

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

Aplicación de Drosophila melanogaster como biomonitor indicador de contaminación acuática

T E S I S

QUE PRESENTA

ADRIANA YADIRA DORANTES VELAZQUEZ

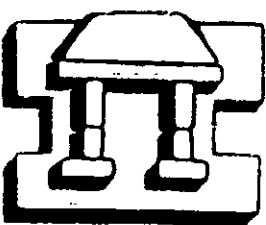
PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

286057



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA EDO. DE MEX. 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Ustedes me dicen, entonces, que tengo que
perecer como también las Flores que cultivé
perecerán.

¿De mi nombre nada quedará,
nadie mi fama recordará?

Pero los jardines que planté, son jóvenes y
crecerán...

Las canciones que canté, ¡cantándose seguirán!

HUEXOTZINCATZIN
Príncipe de Texcoco, 1484

MÁMA:

Gracias por los juegos, por tus cuidados, por tu compañía en la escuela, por tu alegría, por tus consejos, por tu ejemplo.

PÁPA:

Gracias por todas las formas en las que nos demuestras tu amor, por todo lo que haz hecho por nosotros, por tu fortaleza.

Pero sobretodo por el hogar que nos brindan, por su ejemplo de amor y unión

IVONNE:

Desde pequeña aprendí de ti a forjarme un objetivo y no claudicar hasta conseguirlo, gracias por las veces que me has defendido y apoyado, pero sobre todo por ser mi hermana.

ABUELITA Y ABUELITO:

Gracias por todo lo que comparten conmigo, por sus detalles, cariño, interés, enseñanzas y por consentirme.

TERESA:

Vaya que nos haz dado un ejemplo de perseverancia y valor, gracias por regresar a nuestras vidas.

HUGO:

Por fin lo logramos, gracias por tu ayuda, pero sobre todo por estar a mi lado y compartir alegrías y tristezas.

Agradezco a todos mis amigos que de una u otra forma contribuyeron a la culminación de esta tesis, no solo a aquellos que están ahora, también a los que estuvieron en el inicio:

Israel por todo lo que hemos pasado juntos y por todo lo que significas para mí; Areli y Verónica por lo compartido en la adolescencia y lo que falta; Dónica por tu optimismo; Leticia por tu fortaleza y sensatez; Roberto por tus intentos de mejorarme aunque no funcionaron; Alfredo por los recuerdos; Mircea por tu amistad incondicional; Patricia y Víctor por su compañía y confianza; Néctor por tus detalles.

A los compañeros del laboratorio, gracias por sus atenciones:

Hugo por tu apoyo en la elaboración de imágenes para darle una mejor presentación a este trabajo.

Blanca por todo tu apoyo, confianza, interés, por formar parte de nuestro equipo y por que siempre podemos contar contigo, gracias.

Néctor por tu amistad; Julián por lo compartido; Edna y Yolanda por sus consejos; Pati O, Lupita y Armando por sus enseñanzas; Juan Carlos, Adriana C. y Adriana R. por su apoyo.

Familia Rivas: agradezco de manera especial todo el apoyo que me brindaron.

Familia Barbosa: Gracias por su cariño.

ORA. PATRICIA RAMOS: GRACIAS POR SU APOYO, ENSEÑANZA, CONFIANZA Y
SOBRE TODO POR LA OPORTUNIDAD DE TRABAJAR EN EL LABORATORIO.

A los sinodales:

Bióloga MA. Eugenia Heres Puñido

Bióloga Irma Elena Dueñas García

Maestro en Ciencias Ramón V. Moreno Torres

Biólogo Antonio Cisneros Cisneros.

Les agradezco sus comentarios y sugerencias que enriquecieron
este trabajo.

El precepto de Freud es que el hombre no consigue dar un sentido a su existencia si no lucha valerosamente contra aquello que le parecen desigualdades aplastantes

Bruno Bettelheim..

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Genética
"Theodosius Dobzhansky" de la Facultad de Ciencias de la
Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo forma parte del proyecto "Biomonitores y biomarcadores como indicadores de contaminación ambiental".

Con apoyo de la Dirección General de Asuntos del
Personal Académico (DGAPA)

Proyecto IN-207196-UNAM

Las líneas de *Orosophila melanogaster*
utilizadas en este trabajo, fueron donadas por el
Orosophila Stock Center México.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
<i>Drosophila melanogaster</i>	2
Genética toxicológica en <i>Drosophila melanogaster</i>	6
Prueba de mutación y recombinación somática en las alas de <i>Drosophila melanogaster</i>	8
<i>Drosophila melanogaster</i> como biomonitor.....	12
Zona de muestreo.....	16
OBJETIVOS.....	19
HIPÓTESIS.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Muestras.....	20
Preparación de las muestras.....	26
Sistema de cruce.....	27

Tratamiento.....	28
Fijación elaboración de las preparaciones.....	28
Criterios de lectura.....	30
Análisis estadístico.....	30
RESULTADOS.....	34
DISCUSIÓN.....	56
CONCLUSIONES.....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	65

INTRODUCCIÓN

Las mutaciones son cambios heredables en el ADN que pueden ser de diferentes tipos y magnitudes, pueden presentarse en las células sexuales y se manifiestan en la siguiente generación de organismos. También pueden afectar a las células somáticas, por lo que la siguiente generación no se verá afectada, sin embargo, si la mutación ocurre en etapas tempranas del desarrollo de un organismo, podría afectar su formación; pero, si ésta se presenta en la etapa adulta, puede ser el origen de procesos malignos como el cáncer. Los mutágenos potenciales son de origen natural y/o antropogénico, de naturaleza química, física o biológica, en el último caso, como un subproducto de la actividad biológica de algún tipo de organismos en particular (Dean, 1981).

Dada la complejidad que implica el identificar a un posible mutágeno entre los diferentes ambientes en diversos organismos y a lo largo de todo su ciclo de vida, es que la implementación de metodologías experimentales utilizando organismos específicos, como modelos biológicos o sistemas de prueba que respondan a la acción de agentes químicos, físicos y biológicos, se ha diversificado a partir de los primeros estudios de mutagénesis e incluyen sistemas *in vivo* e *in vitro*, así como organismos de diferente complejidad en la escala evolutiva, como: bacterias, levaduras, insectos, plantas, mamíferos, etc. (Dean, 1981).

Los sistemas biológicos para medir el daño genético pueden ser usados:

- 1) Como sistemas de premonitoreo para la selección y desarrollo de químicos seguros
- 2) Para la identificación de posibles carcinógenos que estén constituyendo una mezcla compleja como en los alimentos.
- 3) En estudios de mecanismos de acción de un compuesto (Zijlstra, 1987).

Drosophila melanogaster

Por muchos años, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Fig. 1) ha sido un organismo de investigación prominente para los genetistas, por varias décadas la investigación de genética clásica con *Drosophila* ha propiciado que se identifiquen mutaciones que afectan su morfología y desarrollo. Gran cantidad de mutantes han sido aislados y sujetos a estudios exhaustivos, lo que contribuye a un conocimiento genético y molecular de sus genes; al comparar la homología de muchas de las mutaciones implicadas en los diversos organismos, incluyendo humanos, se ha revelado que una buena parte de los mecanismos implicados en la respuesta de mutagenicidad son similares (Rusell, 1998).

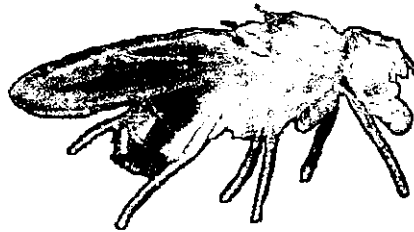


Fig. 1 *Drosophila melanogaster*

Drosophila cuenta con enzimas de desintoxicación similares a las contenidas en la fracción S9 del hígado de mamíferos (Clark, 1982; Hällström *et al.*, 1982), y se ha demostrado que están presentes en mayor proporción durante la fase larvaria de este insecto. Estas enzimas son dependientes del citocromo P-450 (Mitchell y Combes, 1984) y participan de manera importante en la reducción-activación de promutágenos y en el metabolismo de xenobióticos, en particular en moléculas que contienen átomos de nitrógeno, como en el

caso de aminos metiladas, aminos, nitrosaminas, hidrazinas, y aminos aromáticas (Zijlstra, 1987). Posee además una organización celular y cromosómica similar a la de mamíferos. Presenta cuatro cromosomas que han sido totalmente mapeados, su ciclo de vida es de una duración conveniente, relativamente corto para permitir un rápido análisis de gran cantidad de progenie y suficientemente largo para distinguir entre dosis crónicas, agudas y fraccionadas (Mitchell y Combes, 1984).

El ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* tiene una secuencia de eventos bajo estricto control genético, con una duración de 10-12 días a 25° C (Fig. 2). El ciclo inicia con la ovoposición, a las 24 horas eclosionan las larvas que se denominan de 1er estadio, y que pasan por dos estadios más, durante la fase larvaria la ingesta de alimento es continua, llegando a consumir de tres a cinco veces su peso, incrementándolo de 0.05 a 2.0 mg (Mitchel and Combes, 1984).

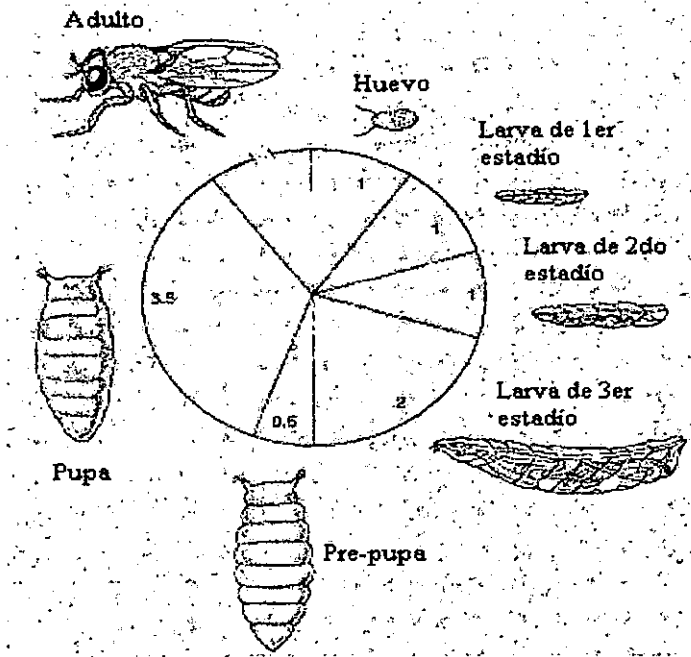


Fig. 2. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* en días.

Tomado de Kalthoff, 1996.

Las larvas tienen dos linajes celulares: larvario e imagal, el primero está implicado exclusivamente con el desarrollo larvario y su funcionamiento, mientras que el imagal está formado por paquetes de células que se conocen como discos imagales, los cuales permanecen en un estado embrionario durante el desarrollo larvario, eventualmente se diferencian en estructuras particulares del cuerpo del adulto, por ejemplo: antenas, ojos, halterios, patas, genitales externos, alas, etc. (Rusell, 1998) (Fig. 3).

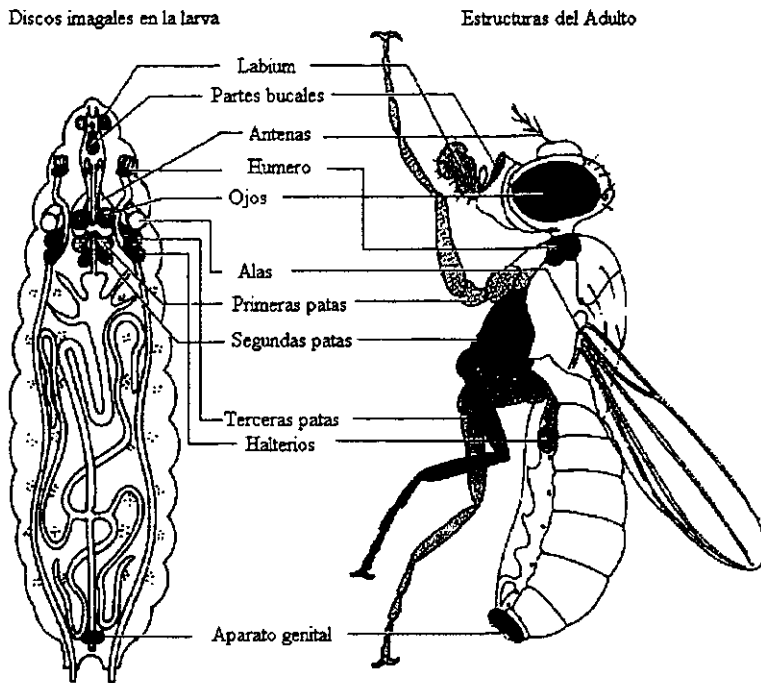


Fig. 3. Distribución de los discos imaginales en la larva. Tomado de Rusell, 1988

Desde el punto de vista genético, los discos imaginales constituyen un excelente material de estudio. Cada disco, aparece como primordio desde el primer estadio larvario, consiste de 20 a 50 células. A partir de este momento, el número de células por cada disco se incrementa por mitosis hasta el final de la fase larvaria en la que llega a contener miles de células por disco. Al final del tercer estadio larvario, 5 días aproximadamente después de la eclosión, la larva inicia el período de pupación en el que parte del material larvario degenera y las células indiferenciadas forman tejidos y las estructuras del adulto que se derivan de cada disco imagal; durante este estado la cutícula que constituye al *puparium* se oscurece y

5 días más tarde emerge la mosca adulta. Aproximadamente de 6 a 8 hrs. después de la que las moscas macho emergen son fértiles, mientras que las hembras lo son a las diez o doce horas (Mitchell, 1984).

Genética toxicológica en *Drosophila melanogaster*

Los estudios de inducción de mutación en *Drosophila melanogaster*, iniciaron con los experimentos de Müller, quien estudió el efecto de los rayos X y diseñó la primer metodología para estudiar mutagénesis, en particular para estudiar la inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo; posteriormente en 1944, Averbach y Robinson fueron los primeros en estudiar la mutagenicidad de compuestos, mediante la inducción de este tipo de mutaciones por agentes químicos (gas mostaza y formaldehído) (Mitchell, 1984). A partir de estos estudios, varias han sido las metodologías que se han empleado como sistemas de ensayo para la detección de mutágenos con *Drosophila melanogaster*, en las que se ha analizado el potencial de compuestos y agentes físicos y biológicos para inducir diversos tipos de mutación. La tabla 1 muestra distintos sistemas de ensayo en *Drosophila melanogaster* (Mitchell y Combes, 1984).

5 días más tarde emerge la mosca adulta. Aproximadamente de 6 a 8 hrs. después de la que las moscas macho emergen son fértiles, mientras que las hembras lo son a las diez o doce horas (Mitchell, 1984).

Genética toxicológica en *Drosophila melanogaster*

Los estudios de inducción de mutación en *Drosophila melanogaster*, iniciaron con los experimentos de Müller, quien estudió el efecto de los rayos X y diseñó la primer metodología para estudiar mutagénesis, en particular para estudiar la inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo; posteriormente en 1944, Averbach y Robinson fueron los primeros en estudiar la mutagenicidad de compuestos, mediante la inducción de este tipo de mutaciones por agentes químicos (gas mostaza y formaldehído) (Mitchell, 1984). A partir de estos estudios, varias han sido las metodologías que se han empleado como sistemas de ensayo para la detección de mutágenos con *Drosophila melanogaster*, en las que se ha analizado el potencial de compuestos y agentes físicos y biológicos para inducir diversos tipos de mutación. La tabla 1 muestra distintos sistemas de ensayo en *Drosophila melanogaster* (Mitchell y Combes, 1984).

Tabla 1. Sistemas de prueba en *Drosophila melanogaster* (tomado de Mitchell y Combes, 1984).

Prueba de letales recesivos ligados al sexo.

Prueba de letales recesivos autosómicos.

Prueba de letales dominantes.

Pérdida de cromosoma sexual (no disyunción).

Pérdida de cromosoma autosómico.

Translocación de los cromosomas 2 y 3.

Daño general a los cromosomas.

Inducción de mutaciones RrnA del locus *bobbed*.

Mutación somática en ojos (mosaicos).

Prueba de mutación y recombinación somática (ojo y ala).

Entrecruzamiento mitótico.

Prueba de locus específico.

Prueba de reparación del ADN.

Con el uso de estas metodologías ha sido posible la detección de una gran variedad de mutágenos, promutágenos, carcinógenos y comutágenos de distinto origen y actividad; utilizando diferentes dosis y rutas de administración (Graf, 1984).

Con la prueba de mutación y recombinación somática (SMART), se han analizado con éxito compuestos puros, también se ha investigado genotoxicidad de mezclas complejas de distinto origen (Graf *et al.*, 1984).

Prueba de mutación y recombinación somática en las alas de *Drosophila melanogaster*

La prueba de mutación y recombinación somática (SMART) detecta la actividad mutagénica y recombinogénica de compuestos en células somáticas de *Drosophila melanogaster* (Graf *et al.*, 1984). En esta prueba se tratan células de los discos imagales de las larvas que darán origen a las alas del adulto.

Las alas de *Drosophila* están formadas por dos monocapas celulares, una dorsal y otra ventral. El plano de división de las células está orientado de manera perpendicular al eje del ala, de manera que los eventos que regulan a las células de la capa dorsal son independientes de aquellos de la capa ventral. Al diferenciarse, cada célula da origen a un tricoma o pelo que se forma por la acumulación de fibras de actina en un polo de la célula, el tricoma crece durante la metamorfosis y posterior a ésta la célula muere y sólo es observable la presencia del pelo en la superficie de las alas. De esta manera puede establecerse una relación directa entre el número de pelos o tricomas en los distintos sectores de las alas y el número de células que los forman (Demerec, 1965, García Bellido y Merriam, 1971, García Bellido y Dapena, 1974).

Las células están determinadas genéticamente de manera que si durante el desarrollo larvario se induce alguna alteración en el material genético de las células de los discos imagales, ésta será transmitida a las células hijas dando origen a una mancha de tricomas o células mutantes en un contexto de células normales (Graf *et al.*, 1984). A partir de resultados obtenidos con compuestos con actividad genotóxica conocida se ha determinado

que los eventos que esta prueba detecta son: mutación puntual, pérdida cromosómica, no-disyunción y recombinación mitótica (Graf, 1984). Para distinguir fenotípicamente estas manchas se utilizan dos marcadores recesivos localizados en el brazo izquierdo del cromosoma 3, que son:

mwh: (*multiple wing hair*) localizado en el cromosoma 3 a 0.03 unidades de mapa, es una mutación autosómica recesiva que en homocigosis total o en mosaicos somáticos produce la aparición de tres o más tricomas por célula en lugar de uno, como en la expresión silvestre (Lindsley y Zimm, 1992).

flr³: (*flare*) ubicado en el cromosoma 3 a 38.8 unidades de mapa, es un gen autosómico recesivo y letal en homocigosis, pero que en mosaicos somáticos provoca que los tricomas adquieran forma de flama. Para mantener la línea de moscas portadoras de este gen se requiere la presencia del cromosoma *TM3*, este es un cromosoma balanceador que porta numerosas inversiones, con el se reduce la probabilidad de obtener recombinación entre los cromosomas homólogos, manteniendo así intacto el gen de interés ya que se impide la formación de nuevos arreglos cromosómicos. De manera indirecta, se reconoce al cromosoma balanceador por la presencia del gen dominante *Ser* (*Serrate*), el cual al expresarse produce indentaciones o muescas en el borde de las alas y que al ser una condición letal en homocigotos contribuye a mantener el arreglo estable (Lindsley y Zimm, 1992).

El uso de dos genes en el mismo cromosoma marca la posibilidad de discernir la ocurrencia de recombinación en la región delimitada por el marcador *flr³* y el centrómero o

en la región entre los marcadores *flr3* y *mwh*. Como resultado de eventos de recombinación pueden recobrase manchas gemelas por recombinación del intervalo proximal al centrómero que es acotado por el marcador *flr3*; y/o manchas sencillas *mwh* que indican entre otros eventos, recombinación entre *mwh* y *flr3*. Por otra parte también pueden recobrase manchas sencillas *mwh* o *flr3* por eventos como mutación puntual, pérdida parcial y total del cromosoma 3 y no disyunción (Graf, 1984) (Fig. 4).

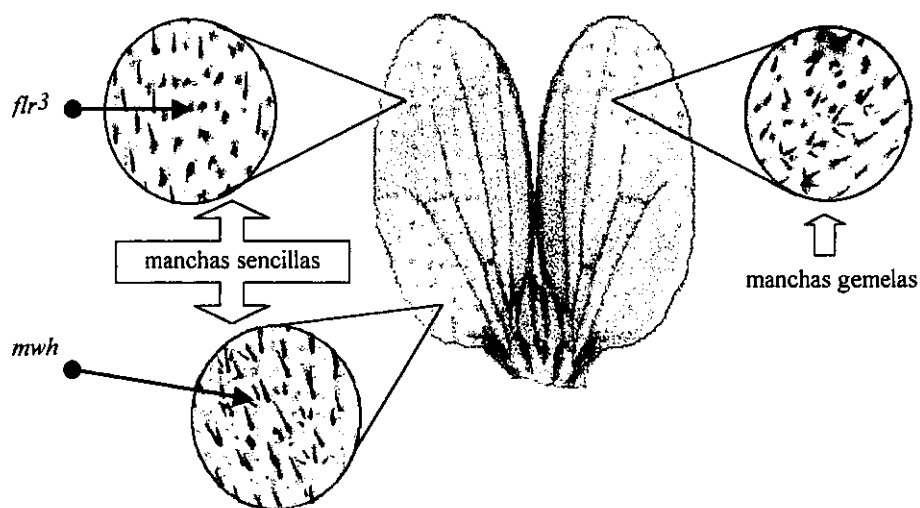


Fig. 4. Fenotipo de las manchas analizadas en las alas.

El tamaño de las manchas recobradas depende del número de divisiones celulares que ocurrieron después de la inducción del cambio genético en la célula afectada original, por lo que puede ser un indicador indirecto de la actividad del compuesto y de la velocidad con la

que alcanza a la célula blanco (Graf *et al.*, 1984), siempre y cuando no exista arresto mitótico o muerte celular, en cuyo caso el tamaño de las manchas recobradas será menor al que teóricamente debiera ser recobrado. Por lo anterior, se considera que el tamaño de las manchas estima el tamaño de los clones producidos (Ramos *et al.*, 1998). La determinación del tamaño de mancha permite, por lo tanto, estimar el número de divisiones celulares que transcurrieron desde que la alteración tuvo lugar. Así, una mancha formada por 16 tricomas (células) debe haberse formado a través de 4 ciclos de división.

Por otro lado, ante una misma exposición a un mutágeno, es posible encontrar algunos organismos especialmente sensibles en los cuales el efecto se expresa de forma marcada, mientras que otros no muestran signos de la exposición. Lo anterior es cuantificado a través de la determinación del número de manchas por mosca lo que indica la proporción de organismos afectados y la magnitud del daño encontrado en éstos. El uso de diferentes métodos de análisis de los resultados obtenidos, permiten la revisión de distintos niveles de la respuesta de genotoxicidad.

Con esta prueba se han analizado más de 350 compuestos, y se ha utilizado también exitosamente en investigaciones para estudiar la relación entre la estructura química y la actividad genotóxica, así como la capacidad antigenotóxica de sustancias y de mezclas complejas (Graf, 1994). La variedad química de los compuestos probados permite considerar que este sistema es aplicable en la evaluación del peligro de zonas posiblemente contaminadas. Una ventaja fundamental de este sistema de prueba es que se lleva al cabo con el organismo intacto, es decir, es un sistema *in vivo*, por lo que la posterior interpretación de la información obtenida con este organismo estima más eficientemente los eventos que ocurren en el ambiente.

Drosophila melanogaster como biomonitor

Monitorear el ambiente es esencial para identificar posibles riesgos en la salud humana, sin embargo, estos estudios son limitados por varias razones. El costo de estos estudios es elevado y se basa principalmente en observaciones obtenidas a partir de análisis químicos que tienen aplicaciones limitadas, ya que en la mayoría de las ocasiones se estudia el efecto de una sustancia para la cual se pueden ensayar diferentes rutas de exposición, concentraciones, formas químicas, etc., sin embargo, la gama de combinaciones que pueden establecerse entre esta sustancia y otras es tan grande que resulta poco práctico intentar cubrir todos los aspectos que podrían ser importantes. Por las mismas razones, reproducir en condiciones de laboratorio todas las interacciones posibles para una sustancia o un grupo de sustancias resulta prácticamente imposible, lo anterior se aplica también al estudio de las mezclas complejas. Un aspecto importante en los estudios de monitoreo es que en ocasiones, las concentraciones en las que se presentan los diferentes componentes individuales de una mezcla compleja pueden estar comprendidos entre los límites permisibles, considerados no peligrosos; sin embargo, la interacción entre los diferentes componentes puede producir combinaciones que representen un peligro real para los organismos expuestos, al provocar un efecto que no se detecta a través del análisis aislado de cada uno de ellos (Butterworth y col., 1995).

Un número cada vez mayor de potentes contaminantes se utilizan en múltiples combinaciones, la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y otras organizaciones interesadas en la calidad del ambiente han desarrollado estándares numéricos de las concentraciones permisibles con la finalidad de reducir el riesgo que implica la exposición a

éstos, sin embargo, el tiempo y recursos dedicados han sido sumamente elevados y los beneficios han sido más bien modestos. De los poco más de 200 compuestos evaluados se ha obtenido información importante sobre su actividad tóxica y genotóxica, se ha establecido que en el caso de ciertos compuestos, se incrementan dramáticamente sus efectos cuando otros contaminantes están presentes y en algunos casos se han establecidos relaciones de sinergismo positivo entre ellos. No obstante, estos estudios son limitados ya que las combinaciones entre los compuestos, el ambiente, su presencia en el mismo sitio y su bioacumulación son variantes que rebasan la capacidad de estas organizaciones para establecer todos los efectos diferentes que se pueden obtener (Vinebrooke, 1998).

Una de las herramientas utilizadas para monitorear el ambiente son los biomonitores. Éstos son organismos utilizados desde hace muchos años para detectar cambios no deseados en el ambiente que permitan alertar sobre un posible peligro. En la antigua Roma se empleaban canarios para detectar la presencia de monóxido de carbono en las minas ya que estas aves responden más rápido a la toxicidad de este gas que los mineros (Butterworth, 1995). Cualquier aspecto o producto de un biomonitor, o variable de respuesta, en la que puede ser evaluado el impacto de los contaminantes ambientales, a través de un cambio detectable, que permita determinar los efectos biológicos de los contaminantes que ingresan al organismo es un biomarcador (Butterworth, 1995), un biomarcador puede ser utilizado como una herramienta de monitoreo el cual debe tener los siguientes criterios:

- especificidad: es el cambio directo resultante de la exposición a un contaminante
- sensibilidad: es el primer cambio producido por el contaminante
- práctico: es la facilidad de determinar la especificidad y sensibilidad

Según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos un biomarcador sería:

el cambio en la química sanguínea al modificarse la temperatura, la calidad del aire o bien la producción de ciertas enzimas desintoxicantes como glutatión, superóxido dismutasa, etc. Un biomarcador combinado con un biomonitor puede crear un sofisticado sistema para detectar en un organismo de prueba un posible riesgo ambiental.

Los biomonitores posibilitan la determinación del impacto de contaminantes individuales o formando mezclas complejas, con la ventaja de que detectan además el efecto de la acumulación de diversos tóxicos y discriminan la ocurrencia de sinergismo entre contaminantes con diversas formas de actividad que coinciden en tiempo y espacio en el ambiente. En resumen, los biomonitores son sensibles a niveles ambientales de contaminantes que no pueden ser detectados por los métodos basados en análisis químicos, los cuales, si bien informan del contenido de contaminantes, no son indicativos del potencial que alcanzan las mezclas complejas, así como del efecto que las mezclas pueden tener en un sistema *in vivo* (Jensen 1998).

En 1991 el Consejo Nacional de Investigación de Estados Unidos señaló las siguientes razones para utilizar diversos organismos como biomonitores:

- 1) Comparten con el hombre el ambiente, así como el consumo de alimentos y agua.
- 2) Responden de manera similar ante la exposición a tóxicos.
- 3) Las patologías resultantes de estos efectos se desarrollan más rápido en organismos que tienen ciclos de vida cortos y descendencia numerosa, en comparación con los humanos (Glickman, 1991).

El valor de los biomonitores se ve incrementado si posee la capacidad de detectar contaminación en más de un tipo de ambiente: acuático, terrestre y aéreo (Butterworth, 1995).

El concepto de biomonitor ha comenzado a tener amplia aceptación por parte de científicos y organizaciones reguladoras y se están desarrollando nuevas alternativas, por ejemplo, científicos en Colorado usan algunos tipos de peces para evaluar la seguridad de provisiones de aguas subterráneas; en Missouri y otros estados se emplea un mejillón (*Anodonta anatina*) de agua dulce para medir la calidad del agua de lluvia. La Agencia de Protección Ambiental (EPA) estima que en un futuro cercano, sería recomendable utilizar organismos indicadores para monitorear aproximadamente 550 descargas municipales e industriales en Texas (Jensen, 1998).

Se pueden resumir las ventajas del uso de biomonitores en las siguientes:

1. Los biomonitores son una alternativa accesible para medir cómo afectan los contaminantes a la salud y la viabilidad de la vida acuática y de otras especies animales. Algunos biomonitores, en particular bioensayos basados en células o tejidos humanos, tienen implicaciones directas para la salud humana.
2. Son sensibles a bajas concentraciones de contaminantes que con frecuencia no pueden ser detectadas como peligrosas por métodos químicos, pero que en exposiciones crónicas pueden implicar un peligro aún mayor para los seres vivos (Jensen, 1998).
3. El efecto de bioacumulación y de biotransformación de progenotóxicos sólo es detectable mediante el uso de organismos capaces de llevar al cabo estos procesos. Lo mismo ocurre con el sinergismo cuando participa en éste la biotransformación.

Drosophila melanogaster ha sido utilizada exitosamente para analizar muestras de polvo atmosférico (Delgado *et al.*, 1994; Krogulski *et al.*, 1997), suelos y desechos aéreos de fábricas (Chroust, 1997), obteniendo resultados positivos, por lo que se considera que este organismo, puede ser un biomonitor adecuado para evaluar el impacto de posibles

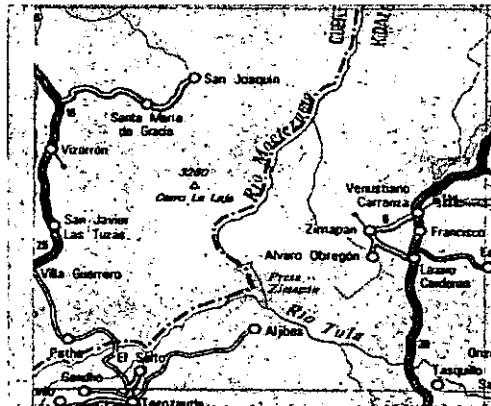
cambios ambientales, ya que es un sistema *in vivo*, económico, de manejo accesible, sensible y que a corto plazo, rinde resultados que se muestran en poblaciones numerosas (Guzmán y Graf, 1995). Sin embargo, es importante señalar que en la mayoría de estos reportes se han utilizado muestras concentradas y extractos obtenidos a través del uso de diversos solventes.

Zona de muestreo

Zimapán está ubicado en el estado de Hidalgo, integrado por nueve municipios. Se localiza en la carretera 85 a 144 Km. de Pachuca, entre los paralelos 20°16' y 21°17' de latitud norte y 98°48' y 99°32' de longitud oeste, a una altitud de 1813 metros sobre el nivel del mar. El valle está limitado al norte por la Sierra El Monte y al sur, por la barranca Tolimán, ésta constituye el drenaje del río del mismo nombre el cual es afluente del río Moctezuma (Armienta y Rodríguez, 1996). Zimapán es una zona semiárida, con un tipo de suelo semidesértico, rico en materia orgánica y nutrientes, el 51% de su uso corresponde a agostaderos, el 8.7% es forestal, el 3% es para uso agrícola y el 37.3 % tiene otros usos (García y Armienta, 1996). Desde la época de la colonia, la principal actividad económica de la localidad ha sido la minería (Armienta y col. 1996), predominando la explotación de plata, oro, plomo y zinc (García y Armienta, 1996).

Al occidente de la zona urbana, la Comisión Federal de Electricidad inició en 1990 el Proyecto Hidroeléctrico Zimapán en los límites de los estados de Hidalgo y Querétaro, con el objetivo principal de generar energía eléctrica, aprovechando el potencial del río Moctezuma. El proyecto incluyó la construcción de una presa, cuya cortina se encuentra

ubicada en la parte occidental del estado de Hidalgo y colinda con el estado de Querétaro en un sitio conocido como "Cañón del Infiernillo" en el que confluyen los ríos Tula y San Juan (Armienta y Rodríguez, 1996) (mapa 1 y Foto 1).



Mapa 1. Ubicación de la presa Zimapán.



Foto 1. Cortina de la presa Zimapán

La construcción fue soportada por estudios geológicos de detalle en la región comprometida (Armienta y Rodríguez, 1996) en la que anteriormente se cultivaban arboles frutales, de pera, tejocote y manzana.

Como parte de un proyecto de evaluación de la calidad del agua de la presa, para establecer su uso para explotación pesquera, personal del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, determinaron periódicamente los siguientes parámetros fisicoquímicos: temperatura, pH, oxígeno disuelto, conductancia y sólidos disueltos. Además, de determinar la concentración de metales pesados y algunos plaguicidas en muestras de sedimentos y peces. Los resultados obtenidos por este grupo mostraron que los valores de metales pesados en muestras de agua fueron menores que los niveles permisibles establecidos para agua potable (Tabla 2). Los niveles de metales pesados en sedimentos también fueron bajos (Tabla 3). El reporte de metales pesados en diferentes tejidos de peces mostró que éstos variaban considerablemente, sin relación aparente con los niveles de metales en los sitios en los que se colectaron los organismos (Tabla 4); todos los valores reportados para metales pesados se encontraron por debajo de los estándares oficiales (Meybeck *et al*, 1989). El reporte de plaguicidas en sedimentos indicó que el contenido de Aldrin fue elevado en los sitios 2, 4 y 5 (Tabla 5). Sin embargo, la presa aún se encuentra en evaluación para determinar su posible uso para cultivo de peces, debido a esto se consideró que este cuerpo de agua era apropiado para medir la capacidad de *Drosophila melanogaster* como posible biomonitor.

OBJETIVOS

Determinar si *Drosophila melanogaster* puede ser un biomonitor de contaminación ambiental en sistemas acuáticos.

Determinar si la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) de *Drosophila melanogaster* puede ser un biomarcador de contaminación ambiental en sistemas acuáticos.

HIPÓTESIS

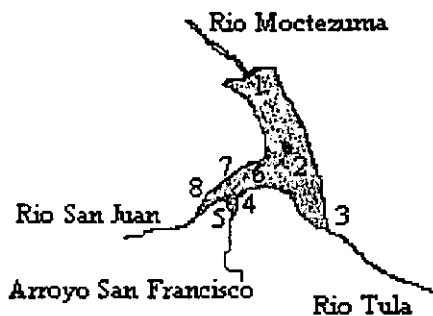
El sistema *in vivo* de *Drosophila melanogaster* ha mostrado ser sensible a bajas concentraciones de mutágenos.

Drosophila melanogaster debe discriminar entre mezclas complejas ambientales con potencial mutagénico y sin él.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se colectaron muestras de agua provenientes de ocho diferentes sitios de la presa Zimapán, previamente establecidos por el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. El punto 1 está ubicado cerca de la cortina donde se encuentra la desembocadura del agua proveniente del Río Moctezuma, donde la corriente es mayor; el punto 2 se localiza cerca de una “isla” formada por la cima de una montaña. Es importante mencionar que la zona en la que se construyó la presa originalmente era utilizada para el cultivo de arboles frutales y se recurría al uso de fertilizantes y plaguicidas para aumentar la producción, por lo que se consideraba probable que residuos de los mismos fueran encontrados en zonas adyacentes; el punto 3 se encuentra en la región más distal en relación con la cortina, en la desembocadura del río Tula; los puntos 4 y 5 fueron tomados en el Arroyo San Francisco, en la desembocadura y la entrada, respectivamente; finalmente, los puntos 6, 7 y 8 corresponden a una zona con poco movimiento en el Río San Juan (Armienta y Rodríguez, 1996) (Mapa 2).



Mapa 2. Puntos de muestreo en la presa Zimapán

Para este estudio, el muestreo se realizó una sola vez en el mes de Diciembre de 1997. En cada sitio se tomaron dos muestras superficiales (30 cm) en frascos de polipropileno con capacidad de un litro, una de las muestras se fijó con 1.5 ml. de ácido nítrico al 1.0 % y se utilizó para determinar la presencia de plaguicidas (para el grupo del I.CMyL de la UNAM) y contenido de metales pesados; una segunda muestra, sin fijador, se utilizó para los estudios de genotoxicidad. Las muestras se refrigeraron para su transportación (Goulden, 1978).

Los parámetros fisicoquímicos determinados al momento de la toma de las muestras indicaron un rango de temperatura de 22 a 26 °C; valores de pH, de 7.8 a 9.01; niveles de oxígeno disuelto de 3.9 a 5.8 mg/l; una conductancia, de 565 a 1337 (μ S) y los sólidos disueltos de 282 a 671, parámetros que son característicos de un clima templado, en los sitios de colecta 7 y 8 no fue posible hacer las determinaciones fisicoquímicas *in situ* (Tabla 6). En otras palabras, estos análisis mostraron poca variación en los valores de temperatura, pH y oxígeno disuelto. Los valores de conductancia (μ S) y sólidos disueltos tendieron a disminuir del punto de colecta 1 al 6. En el punto de colecta 1 (cortina) se encontró la mayor

actividad del agua, una mayor concentración de sólidos disueltos y una mayor conductancia.

En general, los valores obtenidos no mostraron indicios aparentes de algún contaminante en particular.

Tabla 2. Concentraciones de metales pesados en muestras de agua

Punto	Cu (mg/L)	Zn (mg/L)	Pb (mg/L)	Cr (mg/L)	As (mg/L)
N.P.*	1.00	5.00	0.5	0.05	0.05
1	0.017	0.012	0.016	0.005	2.75x10 ⁻⁴
2	0.006	0.007	0.02	<0.003	3.02x10 ⁻⁴
3	0.013	0.01	0.01	0.011	<2.00x10 ⁻⁵
4	0.011	0.004	0.014	0.004	<2.00x10 ⁻⁵
5	0.017	<0.002	0.013	0.016	<2.00x10 ⁻⁵
6	0.018	0.003	0.007	<0.003	<2.00x10 ⁻⁵
7	0.006	0.003	0.008	<0.003	<2.00x10 ⁻⁵
8	0.016	0.005	0.009	0.004	2.97x10 ⁻⁴

* Niveles permisibles de metales pesados en agua potable (Meybek *et al.*, 1990)

Limites de detección de absorción atómica (Equipo Pekin Elmer, modelo 560)

Cu = 0.002 mg/l, Zn = 0.001 mg/l, Pb = 0.01 mg/l, Cr = 0.003 mg/l, As = 2.00x10⁻⁵ mg/l.

Tabla 3. Concentraciones de metales pesados en muestras de sedimento

Punto	Cu (mg/Kg.)	Zn (mg/Kg.)	Pb (mg/Kg.)	Cr (mg/Kg.)	As (mg/Kg.)
2	8.034	58.771	18.533	31.896	6.12 x10 ⁻⁵
3	11.383	67.109	14.454	31.449	<2.00x10 ⁻⁵
4	26.372	76.731	15.948	28.127	<2.00x10 ⁻⁵
5	9.750	63.855	12.73	56.404	<2.00x10 ⁻⁵
6	13.754	44.056	21.414	39.012	2.74x10 ⁻⁴
7	14.125	50.371	20.216	37.614	1.81x10 ⁻⁴
8	10.015	31.957	12.181	41.812	<2.00x10 ⁻⁵

Tabla 4. Concentraciones de metales pesados en muestras de organismos

Tejido/organo/ punto de	Cu (mg/Kg)	Zn (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)	Cr (mg/Kg)	As (mg/Kg)
Atún	3.017	17.321	0.378	0.576	
Tejido 1	0.667	81.191	0.549	0.899	<2.00x10e-5
Branquias y Gónadas 1	10.185	435.852	0.349	1.249	<2.00x10e-5
Tejido 2	1.741	76.372	0.200	<0.003mg/L	<2.00x10e-5
Branquias y Gónada 2	5.885	431.994	0.498	0.199	2.78 x10e-4
Tejido 3	1.378	14.842	0.699	1.051	<2.00x10e-5
Branquias 3	2.846	61.546	1.004	1.705	<2.00x10e-5
Tejido 4	4.237	23.116	0.663	1.148	<2.00x10e-5
Branquias y Gónada 4	4.372	39.328	1.008	1.008	<2.00x10e-5
Tejido 5	0.821	24.777	1.006	0.097	<2.00x10e-5
Branquias 5	2.413	51.335	2.648	0.318	<2.00x10e-5
Tejido 6	0.482	41.314	<0.01	0.401	<2.00x10e-5
Branquias y Gónadas 6	2.724	63.137	<0.01	1.328	<2.00x10e-5
Tejido y Branquias 7	3.068	347.514	0.151	0.146	3.01 x10e-4
Tejido y Branquias 8	1.869	37.514	<0.01	0.401	<2.00x10e-5

Tabla 5. Concentración de plaguicidas en muestras de sedimento

Punto	Aldrin	Heptaclo epoxido	pp DDE	Dieldrin	pp DDT
2	16.82	< 0.000015	< 0.00001	< 0.00002	< 0.00006
3	3.28	< 0.000015	< 0.00001	< 0.00002	< 0.00006
4	21.80	< 0.000015	< 0.00001	< 0.00002	< 0.00006
5	20.00	< 0.000015	< 0.00001	< 0.00002	< 0.00006
6	8.30	< 0.000015	< 0.00001	< 0.00002	< 0.00006
7	6.54	< 0.000015	< 0.00001	< 0.00002	< 0.00006
8	2.49	< 0.000015	< 0.00001	< 0.00002	< 0.00006

ppm = µg/g

Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos en muestras de agua

Punto	Temperatura ° C	pH	O ₂ disuelto mg/l	Conductancia µS	Sólidos disueltos
1	24.3	7.8	5.2	1337	671
2	23	9.01	5.8	1191	600
3	23	8.5	5.1	1132	564
4	22	8.4	3.9	1116	545
5	23	8.6	4.9	897	444
6	26	8.6	4.5	565	282
7	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
8	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A

S/A: sin análisis

Preparación de las muestras

Para establecer diferentes niveles de concentración de las muestras se combinaron dos métodos: filtración y dilución.

La filtración se realizó con membrana microporo (Millipore, 0.45μ) con el fin de separar la materia orgánica "disuelta"(DOM) ($< 0.45 \mu$) de la materia orgánica particulada (POM) ($> 0.45 \mu$) (Fig. 5), esto se realizó con el fin de determinar si la muestra sin filtrar presentaba diferencias en la respuesta en comparación con la muestra filtrada (Vinebrooke y Cullimore, 1998). Por otro lado, las muestras se probaron diluidas al 50% con agua destilada.

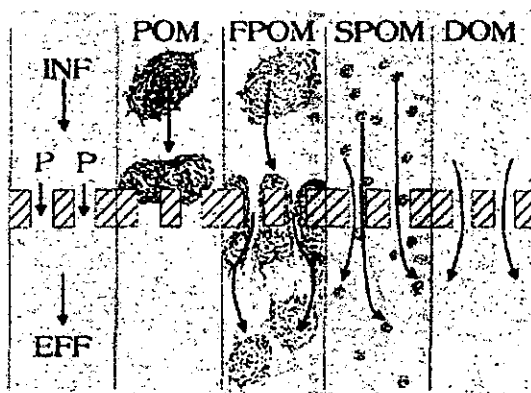


Fig 5. Diagrama del efecto de filtración en varias fracciones de materia orgánica presente, materia orgánica particulada rígida (POM), materia orgánica particulada flexible (FPOM), materia orgánica subparticulada filtrable (SPOM), materia orgánica disuelta (DOM).

Los lotes experimentales que se analizaron para cada punto de muestreo se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Lotes experimentales analizados para cada muestra.

Tratamientos	100	100 F	50	50 F
sin tratamiento	X			
microporo 0.45 μ		X		X
dilución 50 %			X	X

Como testigo negativo se utilizó agua destilada.

Sistema de cruce

Se emplearon dos líneas de *Drosophila melanogaster* para realizar la cruce: hembras vírgenes $flr^3 / In (3LR)TM3, ri^p sep bx^{34e} e^s Ser$ (de forma abreviada $flr^3 / TM3, Ser$) y machos mwh / mwh . De la cruce se obtienen 2 tipos de progenie: moscas libres de inversión ($+ flr^3 / mwh +$) y moscas portadoras de inversiones múltiples ($TM3, Ser / mwh +$). En estado larvario ambos tipos de progenie son indistinguibles, por lo que se les trata simultáneamente y se separan en el estado adulto, diferenciándolas por las alas; las primeras presentan alas de tipo silvestre y las segundas, alas con bordes discontinuos por la presencia del marcador fenotípico *Serrate*.

Tratamiento

Al tercer día de realizada la cruce, los progenitores fueron colocados en frascos con medio de cultivo fresco para que ovopositaran por un período de 8 horas, 72 horas después las larvas fueron separadas del medio por la técnica de Nöthinger (1970) que consiste en agregar a los frascos que contienen las larvas una solución de sacarosa al 20%, lo que provoca la flotación de las larvas por densidad. La solución con las larvas se vertió en un embudo de separación de 4 mm de \varnothing y las larvas se recuperaron en una malla fina de nylon, se enjuagaron con agua corriente a temperatura ambiente y se colocaron en grupos de 100 a 150 en tubos homeopáticos de fondo plano que contenían un gramo de medio instantáneo para *Drosophila* (Carolina Biological Supply) y 4 ml. de la muestra problema o de agua destilada. Las larvas completaron su desarrollo en este medio. Para cada punto de muestreo se realizaron dos experimentos con dos repeticiones independientes; de cada punto de colecta se registraron un total de 120 alas.

Fijación y elaboración de las preparaciones

Una vez que emergieron los adultos fueron sacrificados por exceso de éter y fijados en alcohol al 70%, posteriormente se disectaron las alas de las moscas que presentaban el fenotipo silvestre, colocando 10 parejas de alas de hembras y 10 de machos en portaobjetos con solución Fauré (30 gr de goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 gr de hidrato de cloral y 50

ml de agua) (Graf *et al.*, 1984).

Las alas fueron analizadas con un microscopio óptico a 400X. Cada mancha se registró de acuerdo a la sección del ala en la que se encontró; A, B, C, C', D, D' o E, los sectores se delimitan utilizando la venación natural de las alas (Fig. 6); el número de células que la formaban y el fenotipo de la mancha: *mwh*, *flr³* o *mwh flr³*.

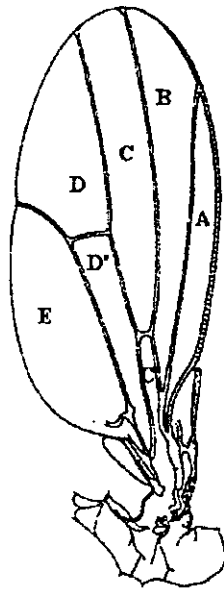


Fig. 6. Delimitación de las zonas de lectura del ala de *Drosophila melanogaster* en prueba SMART.

Criterios de lectura

La mutación *mwh* tiene expresividad variable por lo que es posible encontrar en las moscas homocigóticas para esta mutación células que forman 2, 3 o más pelos. Se ha mostrado que los tratamientos con temperatura pueden inducir la formación de fenocopias en las que se observan expresiones con dos tricomas pero no con tres o más (Katz, 1985), por esta razón sólo se cuantifican como células *mwh* aquellas formadas por tres o más pelos.

Se considera que dos manchas son independientes si se separan entre sí por 3 o más hileras de tricomas normales. Por el plano de división de las células que forman el ala (paralelo con respecto al eje longitudinal de la misma), las manchas ubicadas en la región dorsal son independientes de las observadas en la región ventral del ala (Graf *et al.*, 1984)

Análisis estadístico

Se utilizó el procedimiento de decisión múltiple de Frei y Würzler, (1988) para determinar si existían diferencias significativas entre la frecuencia de mutación y recombinación somática en los lotes experimentales y el testigo. Los datos fueron analizados con la ayuda del programa de cómputo SMART (Frei y Würzler, 1988, no publicado) y se basan en la prueba no paramétrica de χ^2 . El nivel del ensayo se fija en $\alpha = 0.05$. Este análisis permite decidir si la frecuencia de manchas inducidas en los tratamientos tiene un diagnóstico positivo, débil positivo, negativo o indeterminado con base en las siguientes dos hipótesis: la hipótesis nula (H_0) que indica que la frecuencia de las mutaciones inducidas y

espontáneas no es significativamente mayor a la frecuencia del testigo negativo y la hipótesis (H_a) señala que la frecuencia de manchas inducidas sea m veces mayor que la frecuencia del testigo negativo (Graf *et al.*, 1984), donde m , es el factor de multiplicación utilizado para realizar este análisis estadístico, indicando cuántas veces debe incrementarse el número de eventos de los tratamientos con respecto al testigo para considerar una respuesta positiva. Las manchas chicas (de 1 a 2 células) son más comunes, por lo que predominan en relación con la frecuencia de manchas grandes (> 3 células) y la de manchas gemelas, por lo que deben analizarse por separado para evitar una sobreestimación de la inducción de las manchas menos comunes. De esta manera, para considerar un incremento significativo en la frecuencia de manchas chicas y totales (se obtiene de la suma de todas las manchas, por lo que la contribución de las manchas chicas es predominante) se utiliza $m = 2$, mientras que para las manchas grandes y las gemelas $m = 5$. Las siguientes 4 decisiones son posibles (Frei y Würzler, 1988):

1. Aceptar la H_0 y rechazar H_a : negativo
2. Rechazar H_0 y aceptar H_a : positivo
3. Rechazar H_0 y rechazar H_a : débil positivo
4. Aceptar H_0 y aceptar H_a : indeterminado

De acuerdo con Frei y Würzler para obtener un diagnóstico significativo deben registrarse un mínimo de 116 alas, por lo que el tamaño de muestra seleccionado por tratamiento fue de 120 alas (Frei y Würzler, 1995). Para comparar la distribución del número de manchas por mosca se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, fijando un nivel de significancia en $\alpha = 0.05$. Mediante esta prueba no paramétrica se compara la dispersión en la distribución de 3 o más grupos no apareados y en los que la manifestación de la respuesta

sigue un arreglo ordinal (Zar, 1983). La acumulación de valores bajo el área de la curva de probabilidad es comparada entre las muestras para determinar la presencia de diferencias significativas.

En la figura 7 se muestra un resumen de la metodología utilizada.

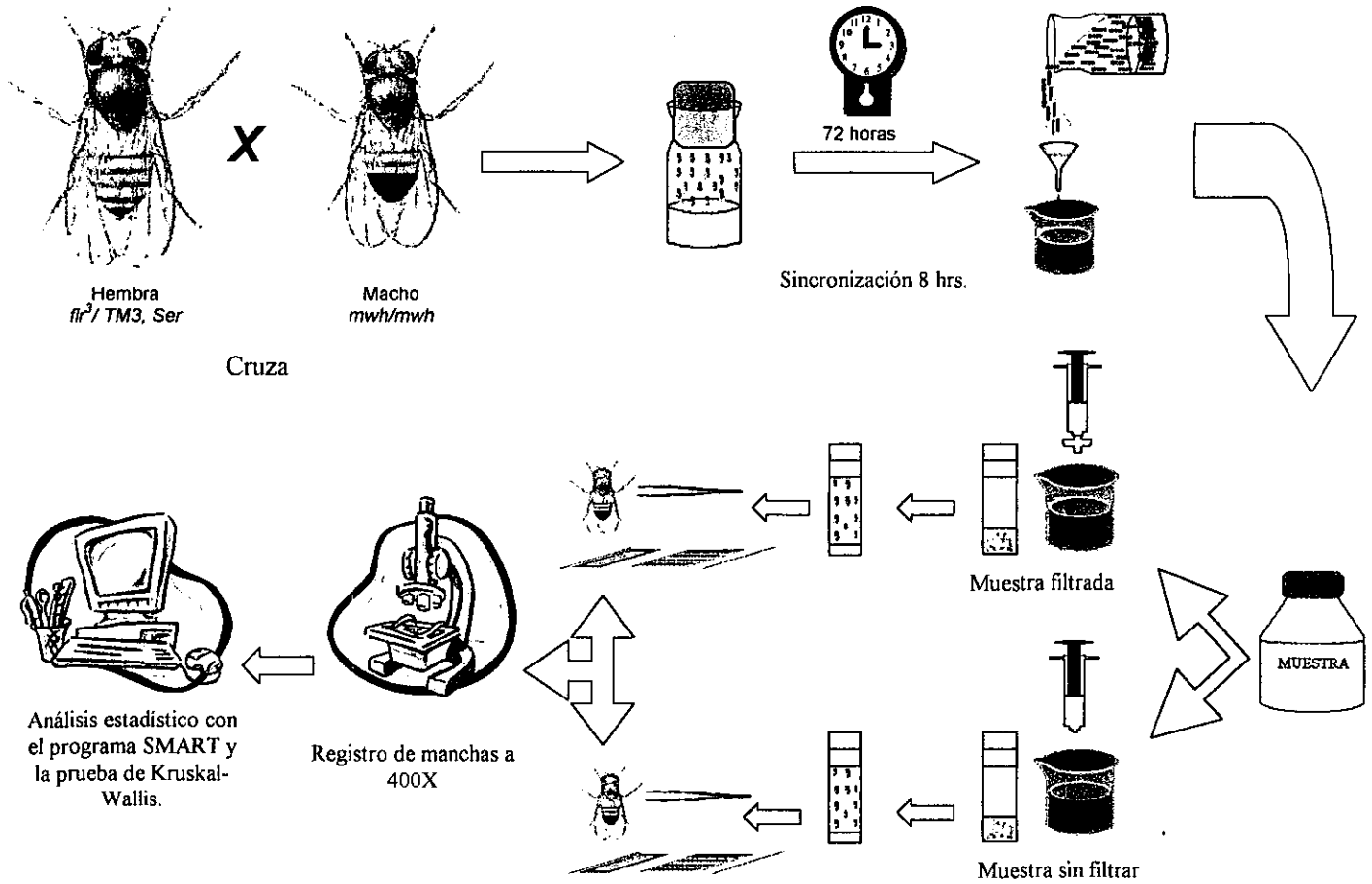


Fig.7. Metodología

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la SMART se compararon para la frecuencia de manchas por ala de acuerdo a Graf *et al.* (1984) y se realizaron dos comparaciones adicionales: un análisis cualitativo del tiempo de formación de las manchas con base en el tamaño de las mismas y un análisis cuantitativo de la dispersión en la distribución del número de manchas por mosca en las series experimentales y sus testigos concurrentes.

Punto 1. La frecuencia de manchas chicas y totales se incrementaron ligeramente ($P > 0.05$) en las muestras filtradas (50F y 100F) y la dilución de la mismas no modificó la respuesta observada (Fig. 8 a). El análisis del tiempo de formación de las manchas indicó que este incremento afectó exclusivamente a las manchas formadas por una célula (Fig. 8 b). No se encontraron diferencias significativas en las distribuciones del número de manchas por mosca entre las series experimentales y el testigo (Fig. 8 c). La frecuencia corregida (frecuencia experimental – frecuencia testigo) de las manchas totales de muestras filtradas y no filtradas se muestran en la figura 8 d, tabla 8.

Punto 2. La frecuencia de manchas sólo se incrementó de manera significativa en las moscas tratadas con la muestra 100 F ($P < 0.05$) (Fig. 9 a). El análisis del tiempo de formación de las manchas indicó que en general, en todas las series experimentales se recobraron manchas de mayor tamaño a las obtenidas en el lote testigo (Fig. 9 b). El número de manchas por mosca en las series experimentales y testigo fue muy similar, excepto por un organismo en el lote expuesto a la muestra completa filtrada (100F) que presentó 29 manchas (Fig. 9 c). La figura 9 d muestra la frecuencia corregida de manchas por ala

obtenida en todas las series, en el análisis de Kruskal-Wallis no hubo respuesta significativa (Tabla 16).

Punto 3. Sólo se observó un ligero incremento en la frecuencia de manchas en los lotes tratados con muestras sin filtrar (50 y 100) (Fig. 10 a). El tamaño de las manchas recobradas fue mayor en las series 100F, 50 y 100 con respecto a las series testigo y 50F, que fueron similares (Fig. 10 b). El número de manchas por mosca fue similar al de las moscas testigo, con excepción de un organismo con 6 manchas en 100F. Es importante señalar que si bien no se incrementó notablemente el número de manchas por mosca, la proporción de moscas con 0, y 1 manchas tuvo una distribución diferente al de las moscas testigo, en el lote expuesto a la muestra completa (100), se recobraron más moscas con dos manchas (Fig. 10 c). En la figura 10 d se comparan las frecuencias corregidas de los lotes experimentales, se observa que las muestras no filtradas tuvieron el mismo efecto, pero las filtradas fueron diferentes obteniéndose en el lote 100F una frecuencia de manchas ligeramente menor a la del testigo concurrente.

Punto 4. La frecuencia de manchas de las moscas expuestas a esta muestra no parece depender del filtrado o de la dilución realizadas. En la muestra completa (100) y en la filtrada diluida (50F), la frecuencia de manchas totales fue similar, pero al separar a las manchas en chicas (de 1 a 2 células), grandes (≥ 3 células) y gemelas, se recobran en ambas un poco más de manchas chicas que en el testigo, pero menos manchas grandes y gemelas. Por otro lado, la frecuencia de manchas totales de los lotes 100 y 50 F fue menor a la del testigo. En todas las series no se observó efecto en las manchas gemelas (Fig. 11 a). El análisis del tamaño de las manchas obtenidas reveló que únicamente en la serie 100F la proporción de manchas de una célula fue menor y la de dos células fue mayor en 100 a la del

testigo (Fig. 11 b). No se observaron diferencias entre el número de manchas por mosca de las series experimentales y testigo. La figura 11 d muestra dos tipos de respuesta: una frecuencia menor a la del testigo en los lotes 50F y 100, una frecuencia menor al testigo y a los lotes anteriores en 100 F y 50.

Punto 5. La frecuencia de manchas totales sólo fue ligeramente mayor en las moscas del lote 50F, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. La frecuencia de manchas grandes disminuyó en el orden: 50F, 100F, 50, 100. No se observó efecto en las manchas gemelas (Fig. 12 a). El análisis del tiempo de formación de manchas mostró que en las moscas del lote 100F éste fue menor ya que se recobraron manchas de mayor tamaño que en el lote testigo. En el resto de los lotes, las manchas fueron de menor tamaño (Fig. 12 b). Con respecto al número de manchas por mosca en las series experimentales este fue menor en todos los casos con respecto al testigo (Fig. 12 c). La figura 12 d muestra que en el caso de las series no filtradas la frecuencia es menor al testigo en el orden $50 > 100$, mientras que en las muestras filtradas, la frecuencia del lote 50F es mayor al testigo y la del lote 100F es menor.

Punto 6. La frecuencia de manchas totales en los lotes sin filtrar fue similar al testigo en la muestra completa (100) y menor en la diluida (50). La frecuencia de manchas chicas y totales de las moscas tratadas con la muestra 100 F fue menor a la del testigo pero al diluirse la muestra (50 F) se recobró una frecuencia de manchas significativamente mayor a la del testigo ($P < 0.05$) (Fig. 13 a). El análisis del tiempo de formación de las manchas recobradas indicó que en el lote 50F, las manchas mas frecuentes son de 1 célula. (Fig. 13 b). Con respecto al número de manchas por mosca, se observó que éste tiende a ser similar a la distribución testigo, aunque la proporción de moscas sin mancha se incrementó en los lotes

100 F y 50 con respecto al testigo, se encontró que la dispersión entre los lotes fue significativa en el análisis de Kruskal Wallis; mediante la comparación múltiple de Dunn se confirmó que existen diferencias significativas entre las distribuciones 50 y 50F (Tabla 17) (Fig. 13 c). En la figura 13 d se observa que la frecuencia de manchas por mosca de las series experimentales y testigo fue: $50F > \text{testigo} > 100 > 100F > 50$.

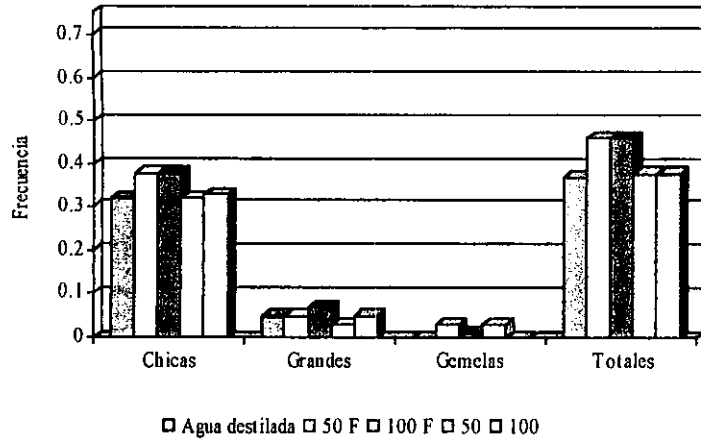
Punto 7. Con excepción del lote 50, la frecuencia de manchas chicas, grandes y totales en los lotes experimentales fue menor a la del lote testigo (Fig. 14 a). Al analizar el tiempo de formación de las manchas se observó que en todos los lotes experimentales se presentaron manchas de mayor tamaño que las recobradas en el testigo; además, en el lote 50F, la frecuencia de manchas de una célula, fue menor a la del testigo (Fig. 14 b). En el mismo lote se recobraron moscas con más manchas, aunque no se encontraron diferencias significativas con el testigo concurrente (Fig. 14 c). En la figura 14 d se compara la frecuencia corregida de manchas totales encontrando el siguiente orden: $50 > \text{testigo} > 100 > 50F > 100F$

Punto 8. El filtrado de las muestras no modificó la frecuencia de manchas en las muestras completas (100F y 100), sin embargo, al diluir las mismas se incrementó ligeramente la frecuencia de manchas (50F y 50) que, en todos los casos, fueron menores a la frecuencia del lote testigo (Fig. 15 a). El análisis del tiempo de formación de las manchas mostró que con excepción del lote 50 que muestra un tamaño de manchas similar al del testigo, en todas las series experimentales se recobraron manchas de tamaño mayor (Fig. 15 b). Con respecto al número de manchas por mosca se observó una dispersión similar entre series experimentales y testigo, sin embargo, es importante señalar que en el caso de la muestra 100, la proporción de moscas sin mancha tiende a ser ligeramente mayor que la del

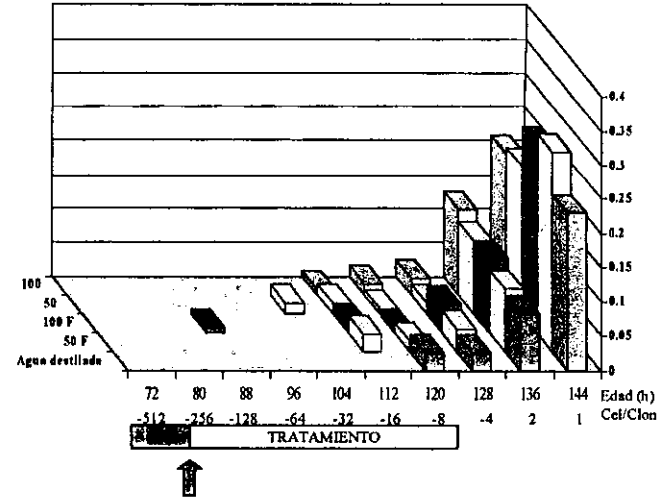
testigo (Fig. 15 c). La figura 15 d compara la frecuencia corregida de manchas por ala obteniendo la siguiente relación: $\text{testigo} > 50 > 50F > 100 = 100F$.

Los resultados del análisis estadístico SMART, se muestran en las tablas 8-15.

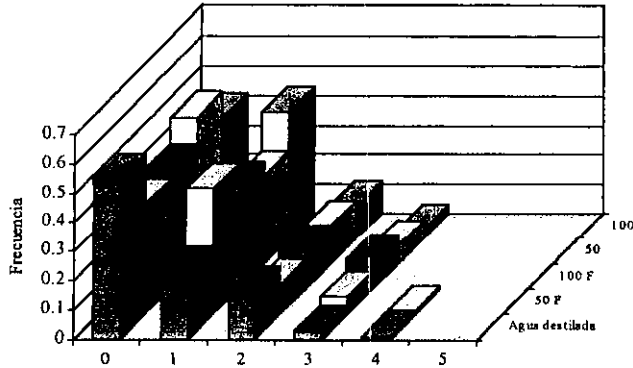
a) Tipo de mancha por ala



b) Células por mancha



c) Manchas por mosca



d) Frecuencia corregida de manchas totales

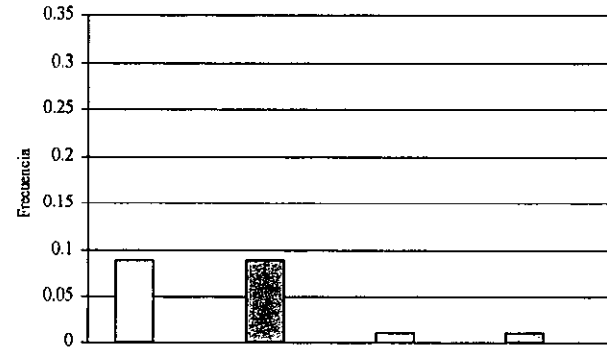


Figura 8 Frecuencia de manchas obtenidas con muestras de agua del punto 1

Tabla 8. Frecuencia de manchas inducidas por muestras de agua del punto 1.

Compuesto []	No. de alas	Manchas por ala (Número de manchas)				Manchas <i>mwh</i>	Tamaño promedio de clón	Frecuencia de formación de clón	
		Manchas sencillas chicas <i>m = 2</i>	Manchas sencillas grandes <i>m = 5</i>	Manchas gemelas <i>m = 5</i>	Manchas totales <i>m = 2</i>			observada	corregida
Agua destilada	120	0.32(38)	0.05(6)	0.00(0)	0.37(44)	43	1.51	1.5	
50 F	120	0.38(46)-	0.05(6)-	0.03(3)i	0.46(55)-	54	1.56	1.8	0.4
100-F	120	0.38(46)-	0.07(8)-	0.01(1)i	0.46(55)-	54	1.67	1.8	0.4
50	120	0.32(39)-	0.03(3)-	0.03(4)i	0.38(46)-	45	1.71	1.5	0.1
100	120	0.33(40)-	0.05(6)-	0.00(0)i	0.38(46)-	46	1.67	1.6	0.1

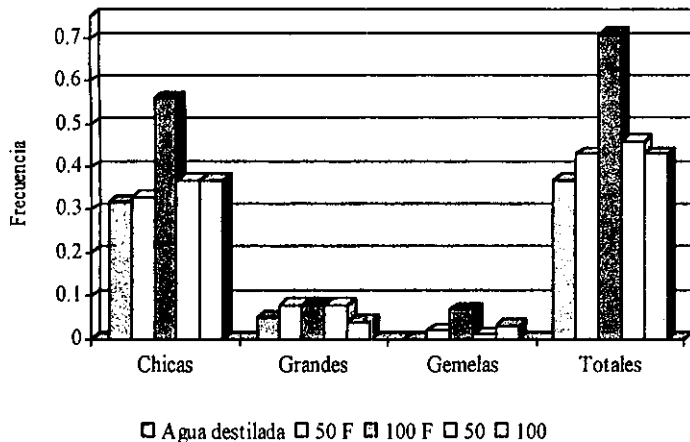
+ = positivo; - = negativo; w = débil positivo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad: alfa = beta = 0.05.

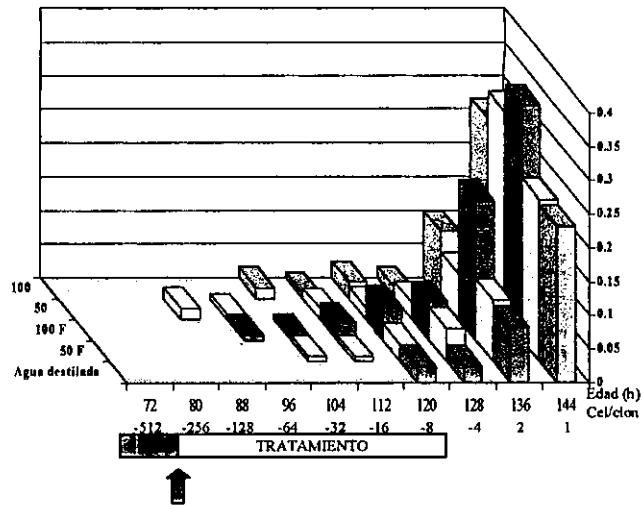
Prueba estadística de una cola.

Diagnostico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (Mut. Res., 203 (1988) 297-308)

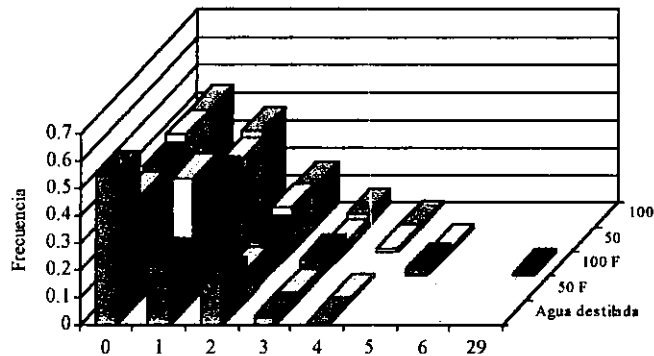
a) Tipo de mancha por ala



b) Células por mancha



c) Manchas por mosca



d) Frecuencia corregida de manchas totales



Figura 9 Frecuencia de manchas obtenidas con muestras de agua del punto 2

Tabla 9. Frecuencia de manchas inducidas por muestras de agua del punto 2.

Compuesto	Nó. de alas	Manchas por ala (Número de manchas)				Manchas <i>mwh</i>	Tamaño promedio de clon	Frecuencia de formación de clon	
		Manchas sencillas chicas m=2	Manchas sencillas grandes m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2			observada	corregida
Agua destilada	120	0.32(38)	0.05(6)	0.00(0)	0.37(44)	43	1.51	1.5	
50 F	120	0.33(40)-	0.08(9)-	0.02(2)i	0.43(51)-	50	1.66	1.7	0.2
100-F	120	0.56(67)+	0.08(10)-	0.07(8)+	0.71(85)+	83	1.81	2.8	1.4
50	120	0.37(45)-	0.08(9)-	0.01(1) i	0.46(55)-	55	1.85	1.9	0.4
100	120	0.37(44)-	0.04(5)-	0.03(3)i	0.43(52)-	50	1.62	1.7	0.2

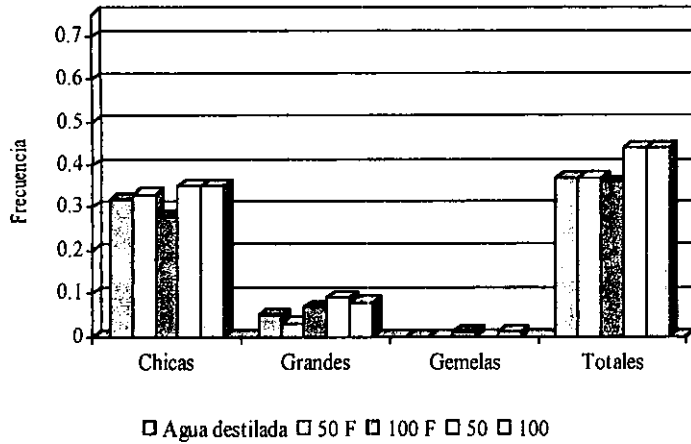
+ = positivo; - = negativo; w = débil positivo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad: alfa = beta = 0.05.

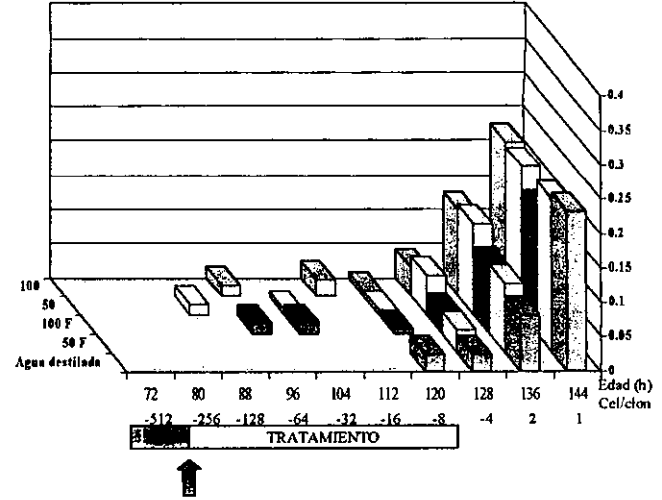
Prueba estadística de una cola.

Diagnostico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (Mut. Res., 203 (1988) 297-308)

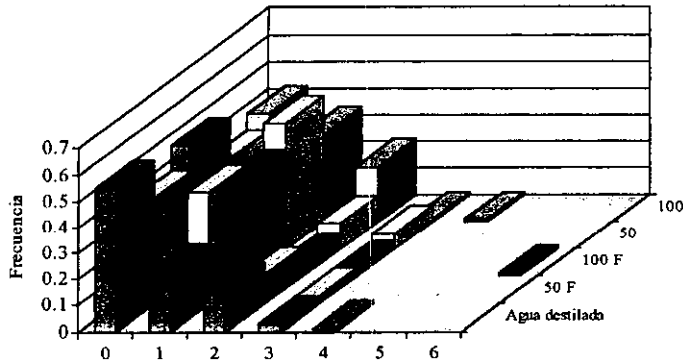
a) Tipo de mancha por ala



b) Células por mancha



c) Manchas por mosca



d) Frecuencia corregida de manchas totales

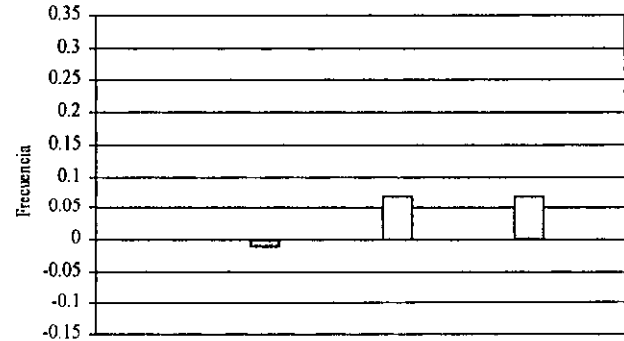


Figura 10 Frecuencia de manchas obtenidas con muestras de agua del punto 3

Tabla 10. Frecuencia de manchas inducidas por muestras de agua del punto 3.

Compuesto [.]	No. de alas	Manchas por ala (Número de manchas)				Manchas <i>mwh</i>	Tamaño promedio de clon	Frecuencia de formación de clon	
		Manchas simples chicas <i>m = 2</i>	Manchas simples grandes <i>m = 5</i>	Manchas gemelas <i>m = 5</i>	Manchas totales <i>m = 2</i>			observada	corregida
Agua destilada	120	0.32(38)	0.05(6)	0.00(0)	0.37(44)	43	1.51	1.5	
50 F	120	0.33(40)-	0.03(4)-	0.00(0)i	0.37(44)-	44	1.45	1.5	0
100-F	120	0.28(34)-	0.07(8)-	0.01(1)i	0.36(43)-	43	2.00	1.5	0
50	120	0.35(42)-	0.09(11)i	0.00(0)i	0.44(53)-	51	1.92	1.7	0.3
100	120	0.35(42)-	0.08(10)-	0.01(1)i	0.44(53)-	51	1.92	1.7	0.3

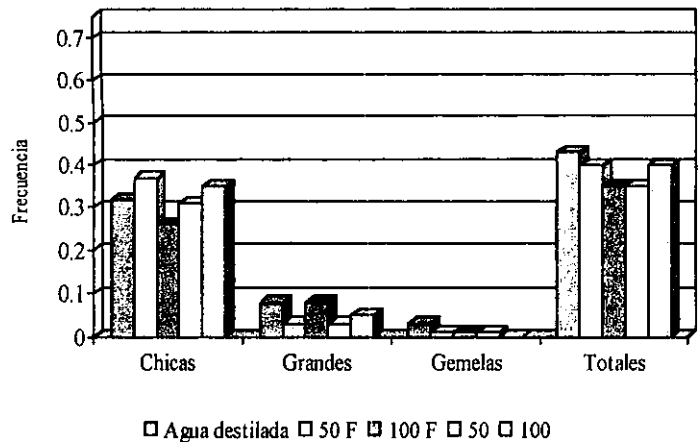
+ = positivo; - = negativo; w = débil positivo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación.

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

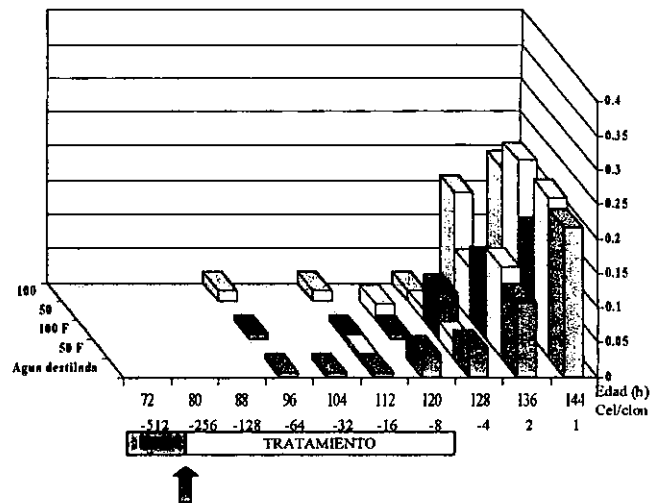
Prueba estadística de una cola.

Diagnostico estadístico de acuerdo a Frei y Würgler (Mut. Res., 203 (1988) 297-308)

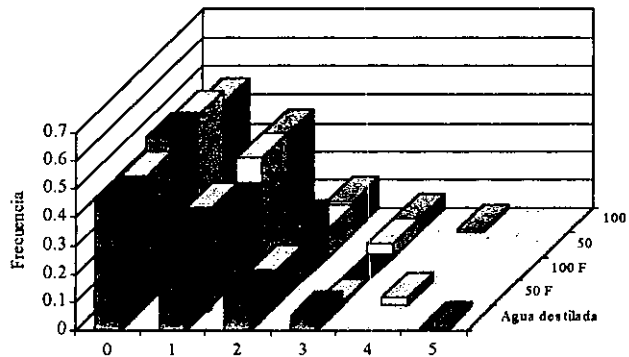
a) Tipo de mancha por ala



b) Células por mancha



c) Manchas por mosca



d) Frecuencia corregida de manchas totales

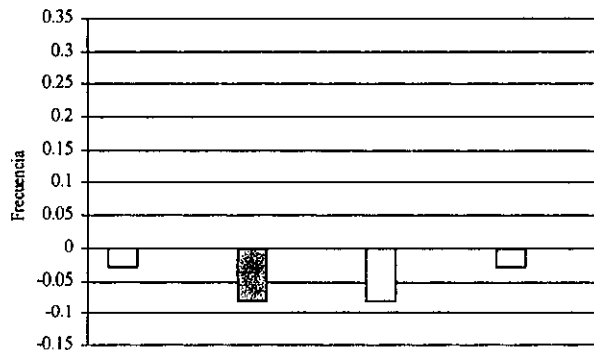


Figura 11 Frecuencia de manchas obtenidas con muestras de agua del punto 4

Tabla 11. Frecuencia de manchas inducidas por muestras de agua del punto 4.

Compuesto [.]	No. de alas	Manchas por ala (Número de manchas)				Manchas <i>mwh</i>	Tamaño promedio de clon	Frecuencia de formación de clon	
		Manchas sencillas chicas <i>m = 2</i>	Manchas sencillas grandes <i>m=5</i>	Manchas gemelas <i>m=5</i>	Manchas totales <i>m=2</i>			observada	corregida
Agua destilada	120	0.32(39)	0.08(9)	0.03(3)	0.43(51)	50	1.80	1.7	
50 F	120	0.37(44)-	0.03(3)-	0.01(1)-	0.40(48)-	47	1.51	1.6	-0.1
100-F	120	0.26(31)-	0.08(10)-	0.01(1)-	0.35(42)-	42	1.98	1.4	-0.3
50	120	0.31(37)-	0.03(4)-	0.01(1)-	0.35(42)-	40	1.50	1.4	-0.3
100	120	0.35(42)-	0.05(6)-	0.00(0)-	0.40(48)-	46	1.87	1.6	-0.1

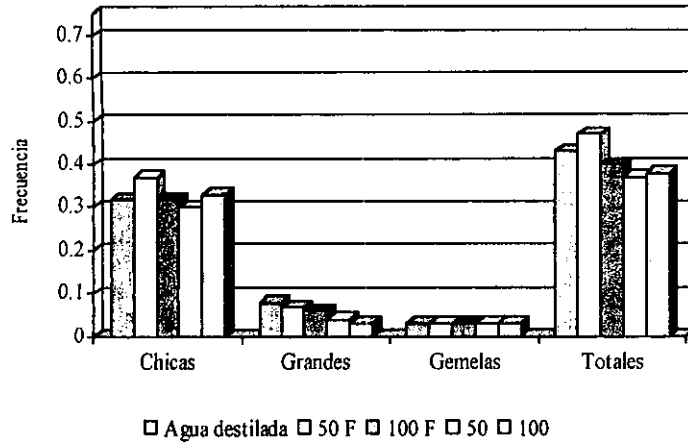
+ = positivo; - = negativo; w = débil positivo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad: alfa = beta = 0.05.

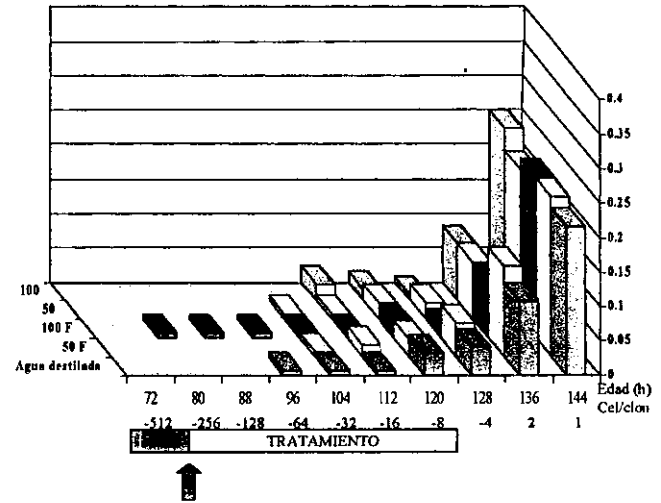
Prueba estadística de una cola.

Diagnostico estadístico de acuerdo a Frei y Würigler (Mut. Res., 203 (1988) 297-308)

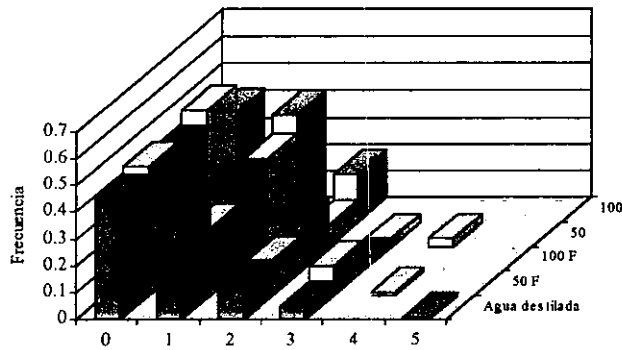
a) Tipo de mancha por ala



b) Células por mancha



c) Manchas por mosca



d) Frecuencia corregida de manchas totales

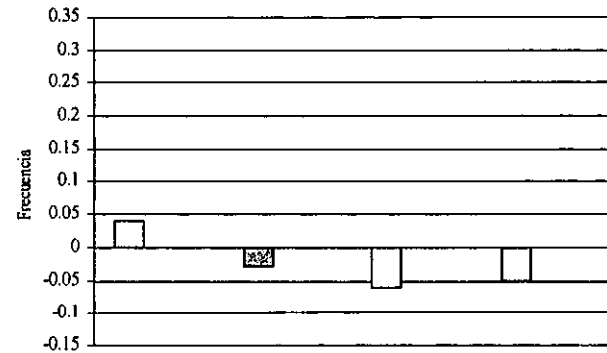


Figura 12 Frecuencia de manchas obtenidas con muestras de agua del punto 5

Tabla 12. Frecuencia de manchas inducidas por muestras de agua del punto 5.

Compuesto []	No. de alás	Manchas por ala (Número de manchas)				Manchas <i>mwh</i>	Tamaño promedio de clon	Frecuencia de formación de clon	
		Manchas sencillas chicas m = 2	Manchas sencillas grandes m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2			observada	corregida
Agua destilada	120	0.32(39)	0.08(9)	0.03(3)	0.43(51)	50	1.80	1.7	
50 F	120	0.37(44)-	0.07(8)-	0.03(4)i	0.47(56)-	55	1.84	1.9	0.2
100-F	120	0.32(38)-	0.06(7)-	0.03(3)i	0.40(48)-	46	1.91	1.6	-0.1
50	120	0.30(36)-	0.04(5)-	0.03(3)i	0.37(44)-	42	1.67	1.4	-0.3
100	120	0.33(40)-	0.03(3)-	0.03(3)i	0.38(46)-	45	1.58	1.5	-0.2

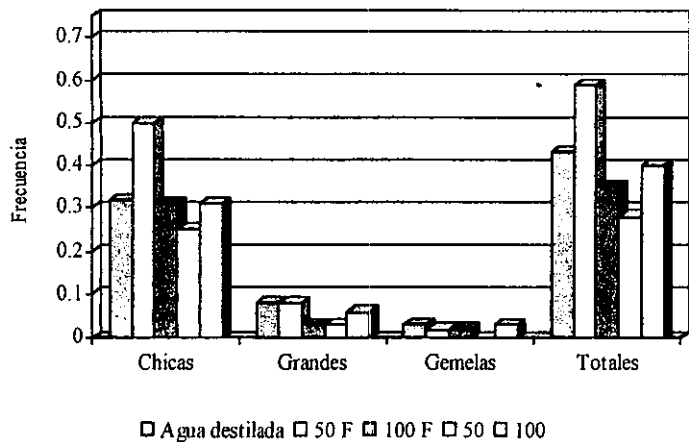
+ = positivo; - = negativo; w = débil positivo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad: alfa = beta = 0.05.

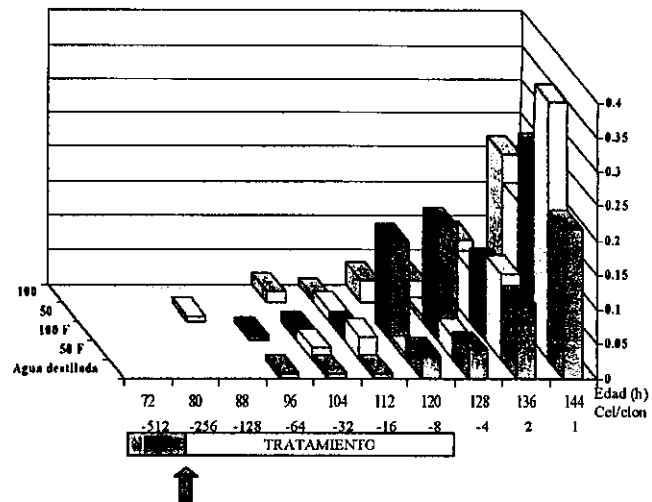
Prueba estadística de una cola.

Diagnostico estadístico de acuerdo a Frei y Wüglger (Mut. Res., 203 (1988) 297-308)

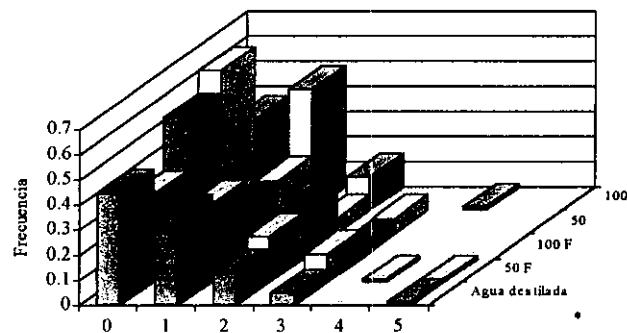
a) Tipo de mancha por ala



b) Células por mancha



c) Manchas por mosca



d) Frecuencia corregida de manchas totales

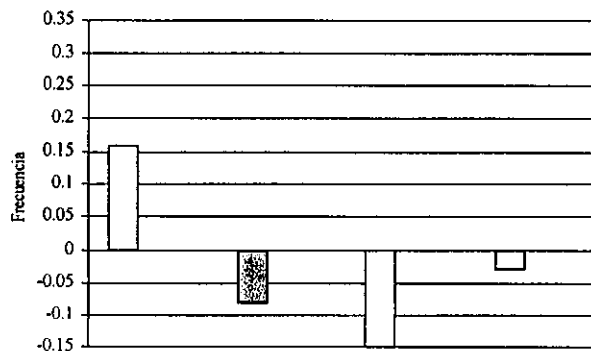


Figura 13 Frecuencia de manchas obtenidas con muestras de agua del punto 6

Tabla 13. Frecuencia de manchas inducidas por muestras de agua del punto 6.

Compuesto []	No. de alas	Manchas por ala (Número de manchas)				Manchas <i>mwh</i>	Tamaño promedio de clon	Frecuencia de formación de clon	
		Manchas simples chicas <i>m = 2</i>	Manchas simples grandes <i>m=5</i>	Manchas gemelas <i>m=5</i>	Manchas totales <i>m=2</i>			observada	corregida
Agua destilada	120	0.32(39)	0.08(9)	0.03(3)	0.43(51)	50	1.80	1.7	
50 F	120	0.50(60)+	0.08(9)-	0.02(2)-	0.59(71)i	70	1.64	2.4	0.7
100-F	120	0.31(37)-	0.03(3)-	0.02(2)-	0.35(42)-	40	1.75	1.4	-0.3
50	120	0.25(30)-	0.03(4)-	0.00(0)-	0.28(34)-	34	1.76	1.2	-0.5
100	120	0.31(37)-	0.06(7)-	0.03(4)i	0.40(48)-	46	1.78	1.6	-0.1

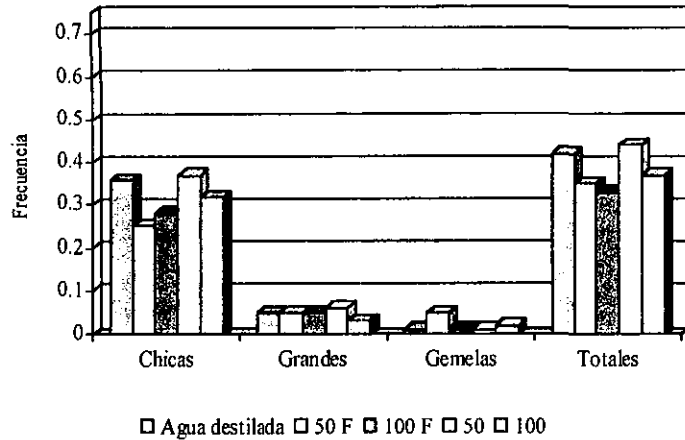
+ = positivo; - = negativo; w = débil positivo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad: alfa = beta = 0.05.

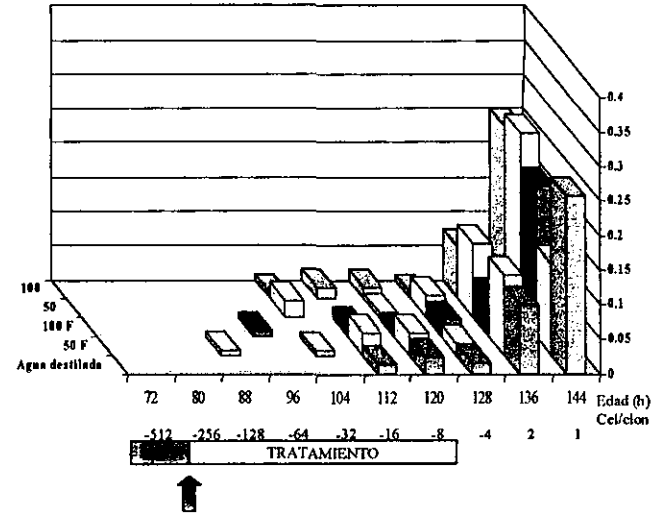
Prueba estadística de una cola.

Diagnostico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (Mut. Res., 203 (1988) 297-308)

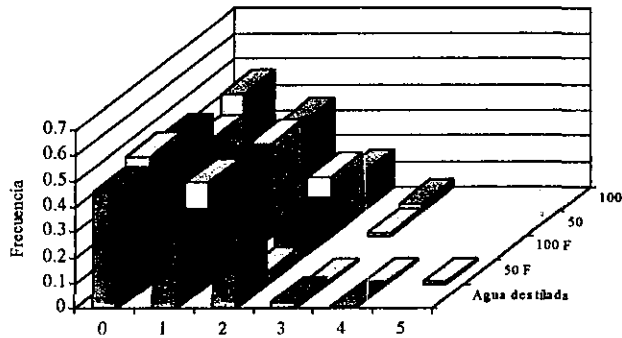
a) Tipo de mancha por ala



b) Células por mancha



c) Manchas por mosca



d) Frecuencia corregida de manchas totales

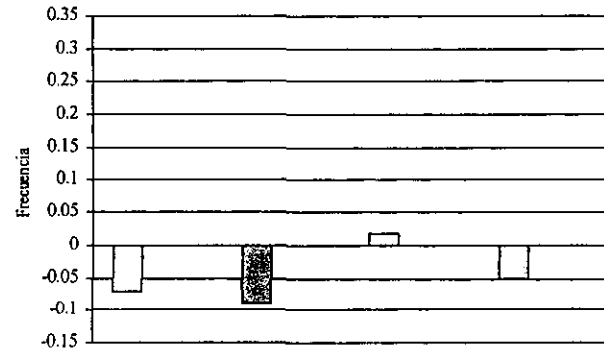


Figura 14 Frecuencia de manchas obtenidas con muestras de agua del punto 7

Tabla 14. Frecuencia de manchas inducidas por muestras de agua del punto 7.

Compuesto []	No. de alas	Manchas por ala (Número de manchas)				Manchas <i>mw</i>	Tamaño promedio de clon	Frecuencia de formación de clon	
		Manchas sencillas chicas m = 2	Manchas sencillas grandes m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2			observada	corregida
Agua destilada	120	0.36(43)	0.05(6)	0.01(1)	0.42(50)	50	1.62	1.7	
50 F	120	0.25(30)-	0.05(6)-	0.05(6)i	0.35(42)-	42	2.26	1.4	-0.3
100-F	120	0.28(33)-	0.05(6)-	0.01(1)i	0.33(40)-	40	1.75	1.4	-0.3
50	120	0.37(45)-	0.06(7)-	0.01(1)i	0.44(53)-	52	1.67	1.8	0.1
100	120	0.32(39)-	0.03(4)-	0.02(2)i	0.37(45)-	44	1.55	1.5	-0.2

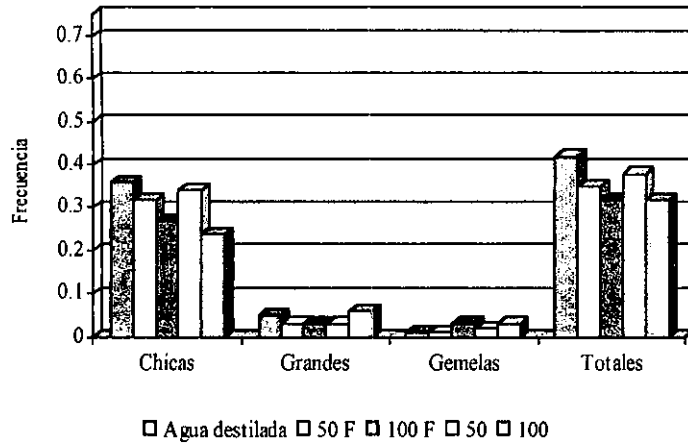
+ = positivo; - = negativo; w = débil positivo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad: alfa = beta = 0.05.

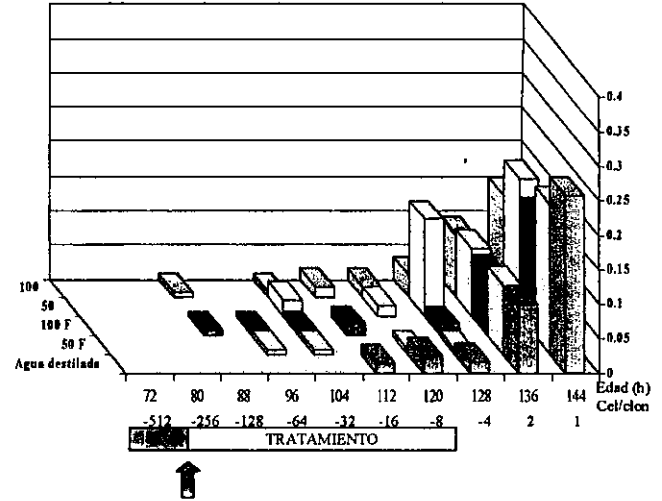
Prueba estadística de una cola.

Diagnostico estadístico de acuerdo a Frei y Würgler (Mut. Res., 203 (1988) 297-308)

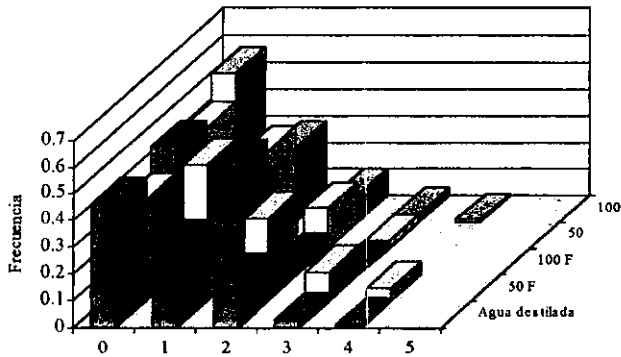
a) Tipo de mancha por ala



b) Células por mancha



c) Manchas por mosca



d) Frecuencia corregida de manchas totales

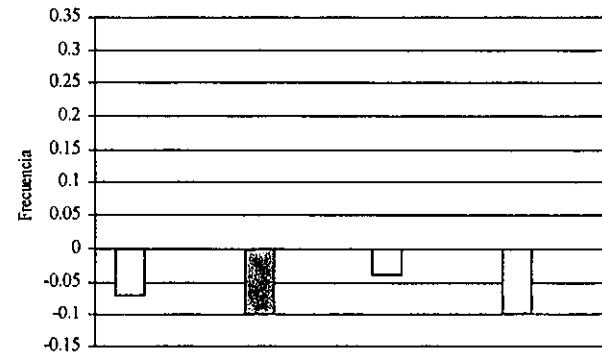


Figura 15 Frecuencia de manchas obtenidas con muestras de agua del punto 8

Tabla 15. Frecuencia de manchas inducidas por muestras de agua del punto 8.

Compuesto []	No. de alas	Manchas por ala (Número de manchas)				Manchas <i>nwh</i>	Tamaño promedio de clon	Frecuencia de formación de clon	
		Manchas sencillas chicas <i>m=2</i>	Manchas sencillas grandes <i>m=5</i>	Manchas gemelas <i>m=5</i>	Manchas totales <i>m=2</i>			observada	corregida
Agua destilada	120	0.36(43)	0.05(6)	0.01(1)	0.42(50)	50	1.62	1.7	
50 F	120	0.32(38)-	0.03(3)-	0.01(1)i	0.35(42)-	42	1.64	1.4	-0.3
100-F	120	0.27(32)-	0.03(4)-	0.03(3)i	0.32(39)-	39	1.90	1.3	-0.4
50	120	0.34(41)-	0.03(3)-	0.02(2)i	0.38(46)-	46	1.65	1.6	-0.1
100	120	0.24(29)-	0.06(7)-	0.03(3)i	0.32(39)-	38	2.08	1.3	-0.4

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

Niveles de probabilidad: alfa = beta = 0.05.

Prueba estadística de una cola.

Diagnostico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (Mut. Res., 203 (1988) 297-308)

Tabla 16. Análisis de Kruskal-Wallis. Punto 2.

	Agua destilada	50 F	50	100 F
50 F	NS*			
50	NS*	NS*		
100 F	NS*	NS*	NS*	
100	NS*	NS*	NS*	NS*

No significativo: NS*=P>0.05

Tabla 17. Análisis de Kruskal-Wallis. Punto 6.

	Agua destilada	50 F	50	100 F
50 F	NS (-23.542)*			
50	NS (28.525)*	S (52.067)**		
100 F	NS (13.425)*	NS (36.967)*	NS (-15.100)*	
100	NS (-5.033)*	NS (18.508)*	NS (-33.558)*	NS (-18.458)*

No significativo: NS*=P>0.05

Significativo: S**=<0.01

DISCUSIÓN

El uso de sistemas de biomonitorio es una alternativa necesaria para la determinación del riesgo ambiental que puede representar un compuesto, mezclas de compuestos, o fuentes particulares de emisión para los organismos. Comúnmente, la determinación de la calidad ambiental se realiza con base en análisis fisicoquímicos a través de los cuales se pretende establecer el grado de contaminación y en consecuencia, el posible impacto para los organismos que lo habitan. La comparación de los parámetros cuantificados con estándares preestablecidos es una herramienta para el diagnóstico de la calidad ambiental de una localidad. Sin embargo, existen numerosos reportes que indican que esta comparación no es suficiente cuando se requiere conocer además el efecto de contaminantes particulares o de mezclas de los mismos en los organismos, esto sin contar, la ocurrencia de sinergismo entre los contaminantes que coinciden en tiempo y espacio (Butterworth, 1995).

Las muestras se probaron sin filtrar, filtradas, diluidas y filtradas-diluidas. Este método se utilizó por dos razones. La primera fue comparar el efecto del filtrado en la actividad de la muestra, ya que este proceso eliminaría partículas orgánicas de más de 0.45 μ . La segunda fue para tener al menos dos niveles de concentración, con los que se podría construir una curva de la actividad genotóxica para cada punto y de esta manera, detectar aquellos tratamientos en los que una concentración sumamente alta provoca la muerte de las células o de los organismos afectados.

En términos generales, la materia orgánica natural (NOM, natural organic matter) en

sistemas acuáticos debe ser considerada la suma de NOM en la forma de partículas rígidas no filtrables (POM, rigid particulate NOM) y la materia orgánica disuelta (DOM, dissolved NOM). Más específicamente se pueden encontrar los siguientes componentes en muestras de agua:

1. Materia orgánica (NOM) particulada, rígida (POM), que no puede pasar a través de una membrana o poro de 0.45μ .
2. NOM particulada, flexible, mayor de 0.45μ en diámetro pero con capacidad de flexibilizarse bajo presión y pasar de esta manera un poro de 0.45μ (FPOM).
3. NOM subparticulada, filtrable, con un diámetro menor a 0.45μ , que pasa directamente a través del poro (SPOM).
4. NOM disuelta, no posee estructura de partícula y está presente en el agua a un nivel molecular sin ser integrada a estructuras particuladas (DOM) (Vinebrooke, 1998).

La prueba de mutación y recombinación somática de *Drosophila* fue diseñada para determinar incremento en la frecuencia basal de mutación y recombinación. En el caso de las manchas totales y las manchas chicas, se requiere duplicar la frecuencia basal ($m=2$) y en el caso de las manchas grandes y gemelas se requiere quintuplicar la frecuencia basal ($m=5$) para diagnosticar una respuesta estadísticamente significativa. Sin embargo, se ha observado que ocasionalmente en un lote experimental se obtiene una frecuencia de mutación y recombinación somáticas menor a la del testigo, esta diferencia podría implicar la presencia de un falso efecto negativo por lo que se ha establecido que para determinar un resultado negativo en la prueba de mutación y recombinación somáticas en *Drosophila*, es necesario que coincidan tres parámetros de evaluación: 1) la frecuencia de manchas por ala; 2) el tiempo de formación de las manchas y 3) el número de manchas por mosca, deben ser

similares a los del testigo negativo concurrente (Ramos *et al.*, 1998). Se ha observado que en ocasiones la frecuencia de manchas por ala en series experimentales y la del testigo negativo es similar, sin embargo el tiempo de formación de las manchas es diferente, recobrándose manchas de mayor tamaño que las del testigo, aunque en igual número; o bien, manchas de un tamaño mucho menor que las del testigo negativo, ambas situaciones se han clasificado como respuesta falso negativo. Por otro lado, la presencia de contaminantes que requieren ser metabolizados por el organismo modifica el número de manchas por mosca. Comúnmente, más del 50 % de las moscas testigo no presentan manchas en sus alas, una fracción menor muestran una mancha y en una proporción aun menor se recobran dos o más manchas por mosca. Es muy poco frecuente que en una mosca no expuesta a genotóxicos se presenten más de tres manchas (Ramos *et al.*, 1999). Por otra parte, existen evidencias de que concentraciones muy elevadas de genotóxicos producen una menor frecuencia de alteraciones cuando el nivel de toxicidad es tal que provoca el retraso en la división celular o bien, la muerte de las células afectadas si el daño producido no puede ser reparado (Brusick, 1985; Ramos-Morales y Rodríguez-Araiz, 1995; González-César y Ramos-Morales, 1997).

De esta manera, cuando se tiene una muestra verdaderamente negativa, procesos como el filtrado o la dilución de la misma no modifican la frecuencia de eventos genéticos ni el patrón en el que estos se presentan. Por otra parte, se considera que una muestra negativa es falsa, cuando alguno de los tres parámetros evaluados muestra un patrón diferente al del testigo negativo concurrente (Ramos *et al.*, 1998).

El uso de metodologías de laboratorio para estudios de biomonitorio plantea la necesidad de determinar cuál es el testigo negativo adecuado. En este trabajo se utilizó agua destilada como testigo negativo, sin embargo, es importante considerar que las variaciones

que se presenten en la naturaleza deben ser mayores que las que se recobran en condiciones controladas de laboratorio. En relación con los estudios de muestras de agua, cada testigo negativo correspondiente debe ser determinado, por ejemplo, para muestras de río, cuerpos de agua cerrados, aguas subterráneas y otros (Ramos, 1999).

De las muestras analizadas, las correspondientes a los puntos 1 y 2 mostraron mayor actividad cuando las muestras fueron filtradas (Fig. 8 a y 9 a) es probable que estas muestras contuvieran materia orgánica formando coloides. El proceso de filtración podría dispersar estos coloides en materia orgánica subparticulada, la cual podría atravesar la membrana y modificar, de esta manera, la actividad de la muestra (ver Fig. 5). Además, en las muestras de los puntos 1 y 2, el tiempo de producción de las manchas fue mayor al de las moscas testigo, lo que indica que las alteraciones que provocaron la producción de las manchas ocurrieron en divisiones celulares más tempranas, por lo que se obtuvieron manchas con mayor tamaño que en las moscas testigo (Fig. 8 b y 9 b). Con respecto al número de manchas por mosca no se observaron diferencias entre las moscas testigo y las experimentales del punto 1, pero sí entre las del punto 2, esto es, en las moscas experimentales, el número de las manchas fue mayor que en el testigo (> 4). Al respecto, es importante señalar que en las moscas tratadas con la muestra de agua filtrada (100F) se recobró un organismo con 29 manchas. El análisis del número de manchas por mosca es importante por la razón anterior. Es costumbre que en la prueba de mutación y recombinación somática se determine el efecto genotóxico de algún compuesto comparando la frecuencia de mutación entre las series experimentales y testigo, sin considerar la localización de las manchas recobradas. Por ejemplo, la frecuencia de manchas por ala varía entre 0.25 y 0.45, cuando se conservan prácticas de laboratorio adecuadas, lo que da un

promedio de 0.35 manchas por ala o 35 manchas por cada 100 alas registradas. En este contexto, una mosca con 29 manchas prácticamente dobla la frecuencia del testigo con lo que se sobrestima el efecto del posible contaminante. Lo anterior es sumamente importante, sobre todo en estudios de mutagénesis en los que se puede llegar a conclusiones equivocadas. En estudios de biomonitordeo, esta respuesta puede permitir la detección temprana del efecto de un cambio en el ambiente en los organismos más sensibles lo que es de gran ayuda para la toma de decisiones sobre la protección del ambiente.

En las moscas del punto 3, la dilución de las muestras no modificó en apariencia la frecuencia de manchas, sin embargo, a pesar de que ésta es igual en las muestras sin filtrar (50 y 100) (Fig. 10 a), el tamaño de las manchas es mayor a la del lote testigo (Fig. 10 b) y el número de manchas por mosca es mayor en la muestra completa que en la diluida (Fig. 10 c). En las muestras filtrada sin diluir (100F) y diluida (50F), se recobran frecuencias similares al testigo, pero nuevamente el tamaño de las manchas es mayor que el de las moscas testigo sin llegar a ser significativo.

En las muestras restantes se observaron diferencias entre las muestras no filtradas y filtradas. Es importante recordar que las muestras se filtraron con una membrana microporo 0.45 μ , como se recomienda para las determinaciones del contenido de contaminantes en muestras de agua (Meybeck, 1989). La diferencia en la respuesta genotóxica provocada por las muestras filtradas y sin filtrar, podría explicarse, al menos parcialmente, debido a que en el proceso de filtrado, la presión ejercida podría provocar el rompimiento de la fracción coloidal y de esta manera, liberar partículas de materia orgánica que, una vez liberadas, podrían atravesar la membrana, modificando su composición y en consecuencia la respuesta, en comparación con la muestra no filtrada.

Se ha observado que en ocasiones la frecuencia de manchas en las series filtradas es menor a la del testigo concurrente y a la de la muestra no filtrada, sin embargo, lo anterior va generalmente acompañado con la aparición de manchas de mayor tamaño o bien, la ausencia de manchas, en comparación con su testigo concurrente (Ramos *et al.*, 1999).

La determinación de la genotoxicidad de un compuesto se hace con base en su capacidad para inducir alteraciones al DNA, de manera que si un genotóxico potencial no incrementa dicha frecuencia se asume que no es genotóxico. Sin embargo, se presta poca atención al hecho de que las moscas expuestas a un posible genotóxico presenten frecuencias de manchas menores a las de moscas no expuestas como se muestra en las figuras 12 a la 15. Este resultado se ha sugerido que puede estar en relación con la inducción de enzimas que participan en la desintoxicación de genotóxicos o bien, con la pérdida de las células dañadas, lo que provocaría que la frecuencia de eventos detectados sea menor (González-César y Ramos-Morales, 1997).

En el resto de las muestras, la frecuencia de manchas en las muestras completas (100) fue menor a la del testigo negativo concurrente (Figuras 11 a 15). En todos los casos se observó que el tiempo de formación de las manchas mostró un patrón diferente al de los testigos negativos concurrentes, aunque la distribución del número de manchas por mosca mostró poca variación en relación con la del testigo. El uso de muestras filtradas, diluidas y filtradas-diluidas facilitó comprobar que efectivamente se trata de falsos negativos, ya que en éstas la dispersión entre los tres parámetros evaluados fue diferente también a la de los testigos negativos concurrentes.

Es importante insistir en que si sólo se utilizan muestras completas, la determinación de la genotoxicidad con fines de biomonitoreo sería muy limitada y podría llevar a

conclusiones falsas.

El uso de *Drosophila* en estudios de biomonitoreo es una alternativa valiosa porque además de ser un modelo *in vivo*, es sensible a niveles ambientales de contaminación y permite detectar a aquellos organismos más sensibles que muestran una respuesta temprana ante cambios ambientales, misma que puede ser atendida para evitar mayores daños al resto de la población o poblaciones expuestas. Es importante complementar los resultados que se obtienen con un organismo, con las determinaciones fisicoquímicas de las muestras problema, lo que nos permitiría saber si hay relación entre las concentraciones y componentes de una mezcla y el daño inducido, sin embargo, no debe olvidarse que con frecuencia, una muestra puede presentar valores menores a los permisibles para un uso específico y no obstante, representar un peligro potencial para los organismos expuestos. En este estudio, conocer las concentraciones de algunos compuestos no permitió establecer una relación entre la respuesta de genotoxicidad y la concentración de los posibles genotóxicos seleccionados, ya que en su mayoría, las concentraciones de los posibles genotóxicos se encontraron por debajo de los límites permisibles. Hay que considerar que sólo se conocía la concentración de algunos compuestos y no la totalidad de los que conformaban la muestra, así como las posibles interacciones entre ellos. Así, no puede descartarse que la actividad genotóxica detectada en los puntos 2 y 6 sea debida a algún otro factor no considerado en este estudio, ya que el análisis de metales pesados y plaguicidas sólo se realizó para: Cu, Zn, Pb, Cr y As, en el caso de los metales pesados y para: aldrín, heptacloro epóxido, ppDDE, Dieldrín y ppDDT, en el caso de plaguicidas. En resumen, con base en los resultados obtenidos en este estudio, se podría señalar lo siguiente:

- El resultado obtenido en el punto 2 debe ser considerado como falso positivo para la

prueba de SMART debido a que el incremento en la respuesta se basa solamente en un organismo de toda la población analizada y no fue comprobada estadísticamente con la prueba de Kruskal - Wallis.

- La respuesta obtenida para el punto de muestreo No. 6, si sería considerada como positiva debido a que fue aportada por varios organismos de la población expuesta, es decir, la respuesta fue reproducible y fue comprobada estadísticamente con la prueba de Kruskal - Wallis.
- *Drosophila melanogaster* sí puede ser utilizada como biomonitor ya que posee la capacidad de descartar entre muestras positivas, negativas y ser sensible aún a las posibles interacciones de los diversos componentes de las muestras.
- Es importante disponer de modelos biológicos *in vivo* para estudios de biomonitoreo. Debe procurarse en lo posible, establecer relaciones de causalidad entre uno o varios factores en el ambiente y el efecto encontrado en los organismos. Es indispensable disponer de criterios claros para diagnosticar una respuesta positiva y una negativa.

CONCLUSIONES

1. *Drosophila melanogaster* es sensible a niveles ambientales de contaminantes.
2. *Drosophila melanogaster* y la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) pueden ser utilizados en estudios de monitoreo ambiental sin necesidad de concentrar las muestras de interés.
3. La comparación de la frecuencia de manchas, el tamaño de manchas y el número de manchas por mosca entre las series experimental y testigo es indispensable para descartar falsos positivos.

BIBLIOGRAFÍA

Abundis M. H. (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 p.

Armienta M. A. y R. Rodríguez (1996) Arsénico en el valle de Zimapan (México). Instituto de Geofísica. U.N.A.M., No. 63: 33 – 43.

Armienta M. A., Rodríguez R., Cruz O., Ceniceros N., Aguayo A., Villaseñor G. y E. Hernández (1996) Problemática ambiental del arsénico en el agua subterránea de Zimapan, Hidalgo. Actas INAGEQ 2: 313 – 316.

Brusick D. (1987) Principles of genetic toxicology, Plenum Press, U. S. A. 284 pp.

Butterworth F. M. (1995) Introduction to biomonitors and biomarkers as indicators of environmental change. In: Biomonitors and biomarkers as indicators of environmental change, Environmental Science Research, U. S. A. Vol. 50: 1 – 8.

Butterworth F. M., Corkum L. D. and J. Guzmán. (1995) Biomonitors and biomarkers as indicators of environmental change. Environmental Science Research, U. S. A. Vol. 50, 350 pp.

Casarett L. J. (1975) Toxicologic evaluation. In: Toxicology the basis science of poison. Mac Millan Pub. USA. 11 -- 25 pp.

Chroust K. (1997) *Drosophila melanogaster*, *Vicia faba* and *Arabidopsis thaliana* short-term bioassays in genotoxicity evaluation of air and soil samples from sites surrounding two industrial factories in the Czech Republic. Folia Biol., Czech Republic 43(2): 71 -- 78.

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

Dean R. (1981) Toxicology in: Water reuse. Problems and solutions. Academic Press, USA, 264 pp.

Delgado A., Ortiz R., Graf U., Villalobos P. y S. Gómez (1994) Genotoxicidad producida por aereopartículas en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Rev. Int. Cont. Amb., 10 (Sup.1): 25 -- 26.

Demerec M. (1965) Biology of *Drosophila*. Hafner Publishing Co. USA, 633 pp.

Frei H. (1994) Análisis estadístico de datos provenientes de las pruebas de mutación y recombinación somáticas (SMART). Rev. Int. Cont. Amb., 10 (Sup.1): 9-14.

Frei H. and F. E. Würzler (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Research* 203: 297 – 308.

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

García Bellido A. and J. Dapena (1974) Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Genetics* 128: 117 – 130.

García Bellido A. and J. R. Merriam (1971) Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology* 24: 61 – 87.

García E. A. y M. A. Armienta (1996) Distribución de arsénico en sedimentos fluviales a lo largo del río Tolimán, Zimapan, Hgo., México. *Actas INAGEQ* 2: 327 – 329.

Glickman L. T. (1991) *Animals as Sentinels of Environmental Health Hazards*. National Research Council, National Academy Press, Washington.

González-César E. and P. Ramos-Morales (1997) Sodium azide induces mitotic recombination in *Drosophila melanogaster* larvae. *Mutation Research* 389: 157 – 165.

Goulden P. A. (1978) Environmental pollution analysis. Heyden International topics in science. Edit by I. C. Thomas. 209 pp.

Graf U. (1994) La situación actual de SMART (Prueba de mutación y recombinación somáticas) en *Drosophila melanogaster*. Rev. Int. Cont. Amb., 10 (Sup. 1): 5 – 7.

Graf U., Delgado-Rodríguez A., Villalobos-Pietrini R. y S. Gómez-Arroyo (1994) Taller latinoamericano de genética toxicológica. Rev. Int. Cont. Amb., 10 (Sup.1): 1 – 4.

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.

Graf U., Würzler F. E., Katz A. J., Frei H., Juon H., Hall C. B. and P. G. Kale (1984) Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. Environmental Mutagenesis 6: 153 – 188.

Guzmán R., Würzler F. and E. Vogel (1990) Training course on *Drosophila* somatic genotoxicity assay in Mexico. Mut Res. 234: 107 – 109.

Guzmán R. J. and U. Graf (1995) *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change, Environmental Science Research, New York. Vol. 50: 169 – 181.

Hällström I., Magnusson J. and C. Ramel (1982) Relation between the somatic toxicity of dimethylnitrosamine and a genetically determined variation in the level and induction of cytochrome P450 in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 92: 161 – 168.

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

Katz A. J. (1985) Genotoxicity of 5-azacytidine in somatic cells of *Drosophila*. *Mut. Res.* 143: 195 – 199.

Kalthoff K. (1996) *Analysis of biological development*. McGraw-Hill, USA. pp 850.

Krogulski A., Borkowka M. and A. Strusinski (1997) Mutagenic activity of atmospheric dust in Warsaw. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 48(1): 31 – 35.

Lindsley D. L. and G. Zimm (1992) *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, USA. pp 1 – 491.

Meybeck M., Chapman D. and R. Helmer (1989) *Global environmental monitoring system: Global freshwater quality*, Behalt of the world health organization and the United Nations Environment. 306pp.

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

Ramel C. and J. Magnusson (1992) Modulation of genotoxicity in *Drosophila*. Mut. Res.
267: 221 – 227.

Ramos Morales P. (1994) Efectos genotóxicos de algunas sales de arsénico en *Drosophila
melanogaster*. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, UNAM. 142 pp.

Ramos Morales P. and A. R. Rodríguez (1995) Genotoxicity of two arsenic compounds in
germ cells and somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Environ. Mol. Mutagen. 25: 288 –
299.

Ramos Morales P., Ordaz M. G., Islas M. J., Rivas H., Dorantes A. y A. Ramirez (1998)
Genotoxicidad de azidas: Inducción de mutación y recombinación somáticas y efecto en la
reparación del DNA, XI Taller Latinoamericano de Toxicología, La Habana Cuba, 21 al 22
de Noviembre.

Ramos Morales P., Ordaz M. G., Dorantes A., Rivas H., Campos A. y M. Martínez (1999)
Drosophila is a reliable biomonitor of water pollution. En prensa

Russell P. (1998) *Genetics*, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., fifth edition. U.S.A. 805pp.

Vinebrooke R. D. and R. Cullimore (1998) Natural organic matter and the bound-water concept in aquatic ecosystems. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 155: 111 – 127.

Zar J. H. (1983) *Bioestatistical analysis*. Prentice Hall, England. 620 pp.

Zijlstra J. A. (1987) Pharmacological and mechanistic aspects of chemically induced mutagenesis in *Drosophila melanogaster*, Druk: Krips Repro Meppel, Germany. 192 pp.

Las cosas ocurren en su momento, es contraproducente
intentar forzar los acontecimientos.
Anthony Bruno, Seven.