positivo; - = negativo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación

Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$

Tabla 6.2 Número y frecuencia de manchas inducido por cromato de potasio en moscas portadoras del balanceador.
Tratamiento 72 x 48 hrs.

0.00	120	23	0.19	1	0.01	0	0.00	24	0.20	24	1.12	0.9
3.2	120	19	0.24	1	0.011	0	0.001	30	0.251	30	1.33	1.0
6.3	120	39	0.32*	2	0.021	0	0.001	41	0.34+	41	1.32	1.4
12.5	120	32	0.271	2	0.021	0	0.001	34	0.281	34	1.35	1.2
25	120	22	0.18-	2	0.021	0	0.001	24	0.20-	24	1.42	0.8
50	120	19	0.16-	3	0.031	0	0.001	22	0.18-	22	1.68	0.8
100	120	17	0.14-	4	0.031	0	0.001	21	0.17-	21	1.62	0.7
200	120	27	0.22-	3	0.031	0	0.001	30	0.251	30	1.57	1.0

Testigo negativo, agua destilada

+ = positivo; - = negativo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación

Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$

Tabla 7.1 Número y frecuencia de manchas inducido por cromato de sodio en moscas libres de inversión.
Tratamiento 72 x 48 hrs.

0.06	120	22	0.18	3	0.03	4	0.03	29	0.24	29	2.14	1.0
3.2	120	29	0.241	14	0.12+	0	0.00-	43	0.361	41	2.95	1.4
6.3	120	42	0.35+	5	0.041	2	0.02-	49	0.41+	49	1.69	1.7
12.5	120	41	0.34+	8	0.071	2	0.02-	51	0.43+	48	2.12	1.6
25	120	39	0.32+	15	0.12+	5	0.04-	59	0.49+	58	2.24	2.0
50	120	48	0.40+	14	0.12+	4	0.03-	66	0.55+	65	2.39	2.2
100	120	42	0.35+	65	0.54+	26	0.22+	133	1.11+	125	3.90	4.5
200	120	50	0.42+	50	0.42+	31	0.26+	131	1.09+	122	3.74	4.2

Testigo negativo agua destilada

+ = positivo; - = negativo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación

Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$

Tabla 7.2 Número y frecuencia de manchas inducido por cromato de sodio en moscas portadoras del balanceador.
Tratamiento 72 x 48 hrs.

0.00	120	23	0.19	1	0.01	0	0.00	24	0.20	24	1.29	0.8
3.2	120	27	0.22	4	0.03	0	0.001	31	0.261	31	1.61	1.3
6.3	120	20	0.17	1	0.011	0	0.001	21	0.17	21	1.24	0.7
12.5	120	17	0.14	2	0.021	1	0.011	20	0.17	20	1.40	0.7
25	120	26	0.22	0	0.001	0	0.001	26	0.22	26	1.08	0.9
50	120	30	0.251	2	0.02	0	0.001	32	0.271	32	1.47	1.1
100	120	34	0.281	1	0.011	0	0.001	35	0.291	35	1.43	1.2
200	120	26	0.22	4	0.031	0	0.001	30	0.25	30	1.83	1.0

Testigo negativo, agua destilada

+ = positivo; - = negativo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación
Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$

Tabla 8.1 Número y frecuencia de manchas inducido por cromato de plomo en moscas libres de inversión.
Tratamiento 72 x 48 hrs.

0.00	120	37	0.31	4	0.03	1	0.01	42	0.35	41	1.63	1.4
ENO3	120	37	0.31	5	0.04-	0	0.001	42	0.35-	41	1.54	1.4
1.6	120	72	0.66+	9	0.088	1	0.011	82	0.68+	81	1.70	2.6
3.2	120	59	0.49+	12	0.10+	4	0.031	75	0.62+	75	1.99	2.6
6.3	120	58	0.48+	7	0.061	2	0.021	67	0.56+	65	1.60	2.2
12.5	120	52	0.431	7	0.061	1	0.011	60	0.501	60	1.63	2.1
25	120	46	0.38-	6	0.051	2	0.021	54	0.45-	50	1.64	1.7
50	120	70	0.58+	15	0.12+	1	0.011	86	0.72+	84	1.94	2.9
100	120	46	0.38-	5	0.04-	1	0.011	52	0.43	52	1.63	1.3
200	120	60	0.50+	6	0.051	2	0.021	68	0.57+	68	1.66	2.3

Testigo negativo agua destilada

+ = positivo; - = negativo; I = indeterminado; m = factor de multiplicación

Niveles de probabilidad: : $\alpha = \beta = 0.05$

Tabla 8.2 Número y frecuencia de manchas inducido por cromato de plomo en moscas portadoras del balaceador.
Tratamiento 72 x 48 hrs.

0.00	120	51	0.26	2	0.02	0	0.00	33	0.23	33	1.39	1.1
FINO3	120	26	0.22	3	0.031	0	0.001	29	0.24	29	1.85	1.0
1.6	120	36	0.30	3	0.031	0	0.001	39	0.32	39	1.31	1.3
3.2	120	29	0.24	7	0.061	0	0.001	36	0.30	36	1.75	1.2
6.3	120	32	0.27	5	0.041	0	0.001	37	0.31	37	1.59	1.3
12.5	120	39	0.32	2	0.021	0	0.001	41	0.34	41	1.44	1.4
25	120	31	0.26	12	0.10+	0	0.001	43	0.36	43	2.09	1.5
50	120	44	0.37	3	0.031	0	0.001	47	0.39	47	1.30	1.6
100	120	43	0.36	3	0.031	0	0.001	46	0.38	46	1.35	1.6
200	120	25	0.21	8	0.071	0	0.001	33	0.26	33	1.67	1.1

Testigo negativo, agua destilada

+ = positivo; - = negativo; I = indeterminado; m = factor de multiplicación

Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$

Prueba de Kruskal -Wallis para la distribución de manchas por mosca en moscas libres de inversión.

Tabla 5.3 Dicromato de potasio

	0.0	3.2	6.3	12.5	25	50	100	200
0.0								
3.2	-58.583 ns							
6.3	-55.883 ns	2.700 ns						
12.5	-57.992 ns	0.5917 ns	-2.108 ns					
25	-533.308 ns	5.275 ns	2.575 ns	4.683 ns				
50	-84.025*	-25.442 ns	-28.142 ns	-26.033 ns	-30.717 ns			
100	-174.33***	-115.74***	-118.44***	-116.33***	-121.02***	-90.300**		
200	-252.35***	-193.77***	-196.36***	-194.36***	-199.04***	-168.33***	-78.025*	

KW=154.99

Tabla 6.3 Cromato de potasio

	0.0	3.2	6.3	12.5	25	50	100	200
0.0								
3.2	-6.592 ns							
6.3	-26.342 ns	-19.750 ns						
12.5	-59.217 ns	-52.625 ns	-32.875 ns					
25	-70.517 ns	-63.925 ns	-44.175 ns	-11.300 ns				
50	-103.28***	-96.683**	-76.933*	-44.058 ns	-32.758 ns			
100	-129.14***	-122.55***	-102.80***	-69.925 ns	-58.625 ns	-25.867ns		
200	-107.98***	-101.39***	-81.642*	-48.767 ns	-37.467 ns	-4.708 ns	21.158 ns	

KW=56.764

Tabla 7.3 Cromato de sodio

	0.0	3.2	6.3	12.5	25	50	100	200
0.0								
3.2	-35.892 ns							
6.3	-45.325 ns	-9.433 ns						
12.5	-45.183 ns	-9.292 ns	0.1417 ns					
25	-56.858 ns	-20.967 ns	-11.533 ns	-11.675 ns				
50	-77.092*	-41.200 ns	-31.769 ns	-31.908 ns	-20.233 ns			
100	-141.68***	-105.78***	-96.492**	-96.492**	-84.817*	-64.583 ns		
200	-156.44***	-120.55***	-111.26***	-11.26***	-99.583***	-79.350*	-14.767 ns	

KW=69.459

P>0.05 ns
P<0.05 *
P<0.01 **
P<0.001 ***

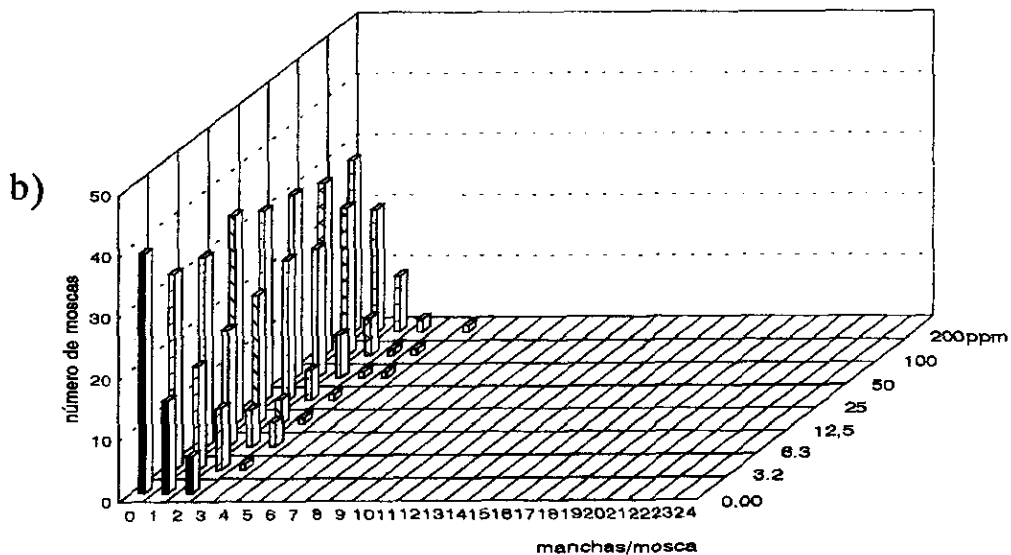
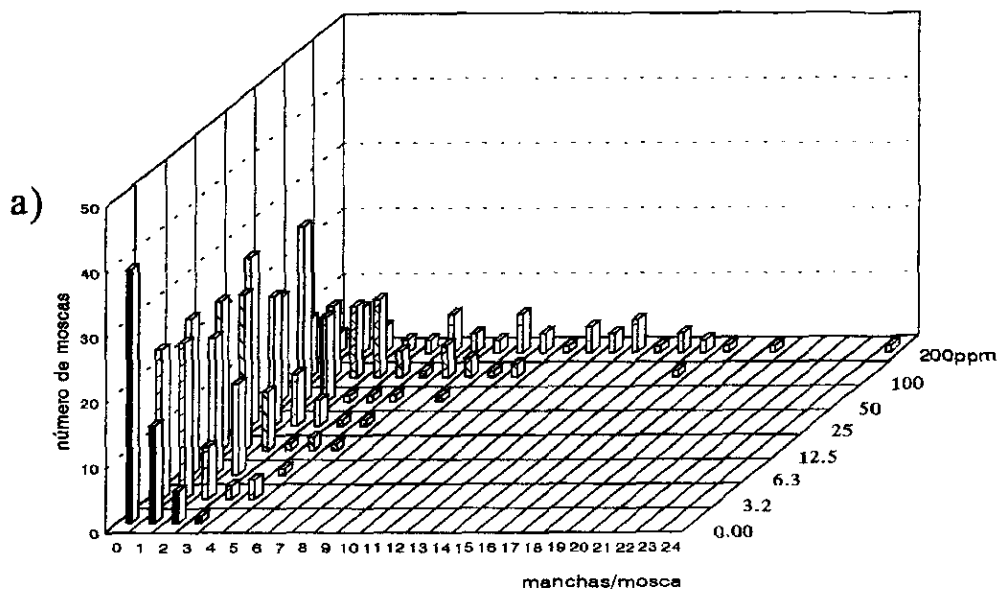


Fig.4.1 Número de manchas por mosca inducidas por dicromato de potasio. a) moscas libres de inversión, b) moscas portadoras del balanceador.

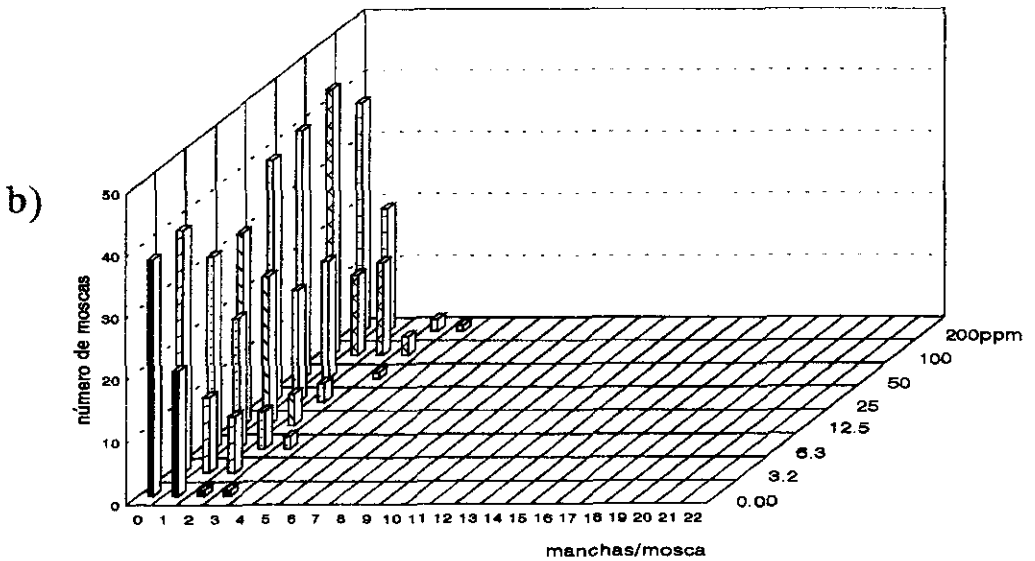
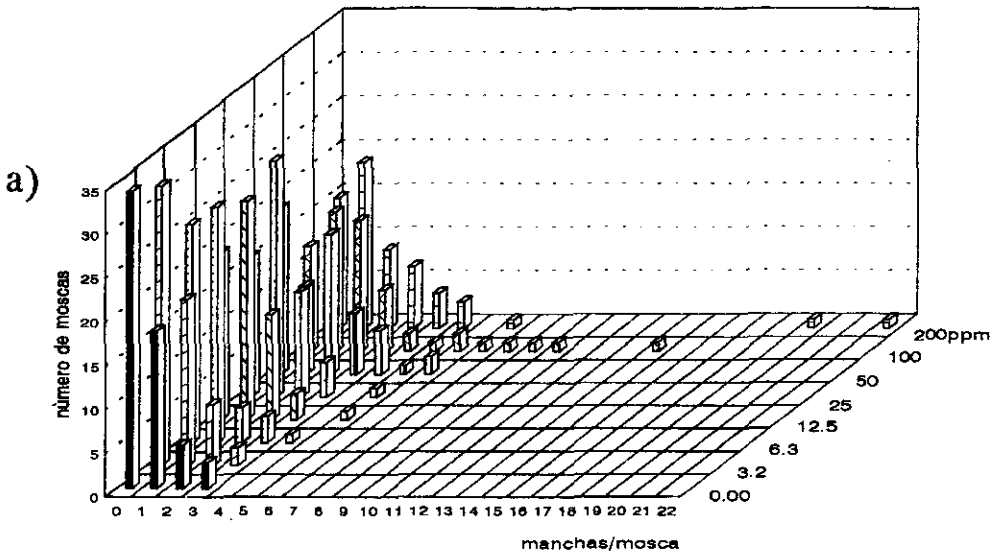


Fig.4.2 Manchas por mosca inducidas por cromato de potasio. a) moscas libres de inversión, b) moscas portadoras del balanceador.

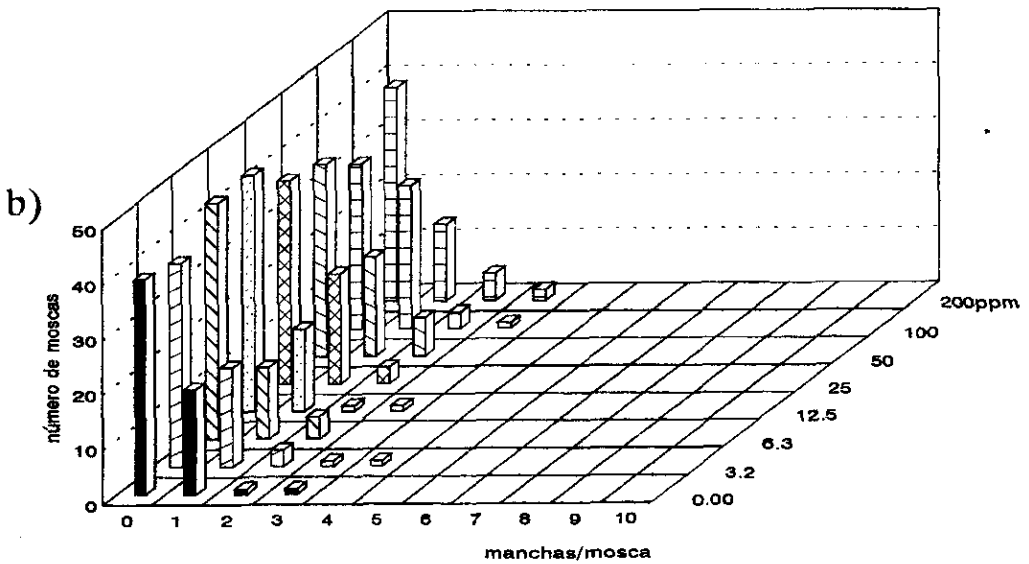
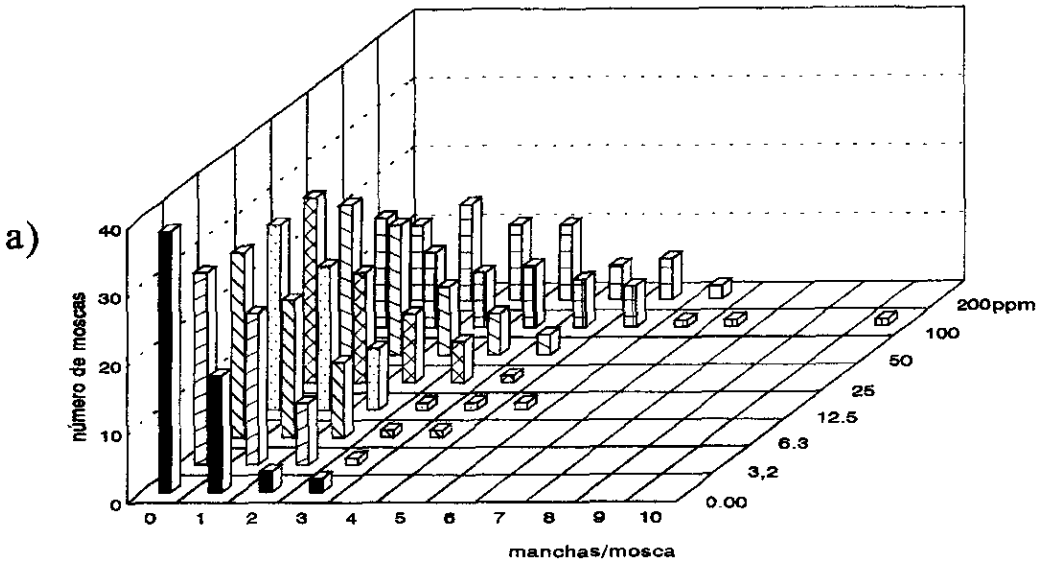


Fig.4.3 Número de manchas por mosca inducidas por cromato de sodio. a)moscas libres de inversión, b)moscas portadoras del balaceador.

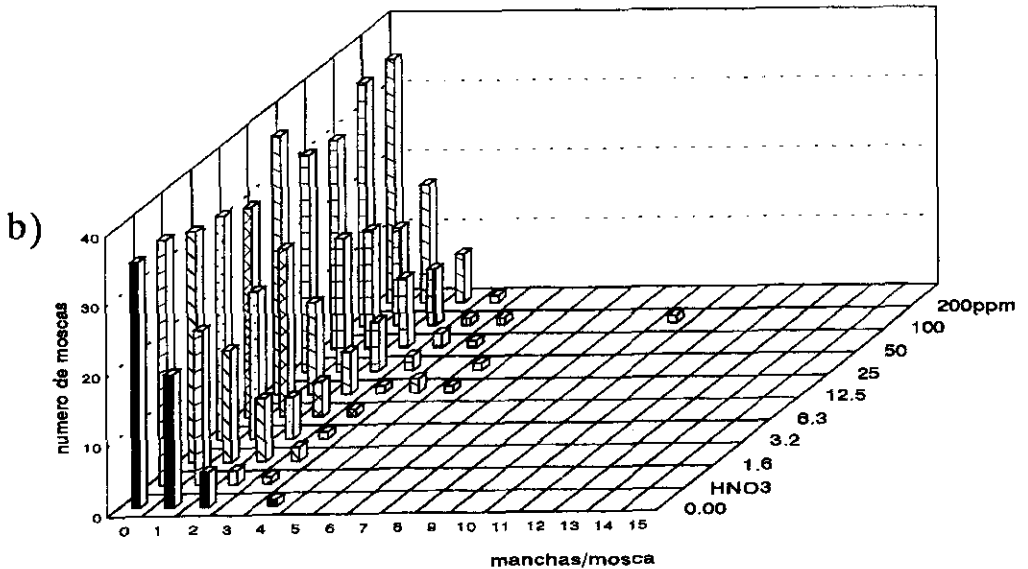
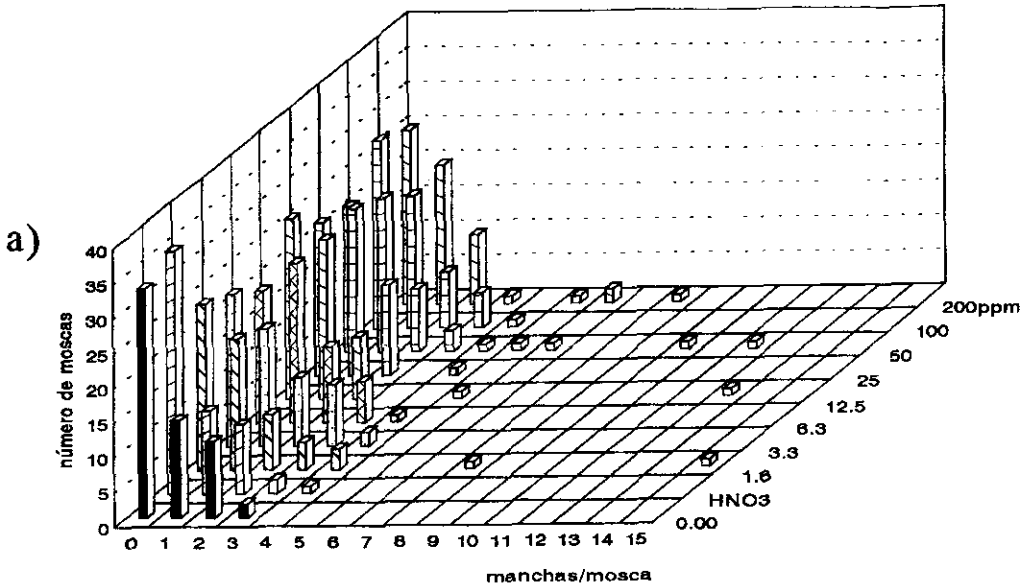
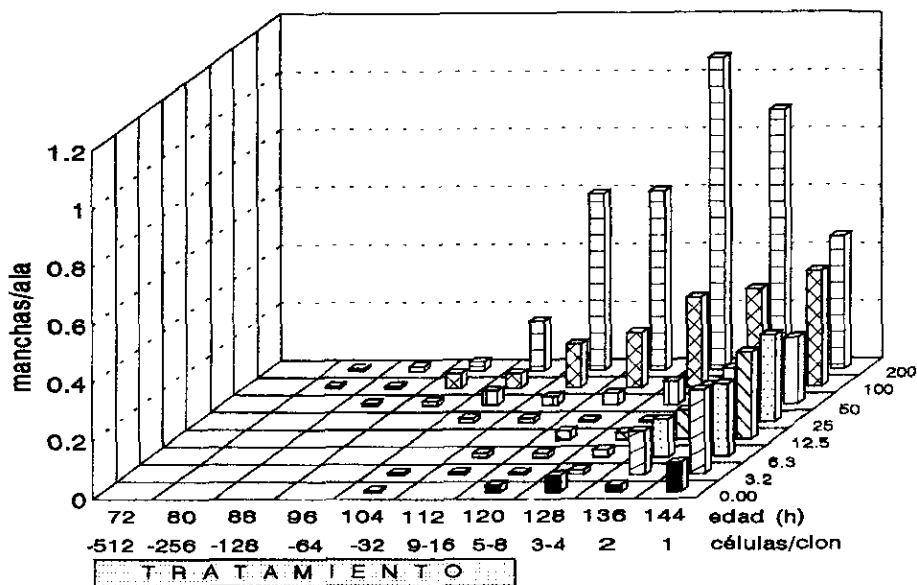


Fig.4.4 Manchas por mosca inducidas por cromato de plomo. a)moscas libres de inversión, b) moscas portadoras del balanceador.

a)



b)

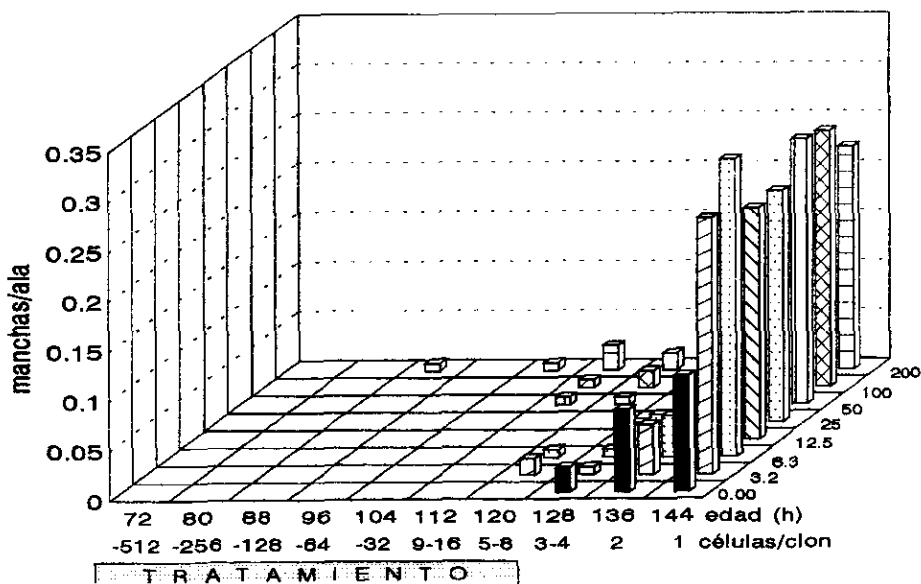


Fig 5.1 Células por mancha inducidas por dicromato de potasio. a) moscas libres de inversión, b) moscas portadoras del balanceador.

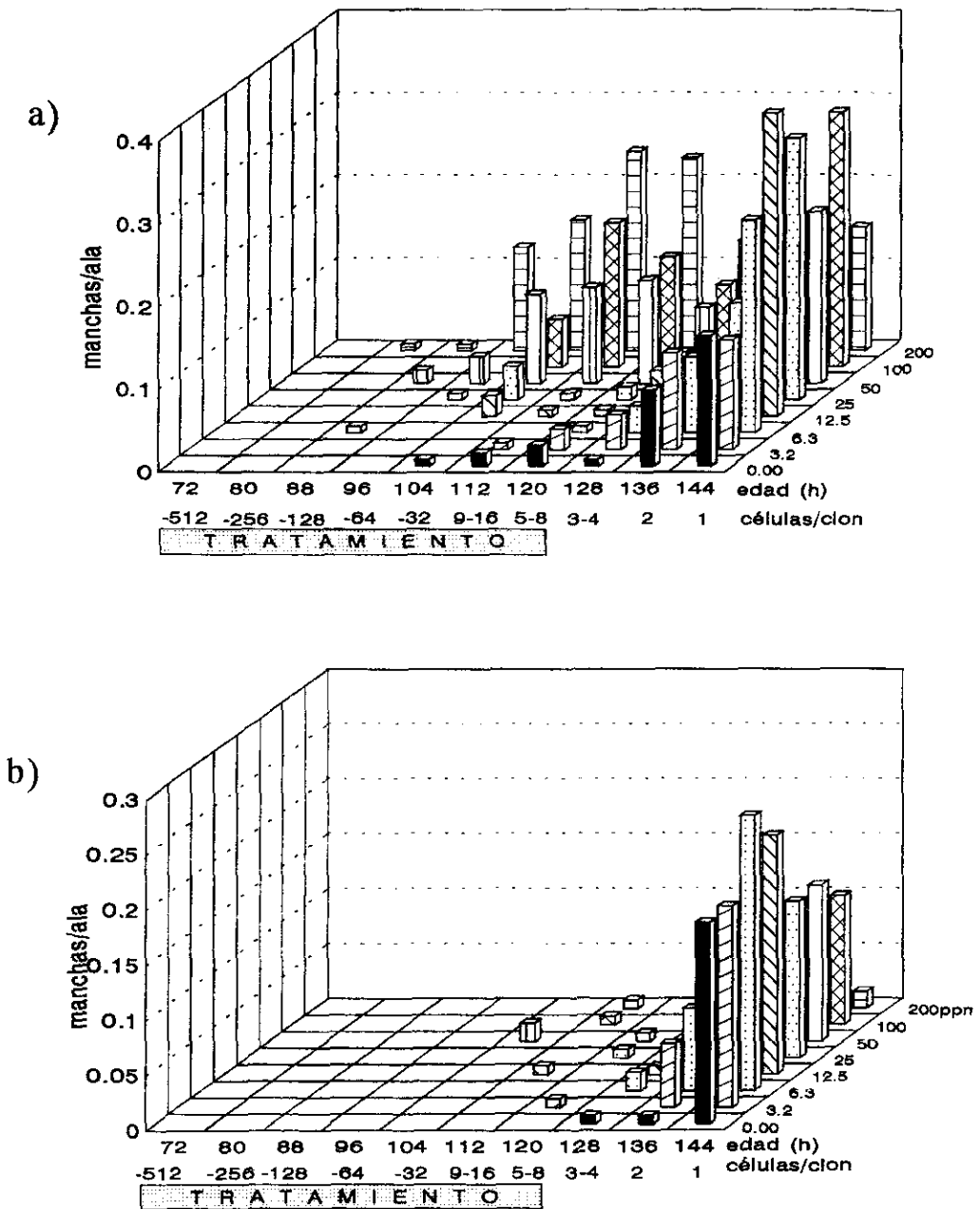


Fig. 5.2 Células por mancha inducidas por cromato de potasio. a) moscas libres de inversión, b) moscas portadoras del balanceador.

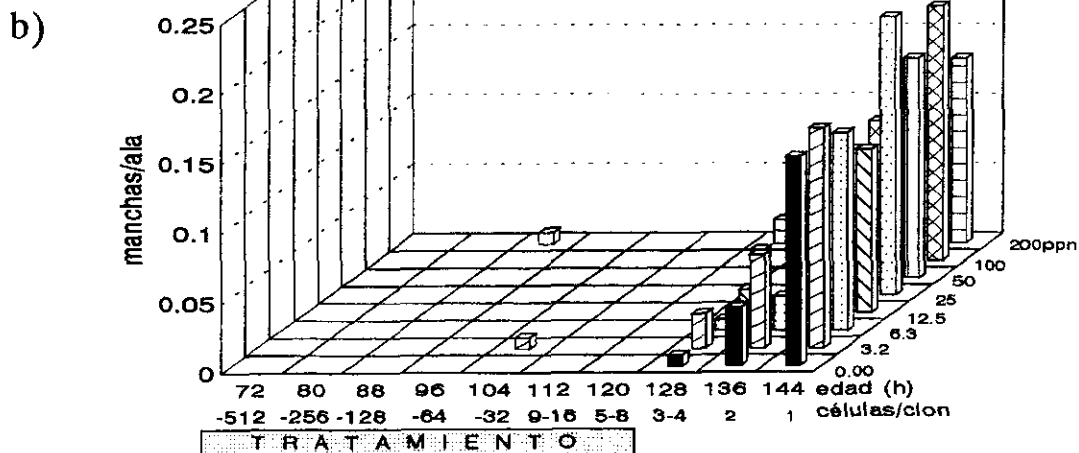
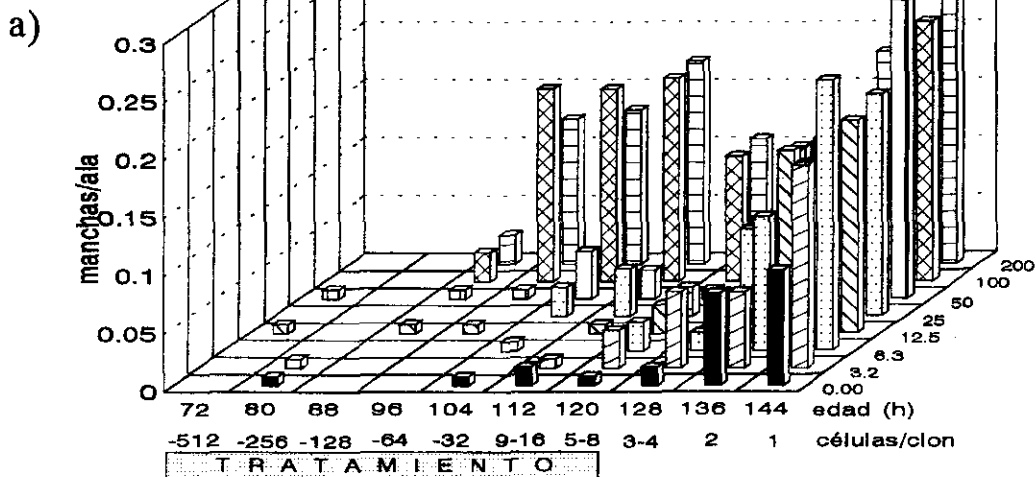


Fig. 5.3 Células por mancha inducidas por cromato de sodio. a) moscas libres de inversión, b) moscas portadoras del balanceador.

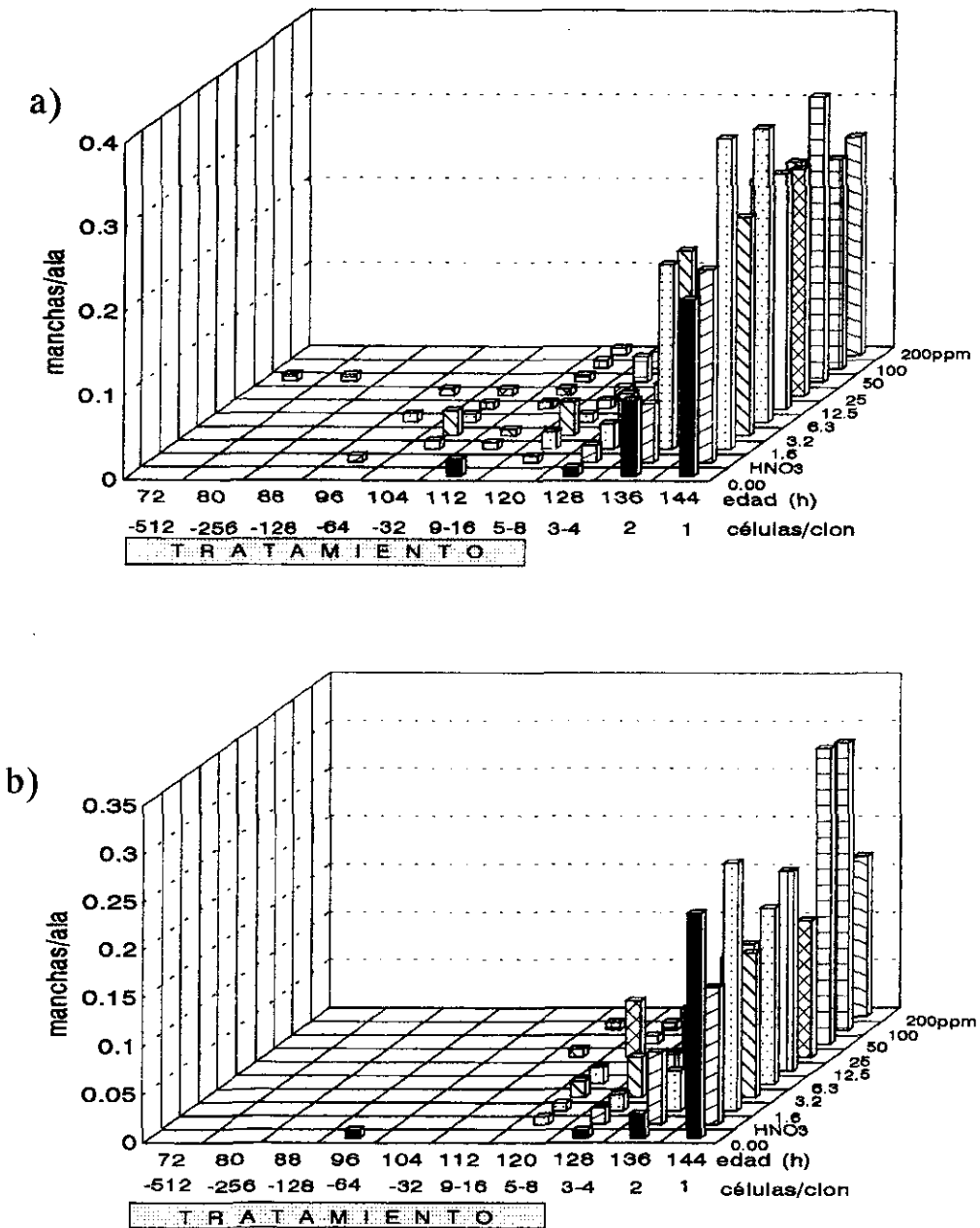


Fig 5.4 Células por mancha inducidas por cromato de plomo.
 a) moscas libres de inversión, b) moscas portadoras del balanceador.

DICROMATO DE POTASIO

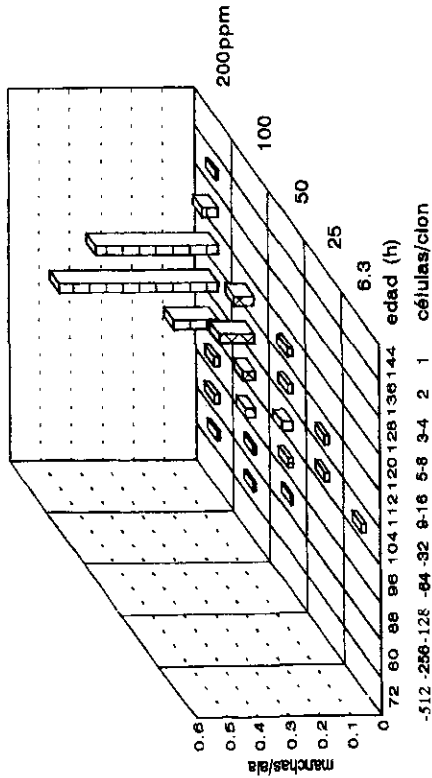
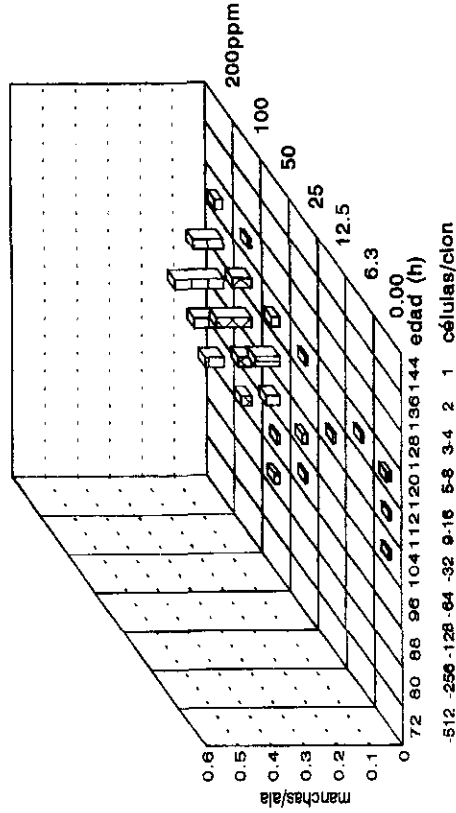


Fig. 6.1 Manchas gemelas inducidas en moscas libres de inversión.

CROMATO DE POTASIO



TRATAMIENTO

Fig.6.2 manchas gemelas inducidas en moscas libres de inversión.

CROMATO DE SODIO

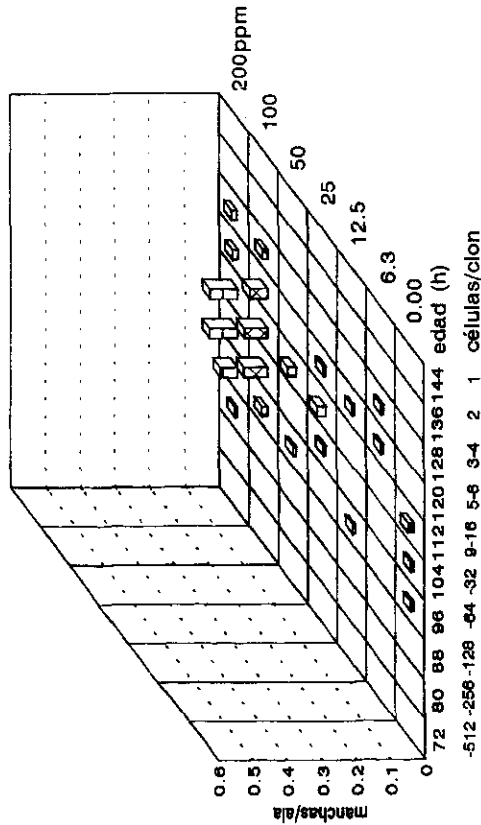


Fig. 6.3 manchas gemelas inducidas en moscas libres de inversión

CROMATO DE PLOMO

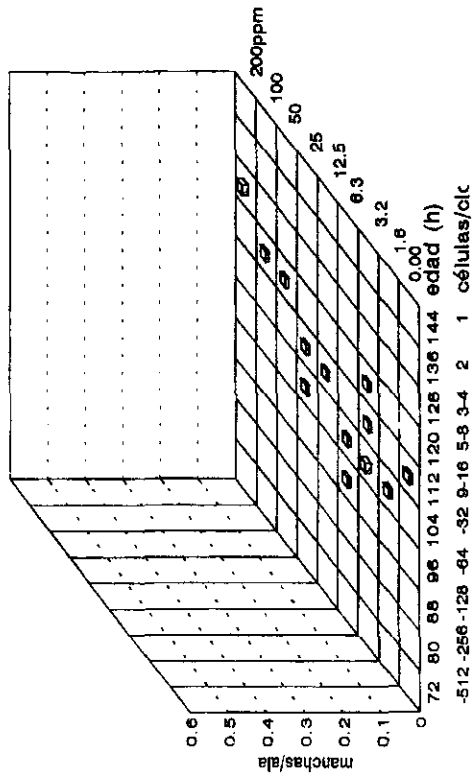


Fig.6.4 Manchas gemelas inducidas en moscas libres de inversión.

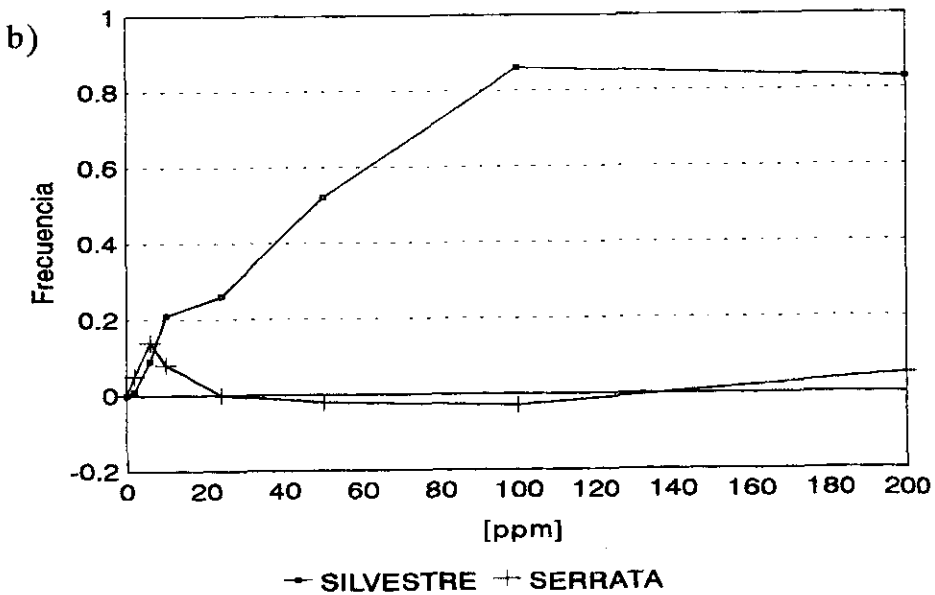
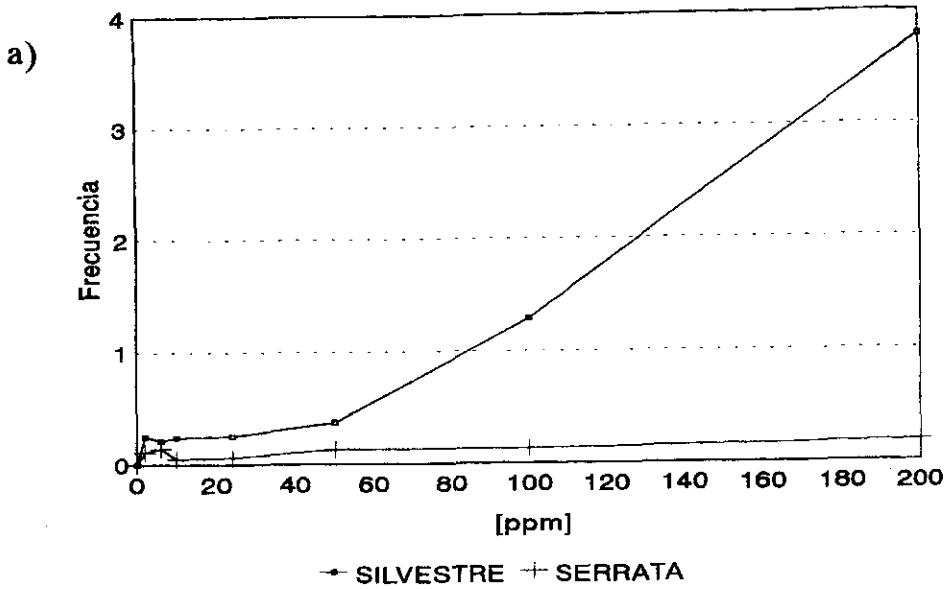


Fig. 7.1 Frecuencia corregida de manchas totales inducidas en moscas libres de inversión y en moscas portadoras del balanceador, a) dicromato de potasio, b) cromato de potasio

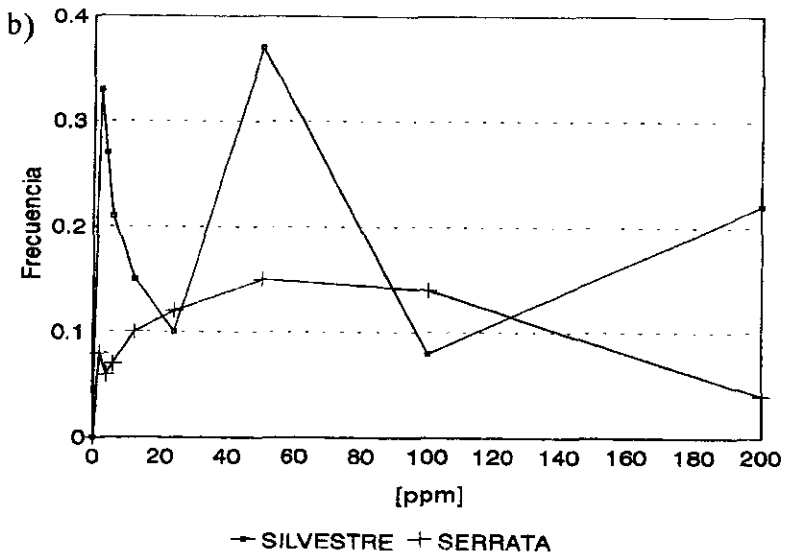
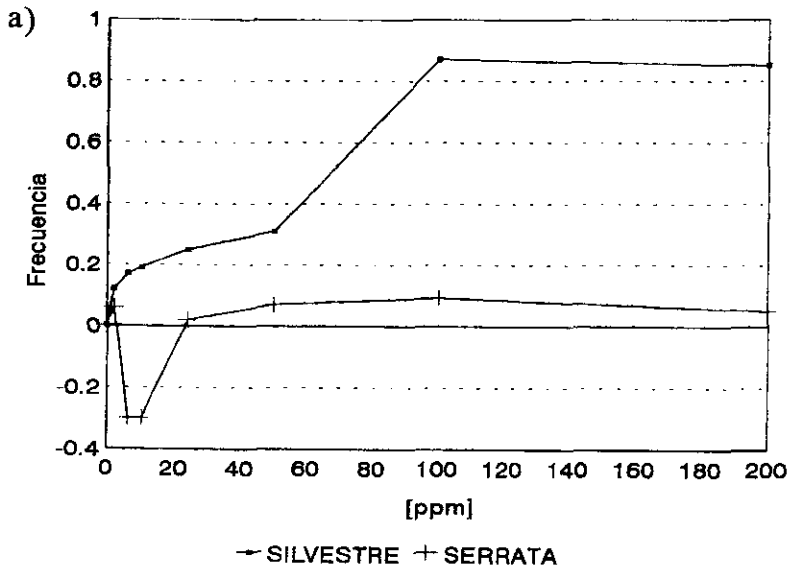


Fig 7.2 Frecuencia corregida de manchas totales inducidas en moscas libres de inversión y en moscas portadoras del balanceador, a) cromato de sodio, b) cromato de plomo.

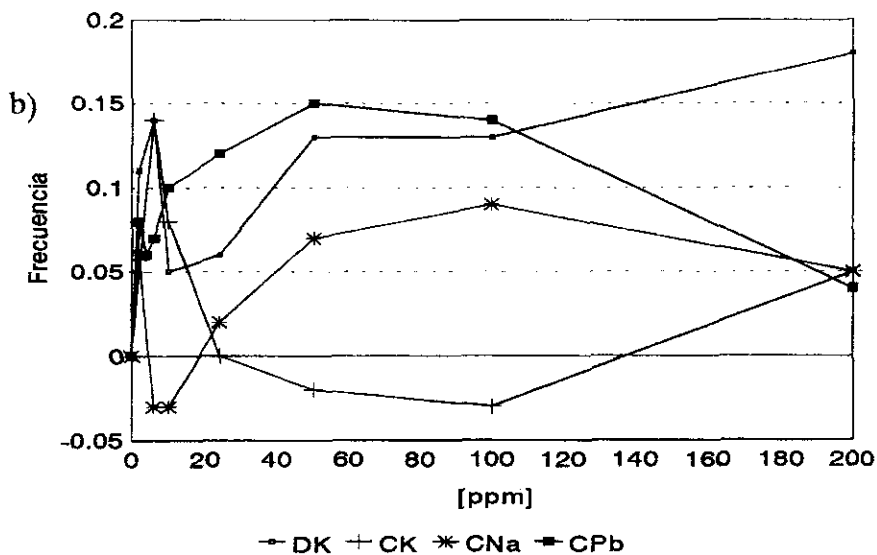
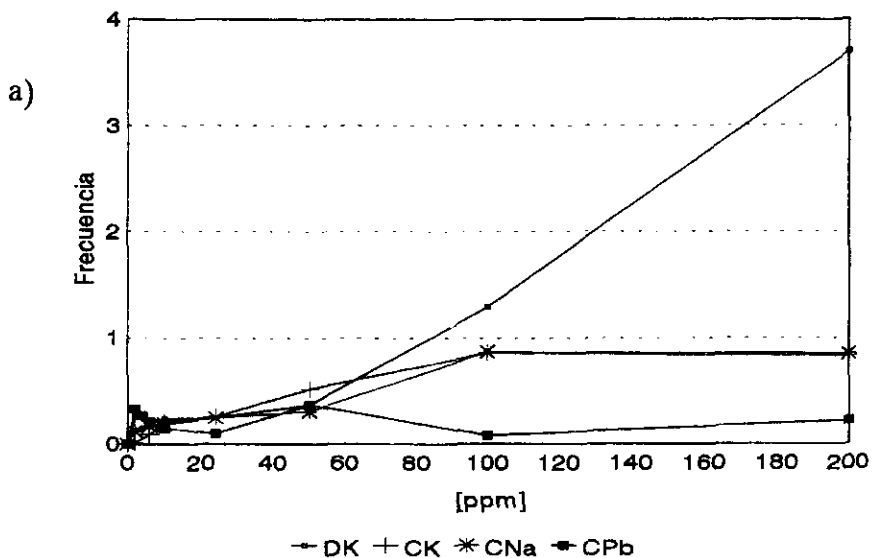


Fig. 7.3. a) Manchas totales inducidas por dicromato de potasio, cromato de potasio, cromato de sodio y cromato de plomo en moscas libres de inversión, b) manchas totales inducidas por los mismos compuestos en moscas portadoras del balanceador

DISCUSIÓN

Uno de los aspectos fundamentales de la toxicología genética es establecer si los compuestos químicos o los agentes físicos de interés pueden representar un riesgo potencial para los sistemas biológicos. El diseño y desarrollo de nuevos sistemas de prueba que permitan avanzar en esta dirección facilitarán las decisiones que deban ser tomadas para la utilización de estos compuestos, de tal forma que impliquen una actividad genotóxica nula o al menos significativamente menor al mínimo predefinido.

El cromo (VI) en sus diferentes compuestos y rangos de solubilidad se ha mostrado consistentemente como un agente capaz de producir un amplio espectro de daño genético como se muestra en la revisión publicada por De Flora *et al.* (1990), donde son analizados más de 700 resultados reportados en la literatura con 32 compuestos de cromo en 130 pruebas a corto plazo, analizando diferentes blancos y/o eventos genéticos terminales.

De los compuestos probados en este trabajo, tres de ellos (dicromato de potasio, cromato de potasio y cromato de sodio) son altamente solubles, produciendo, con muy pocas excepciones, resultados positivos en sistemas celulares, en particular, estos compuestos son mutagénicos en bacterias en las que producen errores en el marco de lectura y, en gran medida, sustitución de pares de base G-C → A-T. Las mutaciones inducidas por cromo (VI) parecen ser amplificadas por errores en las rutas de reparación del ADN. En ensayos bacterianos se tienen evidencias de la participación de la función SOS en la reparación del daño producido por cromo (VI) (De Flora *et al.*, 1990).

Estos compuestos también producen un amplio rango de efectos en levaduras e insectos, mostrando además una gran variedad de efectos genéticos en cultivos de células animales como: alteraciones del ciclo mitótico, inhibición de la síntesis de ADN, síntesis no programada de ADN,

inhibición de la reparación, daño al ADN, intercambio de cromátidas hermanas, micronúcleos, aberraciones cromosómicas y transformaciones morfológicas. Al administrar estos compuestos *in vivo* (Ratones L1210, Ratas Wistar, Hamster Chino, *Drosophila melanogaster*) también se producen algunos eventos terminales como inhibición de la síntesis de reparación de ADN, daño al ADN, mutación, intercambio de cromátidas hermanas, micronúcleos y aberraciones cromosómicas (De Flora *et al.*, 1990).

El último de los compuestos usados para este trabajo, el cromato de plomo, es posiblemente uno de los compuestos de cromo más insolubles. En sistemas bacterianos produce efectos genotóxicos sólo cuando se disuelve en ácidos o álcalis. Se ha llegado a conclusiones similares en estudios con levaduras e insectos y en algunos estudios de mutagénesis en cultivos celulares de mamíferos (De Flora *et al.*, 1990).

El potencial genotóxico de los compuestos de cromo mencionados anteriormente, se comparó mediante la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART). Los resultados obtenidos, son apoyados por los reportados por Graf *et al.* (1992) y Amrani *et al.* (1999) en el mismo sistema de prueba para dicromato de potasio y cromato de potasio y son comparables con los publicados para los compuestos de cromo (VI) que son altamente solubles en otros sistemas de prueba (De Flora *et al.*, 1990; Bianchi *et al.*, 1983; Leonard y Lauwerys, 1980).

Esta metodología, mediante el análisis de manchas por ala permite evaluar la genotoxicidad de los compuestos de dos formas diferentes, es decir, por un lado, la concentración mínima en la cual se produce un incremento significativo en la frecuencia de manchas y por el otro la máxima inducción de genotoxicidad. La concentración mínima en la cual la inducción de daño fue significativa en las moscas libres de inversión se obtuvo con cromato de plomo a 1.6 ppm, seguido por dicromato de potasio a 3.2 ppm (aunque no se probó una concentración menor), cromato de sodio a 6.3 ppm y cromato de potasio a 12.5 ppm. Es necesario aclarar que 1.6 ppm

sólo se probó para cromato de plomo y para tener un adecuado punto de referencia para compararlos sería conveniente probar esta concentración en DK.

En cuanto a la máxima inducción de genotoxicidad se encontró que el dicromato de potasio incrementó en 17 veces la frecuencia de manchas con respecto al testigo en 200 ppm, cromato de sodio 4.6 veces más que el testigo en 100 ppm, cromato de potasio 3.8 veces más en 100 ppm y cromato de plomo 2 veces más que el testigo en 50 ppm.

Estas dos relaciones, a reserva de conocer más sobre el mecanismo de acción del cromo, parecen estar influenciadas tanto por el rango de solubilidad de los compuestos de cromo (solubles > insolubles), como por las sales que acompañan a estos compuestos (potasio > sodio > plomo), aunque en el caso de cromato de plomo y en general de los compuestos de cromo insolubles, también depende fuertemente de la forma de administración del compuesto, es decir, la forma en la que se disuelve y, en consecuencia, del disolvente empleado; o si se administra particulado. Se han reportado trabajos en otros sistemas de prueba en los que el cromato de plomo induce una respuesta positiva e incluso incrementada sólo disuelto en NaOH, (Douglas *et al.*, 1980; Levis and Majone 1981); otros muestran efecto positivo sólo disuelto con ácido nitriloacético (NTA) (Loprieno *et al.*, 1985; Venier *et al.*, 1985; Costa R. *et al.*, 1988); con HCl (Nestmann *et al.*, 1979) o como en los reportes presentados por Wise J. *et al.* (1992) y Xu J. *et al.* (1992) que obtienen resultados positivos con cromato de plomo particulado en fibroblastos humanos pero no en células CHO.

Cabe destacar que los tres compuestos solubles presentan un comportamiento bastante similar y aunque tanto la concentración mínima efectiva, como la máxima inducción de genotoxicidad difieren en los tres, también en estos compuestos se observa que a mayor concentración, la inducción de daño aumenta. En el caso de cromato de plomo la situación es diferente, es decir, a partir de 1.6 ppm se produce un incremento en la frecuencia de inducción de manchas la cual es menor gradualmente, hasta 12.5 ppm; vuelve a aumentar en 50 ppm (máxima

inducción de genotoxicidad) y baja en 100 ppm, para finalmente aumentar en 200 ppm. Esta variación en la respuesta podría deberse a que en las concentraciones en las que no se recobra un incremento significativo, la actividad de enzimas implicadas en los mecanismos de eliminación de xenobióticos y/o reparación podría haber sido inducida, siendo agotada o saturada por concentraciones mayores en las que la actividad genotóxica del compuesto vuelve a detectarse. El análisis de manchas por ala desarrollado por Frei y Würigler (1988) determina el efecto global de la inducción de manchas, es decir, evalúa a la población en su conjunto, se sabe sin embargo, que los organismos que forman una población no presentan siempre la misma respuesta ante el mismo estímulo. El análisis de manchas por mosca, en el que se toma en cuenta el número de manchas que presenta una mosca en sus dos alas, permite apreciar que en una población se presentan organismos particularmente susceptibles al efecto de genotóxicos; estas variantes en la susceptibilidad de los organismos han sido interpretadas a través de diferencias en el sexo, al polimorfismo genético, a la deficiencia o eficiencia en los mecanismos de reparación o desintoxicación, o a la ingesta diferencial del compuesto bajo estudio, entre otras causas.

La aplicación de métodos estadísticos no paramétricos hace posible la comparación cuantitativa de manchas, tanto de las poblaciones expuestas como de las testigo, bajo la suposición de que la distribución poblacional del número de manchas por mosca se modifica ante factores de presión (Frei y Würigler, 1995; Ramos *et al.*, 1996), mostrando además que el efecto de los genotóxicos se manifiesta inicialmente en el sector más sensible de una población y que la fracción de organismos afectados se incrementa gradualmente conforme se intensifica la concentración del genotóxico o la exposición a éste.

Los resultados obtenidos mediante la prueba de Kruskal-Wallis (análisis de manchas por mosca) para las moscas libres de inversión muestran que para dicromato de potasio, cromato de potasio y cromato de sodio, la diferencia entre el lote testigo y las diferentes concentraciones probadas es significativa desde 50 ppm, lo cual sugiere que para estos compuestos, a mayor

concentración el efecto del genotóxico aumenta, sin embargo al analizar las gráficas se observa que la dispersión del número de manchas por mosca se modifica desde las concentraciones más bajas. En el caso de cromato de plomo, no se encontraron diferencias significativas para ninguna de las concentraciones probadas, pero como en el caso anterior, la dispersión de la distribución también se modifica en el rango de concentraciones probadas. Esto indica que aún cuando las diferencias en la prueba estadística no alcanzan a ser significativas, la acción del compuesto en estudio se ve reflejado en los sectores más sensibles de la población, como se puede apreciar en las gráficas 4.1 a 4.4.

El análisis de células por mancha se realizó con la finalidad de establecer la relación existente entre la edad de la larva y el tiempo de inducción de la mancha que se genera.

Los resultados obtenidos muestran que entre más joven es la larva, las manchas son más grandes aunque su frecuencia es muy baja y por el contrario, a medida que se incrementa la edad de la larva el tamaño de la mancha es menor y la frecuencia aumenta, estos resultados están de acuerdo con la relación encontrada por García Bellido y Merriam (1971) quienes demostraron esta relación inversa trabajando con radiaciones ionizantes.

Por otro lado, sabemos que los compuestos de cromo deben ser reducidos dentro de la célula y que esta reducción es crucial para la inducción de lesiones al ADN, y/o para su desintoxicación. En diferentes estudios realizados *in vitro* se sugiere que el glutatión, el ácido ascórbico y la cisteína son los componentes no enzimáticos más importantes en el proceso de reducción del cromato en el citoplasma (Liu S., and K: Dixon 1996). Algunos resultados sugieren que la reducción del cromato por glutatión, cisteína ó ácido ascórbico producen rompimiento de hebra sencilla de ADN (Kortenkamp A. and P. O'Brien 1994), formación de aductos glutatión-cromo-DNA y en menor cantidad, aductos cisteína-cromo-DNA (Borges KM. and E. Wetterhan 1989); y con ácido ascórbico, rompimiento de hebras sencillas, aductos cromo-DNA y radicales libres (Stearns D. *et al.*, 1994). También se ha sugerido que el peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

puede ser reductor del cromato produciendo en este proceso Cromo (V), radicales hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) y especies de oxígeno activo (O^2 , $^1\Delta_g\text{O}_2$) (Kawanishi S. *et al.*, 1986; Kawanishi S. *et al.*, 1994). Aun no se ha establecido con certeza la participación de cada uno de estos reductores del cromato, lo que sí es una regla general es que en el proceso de reducción del cromato, por el reductor que esté involucrado, se generan especies de oxígeno activo ($\text{HO}\cdot$, $^1\Delta_g\text{O}_2$, O_2^-) y radicales ($\text{RS}\cdot$ y $\text{R}\cdot$) los que por sí solos pueden causar lesiones al ADN.

Otro aspecto relevante de estos estudios es que se ha encontrado que existe una relación inversa entre la velocidad de reducción y la generación de daño al ADN (un aumento en la cantidad del reductor incrementa la velocidad de la reacción de reducción): una reducción lenta incrementa el daño. Alternativamente, el efecto puede deberse a la eficiencia de los atrapadores de radicales libres por un exceso del reductor.

Tomando en cuenta las proposiciones anteriores y analizando las gráficas de células por mancha observamos que la generación de manchas se prolonga más allá de las 120 horas (tiempo en el cual se forma el pupario y la larva deja de estar en contacto con el compuesto), es decir encontramos manchas que se están produciendo hasta las 144 horas, lo cual indica que estas manchas pueden ser producto tanto del efecto del compuesto como del daño oxidativo generado por los radicales libres producidos durante la reducción del cromato.

Con respecto al número de pelos (células) que forman las manchas recobradas, el DK produjo manchas de hasta 32 células en las concentraciones de 3.2 a 25 ppm, sin embargo, en las concentraciones mayores produjo manchas de hasta 256 células, lo que sugiere que se requiere de una concentración más alta de DK para detectar efectos cuantitativos. El tipo de lesiones inducidas por este compuesto se asocian fuertemente con la recombinación mitótica, lo cual es reforzado por la ausencia de manchas de tamaño grande en las moscas portadoras de inversiones, en las cuales no se recuperan eventos viables de recombinación, aunque llegan a presentarse

algunas manchas de más de 8 células en estas moscas. La fracción de manchas (principalmente de 1 célula) que se recobran en las moscas con inversiones podría ser ocasionada más por el daño oxidativo asociado a la biotransformación del DK que a eventos de recombinación.

La distribución del número de células por mancha en las moscas expuestas a CK y CNa resultó similar tanto para las moscas libres como para las portadoras de inversiones. También en este caso, la actividad de estos compuestos depende fuertemente de la recombinación mitótica.

En contraste con los tres compuestos anteriores, el CPb, mostró un patrón ligeramente diferente. Aunque indujo manchas de tamaño grande (512 células a 50 ppm), prácticamente desde el inicio del tratamiento, la frecuencia de manchas de 3 o más células en las diferentes concentraciones es similar, es decir, induce manchas de diferente tamaño con una frecuencia similarmente baja, pero diferente de la que se obtiene en la serie testigo; en las concentraciones más altas sólo se obtienen manchas de hasta 16 células. Esto podría sugerir la participación de un mecanismo diferente al que se encuentra con los otros compuestos de cromo en los que se recobran manchas de tamaño variable y con frecuencias también variables. Es importante recordar que el plomo es un inductor enzimático potente que podría activar una respuesta del sistema biológico ante la presencia de este compuesto, ya que en apariencia, la frecuencia de manchas grandes recobradas es independiente de la concentración de compuesto a la que fueron expuestas las moscas. En las moscas portadoras de inversiones no se presentan manchas de tamaño grande, lo que indica que las manchas observadas en las moscas libres de inversión se asocian con eventos de recombinación mitótica.

Los procesos de mutación y recombinación somáticas tienen una gran relevancia en la carcinogénesis. Las alteraciones somáticas en células de organismos heterocigóticos para algunos genes como los supresores de tumores, pueden contribuir a la progresión de tumores por la pérdida de heterocigocidad (Knudson, 1991). De esta forma, cualquier incremento en la recombinación mitótica puede conducir, potencialmente, a un incremento en la frecuencia de

homocigocidad de uno de estos genes recesivos supresores de tumor (Rothstein y Gangloff, 1995). Así, es evidente la importancia de detectar compuestos que pueden conducir a eventos de recombinación. En el caso de la prueba que nos ocupa, podemos dar un primer diagnóstico en este sentido cuando en el análisis de manchas por ala encontramos una alta frecuencia de manchas gemelas, que son generadas por eventos de recombinación entre el marcador proximal (*flr³*) y el centrómero. En las figuras 6.1 a 6.4 se puede observar la distribución de manchas gemelas mediante el análisis de células por mancha donde se muestra que para los tres compuestos solubles las manchas gemelas aparecen desde las 88 h de edad de la larva hasta las 136 h con un tamaño que va desde 2 hasta –256 células por mancha; también es evidente en este análisis que al aumentar la concentración del compuesto la frecuencia de aparición de estas manchas también aumenta. En el caso de cromato de plomo la presencia de manchas gemelas se observó a partir de las 96 h y hasta las 128 h de edad de la larva, con un tamaño de mancha que va de 3-4 células por mancha a – 64; sin embargo, la frecuencia con la que aparecen es la misma en todas las concentraciones a excepción de 3.2 ppm y 200 ppm donde se observaron ligeros incrementos.

Un segundo diagnóstico lo obtenemos analizando las moscas portadoras del cromosoma balanceador y comparando la frecuencia de aparición de manchas con las de las moscas libres de inversión, con lo cual se obtiene el porcentaje de recombinación inducido por los compuestos bajo estudio.

De esta manera encontramos que el dicromato de potasio y el cromato de sodio mostraron en la concentración más alta (200 ppm), una proporción de 90 y 76% respectivamente, de inducción de manchas debidas a recombinación; para cromato de potasio fue de 85% en 100 ppm y para cromato de plomo del 52% en 1.6, 3.2 y 200 ppm.

CONCLUSIONES.

- La relación de genotoxicidad encontrada para los cuatro compuestos de cromo (VI) a bajas concentraciones fue: CPb > DK > CK = CNa
- La relación de genotoxicidad encontrada para los cuatro compuestos de cromo (VI) a altas concentraciones fue: DK > CK ≥ CNa > CPb.
- La relación de genotoxicidad encontrada para la inducción de manchas gemelas por los cuatro compuestos de cromo (VI) a altas concentraciones fue: DK > CK > CNa >> CPb.
- En las moscas portadoras del cromosoma balanceador la comparación del efecto inducido en la concentración significativa mínima (6.3 ppm) dio la relación: DK = CK.
- En las moscas portadoras del cromosoma balanceador la comparación del efecto inducido en la concentración más alta sólo fue significativo para el DK.
- El análisis del número de manchas por mosca permite identificar a la fracción de los organismos de una población tratada que contribuyen a una respuesta de genotoxicidad.
- La utilización de métodos de estadística no paramétrica es de utilidad en la toma de decisiones, principalmente ante la falta de respuestas claramente positivas o negativas en la inducción de manchas.

- La prueba SMART permite discriminar el potencial genotóxico de compuestos químicos derivados de un solo elemento con diferentes asociaciones.
- La prueba de Mutación y Recombinación Somática es un excelente modelo *in vivo* para detectar eventos de recombinación.

REFERENCIAS.

- Abundis H. M. (1996) Determinación de la mutación y recombinación somáticas en la inducción de efectos genotóxicos por tres sales de vanadio en *Drosophila melanogaster*. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias UNAM. 90 pp.
- Amrani S., M. Rizky, A. Creus and R. Marcos. (1999) Genotoxic Activity of Different Chromium Compounds in Larval Cell of *Drosophila melanogaster*, as Measured in the Wing Spot Test. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34:47-51.
- Barceloux DG. (1999) Chromium. *J. Toxicol Clin Toxicol* 37 (2): 137-94.
- Bianchi V., L. Celotti, G. Lanfranchi, F. Majone, G. Marin, A. Montaldil, G. Sponza, G. Tamino, P. Venier, A. Zantedechi y A. Levis. (1983) Genetic effects of chromium compound. *Mutation Res.* 117: 279-300

- La prueba SMART permite discriminar el potencial genotóxico de compuestos químicos derivados de un solo elemento con diferentes asociaciones.
- La prueba de Mutación y Recombinación Somática es un excelente modelo *in vivo* para detectar eventos de recombinación.

REFERENCIAS.

- Abundis H. M. (1996) Determinación de la mutación y recombinación somáticas en la inducción de efectos genotóxicos por tres sales de vanadio en *Drosophila melanogaster*, Tesis de maestría, Facultad de Ciencias UNAM. 90 pp.
- Amrani S., M. Rizky, A. Creus and R. Marcos. (1999) Genotoxic Activity of Different Chromium Compounds in Larval Cell of *Drosophila melanogaster*, as Measured in the Wing Spot Test. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34:47-51.
- Barceloux DG. (1999) Chromium. *J. Toxicol Clin Toxicol* 37 (2): 137-94.
- Bianchi V., L. Celotti, G. Lanfranchi, F. Majone, G. Marin, A. Montaldil, G. Sponza, G. Tamino, P. Venier, A. Zantedechi y A. Levis. (1983) Genetic effects of chromium compound. *Mutation Res.* 117: 279-300

- Borges K.M., K.E. Wetterhan (1989). Chromium cross-link glutathione and cysteine to DNA. *Carcinogenesis* 10 (11) 2165 – 8.
- Brusick D. (1987) Evolution of testing strategies for genetic toxicity. *Mutation Res.*, 205: 69-78
- Brusick D., (1987) Principles of genetic toxicology. Plenum Press. New York, USA., 284 pp.
- Cairns J. (1981) The origin of human cancers. *Nature*, 289: 353-357.
- Casarett L. J., (1975) Toxicology of the poisons. The basic science. Memillan Publishing Co., Inc. New York, USA.
- Costa R. G. Strolego y A. Gino. (1988) Mutagenicity of lead chromate in *Drosophila melanogaster* in the presence of nitrilotriacetic acid (NTA). *Mutation Res.* 204: 257-261.
- De Flora S., M. Bagnasco, D. Serra y P. Znacchi. (1990) Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutation Res.* 238: 99-172
- De Flora S., K. Wetterhahn (1989) Mechanisms of chromium metabolism and genotoxicity. *Life Chemistry Reports*. Vol 7, 169-244 pp.
- Douglas G. R., R.D.L. Bell, C.E. Grant, J.M. Wytmsa and K.C. Bora (1980) Effect of lead

Cromate on chromosome aberration, sister-chromatid exchange and DNA damage in mammalian cells *in vitro*. *Mutation Research*, 77: 157 – 163.

- Frei H. and F.E. Würzler (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results. *Mutation Res.* 279: 21 – 33.

- Frei H. (1994) Statistical analysis of data from somatic mutation and recombination tests (SMART). *Rev. Int. Contam. Ambien.* 10 (Suplemento 1), 9-14.

- Frei H., F. Würzler. (1995) Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Res.* 334: 247-258.

- Frey P. (1977) *Química Moderna*. Montaner y Simón S.A. España 614-631pp.

- Galvão L. Y G. Corey (1987) *Cromo*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Serie vigilancia 5, 66pp.

- García-Bellido A. y R. Merriam. (1971) Clonal parameters of tergite development in *Drosophila*. *Developmental Biology*. 26: 264-276.

- García-Bellido A. y J. Dapena. (1974) Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila*. *Mol. Gen. Genet.* 128: 117-87.

- Graf U., H. Juon, A. J. Katz, H. J. Frei, F.E. Würgler. (1983) A pilot study on a new *Drosophila* spot test. *Mutation Res.* 120: 233-239.
- Graf U., F. Würgler, A. Katz, H. Frei, H. Juon, C. Hall y P. Kale (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.*, 6: 153-188
- Graf U., O. Heo y O. Olvera. (1992) The genotoxicity of chromium (VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. *Mutation Res.* 266: 197-203.
- Graf, U., Wild, D. and Würgler, F.E. (1992b) Genotoxicity of [2-amino-3-methylimidazol-4-5-*f*] quinoline (IQ) and related compounds in *Drosophila*. *Mutagenesis* 7, 145-149.
- Graf U., (1995) Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experientia.* 51: 168-173.
- González-César E. y P. Ramos-Morales (1997) Sodium azide induces mitotic recombination in *Drosophila melanogaster* larvae. *Mutation Res.* 389: 157-165.
- IARC (1990) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human, Vol. 49, Chromium, Nickel and Welding, International Agency for Research on Cancer, Lyon.

- IARC (1999). The Use of Short- and Medium-term Tests for Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation. IARC Scientific Publications No. 146, 12-13 pp.
- Kawanishi S., S. Inoue, and S. Sano. (1986) Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate (VI) in the presence of hydrogen peroxide. *The Journal of Biological Chemistry*. 261: 5952-5958.
- Kawanishi S., S. Inoue and K. Yamamoto. (1994) Active Oxygen Species in DNA Damage Induced by Carcinogenic Metal Compounds. *Environ Health Perspect* 102 (Suppl 3): 17-20.
- Knudson A. (1991) Overview: Genes that predispose to cancer. *Mutation Research* 247: 185-190.
- Kortenkamp A., Z. Ozolins, D. Beyersmann y P. O'Brien. (1988) Generation of PM2 DNA breaks in the course of reduction of chromium (VI) by glutathione. *Mutation Res.* 216: 19-26.
- Kortenkamp A., and P. O'Brien (1994) The generation of DNA single-strand breaks during the reduction of chromate by ascorbic acid and/or glutathione in vitro. *Environ Health Perspect* 102 (Suppl 3): 237-241.
- Léonard A. and R. Lauwerys. (1980) Carcinogenicity and mutagenicity of chromium. *Mutation Res.* 76: 227-239.

- Levis A.G. and F. Majone (1981) Cytotoxic and clastogenic effects of soluble and insoluble compounds containing hexavalent and trivalent chromium, *Br. J. Cancer*, 37 ; 219-235.
- Linsdley L. and G. Zimm (1992) The genome of *Drosophila melanogaster*, Academic Press, Inc., U.K., 1142 pp.
- Liu S. and K. Dixon (1996). Induction of mutagenic DNA damage by chromium (VI) and glutathione. *Environmental and molecular mutagenesis* 28: 71-79.
- Loprieno N., G. Boncristiani, P. Vernier, A.G. Levis (1985) Increased mutagenicity of chromium compounds by nitrilotriacetic acid. *Environ. Mutagen.*, 7: 185-200.
- Maldonado 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, Facultad de Ciencias, UNAM. 60 pp.
- Muñoz J. A. (1994). Caracterización del potencial genotóxico y protector de *Ipomea orizabensis* en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 96 pp.
- Negishi, T., Shiotani, T., Fujikawa, K and Hayatsu, H. (1991) The genotoxicities of N-nitrosamines in *Drosophila melanogaster in vivo*: The correlation of mutagenicity in the wing spot test with the DNA damage detected by the DNA-repair test. *Mutat. Res.*, 252, 119-128
- Nestmann E.R., T.I. Matula, G.R. Douglas, K.C. Bora and D.J. Kowbel (1979) Detection of

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

mutagenic activity of lead cromate using a battery of microbial tests, *Mutation Res.*, 66; 357-365.

- Nirmal, K. R. And T. G. Rossman (1992) Mutagenesis and comutagenesis by lead compounds. *Mutation Res.* 298, 97-103.
- Nöthiger J. (1970) Sucrose density separation: a method for collecting large numbers of *Drosophila* larvae, *Dros. Inf. Ser.* 45:177.
- Organización Mundial de la salud (1980) Critereios de salud ambiental 6. Principios y métodos para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas. Parte I. Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud. México. 287 pp.
- Petrilli F., A. Camoirano, C. Bennicelli. P. Znacchi, M. Astengo and S. De Flora. (1985) Specificity and inducibility of the metabolic reduction of chromium (VI) mutagenicity by subcellular fractions of rat tissues. *Cancer Res.* 45: 3179-3187.
- Ramos, P., H. Abundis, J.C. Gaytán, M.G. Tellez,, P.G. Orozco, J. Maldonado, J. Hernández, E. González, P. Reyes, E.M. Galicia y J.A. Muñoz (1993) Manual de Laboratorio de Genética para *Drosophila melanogaster*. McGraw-Hill, 1ª edición, México, D.F. 131 pp.
- Ramos M. P. y R. Rodríguez (1995) Genotoxicity of two arsenic compounds in germ cells an somatic cell of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Molec. Mutagen.* 25: 288-299.

- Ramos P., G. Ordaz, J. Maldonado, A. Muñoz, E. González, H. M. Abundis, A. Campos, M. Martínez, Y. Páez, M. Islas, J. Gaytán, P. Orozco, B. Hernández, Y. Dorantes, H. Rivas, A. Muñoz, e I. Jiménez. (1996) Susceptibilidad diferencial de *Drosophila melanogaster* en la prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART). Análisis de la distribución muestral. Memorias del 4º Congreso Conjunto de las Sociedades Mexicanas de Genética y Toxicología Genética. Pag. 5.
- Ramos-Morales P, Ordaz G., Dorantes A.Y., Rivas H., Campos P., Martínez M., Hernández B. (2000). “*Drosophila* is a reliable biomonitor of water pollution” En Butterworth F, Gonsbatt (1999) *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change. A Handbook, Part II*, Plenum Press, (En prensa).
- Rothstein R., S Gangloff (1995). Hyper-recombination and Bloom’s syndrome: microbes again provide clues about cancer. *Genome Res* 5:421-426.
- Russell P. J. (1998) *Genetics*, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Fifth Edition, U:S:A., 894 pp.
- Shibahara, T., Ogawa, H.I., Ryo, H. and Fujikawa, K. (1995) DNA- damagin potency and genotoxicity of aflatoxin M₁ in somatic cells *in vivo* of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*. 10, 161-164.

- Stearns D., K. Courtney, P. Giangrande, L. Phieffer and E. Wetterhan (1994). Chromium (VI) Reduction by Ascorbate: Role of Reactive Intermediates in DNA Damage *In Vitro*. *Environ Health Perspect* 102(Suppl3): 21-25.
- Vernier P., A. Montaldi, C. Gava, L. Zentilin, G. Tecchio, V. Bianchi, S. Paglialunga and A.G. Levis (1985) Effects of nitrilotriacetic acid on the induction of gene mutations and sister-chromatids exchanges by insoluble chromium compounds, *Mutation Res.*, 156: 219-228.
- Vogel E., W. Blijleven, P. Klapwijk and J. Zijlstra. (1980) Some current perspectives of the applications of *Drosophila* in the evaluation of carcinogens. In: G.M. Williams, R. Kroes, H. Waaijers and K. Van de Poll (Eds.) *The Predictive Value of Short-term Screening Tests in Carcinogenicity*. Elsevier, Amsterdam, 125-147 pp.
- Vogel E. W. and A. Szakmáry. (1990) Basic principles and evaluation of results of assays measuring genotoxic damage in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation and the Environment*. Part B: 149-158.
- Vogel, E. (1992) *Genotoxic chemicals an introduction into the basic principles of genetic toxicology*. Laboratorium voor Stralengenetica en Chemische Mutagenese, RU Leiden, Sylvius Laboratoria. (Curso).

- Vogel E., U. Graf, H. J. Frei and M.M.J. Nivard (1999) The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. The use of short medium term tests for carcinogens and data on genetics effects in carcinogenic hazard evaluation. D.B. McGregor. J. M. Rice and S. Vennit eds. IARC Scientific Publications No. 146. Lyon. 427-470 pp.

- Willers H., E. McCarthy, B. Wu, H. Wunsc, W. Tang, D. Taghian, F. Xia and S. Powel (2000). Dissociation of p53-mediated suppression of homologous recombination from G1/S cell cycle checkpoint control. *Oncogene*, 19, 632-639 pp.

- Winder C. and T. Bonin (1993) The genotoxicity of lead. *Mutation Res.* 285: 117-124.

- Wise J.P., J. C. Loenard and S. R. Patierno. (1992) Clastogenicity of lead chromate particles in hamster and human cells. *Mutation Res.* 278: 69-79.

- Xu J., J.P. Wise and S.R. Patierno (1992). DNA damage induced by carcinogenic lead chromate particles in cultured mammalian cells. *Mutation Research*, 280; 129-136.